

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00394

鲫鱼酸性磷酸酶酶学特性及不同效应物对酶活力的影响

高举 赵欣平 詹付凤 张 营 余 同

(四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 经 NaAc-HAc 缓冲液(pH5.0)抽提, 正丁醇处理, 硫酸铵分级沉淀, DEAE-32 离子交换层析, Sephadex G-150 凝胶过滤纯化, 从鲫鱼内脏中分离纯化出电泳纯的酸性磷酸酶。该酶提纯倍数为 30.82, 比活力 195.06 U/mg。研究表明, 该酶催化对硝基苯磷酸二钠水解反应, 最适 pH 4.8, pH 小于 4 和大于 7 时不稳定; 最适温度 45℃, 温度高于 50℃ 不稳定; 米氏常数为 0.23 mmol/L, 利用 SDS-PAGE 测定酶亚基分子量为 33.3 kD。化学修饰剂 SUAN、PMSF、DTT、NBS 对该酶活力影响不大, BrAc 和 IAc 有明显抑制作用。金属离子对该酶催化活力有不同影响, Na^+ 、 K^+ 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 影响不显著, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 有激活作用, Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 有抑制作用, 其中 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 对鲫鱼酸性磷酸酶荧光光谱的影响表明金属离子对酶活力的影响与酶构象改变有关。

关键词: 酸性磷酸酶; 纯化; 酶学性质; 化学修饰; 金属离子; 鲫鱼

中图分类号: Q556 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)02-0394-08

酸性磷酸酶(Acid phosphatase, 简称 ACP, EC 3.1.3.2) 在生物体内分布很广, 动物、植物、微生物中均广泛存在, 它是生物体内调控磷代谢的重要酶类, 除了参与磷酸酯的代谢外, 还参与能量转换以及信号传导等重要生命活动。目前国内外对人各组织器官、植物、微生物中酸性磷酸酶已有相当广泛的研究^[1-3], 但关于鱼类特别是鲫鱼酸性磷酸酶的研究报道较少。鲫鱼(*Carassias auratu*)是我国一种养殖面积广泛的淡水鱼类, 饲养成本低, 价格便宜, 不仅营养丰富^[4], 而且有重要的药用价值, 是开发利用的好材料, 但是鲫鱼生活的水体环境的金属离子污染严重危害了其自身的生长和繁殖^[5]。作者从鲫鱼内脏中分离纯化得到一种 ACP, 并对其酶学特性进行了研究, 以期了解鲫鱼 ACP 的生物学特性, 并且研究了化学修饰剂及金属离子对该酶活性的影响, 为进一步深入研究提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

鲫鱼购于四川省崇州市集贤乡长吻鲩原种场,

Sephadex G-150, 为 Pharmacia 产品, DEAE-32 为 Sigma 产品, 对硝基苯磷酸二钠(p-NPP)为德国 Merck 产品, 其余试剂为国产分析纯。所有试剂均用去离子水配制。

1.2 ACP 的分离纯化

参照江琰^[6]方法略加修改。

1.3 ACP 酶活力的测定

参照 Orlando^[7] ACP 的活力测定方法, 稍加改进。

1.4 蛋白质浓度测定

Bradford 法测定^[8], 牛血清白蛋白为标准样品。

1.5 ACP 纯度鉴定

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯度鉴定^[9]。

1.6 ACP 分子量的测定

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 ACP 亚基分子量^[9]。

1.7 ACP 最适 pH 及 pH 稳定性测定

将 ACP 分别加入到 pH 2.0—8.0 缓冲液中, 在 37℃ 下, 测定 ACP 活性。ACP 分别加入 pH 2.0—8.0

收稿日期: 2008-06-23; 修订日期: 2009-04-23

基金项目: 成都市科技局(05GGSF220)资助

作者简介: 高举(1983—), 男, 汉族, 河南平顶山人; 硕士; 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: gaogaoswj@163.com

通讯作者: 赵欣平, E-mail: xinpingshao@sohu.com

缓冲液后, 室温放置 2h, 在 37℃、最适 pH 反应条件下, 测定 ACP 活性。

1.8 ACP 最适反应温度及热稳定性测定

在 ACP 最适反应 pH 条件下, 分别在不同温度 (25—65℃), 测定 ACP 活性。将 ACP 在最适 pH 环境中, 不同温度 (25—75℃) 分别保温 15、30、45min, 在最适 pH、温度条件下测定酶活力。

1.9 ACP 米氏常数的测定

以 p-NPP 为底物, 在最适 pH、温度条件下测定酶促反应速度, 并按 Lineweaver-Burk 法作图, 求出 K_m 值。底物浓度选择范围为 0.125—4 mmol/L。

