

张振旺, 李梦茜. 分光光度计法分析检测家蚕酪氨酸羟化酶的活性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 281-283.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.092

分光光度计法分析检测家蚕酪氨酸羟化酶的活性

张振旺, 李梦茜

(河池学院, 广西宜州 546300)

摘要:家蚕酪氨酸羟化酶(BmTH)是一种以酪氨酸为底物、铁离子和四氢生物喋呤为辅因子,可催化氧化酪氨酸形成多巴的芳香族氨基酸羟化酶,目前检测分析酪氨酸羟化酶活性的方法耗时、繁琐且工作量大。建立了分光光度计检测法快速测定家蚕酪氨酸羟化酶活性的新方法,采用高碘酸钠氧化反应产物 *L*-多巴生成多巴色素发色团,其在 475 nm 处有最高吸收峰。该方法快速准确,可用于酪氨酸羟化酶活性的测定。

关键词:酪氨酸羟化酶;分光光度计;体外表达;*L*-酪氨酸;*L*-多巴;活性测定

中图分类号: Q554⁺.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0281-02

酪氨酸羟化酶(TH)在多巴胺(DA)的合成体系中是限速步骤,氧化酪氨酸为左旋多巴(*L*-dopa),并进一步氧化为多巴胺^[1-2]。目前检测酪氨酸羟化酶活性的分析方法很多,包括用放射性同位素化学法^[3-6]、高效液相色谱法(HPLC)分析 *L*-dopa 的生成、二氧化碳碳十四的捕获^[7-11]。这些检测酪氨酸羟化酶活性的方法都是可行的选择,但是这些检测方法具有相当大的缺点。首先,这些方法是耗时的,例如高效液相色谱法分析须要平均每 20 min 采 1 次样,导致试验和数据分析^[8,10]之间相当大的时间间隔。其次,常见酪氨酸羟化酶活性的检测方法为放射性标记法,这些放射性的物质须要隔离,须要购买昂贵的放射化学药品,并且涉及特殊的处理。如氟释放试验要求广泛的繁琐后期检测工作,从反应混合物中分离氟化水^[7];而另一种方法必须捕获二氧化碳碳十四,并且检测碳十四。这 2 种检测方法都是耗时而缓慢的,并涉及液体闪烁计数^[12-13]。其次,这些方法中测定每一个产物的形成发生在固定的时间点,不能实时检测酪氨酸羟化酶活性。本研究采用基因重组家蚕酪氨酸羟化酶(BmTH)开发一种新的实时检测方法,通过分光光度法监测生产的 *L*-dopa 用以测量 BmTH 活性,用高碘酸钠氧化 *L*-dopa 产生多巴色素,其在 475 nm 处有峰值。该方法简洁、灵敏、迅速,且对身体没有辐射,方便推广使用,并可用于体内、体外 TH 活性的检测。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

高速离心机(美国 Thermo 公司);KS-C 细胞破碎仪(浙江宁波科生仪器厂)。

L-酪氨酸(*L*-Tyrosine)、四氢生物喋呤(BH₄)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、高碘酸钠和所有其他化学品均购

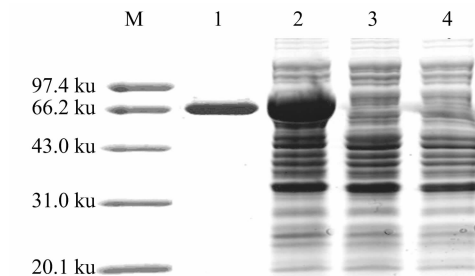
自 Sigma-Aldrich 公司(USA),除非另有说明。

1.2 反应液条件

采用反应液 A 和 B 的混合液:将 TH、四氢生物喋呤(BH₄)、*L*-酪氨酸、铁(II)在冰上进行预混合孵育 6 min(混合液 A);第 2 混合液使用浓度为 10 mmol/L HEPES(pH 值 6.8)的缓冲液配制高碘酸钠(混合液 B)。A 和 B 以 1:1 的比例混合,总体积 800 μL,使酪氨酸羟化酶、BH₄、亚铁(FeSO₄)、酪氨酸、高碘酸的终浓度分别为 0.625 μg/μL、0.3 mmol/L、3 μmol/L、55 μmol/L、100 μmol/L。混合液于 37 °C 孵育 30 min 后转入石英比色皿中检测。

