维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0457-02

不同方法测定黄嘌呤对 Bacillus fastidiosus 胞外尿酸酶抑制效力的比较

赵利娜,赵运胜,陶　佳,廖　飞

（重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室,重庆　400016）

【中国图书分类法分类号】Q55;Q555.8　　【文献标识码】B　　【收稿日期】2005-10-19

筛选酶抑制剂常需测定米氏常数(Km)和最大反应速度（Vm）来确定抑制常数（Ki）[1,2]。双倒数分析法测定 Ki 效率低，且靶酶 Km 越高则成本越高。积分法[3,4]和线性动力学法[5,6]测定 Ki 所需底物浓度都高于 Km，至今对高 Km 靶酶都测定极低底物浓度下的半抑制浓度,或再换算成抑制常数表示抑制效力。但测定低浓度底物下的初速度要求高灵敏度的定量方法。实际上在低浓度底物下用简化积分法也可测定 Ki [7]。Bacillus fastidiosus 胞外尿酸酶 Km 接近 0.2 mmol/L,黄嘌呤是其竞争性抑制剂[4-6]。本文用低浓度尿酸,比较测定初速度确定黄嘌呤半抑制浓度和简化积分法测定黄嘌呤抑制常数的差异。

1　材料和方法

1.1　试剂和材料

尿酸、黄嘌呤购自 ICN,DEAE- 纤维素购自 Sigma,Bacillus fastidiosus（ATCC29604）菌株购自武汉大学菌种保藏中心,重蒸水,其余试剂均为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　胞外尿酸酶制备　Bacillus fastidiosus 在 30℃培养 12 h,收集培养液上清（共 3 次）,饱和硫酸铵沉淀蛋白后溶于水，透析过夜,Tris-HCl 缓冲液（0.10 mol/L,pH8.0）平衡 DEAE- 纤维素柱，用 0.1~0.4mol/L 氯化钠线性梯度洗脱,收集活性成份。测定 25℃时氧化 75 μmol/L 尿酸的初速度,每分钟氧化 1.0 μmol 底物的酶量为一个单位[4-6]。

1.2.2　双倒数分析法测定抑制常数　所用黄嘌呤浓度为 0~18.0 μmol。此酶米氏常数较高,无法在 293 nm 测定高于米氏常数底物浓度下吸收变化初速度，故测定 308 nm 吸收变化确定 0.08~0.40 mmol/L 尿酸的初速度。所用酶浓度为 0.01 U/ml,分析启动反应 30s 后 1min 内数据,再用双倒数分析法确定表观动力学参数和对应 Ki。

1.2.3　测定低浓度底物下初速度确定抑制常数　用 20.0 μmol/L 尿酸和 0.005 U/ml 尿酸酶，测定不同浓度黄嘌呤抑制作用下 293 nm 吸收变化初速度（Vi）。据 1/Vi 的变化确定竞争性 Ki（与半抑制浓度 IC_{50} 相对应）。

1.2.4　简化积分法测定抑制常数　用 20.0 μmol/L 尿酸和 0.015U/ml 酶量,（25±0.5）℃记录不同浓度黄嘌呤抑制下启动反应 40 s 后反应曲线。用 VB 程序分析底物从 15.0 μmol/L 消耗到 1.5 μmol/L 反应曲线确定 Vm/Km。根据 Km/Vm 随抑制剂浓度变化确定 Ki[7]。

1.3　统计学分析

结果为均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）。用 SAS 8.2 作统计分析，用 t 检验比较均值。

2　结果和讨论

在 308 nm 测定此尿酸酶作用于不同浓度尿酸的初速度，双倒数法分析得其 Km 为（212±12）μmol/L（n=8）。根据 Km 和 Vm 随黄嘌呤浓度的变化确定抑制类型和 Ki,得竞争性 Ki 为（35.5±2.5）μmol/L（n=4）。根据低浓度尿酸时初速度变化可得与半抑制浓度对应竞争性 Ki（表 1）。根据积分法所得 Vm/Km 也可得竞争性 Ki。这两种方法所得 Ki 与双倒数法所得都无统计差异，且所得 Ki 都对初始底物浓度误差不敏感。根据半抑制浓度方法确定抑制常数需要无抑制剂 Km。但此 Km 存在显著误差时（从 100 μmol/L 上升到 300 μmol/L），简化

作者介绍：赵利娜(1979-　)女,硕士生,
主要研究方向:分析生物化学和生化药理学。

基金项目：国家自然科学基金(编号 30472139)和重庆医科大学创新基金(2002CX03)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

积分法所得 Ki 无变化，而根据半抑制浓度方法所得 Ki 有显著变化(表 1)。

表 1 不同预设 Km 时测定黄嘌呤对 Bacillus fastidiosus 胞外尿酸酶 Ki 的比较

Km (mmol/L)	Ki(μmol/L)	
	简化积分法	半抑制浓度法
0.10	35.0 ± 2.7 (4)[a]	27.0 ± 2.3 (3)[b]
0.21	34.5 ± 3.0 (4)[a]	31.0 ± 2.6 (3)[c]
0.30	35.5 ± 3.0 (4)[a]	31.3 ± 2.6 (3)[c]