1.10 化学修饰剂对酶活力的影响

最适 pH、温度条件下, 分别向反应体系中加入不同浓度的琥珀酸酐(Succinic anhydride, SUAN)、苯甲基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)、N-溴代琥珀酰亚胺(N-bromosuccinimide, NBS)、溴乙酸(Bromoacetic acid, BrAc)、碘乙酸(Iodoacetic acid, IAc), 室温放置 30min 后测定酶活力。

1.11 金属离子对酶活力的影响

在最适 pH 值、温度条件下, 分别向反应体系中加入不同浓度的 K^+ 、 Na^+ 、 Ag^+ 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} , 测定酶活力。

1.12 金属离子对 ACP 影响的荧光光谱

不同金属盐分别溶于 0.02 mol/L NaAc-HAc(pH4.8)缓冲体系中, 在室温下与酶作用 10h 后, 用 Hitachi F-4500 型荧光分光光度计测定荧光发射光谱。激发波长为 278 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm, 扫描范围为 300—400 nm。

2 结 果

2.1 ACP 纯化

鲫鱼内脏组织匀浆、正丁醇抽提、硫酸铵分级沉淀、透析后进行 Sephadex G-150 凝胶过滤层析(图 1), 活性峰在 12—23 管之间; 收集, 透析, 超滤浓缩后进行 DEAE-32 离子交换柱层析(图 2), 活性峰在 22—30 管之间。收集后, 超滤浓缩, 再上 Sephadex G-150 层析柱, 其洗脱图谱(图 3), 活性峰在 16—22 管之间。每个步骤得到的活性峰均没有与杂蛋白峰重叠, 测定各步的总体积、总蛋白、总活力, 并计算比活力、回收率和纯化倍数(表 1)。

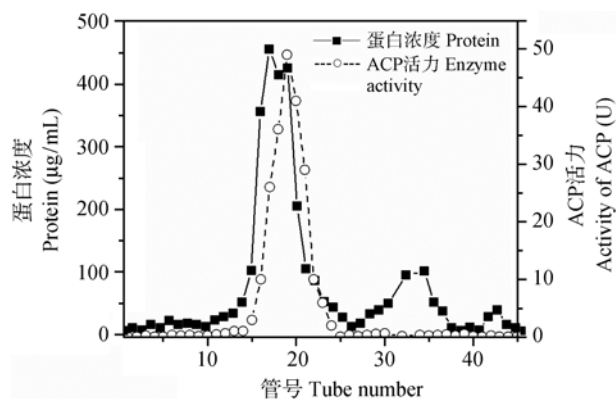


图 1 鲫鱼 ACP Sephadex G-150 凝胶过滤

Fig. 1 Sephadex G-150 Chromatography of ACP from *Carassias auratus*

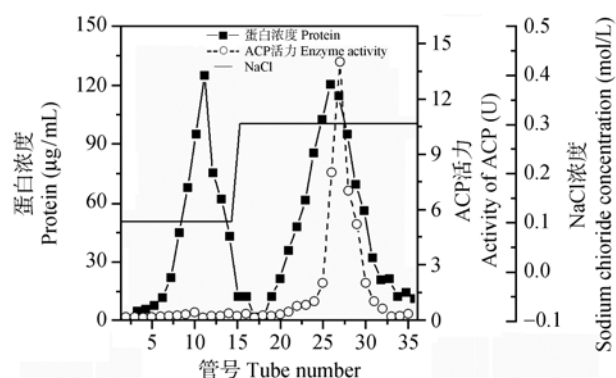


图 2 鲫鱼 ACP DEAE-32 离子交换层析

Fig. 2 DEAE-32 ion-exchange Chromatography of ACP from *Carassias auratus*

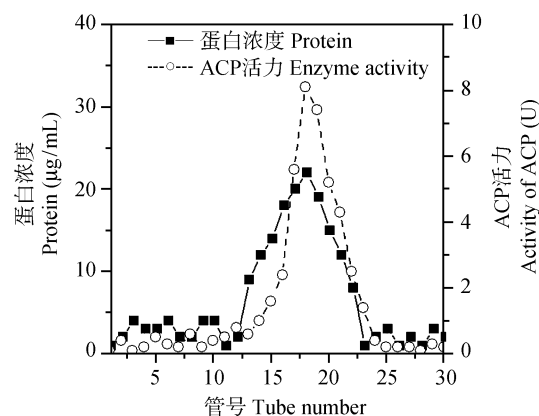


图 3 鲫鱼 ACP Sephadex G-150 凝胶过滤

Fig. 3 Sephadex G-150 Chromatography of ACP from *Carassias auratus*

2.2 ACP 纯度鉴定

经 Sephadex G-150 凝胶过滤层析纯化得到的酶通过 Native-PAGE 和 SDS-PAGE(图 4)电泳分析, 均可见单一条带, 证明该酶已达到电泳纯。

