岛津
SHIMADZU

使用岛津UVProbe软件测定络氨酸酶催化多巴的米氏常数和最大反应速度

No.UV-013

摘要： 本文以酪氨酸催化左旋多巴氧化反应为为例，使用UVProbe软件完成了Km和Vmax，及其相关测定。

关键词： UVProbe软件 酪氨酸酶 多巴 Km Vmax

酶是由细胞产生的一种具有催化性能的蛋白质，具有催化效率高、高度专一的特性。酶促反应动力学(kinetics of enzyme-catalyzed reactions)研究酶促反应速度以及影响此速度的各种因素，在最大限度发挥酶反应的高效率，寻找最有利的反应条件，了解酶在代谢中的作用机理等方面发挥着重要的作用。

米氏常数(Km)和最大速度(Vmax)是酶促反应动力学研究的内容之一，通过反应所要求的的速度或者已知底物的浓度，可以求出应当加入底物的浓度或者该条件下的反应速度。

酪氨酸酶(tyrosinase)是黑色素合成的关键酶，广泛地存在于广泛存在于动物、植物、昆虫、真菌和细菌体内。在本实验中，通过UVProbe软件动力学测定中的酶表功能，测得了常温下酪氨酸酶催化左旋多巴(L-DOPA)反应的Km和Vmax。

原理：如下图所示，左旋多巴在酪氨酸酶的催化下被氧化成为多巴醌：

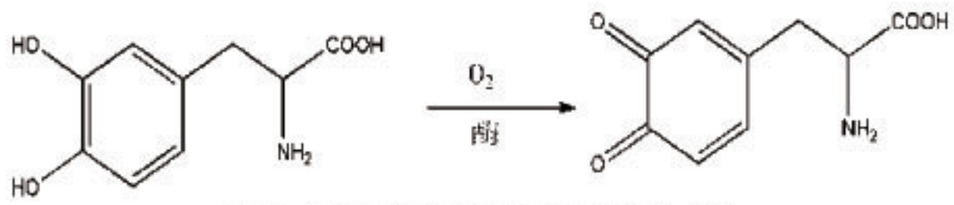

图1 酪氨酸催化左旋多巴氧化

在某一浓度的左旋多巴缓冲溶液中加入一定量的酶，在多巴醌的特征吸收波长下，测定该反应中吸光度随时间的变化曲线，得到反应速率。依据米氏方程线性形式

$$\frac{1}{v}=\frac{Km}{V\max}\bullet\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V\max}$$

将不同的反应速率和对应的浓度代入该式，拟合得到直线，从直线的截距和斜率便可以求得该反应的Km和Vmax。

前处理：配制PH=6.8的磷酸钠缓冲溶液(0.1M NaOH 23.5ml，0.1M NaH2PO4 50ml，加水定容至100ml)，用该缓冲溶液配制不同浓度的左旋多巴溶液，并配制酪氨酸酶缓冲溶液待用。

仪器配置：

UV2450

UVProbe软件

实验条件

狭　　缝：2nm

测定模式：吸光度

测定结果

在UVProbe光谱功能中以蒸馏水做基线测定缓冲溶液、多巴溶液和多巴醌溶液的吸收光谱，结果如下图所示，从图中可以看出在475nm处只有多巴醌有吸收，因此在动力学测定中，选择475nm为分析波长。

