

背角无齿蚌碱性磷酸酶的功能基团研究

张洪渊 刘克武 姜 云 龚由彬 罗胜清

(四川大学生物学系, 成都 610064)

提 要

在一定条件下分别采用 PMSF、DTT、PCMB、NBS、TNBS、SUAN、BrAc 及 IBr 等化学修饰剂选择修饰背角无齿蚌碱性磷酸酶的多种氨基酸残基, 并测定其酶活力变化。结果表明, PMSF、NBS、TNBS、SUAN、DTT 的修饰能显著抑制酶的活力, 活力的降低与修饰剂的浓度相关。BrAc、IAC、PCMB 的修饰不表现对酶的抑制作用。作者初步认为, Ser、Lys 和 Trp 残基是背角无齿蚌碱性磷酸酶的必需功能基团, 部分二硫键对保护酶的催化功能也是必需的。

关键词 碱性磷酸酶, 必需基团, 化学修饰, 背角无齿蚌。

探讨酶活性部位的功能基团, 对研究酶的结构与功能及酶的催化机理具有重要意义。化学修饰法是目前探明酶活性部位功能基团的常用方法之一, 已用此法探明多种动物不同酶的必需基团^[1-7]。对于碱性磷酸酶 (AKP) 的化学修饰, 已对 *E. coli*^[8]、牛肠^[9]、缢蛏^[10]、文昌鱼^[11]等的 AKP 作过研究。对于河蚌中与珍珠质分泌相关的 AKP 的功能基团研究尚未见报道。本文用几种修饰剂对背角无齿蚌外套膜的 AKP 进行了研究, 初步探讨了其功能基团。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂 背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana* Heude) 取自成都郊区, 蚌龄 2—3 龄。Sephadex G-100 为 Pharmacia 产品, 磷酸苯二钠为 Merck 产品。各种化学修饰试剂 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS)、对氯汞苯甲酸 (PCMB)、二巯基苏糖醇 (DTT)、三硝基苯磺酸 (TNBS)、琥珀酸酐 (SUAN)、溴乙酸 (BrAc) 及碘乙酸 (IAC) 均为国产分析纯或生化试剂级。

1.2 方法 背角无齿蚌外套膜 AKP 的分离纯化及活力测定见前文^[12]。外套膜经正丁醇抽提、硫酸铵盐析、Sephadex G-100 凝胶过滤等步骤, 分离出比活为 150 单位 / mg 蛋白的酶制剂。

各种化学修饰剂修饰酶的基本条件: 基质缓冲液由 0.01mol / L 磷酸苯二钠溶液、0.05mol / L 碳酸缓冲液 (pH9.5)、3% 4-氨基安替比林溶液及蒸馏水按 5:10:1:4 比例配制, 分别加入不同浓度 (0.1 或 1.0m mol / L) 的各修饰剂, 并各加入 0.1mL 提取酶液, 在相同温度 (40℃)、相同 pH 值 (pH9.5) 条件下反应, 测定随时间进程的活力变化。

2 结果

2.1 几种化学修饰剂对背角无齿蚌 AKP 活力的影响

取试管 8 只, 各管加入 10mL 基质缓冲液, 并分别加入 PMSF、DTT、NBS、PCMB、BrAc、Iac、SUAN 及 TNBS 溶液, 使其终浓度为 1.0m mol / L (PMSF 为 0.1m mol / L)。再于各管中加入酶液 0.1mL (15μg / mL), 40℃ 反应 8min, 然后加入 2.0mL 0.1mol / L NaOH 溶液终止反应, 测定各管的酶活力, 以不加任何修饰剂的对照管的活力为 100, 计算各管的相对活力 (表 1)。

表1 一些化学修饰剂对AKP活力的影响

Tab.1 The effects of some chemical modifier on AKP activity

修饰剂 Modifier	PMSF	DTT	PCMB	NBS	BrAc	Iac	SUAN	TNBS
终浓度(m mol/L) Terminal concentration	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
相对活力 Relative activity	76	69	89	8	93	96	44	38

由表 1 可见, NBS、TNBS 和 SUAN 对 AKP 活力影响较大, PMSF、DTT 次之, 而 PCMB、BrAc 和 IAc 影响很小。

2.2 PMSF 对丝氨酸残基的修饰

用 0.1m mol/L PMSF 修饰 AKP, 测定其失活的时间进程。结果表明, AKP 的活力随修饰时间的延长而下降, 在修饰 20min 后, 活力下降一半, 75min 后完全失活 (图 1)。如果以相对活力的对数对时间作图, 得到一条直线 (图 2), 表明 AKP 的失活过程为一级反应。

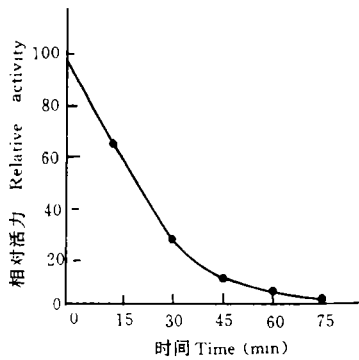


图1 PMSF 对 AKP 活力的影响

Fig.1 The effect of PMSF on activity of alkaline phosphatase.