表 1 鲫鱼 ACP 纯化
Tab. 1 Purification of ACP from *Carassias auratu*

纯化步骤 Purification step	总体积 Total Volume (mL)	总蛋白 Total Protein (mg)	总活力 Total Activity (U)	比活力 Specify Activity (U/mg)	回收率 Yield (%)	纯化倍数 Purification multiple
匀浆 Homogenate	100	302.51	1914.47	6.35	100	1
正丁醇抽提 Extraction with n-butyl alcohol	83	203.74	1377.85	6.77	71.81	1.07
硫酸铵盐析物 Salting-out (NH) ₂ SO ₄	10	10.53	178.53	17.37	9.33	2.75
SephadexG-150 柱层析 SephadexG-150 colum	15	3.07	153.19	49.91	8.13	7.87
DEAE-32 柱层析 DEAE-32 columnn	5	0.27	35.17	130.32	1.83	20.54
SephadexG-150 柱层析 SephadexG-150 colum	9	0.16	31.56	195.06	1.65	30.82

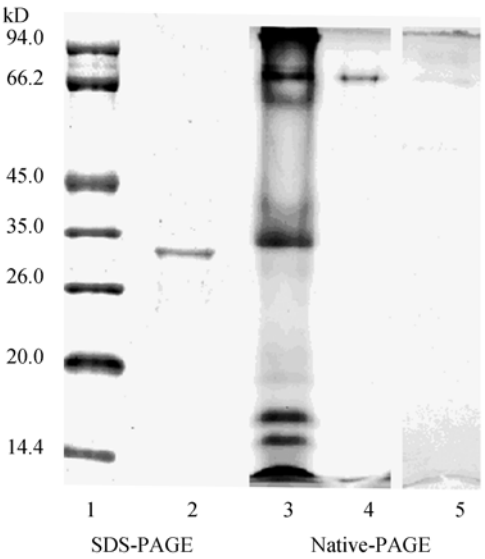


图 4 鲫鱼 ACP 的 Native-PAGE 和 SDS-PAGE

Fig. 4 Native-PAGE and SDS-PAGE of ACP from *Carassias auratus*

1. 蛋白标准分子量; 2. ACP 亚基; 3. 粗酶液; 4. ACP; 5. 活性染色后 ACP

1. Protein maker; 2. ACP submit; 3. Crude homogenate; 4. ACP; 5. ACP protein band by active staining

2.3 ACP 亚基分子量的测定

SDS-PAGE 标准样品与鲫鱼 ACP 经电泳分离后, 分别测定标准样品与鲫鱼 ACP 电泳条带与分离胶起始位置之间的距离(A, 单位 cm), 并测定前导离子与分离胶起始位置之间的距离(L, 单位 cm), 然后计算标准样品与鲫鱼 ACP 的迁移率 R_f ($R_f=A/L$), 以标准样品的 R_f 为纵坐标, 分子量对数为横坐标得标准图(图 5); 然后以鲫鱼 ACP 的 R_f 值查标准图得鲫鱼 ACP 亚基分子量为 33.3 kD。

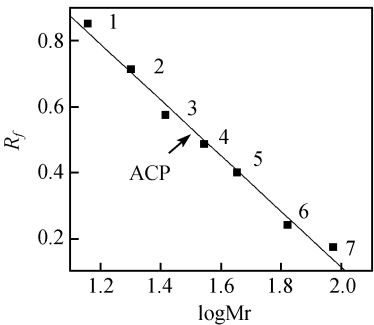


图 5 鲫鱼 ACP 亚基分子量

Fig. 5 Molecular weight of ACP from *Carassias auratus*

1. 溶菌酶 14.4 kD; 2. 胰蛋白酶抑制剂 20 kD; 3. 胰凝乳蛋白酶原 26 kD; 4. 胃蛋白酶 35 kD; 5. 卵清蛋白 45 kD; 6. 牛血清白蛋白 66.2 kD; 7. 磷酸化酶 b 94 kD

1. Lysozyme 14.4 kD; 2. Trypsin inhibitor 20 kD; 3. Chymotrypsinogen 26 kD; 4. Pepsin 35 kD; 5. Ovalbumin 45 kD; 6. Albumin 66.2 kD; 7. Phosphatase b94 kD

2.4 ACP 的最适 pH 和 pH 稳定性

鲫鱼 ACP 最适 pH 为 4.8 (图 6a), 在 pH 小于 4 和大于 7 条件下不稳定(图 6b)。

2.5 ACP 的最适温度和热稳定性

在 pH4.8 时, 测定在不同温度下的酶活力, 结果表明, ACP 的最适温度为 45℃ (图 7a), 酶活力随温度变化趋势(图 7b)。

2.6 酶米氏常数测定

在 pH4.8, 温度 45℃ 下, 测定在底物浓度为不同底物浓度时的反应速度, 按测定结果计算 $1/v$ 及 $1/[S]$, 并按 Lineweaver-Burk 法作图, 求得 ACP 的 K_m 值为 0.23 mmol/L (图 8)。

