

## 4-羟基苯乙酸对酪氨酸酶作用机理研究

李树白 樊亚娟 顾月  
(常州工程职业技术学院 江苏常州 213164)

**摘要:** 本实验研究了4-羟基苯乙酸对酪氨酸酶的作用机理。实验结果表明:在低浓度条件下,4-羟基苯乙酸对酪氨酸酶具有激活抑制作用;在高浓度条件下,4-羟基苯乙酸对酪氨酸酶具有抑制作用。

**关键词:** 酪氨酸酶 4-羟基苯乙酸 激活作用

中图分类号: Q356.1

文献标识码: A

文章编号: 1674-098X(2013)01(a)-0025-01

酪氨酸酶(Tyrosinase), 又称多酚氧化酶, 是一种含铜金属酶, 广泛存在于细菌、真菌、裸子植物、被子植物、哺乳动物等生物中, 并存在于生物界系统发育阶段的各个水平。一般认为, 羽毛, 毛发, 眼睛, 昆虫表皮, 种子等呈现出黑色、褐色、浅黄色等色素, 都是酪氨酸酶作用的结果。酪氨酸酶的产物黑色素具有抗紫外线、清除自由基、抗病毒等重要功能。最新研究表明, 可利用黑色素制备相应的抗体来治疗与酪氨酸酶表达相关的疾病。因此, 国内外很多学者都致力于寻找具有特异的、高效的酪氨酸酶作用物, 研究其抑制或激活的作用机理和动力学。该文以4-羟基苯乙酸作为效应物, 研究其对酪氨酸酶催化反应的影响及作用动力学, 得到有关动力学参数, 为酪氨酸酶抑制剂和激活剂的分子设计的实际应用提供理论依据。

## 1 实验方法

### 1.1 材料及仪器

蘑菇酪氨酸酶(Mushroom tyrosinase) 购于Sigma公司, 总活力为50 KU。L-3, 4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA) 购于上海斯高勒生物技术有限公司。对羟基苯乙酸、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 和磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 等试剂均为国产分析纯。仪器为上海UNICO公司UV-2102PC型紫外可见分光光度计。

### 1.2 酪氨酸酶酶活测定

以1.0 mM L-DOPA为底物。先将0.6 mL 5 mM的L-酪氨酸(溶于pH 6.8的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液) 溶液置于石英比色皿中, 加入2.28 mL pH 6.8的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液, 置于30 °C恒温水浴中恒温10 min, 加入90  $\mu\text{L}$ 含不同浓度的4-羟基苯乙酸溶液和0.8 mg/mL酪氨酸酶水溶液, 测定 $\text{OD}_{475}$ 。此测活体系中, 酶的终质量浓度为1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

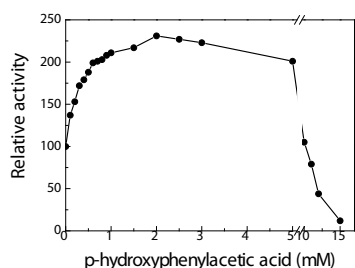


图1

## 2 结果与讨论

### 2.1 4-羟基苯乙酸对酪氨酸酶的影响

如图1所示, 固定酪氨酸酶催化反应体系中的终质量浓度为0.55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 底物L-DOPA的浓度为1.0 mmol/L。结果表明, 在4-羟基苯乙酸浓度在10.0 mmol/L以内, 对酪氨酸酶催

化氧化L-DOPA起激活作用, 并且激活作用随4-羟基苯乙酸浓度的激活程度是先增加后下降, 在2.0 mmol/L浓度左右, 酶催化活力变为原来的2.4倍。当酶催化反应体系中4-羟基苯乙酸的浓度超过10 mmol/L, 4-羟基苯乙酸对酪氨酸酶起抑制作用, 当4-羟基苯乙酸浓度为15.0 mmol/L时, 酶催化活力变为原来的20%。

### 2.2 4-羟基苯乙酸对酪氨酸酶作用机理分析

黑色素的合成途径一般被分为两个阶段: 远端步骤和近端步骤。近端步骤包括单酚和/或邻-二酚的酶氧化, 由含铜酪氨酸酶催化形成邻醌; 远端步骤包括化学反应和酶反应, 最终合成黑色素。(见图2)

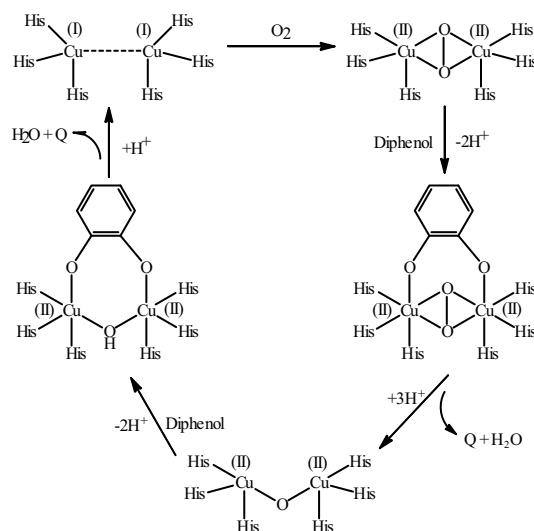


图2

在双酚酶催化循环中, 还原态酶( $E_{\text{met}}$ )与双酚(D)非共价结合, 双酚上的羟基被亲核试剂进攻释放出2个 $\text{H}^+$ , 生成的复合物 $E_{\text{met}}-D$ 分解释放出醌(Q)、水和脱氧态酶( $E_{\text{deoxy}}$ )。

$E_{\text{deoxy}}$ 结合氧气生成氧化态酶( $E_{\text{oxy}}$ ),  $E_{\text{oxy}}$ 可结合单酚也可以结合双酚, 结合双酚后继续进行双酚循环, 双酚与氧化态酶非共价结合, 双酚上的羟基被亲核攻击, 释放出2个 $\text{H}^+$ , 同时双酚与铜离子形成分子轨道共面, 研究已表明, 分子轨道共面对于氧化还原反应的发生是必需的, 生成复合物 $E_{\text{met}}-D$ 并分解释放出醌、水和还原态酶, 完成循环双酚在此循环中不断被氧化成为醌, 如图所示。

## 3 结语

通过酶动力学手段, 筛选酪氨酸酶高效的激活剂4-羟基苯乙酸, 并总结出相关的构效关系, 为进一步设计和改造得到新型高效的酪氨酸酶作用物奠定了基础。