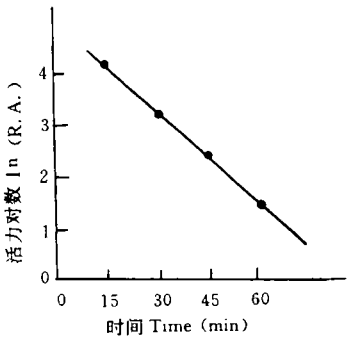


图2 活力对数与时间的关系

Fig.2 The relationship between activity logarithm and time.

直线的斜率 K 为 PMSF 存在下 AKP 的失活速度常数, 其数值为 8.2×10^{-4} 。由此可见, 丝氨酸残基是背角无齿蚌外套膜 AKP 活性部位重要的功能基团。

2.3 NBS 对色氨酸残基的修饰

NBS 可特异修饰蛋白质中的色氨酸残基, 使酶失活。作为用不同浓度的 NBS 作用于 AKP, 发现随 NBS 浓度的升高, 酶的失活很快, 当浓度达 1 m mol/L 时, AKP 剩余酶活仅有 8%(图 3), 而且色氨酸的特征吸收峰 278nm 消失(图 4)。

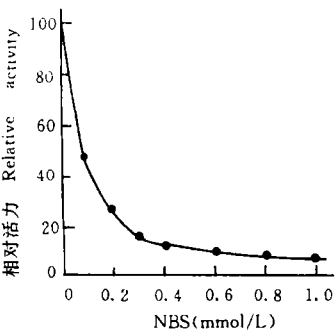


图3 NBS 对 AKP 活力的影响
Fig.3 The effect of NBS on activity of alkaline phosphatase.

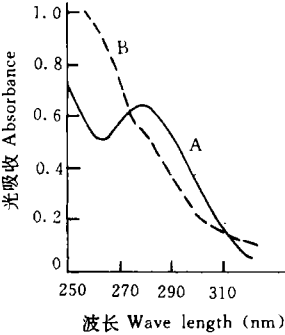


图4 NBS 修饰后的 AKP 吸收曲线
Fig.4 Absorption curve of alkaline phosphatase modification by NBS.
A. Control; B.0.5 m mol/L NBS.

2.4 TNBS 和 SUAN 对赖氨酸的修饰

用以作用于氨基的试剂 TNBS 和 SUAN 修饰 AKP, 发现二者均使酶活力下降, 下降的程度与修饰剂的浓度相关。 1 m mol/L 的 TNBS 及 SUAN 在 0.05mol/L 碳酸缓冲液 (pH9.5) 中, 8min 内可使酶活力分别下降 62% 和 56%(酶浓度 $20\mu\text{g / ml}$) (图 5)。随着修饰剂浓度的增大和作用时间的延长, 酶活力继续下降, 但下降的趋势比较缓慢。

2.5 DTT 对 AKP 酶活力的影响

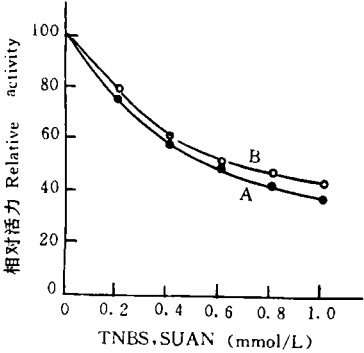


图5 TNBS 和 SUAN 对 AKP 活力的影响
Fig.5 The effects of TNBS and SUAN on activity of alkaline phosphatase.
A. TNBS; B. SUAN.

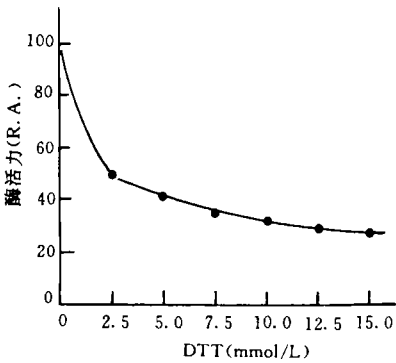


图6 DTT 对 AKP 活力的影响
Fig.6 The effect of DTT on activity of alkaline phosphatase.