2.7 化学修饰剂对鲫鱼 ACP 活性的影响

由表 2 可见, SUAN、PMSF、DTT、NBS 对 ACP

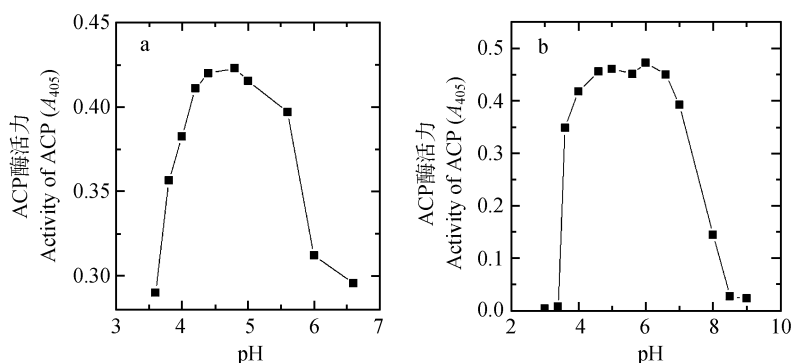


图 6 鲫鱼 ACP 的最适 pH 及 pH 稳定性

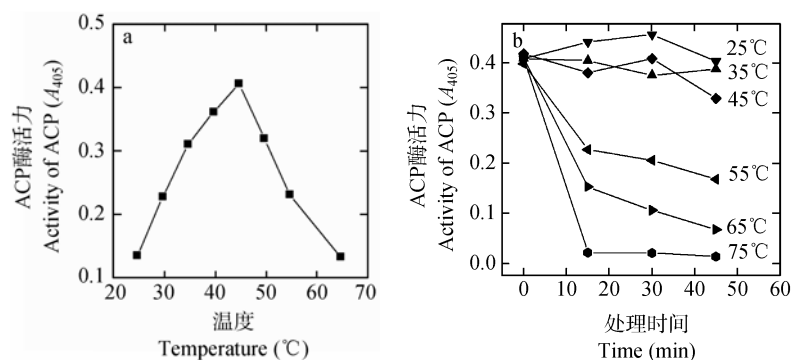
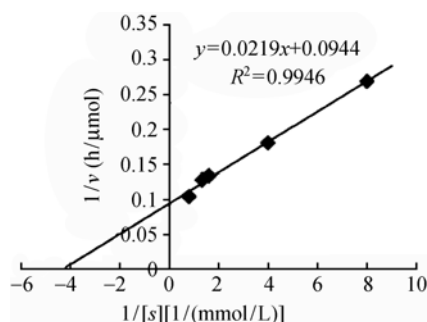
Fig. 6 pH-activity (a) and stability of pH (b) of ACP from *Carassias auratus*

图 7 鲫鱼 ACP 最适温度(a)和温度稳定性(b)

Fig. 7 Temperature-activity (a) and stability of temperature (b) of ACP from *Carassias auratus*图 8 鲫鱼 ACP 的 K_m 值Fig. 8 Lineweaver-Burk plot for the Michaelis-Menten constant K_m

酶活力影响不大, BrAc 和 IAc 在 1 mmol/L 时就能明显抑制 ACP 的活性。

2.8 部分金属离子对鲫鱼 ACP 活性的影响

一些金属离子对 ACP 活力的影响(表 3), Na^+ 、 K^+ 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 对 ACP 酶活力影响不大; Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 有一定激活作用, Ag^+ 、 Cu^{2+} 有抑制作用, 但是其激活和抑制作用与金属离子浓度没有明显依赖关系, 而 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的激活作用(图 9a)和 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 的抑制作用(图 9b)随着金属离子浓度的变化而变化。

2.9 部分金属离子对鲫鱼 ACP 荧光光谱的影响

由图 10 和 11 可见, 278 nm 激发后, ACP 内源性荧光在 340 nm 处有特征荧光发射峰。经金属离子处理后, 荧光发射峰位均没有出现位移。经 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 处理后, ACP 的荧光强度随着金属离子浓度的升高而升高(图 10), 而经 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 处理后, ACP 的荧光强度随着金属离子浓度的升高而降低(图 11)。