1.3 酪氨酸羟化酶的制备

体外表达家蚕 TH 样品的制备:家蚕 TH 开放阅读框被亚克隆到表达载体 pET-28-(a+)上,用 pET-28(a+)-BmTH 的重组载体转化 BL-21(DE3)大肠杆菌。在 3 mL 的 LB 培养基中补充 3 μL(100 mg/mL)卡那霉素并在 37 °C 下培养,扩大到 1 L 的 LB/Kan,生长至 $D_{600\text{ nm}}=0.4$,然后将烧瓶冷却到 16 °C 并检测直到增长到 $D_{600\text{ nm}}=0.6$;加入 1 mL IPTG(100 mg/mL)诱导表达 BmTH,培养 20 h 后,于 6 000 r/min 离心 5 min,使用超声波裂解沉淀,18 000 r/min 离心 40 min,上清液被保留下来,将 BmTH 融合蛋白上清液与 His-Ni 柱孵育,使用 MCAC-咪唑(金属螯合亲和层析)200 mmol/L 梯度洗脱,使 BmTH 达到 99% 的纯度,详见图 1。



M—Marker; 1—纯化蛋白质; 2—pET-28(a+)-BmTH; 3—pET-28(a+); 4—正常BL21

图1 BmTH 重组蛋白的表达和纯化

1.4 酶活性的测定

取上述 500 μg 酪氨酸羟化酶样品,加入体积为 400 μL

收稿日期:2014-06-20

基金项目:广西教育厅立项项目(编号:LX2014332)。

作者简介:张振旺(1985—),男,河南周口人,硕士,助理实验师,从事生物技术研究。E-mail:zhenwangzhang@126.com。

通信作者:李梦茜,硕士,助教,从事微生物药物学研究。E-mail:limengxi66@126.com。

的反应液 A (0.6 mmol/L 四氢生物蝶呤、6 μmol/L FeSO₄、110 μmol/L L-酪氨酸),在冰上进行预混合孵育 30 min;反应液 B 使用 10 mmol/L HEPES (pH 值 6.8) 的缓冲液配制高碘酸钠 (混合液 B)。A 和 B 以 1 : 1 的比例混合,使酪氨酸羟化酶、BH₄、FeSO₄、L-酪氨酸、高碘酸钠的终浓度分别为 0.625 μg/μL、0.3 mmol/L、3 μmol/L、55 μmol/L、100 μmol/L。混合液于 37 ℃ 孵育 30 min 后转入比色皿检测。

测定产物在 475 nm 处的吸光度 $D_{475\text{ nm}}$,根据 $D_{475\text{ nm}}$ 计算酪氨酸羟化酶的活性。使用多巴色素的摩尔吸收系数 $e = 3\,700\text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})^{[9]}$ 。TH 活性单位定义为:在 37 ℃ 条件下,1 min 内 $D_{475\text{ nm}}$ 变化 0.1 为多巴色素的 1 个活性单位(U)。根据以下公式计算酶的活性:酶活性 = $(D_1 - D_0) \times V_t / (e \times d \times T \times V_s)$ 。式中: D_1 为样品反应液吸光度 $D_{475\text{ nm}}$; D_0 为阴性对照 $D_{475\text{ nm}}$ (阴); e 为摩尔吸收系数, $e = 3\,700\text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; d 为光径,cm; t 为反应时间,min; V_t 为反应液总体积,mL; V_s 为酶溶液体积,mL。酶的活性 (U/mg) 计算公式如下:活性 = 单位体积内的活性单位数/单位体积内的蛋白质量。

2 结果与分析

2.1 背景物质对吸光度的影响

测定家蚕酪氨酸羟化酶活性,反应体系的 A 液、B 液中主要有 BmTH、四氢生物蝶呤、L-酪氨酸、HEPES Buffer、高碘酸钠、FeSO₄ 等物质。由表 1 可知,反应液中物质在 475 nm 下的吸光度不会干扰多巴色素的测定。

表 1 背景物质的 $D_{475\text{ nm}}$

组合	背景物质						$D_{475\text{ nm}}$
	HEPES	L-酪氨酸	FeSO ₄	BH ₄	NaIO ₄	酪氨酸羟化酶	
组合 1	+	-	-	-	-	-	0.019
组合 2	+	+	-	-	-	-	0.015
组合 3	+	-	+	-	-	-	0.021
组合 4	+	-	-	+	-	-	0.028
组合 5	+	-	-	-	+	-	0.019
组合 6	+	-	-	-	-	+	0.018
组合 7	+	+	+	+	+	-	0.022
组合 8	+	+	+	+	+	+	0.025