采用不同浓度的 DTT 在碱性条件 (pH9.5, 0.05mol/L 碳酸缓冲液, 内含 0.005mol/L $Mg(Ac)_2$) 下与酶同时保温 20min (图 6), 由图可见, 随 DTT 浓度的增大酶活力急剧下降, 但 DTT 浓度达到 15 m mol/L 时, 酶活被抑制 71.5%, DTT 浓度再增大, 酶活力不再下降。

2.6 BrAc 和 IAc 对 AKP 的作用

通常在偏酸性条件下, 溴乙酸和碘乙酸可与蛋白质分子中的组氨酸残基反应。而本实验中, AKP 与 0.1mol/L BrAc 和 IAc 在酸性条件 (pH5.0, 0.1mol/L 醋酸缓冲液) 下, 40℃ 保温 20min, 酶活力变化不大, 影响很小 (表 1), 表明组氨酸残基被 BrAc 和 IAc 修饰后并不影响 AKP 的活力。

2.7 PMSF 和 DTT 对 AKP 的抑制动力学

在 0.05mol / L 碳酸缓冲液中 (pH9.5, 含 0.005 mol / L $Mg(Ac)_2$), 分别加入 PMSF (0.1mmol / L) 和 DTT (1.0 mmol / L), 求出底物浓度下的酶活力, 而后按双倒数作图法作图 (图 7)。结果表明, PMSF 和 DTT 对 AKP 均为非竞争性抑制, 二者抑制程度有差别。

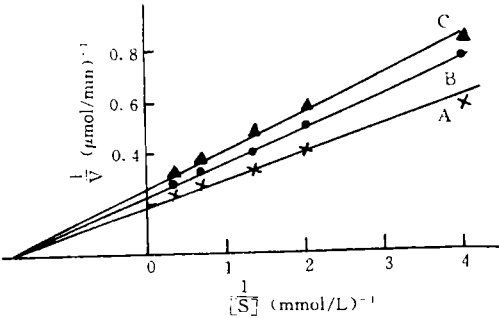


图 7 PMSF 和 DTT 对 AKP 的抑制动力学曲线
Fig.7 Inhibitory kinetics of PMSF and DTT on alkaline phosphatase.
A. [I]=0; B.[PMSF]=0.1mM; C. [DTT]=1.0mM.

3 讨论

PMSF 是对蛋白质分子中丝氨酸残基的专一修饰剂^[1], 作者用该试剂对背角无齿蚌的 AKP 进行修饰, 75min 可使酶完全失活, 而且失活过程对 PMSF 表现为一级反应, 说明 Ser 残基可能是背角无齿蚌 AKP 的功能基团之一。这个结果与 E.coli^[8]、缢蛏^[10]和牛肠^[9]是一致的。表明对 AKP 而言, Ser 残基在生物进化中是保守的, 这可能与它作为 AKP 重要功能基团相关。

NBS 是常用于修饰蛋白质中色氨酸残基的特异试剂^[2], 用它修饰背角无齿蚌 AKP, 随 NBS 浓度的增加, AKP 活力急剧下降, 当达 1 m mol/L, AKP 活力下降 92%。将经修饰的酶测其紫外吸收光谱, Trp 的特征吸收峰 (278nm) 消失, 说明 AKP 中 Trp 已被 NBS 氧化, 酶活力的丧失与 Trp 的氧化直接相关, 因此初步判断 Trp 也应是 AKP 的功能基团。这对缢蛏^[10]和文昌鱼^[11]的 AKP 也是相吻合的。

Tait 等^[8]用乙酸酐、Meigher 等^[13]用琥珀酸酐修饰 E.coli 的 AKP, 发现赖氨酸残基被修饰, 引起 AKP 活力下降。作者用三硝基苯磺酸 (TNBS) 和琥珀酸酐 (SUAN) 修饰 Lys, 均引起 AKP 活力下降。但修饰剂浓度达 1 m mol/L 时, 酶活力仅分别抑制了 62% 和 56%。说明 Lys 残基的 e-NH₂ 与背角无齿蚌 AKP 活性相关, 但可能仅有少数 Lys 残基才有直接关系。

二巯基苏糖醇 (DTT) 具有较强的还原性, 可将蛋白质分子中的二硫键还原, 引起分子构象变化, 进而影响其功能。本文讨论了用不同浓度的 DTT 在碱性条件 (pH9.5, 碳酸缓冲