3 讨论

3.1 鲫鱼 ACP 的酶学特性

实验结果表明, 鲫鱼内脏 ACP 的最适 pH 为 4.8, 与背角无齿蚌 4.8^[10]相同, 而长毛对虾 4.5^[11]、文昌鱼 4.5^[12]; 最适温度为 45°C, 而猪精液 ACP 52°C^[13], 背角无齿蚌 ACP 50°C^[10], 长毛对虾 ACP 40°C^[11], 人前列腺 ACP 60°C^[14]; 以 p-NPP 为底物测得鲫鱼内脏 ACP K_m 值为 0.23 mmol/L, 而意大利蜂 ACP 0.23 mmol/L^[7]、牛心低分子量 ACP 0.35 mmol/L^[15]、背角无齿蚌 ACP 0.73 mmol/L^[10]; 这说明酶学特性因动物种属不同而有一定差异。ACP 有高分子量和低分子量之分, 小分子量的酶有几个相同亚基组成聚

表 2 化学修饰剂对鲫鱼 ACP 活性的影响
Tab. 2 Effects of some chemical modifications on the activity of ACP from *Carassias auratus*

化学修饰剂 Chemical modification	浓度 Concentration	相对酶活 Relative activity of ACP (%)		
		100 μmol/L	1 mmol/L	10 mmol/L
Control		100	100	100
SUAN		104	91	90
PMSF		105	92	89
DTT		95	91	90
NBS		91	87	91
IAc		86	43	22
BrAc		90	38	15

表 3 金属离子对鲫鱼 ACP 活性的影响
Tab. 3 Effects of some metal ions on ACP from *Carassias auratus*

金属离子 Metal ion	浓度 Concentration	相对酶活 Relative activity of ACP (%)		
		10 μmol/L	100 μmol/L	1 mmol/L
Control		100	100	100
Na ⁺		102	96	102
K ⁺		96	89	104
Ag ⁺		78	81	73
Ni ²⁺		97	103	106
Co ²⁺		104	96	106
Mn ²⁺		108	110	125
Ba ²⁺		109	115	119
Cu ²⁺		89	76	78

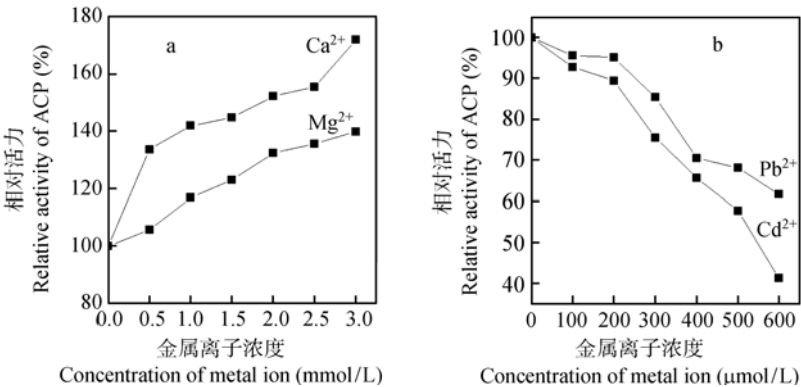


图 9 金属离子对鲫鱼 ACP 活性的影响
Fig. 9 Effects of some metal ions on ACP from *Carassias auratus*

合体, 亚基分子量在 35 kD 左右, 高分子量酶一般有两个相同亚基组成, 亚基分子量在 55 kD 左右^[16]。本实验中通过 SDS-PAGE 的方法测得的鲫鱼 ACP 亚基分子量为 33.3 kD, 属于小分子量亚基类型, 与金鱼抗酒石酸钠 ACP 分子量 34 kD^[17]大小一致。

3.2 化学修饰对鲫鱼 ACP 活性的影响

用化学修饰法探明酶活性部位功能基团是目前常用的方法之一^[18]。PMSF 是蛋白质分子中丝氨酸

残基的专一修饰剂; NBS 特异修饰蛋白质分子中色氨酸残基; TNBS 和 SUAN 等乙酸酐常用来修饰赖氨酸残基; BrAc 和 IAc 在 pH 5.0 左右可专一地与蛋白质中组氨酸残基起作用, 生成羧甲基衍物; DTT 还原性较强, 可将蛋白质分子中的二硫键还原, 引起分子构象变化, 从而影响其功能。本实验中, ACP 活力随着 BrAc 和 IAc 两种修饰剂浓度的增大很快下降, 当达到 1 mmol/L 时, ACP 活力减少 50%以上, 酶活力的丧失与组氨酸和 BrAc、IAc 反应相关, 由