注:“+”“-”分别表示添加、未添加该物质。

2.2 实时分析 BmTH 酶活性

测定反应液在 10 s、5 min、10 min、20 min、30 min 内 $D_{475\text{ nm}}$ 的变化,可以实时观察 BmTH 酶活性。根据图 2 结果,按上述的测定方法测得 BmTH 活性为 10.95 U,活性为 21.9 U/mg。

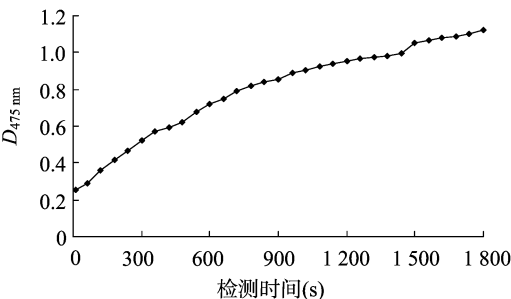


图2 多巴色素产物在 30 min 内的 $D_{475\text{ nm}}$

2.3 反应终止时间的确定

将反应液 A、反应液 B 混合后于 37 ℃ 孵育 30 min 后检测发现,反应时间终止于 29 min 左右,多巴色素发色团在 30 min 后的 $D_{475\text{ nm}}$ 无明显变化 (图 3)。

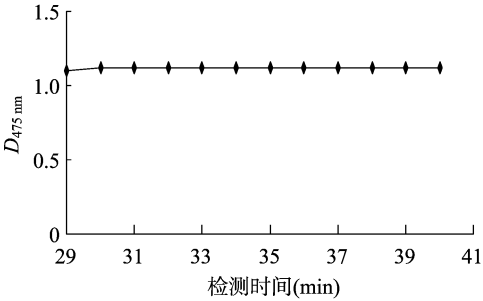


图3 反应液孵育 30 min 及之后的 $D_{475\text{ nm}}$

3 结论

本研究是采用分光光度计检测重组 BmTH 活性而开发一种新的实时检测方法,通过分光光度法检测高碘酸钠氧化 L-dopa 的产物多巴色素发现其在 475 nm 处有吸收峰,从而可以简便快速检测 BmTH 的活性。该方法简洁、灵敏、迅速,且对身体没有辐射,方便推广使用,并可用于体内、体外 TH 活性的检测。

参考文献:

[1] Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase; the initial step in norepinephrine biosynthesis [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1964, 239: 2910 - 2917.

[2] Elsworth J D, Roth R H. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease [J]. Exp Neurol, 1997, 144 (1): 4 - 9.

[3] Karobath M. Catecholamines and the hydroxylation of tyrosine in synaptosomes isolated from rat brain [J]. Proc Natl Acad Sci, 1971, 68 (10): 2370 - 2373.

[4] Cicero T J, Sharpe L G, Robins E, et al. Regional distribution of tyrosine hydroxylase in rat brain [J]. Journal of Neurochemistry 1972, 19 (9): 2241 - 2243.

[5] Okuno S, Fujisawa H. Purification and some properties of tyrosine 3 - monooxygenase from rat adrenal [J]. Eur J Biochem, 1982, 122 (1): 49 - 55.

[6] Reinhard J F Jr, Smith G K, Nichol C A. A rapid and sensitive assay for tyrosine - 3 - monooxygenase based upon the release of ³H₂O and adsorption of [3H] - tyrosine by charcoal [J]. Life Sci. 1986, 39 (23): 2185 - 2189.

[7] Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. A rapid and simple radio assay for tyrosine hydroxylase activity [J]. Analytical Biochemistry, 1964, 9 (1): 122 - 126.

[8] Mexas L M, Florang V R, Doorn J A. Inhibition and covalent modification of tyrosine hydroxylase by 3,4 - dihydroxyphenylacetaldehyde, a toxic dopamine metabolite [J]. Neuro Toxicology, 2011, 32 (4): 471 - 477.

[9] Bostwick J R, Le W D. A tyrosine hydroxylase assay in microwells using coupled nonenzymatic decarboxylation of dopa [J]. Analytical Biochemistry, 1991, 192 (1): 125 - 130.