与双倒数法测定结果比较 [a]P>0.2, [b]P<0.02, [c]P>0.05。

抑制常数是筛选酶抑制剂的最合理指标。测定与半抑制浓度对应的 Ki 需要明确抑制类型、所用底物浓度及无抑制剂时 Km 等参数，而且要求所用底物浓度越低越好，故必需用尽可能高灵敏度的定量方法。但无论所用定量方法灵敏度多高，其所用底物浓度太低则所得初速度对底物浓度误差很敏感，这会显著降低所得 Ki 的可靠性。相反，用低浓度底物下的积分法测定酶活性和抑制常数对初始底物浓度误差都不敏感[3,4,8]，甚至不需要准确确定无抑制剂时 Km。另外，本文结果表明用简化积分法测定 Ki 所需底物浓度低于 10% Km 即可，并不需要低于 2% Km[7]，这更可显著降低对定量方法灵敏度的要求，便于常规实验。因此，在实践中对于已知抑制类型抑制剂和其类似物，可根据定量方法灵敏度与 Km 的相对大小选择测定抑制效力的方法；当反应不可逆且可连续监测反应曲线时，在较低底物浓度下用简化积分法测定 Ki 筛选抑制剂更便于实验。

(通讯作者：廖飞。重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室。Tel:86-23-68485073, E-mail, liaofeish@vip.sina.com)。

参 考 文 献

[1] Bronson DD, Daniels DM, Dixon JT, et al. Virtual kinetics: using statistical experimental design for rapid analysis of enzyme inhibitor mechanisms [J]. Biochem Pharmacol,1995;50(5):823-831.

[2] Kakkar T, Pak Y, Mayersohn M. Evaluation of a minimal experimental design for determination of enzyme kinetic parameters and inhibition mechanism [J]. J Pharmcol Exp Ther, 2000;293(5):861-869.

[3]. Liao F, Zhu XY, Wang YM, et al. The comparison of the estimation of enzyme kinetic parameters by fitting reaction curve to the integrated Michaelis-Menten rate equations of different predictor variables [J]. J Biochem Biophys Methods, 2005;62(1):13-24.

[4] 赵利娜，廖 飞，赵运胜. 用积分法考察黄嘌呤对 Candida sp.尿酸酶的抑制作用 [J]. 第四军医大学学报, 2005;26(19):1792-1794.

[5] Liao F, Yang X, Zhou QX, et al. Fast estimation of Michaelis-Menten constant of arylesterase with a pair of medium concentration of substrate [J]. J Med Coll PLA,2003;18(5):312-316.

[6] 赵利娜，廖 飞，赵运胜. 用线性动力学方法考察黄嘌呤对尿酸酶的抑制作用[J]. 第四军医大学学报,2005;26(15):1360-1362.

[7] Meyer-Almes FJ, Auer M. Enzyme inhibition assay using fluorescence correlation spectroscopy: a new algorithm for the derivation of K(cat)/K(M) and K(i) values at substrate concentration much lower than the Michaelis constant[J]. Biochemistry, 2000;39 (43):13261-13268.

[8] 廖 飞，朱小云，王咏梅，等. 在高于米氏常数的底物浓度下用积分法测定尿酸酶活性 [J]. 第四军医大学学报,2004;25 (17): 1551-1554.

(上接第 383 页)

[9] 刘冠贤，叶任高，谭志明，等. 大黄素延缓狼疮性肾炎间质成纤维化作用的研究[J]. 中国实验临床杂志, 1999;11(3):24-32.

[10] Ning Y, Wang J, Qu S. Effect of emodin on human kidney fibroblast proliferation [J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2000; 20(2):105-106.

[11] Zhu J, Liu Z, Huang H, et al. Rhein inhibits transforming growth factor betal induced plasminogen activator inhibitor-1 in endothe lial cells [J]. Chin Med (Engl), 2003;116(3): 354-359.

[12] Yin C, Xu C. Effect of aloe-emodin on proliferation of vascular smooth muscle cells after arterial injury [J]. Zhongguo Zhon Xi Yi Jie He Za Zhi, 1998; 18(7): 420-422.

[13] 阴 健，郭力弓，编著.《中药现代研究与临床应用》(Ⅱ)[M]. 北京：中医古籍出版社，1995.

[14] Agarwal SK, Singh SS, Verma S, et al. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from Rheum emodi [J]. Ethnopharmacol, 2000; 72(1-2): 43-46.

[15] Wu Yanwena, Gao Wenyuan, Xiao Xiaohe, et al. Calorimetric investigation of the effect of hydroxyanthraquinones in Rheum officinale Baill on Staphylococcus aureus growth [J]. Thermo- chimica Acta, 2005;429:167-170.