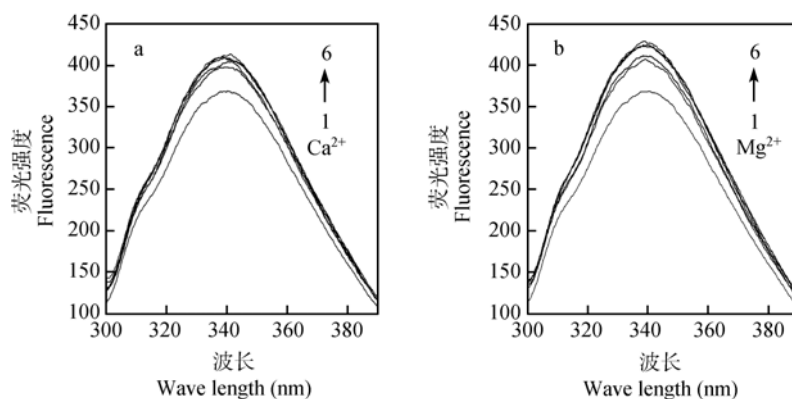


图 10 激活金属离子对鲫鱼 ACP 荧光光谱的影响

Fig. 10 Effects of activation metal ions on ACP fluorescence spectra

a、b 中 1→6 分别为 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度 0、0.5、1、1.5、2、2.5 mmol/L

a and b. The concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} from 1 to 6 is 0, 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mmol/L

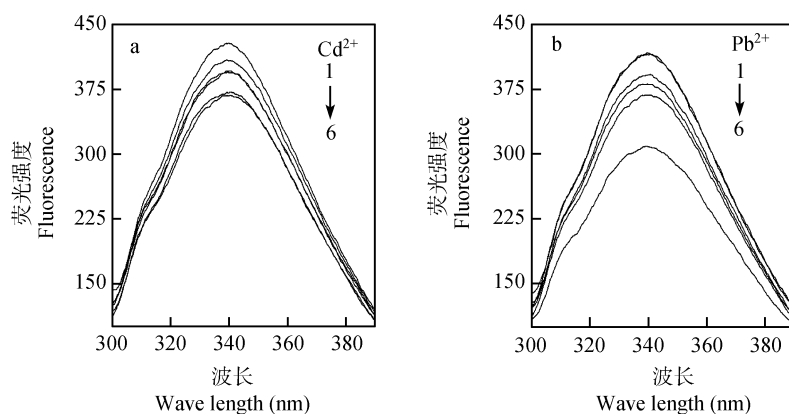


图 11 抑制金属离子对鲫鱼 ACP 荧光光谱的影响

Fig. 11 Effects of inhibition metal ions on ACP fluorescence spectra

a、b 中 1→6 分别为 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 浓度 0、100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$

a and b. The concentration of Cd^{2+} and Pb^{2+} from 1 to 6 is 0, 100, 200, 300, 400 and 500 $\mu\text{mol/L}$

此判断组氨酸是 ACP 的功能基团之一。PMSF、NBS、DTT 和 SUAN 对鲫鱼 ACP 活性影响都不明显, 说明在酶活性中心可能不存在丝氨酸残基、色氨酸残基、赖氨酸残基, Kyoichi, *et al.*^[17] 研究表明金鱼抗酒石酸钠酸性磷酸酶的酶活性中心主要有 Asp、Tyr、Asn、His 氨基酸, 这一结果与本实验结果一致。

3.3 不同金属离子对鲫鱼 ACP 的影响

不同金属离子对酶的影响不同, 在有影响的金属离子中, 它们对酶的结构和功能所起的作用也不尽相同^[19,20], 金属离子可能是通过结合于酶活性部位影响酶的构象与活力^[21]。在本实验结果中金属离子 K^+ 、 Na^+ 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对鲫鱼 ACP 的影响与背角无齿蚌^[10]、瘦肉猪精液^[13] ACP 性质一致; Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 对鲫鱼 ACP 有不同程度的抑制作用, 其中 Pb^{2+} 、

Cd^{2+} 的抑制作用更为强烈, 这一结果同背角无齿蚌^[10]、长毛对虾^[11]、瘦肉猪精液^[13] ACP 性质相同。鲫鱼 ACP 的活性对 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 等重金属离子比较敏感, 因此可以作为这些重金属离子污染的环境指示。

分别选取两种特征性的激活剂和抑制剂研究其对 ACP 荧光光谱的影响。通过对荧光特征峰及其在不同条件下的位移情况、荧光猝灭、荧光增强等的研究, 可以获得蛋白质分子中荧光生色基团的种类、结构和所处微环境及其分布情况, 蛋白质分子构象变化等有用信息^[22]。278 nm 激发时, 蛋白质分子中酪氨酸和色氨酸残基受到激发, 其最大发射峰分别在 304 nm 和 310—350 nm 左右。本实验用 278 nm 波长激发所得的 340 nm 处的特征荧光发射峰主要是生色基团色氨酸残基作用的结果, 酪氨酸残基

的贡献很小。实验中 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 两种金属离子均使荧光强度升高,其原因可能是由于金属离子的加入导致酶所处微环境产生变化,使更多的生色基团暴露到溶液中,同时酶活性中心微环境的改变,有利于酶和底物结合,从而达到激活效果。随着 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 浓度的升高,ACP 的荧光强度不断的降低,其原因可能是由于金属离子与酶蛋白的活性中心基团结合,在抑制酶活力的同时,亦致使其荧光强度下降。