赵伟,邱迎彤,李岑,等. 臭常山喹啉生物碱化学成分及活性研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 283–285.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.093

臭常山喹啉生物碱化学成分及活性研究

赵伟¹, 邱迎彤³, 李岑², 吕庆银¹, 张于³, 张振²

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州理工学院制药工程学院, 贵州贵阳 550025;
3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650000)

摘要:从芸香科臭常山属臭常山(*Orixa japonica* Thunb.)乙醇提取物中分离得到了5种喹啉生物碱,通过理化性质和波谱分析鉴定为:米利纽碱(melineurine)、普拉迪斯碱(platydesmine)、巴福酮(balfourolone)、罂度瑞叭啉碱(pseudoribalinine)和青花椒碱(schinifoline),该5个化合物均首次从该属植物中分离得到。对这些化合物进行了鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、萎蔫短小杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌活性筛选试验,发现化合物巴福酮(balfourolone)对肺炎克雷伯氏杆菌和金黄色葡萄球菌具有较好的抑制活性,且在50 mmol/mL浓度下抑制率分别达到50.1%、56.9%。

关键词:臭常山;喹啉生物碱;分离鉴定;抑菌活性

中图分类号: R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0283-03

臭常山(*Orixa japonica* Thunb.)为芸香科臭常山属植物,在《贵州民间方药集》《贵阳民间药草》《贵州草药》中称为臭山羊、大山羊^[1]、骚牯羊^[2]、梔子黄^[3]等。在贵州民间用其根、茎、叶入药,主治风热感冒、咳嗽喉痛、脘腹胀痛、风湿关节痛、跌打伤痛、湿热痢疾、疟疾等病症^[4];各部位煎出的汁用以杀灭牛马身上的虱子。国内外有关臭常山的文献报道集中在对其进行化学研究,而对生物活性的研究较少^[5],近代药理研究也不多见,其有效部位、有效成分、作用机理仍不明确。本试验对购自贵州贵阳的臭常山的乙醇提取物进行化学研究,分离得到5个化合物,并进行7种抑菌活性筛选,以期得到具有抗菌活性的先导化合物,为民族药新药开发提供物质基础。

1 仪器与材料

1.1 材料

臭常山于2012年4月购自贵州贵阳市中药材批发市场,

由贵阳医学院孙庆文副教授鉴定为芸香科植物臭常山。

1.2 试验菌株

贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室保存菌株:鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、萎蔫短小杆菌(*wilting short bacillus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

1.3 仪器

Bruker AM-400、DRX-500 和 Avance III-600 核磁共振仪,以TMS作为内标;ESI质谱由Waters 2695 HPLC-Thermo Finnigan LCQ Advantage 离子阱质谱仪测定;高效液相 Agilent 1100 和 1200,色谱柱 Eclipse XDB-C₁₈;Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司);反相填充材料 Lichroprep RP-18 gel (20~45 μm) (德国默克公司);柱色谱和薄层色谱硅胶 GF254 型(山东青岛海洋化工厂)。显色剂为碘化铋钾溶液。

1.3 试验方法

1.3.1 提取与分离 取干燥的臭常山样品5 kg,粉碎后用10倍量95%的乙醇溶液超声提取3次(提取时间每次均为30 min)后过滤,合并滤液,减压回收乙醇得到浸膏,将浸膏加水稀释后,依次用乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次,减压回收溶剂,得乙酸乙酯萃取物160 g,采用硅胶柱层析、反相 RP-18 柱层析、Sephadex LH-20 以及 HPLC 等各种方法分离纯化。

收稿日期:2015-03-28

基金项目:贵州省科学技术项目(编号:黔科合J字[2011]3004);中国科学院2013学西部之光项目。

作者简介:赵伟(1990—),男,江苏靖江人,硕士,研究方向为天然产物。E-mail:zhaoweil51525@sina.com。

通信作者:张振,教授,研究方向为天然产物,E-mail:zhangzhen@git.edu.cn;张于,研究员,研究方向为植物生物碱的化学研究,E-mail:zhangyu@mail.kib.ac.cn。

[10] Philipp E. Assay for tyrosine hydroxylase in hypothalamic homogenates using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. Journal of Chromatography, 1987, 419(419): 27–36.

[11] Haavik J, Flatmark T. Rapid and sensitive assay of tyrosine 3-monooxygenase activity by high-performance liquid chromatography using the native fluorescence of DOPA[J]. Journal of Chromatogra-

phy, 1980, 198(4): 511–515.

[12] Okuno S, Fujisawa H. Assay of tyrosine 3-monooxygenase using the coupled nonenzymatic decarboxylation of dopa[J]. Analytical Biochemistry, 1983, 129(2): 405–411.

[13] Winder A J, Harris H. New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase[J]. European Journal of Biochemistry/FEBS, 1991, 198(2): 317–326.