液)下与酶作用的结果,即酶活随 DTT 浓度提高而下降,DTT 为 2.5m mol / L 时,20min 内酶活力下降 50%,但 DTT 浓度达 15.0m mol / L 时,酶活只被抑制 71.5%,说明酶分子中仅有一部分二硫键与酶的活力相关,这些二硫键可能在维持酶活性中心构象中起着重要作用。从动力学研究看,属非竞争性抑制类型,只影响最大反应速度,对酶与底物的亲和力没有影响。

PCMB 是常用于修饰蛋白质分子巯基侧链的试剂,常用于修饰半胱氨酸残基。本实验结果巯基修饰对酶活力影响不大(表 1),表明巯基可能不是背角无齿蚌 AKP 催化功能所必需。

溴乙酸、碘乙酸在偏酸性条件下,能专一地与蛋白质中组氨酸残基反应,生成羧甲基衍生物。本实验中这两种修饰剂对 AKP 活力几乎没有什么影响(表 1),说明 His 残基可能不是 AKP 的必需功能基团。Tait 等^[8]用重氮-1-氢-四唑(DHT)修饰 E.coli AKP 及余卫平等^[10]用溴乙酸修饰缢蛏 AKP 的 His,其活力均有提高,与本实验的结果有所差异,这可能与种属差异或所用修饰剂不同有关,但从总的变化来看,经修饰后的酶活力不变或略有提高,均说明 His 残基可能不是 AKP 的必需功能基团。

参 考 文 献

- [1] Putnam F W, in Neurath H & Bailey K (eds.) The chemical modification of proteins. The proteins. Vol. 1. B. 1953, 893 Academic Press. New York.
- [2] Viswanatha T, Lawson W B & Witkop B, The action of N-bromo-succinimide on trypsinogen and its derivatives. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 40: 216—224.
- [3] Viswanatha T & Lawson W B, The action of N-bromo-succinimide on chymotrypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 93:128—134.
- [4] Dixon G H, Kauffman D L & Neurath H, Amino acid sequence in the region of diisopropyl-phosphoryl binding in diisopropyl-phos phoryl trypsin. *J. Biol. Chem.*, 1958, 233: 1373—1381.
- [5] Nakashima K et al., Regulatory sulfhydryl groups and activation by homocystine in liver fructose diphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, 141:579.
- [6] 袁之华、林其谁,鼠肝线粒体胆碱脱氢酶中巯基的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1987, 19 (3): 166—171.
- [7] 于振宝、许根俊,巯基修饰对蛇肌果糖-1,6-二磷酸酯酶活力的影响. *生物化学与生物物理学报*, 1992, 24 (5): 435—441.
- [8] Tait G H and Vallee B L, Studies on the active center of alkaline phosphatase of E.coli. *Proc. Natl. Acta Sci. U. S. A* 1966, 56:1247—1251.
- [9] Engstrom L, The amino acid sequence around the reactive serine in Calf-intestinal alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1964, 92: 79—84.
- [10] 余卫平、颜思旭,缢蛏碱性磷酸酯酶功能基团的化学修饰. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1986, 25 (5): 562—567.
- [11] 陈清西、颜思旭,文昌鱼碱性磷酸酶的必需基团研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1986, 25 (5): 568—573.
- [12] 张洪渊、刘克武、石安静等,背角无齿蚌碱性磷酸酶的分纯化及其动力学研究. *水生生物学报*, 1996, 20 (1): 57—62.
- [13] Meighen E and Yoe R, Hybrids of chemical derivatives of Escherichia coli alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1975, 412:262.

FUNCTIONAL GROUPS OF ALKALINE PHOSPHATASE FROM *ANODONTA WOODIANA* HEUDE

Zhang Hongyuan, Liu Kewu, Jiang Yun, Gong Youbin and Luo Shengqing

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract

The alkaline phosphatase from *Anodonta woodiana* Heude was selectively modified by PMSF, DTT, PCMB, NBS, TNBS, SUAN, BrAc and IAc, and changes in the activities of the enzyme have been detected. The reaction of AKP with PMSF, NBS, TNBS, SUAN and DTT resulted in a strong inhibition of the enzyme activities which decreased with the increase of modifier concentration. The bromoacetic acid, iodoacetic acid and p-chloromercuri-benzoic acid were found without any inhibition effect. Studies of inactivation of AKP by chemical modification demonstrated that Ser, Lys and Trp residues are indispensable functional groups of the AKP. Partial disulfide bond are also for the function of this enzyme.

Key words Alkaline phosphatase, Essential groups, Chemical modification, *Anodonta woodiana* Heude