参考文献:

- [1] Yoneyama T, Shiozawa M, Nakamura M, et al. Characterization of a novel acid phosphatase from embryonic axes of kidney bean exhibiting vanadate-dependent chloroperoxidase activity [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 37477—37484
- [2] Bozzo G G, Raghothama K G, Plaxton W C, et al. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures [J]. *Eur J Biochem*, 2002, **269**: 6278—6286
- [3] Chen J Y, Zhang Y, Ao S Z, et al. Prediction and comparison of secondary structures for acid phosphatase polypeptides P56, P57, P60 in yeast [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 1990, **22**(1): 87—90 [陈山野, 张鹰, 敖世洲, 等. 酵母酸性磷酸酶多肽 P56, P57 和 P60 二级结构的预测与比较. 生物化学与生物物理学报, 1990, **22**(1): 87—90]
- [4] Li F, Wu H Q, Ge Z C, et al. Comparison of five extraction methods by analyzing the total proteins from carp using EMKC [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2008, **32**(1): 125—128 [黎锋, 吴海强, 戈早川, 等. 利用胶束电动毛细管电泳比较五种提取鲫鱼总蛋白方法研究. 水生生物学报, 2008, **32**(1): 125—128]
- [5] Gao J, Zhao X P, Zhan F F, et al. Effects of lead on acid phosphatase and alkaline phosphatase in *Carassias auratus* [J]. *Sichuan J Zool*, 2008, **27**(2): 201—204 [高举, 赵欣平, 詹付凤, 等. 铅对鲫鱼碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性的影响. 四川动物, 2008, **27**(2): 201—204]
- [6] Jiang Y, Liu K W, Yang S Z, et al. Isolation, purification and characterization of acid phosphatase from *Apis cerana* [J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci)*, 2001, **38**(5): 776—780 [江琰, 刘克武, 杨守忠, 等. 意蜂工峰酸性磷酸酶的分离纯化及动力学研究. 四川大学学报(自然科学版), 2001, **38**(5): 776—780]
- [7] Orlando J L, Zirino T, Quirk B J, et al. Purification and properties of the native form of the purple acid phosphatase from *Bovine spleen* [J]. *Biochem*, 1993, **32**: 8120—8129
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248—254
- [9] Wang J Z, Fan M. The handbook of protein methods [M]. Beijing: Science Press. 2002 [汪家政, 范明. 蛋白技术手册. 北京: 科学出版社. 2002]
- [10] Wei W, Zhang H Y, Shi A J. Purification and properties of acid phosphatase from *Anadonta woodlana* (Heude) [J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci)*, 1999, **36**(3): 569—572 [魏炜, 张洪渊, 石安静. 背角无齿蚌酸性磷酸酶的分离、纯化及部分性质研究. 四川大学学报, 1999, **36**(3): 569—572]
- [11] Chen S L, Chen Q X, Yang P Z. Studies of phosphatase from *Penaeus penicillatus* [J]. *Acta Sci Naur Univ Sunyatseni*, 1996, **36**: 135—140 [陈素丽, 陈清西, 杨佩真. 长毛对虾磷酸酯酶的研究. 中山大学学报(自然科学版), 1996(增刊), **36**: 135—140]
- [12] Chen S L, Gong S J, Zeng W Z. Purification and some properties of acid phosphatase from amphioxus *Branchiostoma belcheri*(Gray) [J]. *J Xiamen Univ (Nat. Sci.)*, 1985, **24**(1): 84—90 [陈素丽, 龚少静, 曾伟章. 文昌鱼酸性磷酸酶的分离纯化及部分性质的初步研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1985, **24**(1): 84—90]
- [13] Huang X H, Feng X, Liu X, et al. Partial characteristic of acid phosphatase from sperm of PIC pigs (PIC344) [J]. *Sichuan J Zool*, 2005, **24**(1): 17—26 [黄新和, 冯兴, 刘鑫, 等. 瘦肉猪(PIC344)精液酸性磷酸酶的部分性质研究. 四川动物, 2005, **24**(1): 17—26]
- [14] Robert L, Van E. Structural and mechanistic basis for the activation of a low molecular weight protein tyrosine phosphatase [J]. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 2313
- [15] Zhong Y Z, Robert L V E. Properties and isozymes of acid and alkaline phosphatase in cattle testes and errdometrium [J]. *Archs Biochem Biophys*, 1990, **282**(1): 39—48
- [16] Aleksandra K. Acid and alkaline phosphatase noesteraser in Egyptian snake venoms [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1985, **81**: 177—180
- [17] Kyoichi A, Masaki K, Masahisa N, et al. Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2007, **362**: 594—600
- [18] Zhou H M, Wang H R. Chemical modification [M]. Beijing: Tsinghua University Press. 1998 [周海梦, 王洪睿. 蛋白质化学修饰. 北京: 清华大学出版社. 1998]
- [19] Agrirre-Garcia M M, Cerbon J, Talamas-Rohana P. Purification and properties of an acid phosphatase from *Enatana-moeba histolytica HM-1* [J]. *Inter J Parasitology*, 2000, **30**: 585—591
- [20] Liu B, Wang W, Deng N S. The current research status of mechanism between aquatic organisms and metal ions [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2002, **26**(6): 697—703 [刘彬, 王维, 邓南圣. 水生生物与金属离子相互作用机理研究现状. 水生生物学报, 2002, **26**(6): 697—703]
- [21] Tohru Y, Maya T, Tomonori S, et al. Expression and characterization of a recombinant unique acid phosphatase from kidney bean hypocotyl exhibiting chloroperoxidase activity in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Protein Express Purif*, 2007,