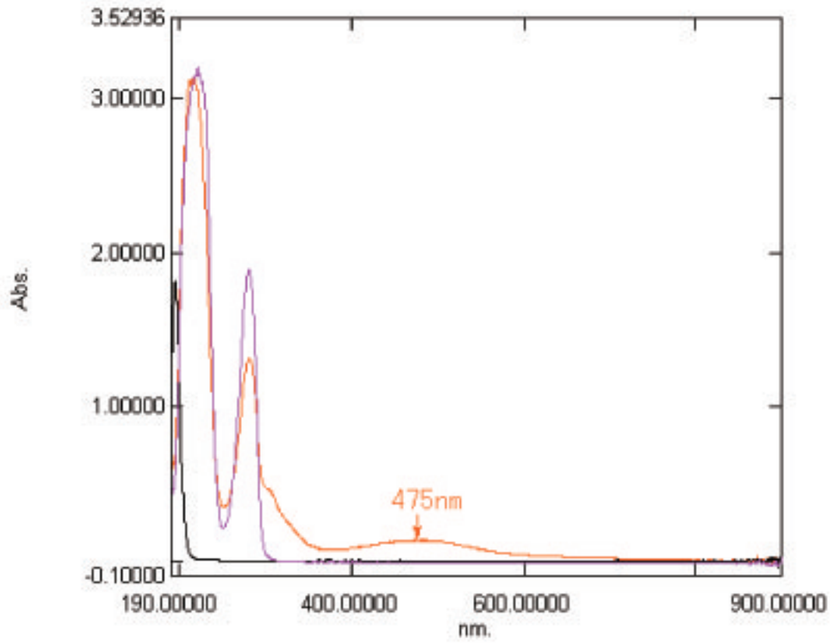

图 2 吸收谱图 (扫描速度: 中速)
黑: 缓冲溶液, 粉: 多巴溶液, 橙: 多巴醌溶液

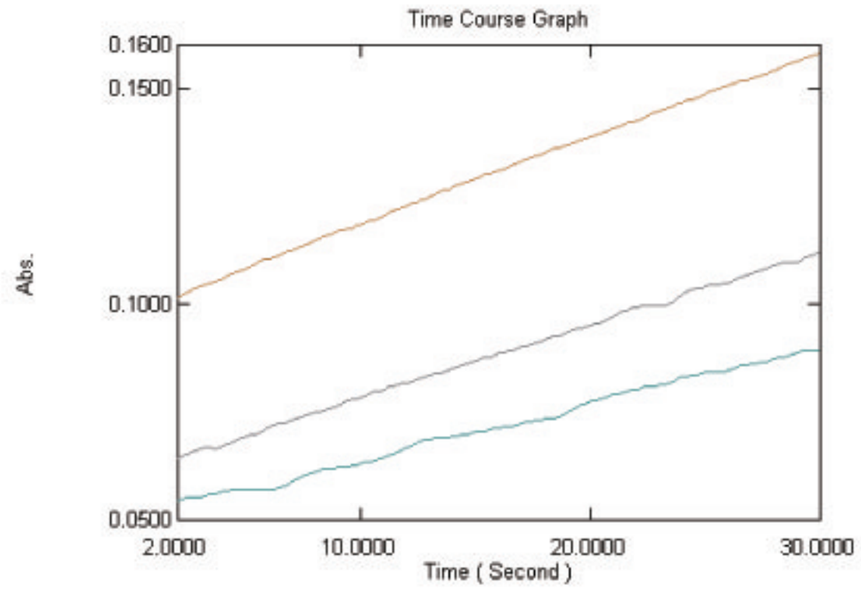

图 3 动力学曲线
棕: 4.23m mol/l, 灰: 2.12m mol/l, 青: 1.06m mol/l

以缓冲溶液和酶作参比液调零，取不同浓度的多巴溶液3ml放入比色皿中，加入100ul酪氨酸酶溶液混合均匀后立即开始测定，动力学图像如图3所示。

依据文献，取吸收系数为5012Abs/(mol · cm)$^{-1}$，设置校正因子，计算2~30秒的反应速度，结果如表1所示。

表1 标准表

浓度 m mol/l	反应速度 (m mol/Min)	m Abs/Min
4.23	0.02399	120.2396
2.12	0.02036	102.0593
1.06	0.01578	79.0935

在UVProbe动力学功能中新建Michaelis-Menten表，将动力学曲线数据装载进入表中，并填入对应浓度值，即可拟和曲线并得到计算结果。

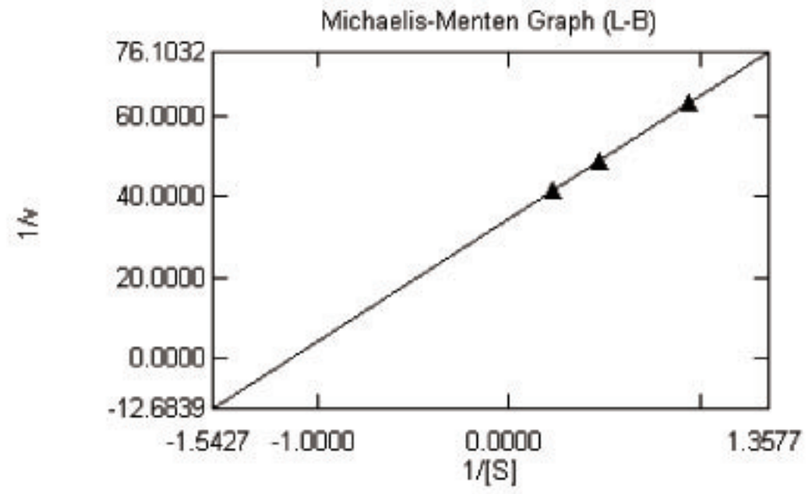

图4 拟和曲线

表2 结算结果列表

File	[S]	Weight	v	1/[S]	1/v
C1 - Storage 171711 - C1.KI	4.2300	1	0.0240	0.2364	41.6879
C2 - Storage 173535 - C2.KI	2.1200	1	0.0204	0.4717	49.1139
C3 - Storage 175200 - C3.KI	1.0600	1	0.0158	0.9434	63.3748
Load					
	Km=0.8863, Vmax=0.0290, Slope=30.6116, r2=0.9999				

结论

在本实验中，室温下酪氨酸酶催化左旋多巴氧化反应的Km和Vmax及其相关的所有测定均在UVProbe软件完成，操作简便。