53: 31—39

High Education Press. 2000 [赵南明, 周海梦, 蔡国平. 生

[22] Zhao N M, Zhou H M, Cai G P. Biophysics [M]. Beijing:

生物物理学. 北京: 高等教育出版社. 2000]

PROPERTIES OF ACID PHOSPHATASE FROM *CARASSIAS AURATUS* AND EFFECTS OF SEVERAL EFFECTORS ON THE ACTIVITY OF THE ENZYME

GAO Ju, ZHAO Xin-Ping, ZHAN Fu-Feng, ZHANG Ying and YU Tong

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment Ministry of Education, School of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Acid phosphatase (ACP) is one kind of enzyme, which is not absolutely specific. It can catalyze the hydrolysis of phosphoric acid ester chemical compound in acid environment. ACP activities are involved in a variety of metabolic processes, such as molecule permeability, growth and cell differentiation. In ecotoxicology, this enzyme has been used as an indicator of intoxication because of its sensitivity to metallic salts. So the objective of this paper is to characterize the ACP from *Carassias auratus*, to analyze the *in vitro* effects of different metal ions on the enzyme activity and to estimate its potential use as a stress biomarker. This paper mainly deals with isolating, purifying ACP from viscera of *Carassias auratus* and studying its characters and preparing for its application. ACP was prepared and purified by means of the following techniques: n-butyl alcohol extraction, 0.3 and 0.8 ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography on DEAE-32 column and gel filtration chromatography on Sephadex G-150. The preparation was shown to be homogenous on polyacrylamide gel electrophoresis. The specific activity of the enzyme was 195.06 unit per mg protein. Its molecular weight was determined to be about 33.3kD on SDS-PAGE. The kinetic characters of the enzyme had been studied. The enzyme showed an optimum pH of 4.8 with *p*-nitrophenylphosphate as substrate, however, high catalytic activity of the enzyme was within the pH range of 4.0—5.5. The optimal catalytic reaction temperature was 45°C, and the activity of the enzyme decreased quickly when the temperature was above 55°C. The Michaelis-Menten constant (*K_m*) was 0.23mmol/L. Chemical modification was used to illuminate the essential amino acid in the catalytic activity of ACP from *Carassias auratus*. The results revealed that succinic anhydride, phenylmethylsulfonyl fluoride, dithiothreitol and N-bromosuccinimide had no effect on the activity of the enzyme, while bromoacetic acid and iodoacetic acid inhibited the enzyme. The inhibition of bromoacetic acid and iodoacetic acid on the activity of ACP from *Carassias auratus* indicated that there were histidine residues at the active site of the enzyme. Different metal ions had different effects on ACP from *Carassias auratus*. The positive monovalent metal ions K⁺ and Na⁺ had no effect on the enzyme, while Ag⁺ inhibited the enzyme; The positive bivalent cations had different effects on the enzyme: Co²⁺ and Ni²⁺ had no effect on the enzyme; Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ and Mn²⁺ activated the enzyme while Cu²⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺ inhibited the enzyme. The activation of Mg²⁺ and Ca²⁺ and the inhibition of Pb²⁺ and Cd²⁺ were depended on the concentration of metal ions. Fluorescence spectra of ACP which was incubated with Pb²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ showed that effects of metal ions on the enzyme might be related to a conformational change on the enzyme. Thus these characters of ACP suggest that the enzyme is suitable to be used as a stress biomarker, but more knowledge of the physicochemical and kinetic characteristics of the enzyme activity of ACP from *Carassias auratus* is necessary before it can be employed as biochemical indicator of stress due to heavy metals.

Key words: Acid phosphatase; Purification; Properties; Chemical modification; Metal ions; *Carassias auratus*