

背角无齿蚌碱性磷酸酶的分离、 纯化及其动力学研究*

张洪渊 刘克武 石安静 龚由彬 罗胜清**

(四川大学生物系, 成都 610064)

提 要

作者对背角无齿蚌外套膜的碱性磷酸酶(AKP)进行了分离纯化,并对其动力学性质进行了初步研究。外套膜匀浆,经正丁醇抽提、盐析、Sephadex G-100 凝胶过滤等步骤,得到了比活力为 149.6 单位/mg 蛋白的酶制品。通过动力学方法测得其最适 pH 值为 9.5,最适温度为 40℃,以磷酸苯二钠作底物的 K_m 值为 0.57mmol/L。 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶有激活作用,而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 KH_2PO_4 、EDTA 和巯基乙醇有抑制作用。

关键词 背角无齿蚌,外套膜,碱性磷酸酶

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,简称 AKP, E.C. 3·1·3·1)在细菌和高等动物中已作过广泛研究,但对贝类中 AKP 的研究报道不多^[1-3]。作者对我国主要淡水育珠蚌种之一的背角无齿蚌外套膜的 AKP 进行了纯化,并对它的动力学特性进行了初步研究,以供淡水育珠机理探讨中的酶学性质和生化特征提供部分依据。

1. 材料和方法

1.1 材料和试剂

背角无齿蚌(*Anodonta woodiana* (Heude))取自成都郊区。

Sephadex G-100 为 Pharmacia 产品,磷酸苯二钠为上海新中化学厂出品,4-氨基安替比林为上海试剂一厂产品,EDTA(乙二胺四乙酸二钠)、ME(巯基乙醇)等试剂亦均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 AKP 的分离纯化 参考 Mckenna 等^[4]的方法并略加修改。取外套膜组织块用蒸馏水漂洗后剪碎,按 1:3(W/V)加入预冷的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5,含 0.1mol/L 氯化钠),匀浆 1min,冰箱内放置过夜。于匀浆中加入在 4—6℃ 预冷过的

* 国家自然科学基金资助项目(39070668)

** 万谦、黄雪松参加部分实验工作

1992年12月21日收到,1995年6月23日收到修改稿。

正丁醇至 20% (V/V), 37℃ 保温 30min 后, 冰箱内放置 10h, 室温下离心 15min (3000r/min)。上清液加入硫酸铵, 取 0.35 至 0.7 饱和度盐析物, 溶解于 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 后, 对 0.15%NaCl 溶液透析, 透析液离心后上 Sephadex G-100 柱 (0.8×80cm), 用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 为 7.5) 洗脱, 流速 0.4ml/min, 分部收集, 分别测定蛋白质含量及 AKP 酶活。

1.2.2 酶活力测定 参照金氏法^[5], 基质缓冲液 [0.01mol/L 磷酸苯二钠溶液: 0.05mol/L 碳酸缓冲液 (pH10): 3%4-氨基安替比林溶液及蒸馏水按 5:10:1:4] 2ml, 在 37℃ 水浴中预热 5min, 加入酶液 0.1ml, 混匀后于 37℃ 保温 15min, 加入 2.4% 高铁氰化钾溶液, 5min 后用 721 型分光光度计, 在波长 510nm 下测定其光吸收值。在此条件下, 以每分钟产生 1μmol 酚的酶量定义为 1 个活力单位。

1.2.3 蛋白质测定 按照 Lowry 法^[6]测定蛋白质浓度。

1.2.4 pH 值对酶活力的影响 参考文献[3]的方法, 以 0.01mol/L 磷酸苯二钠为底物, 加入 2 倍体积的具有系列不同 pH 值的 0.05mol/L 碳酸缓冲液作为基质缓冲液 (另含 0.2 倍的 3%4-氨基安替比林溶液), 测定由 Sephadex G-100 柱洗脱的酶液在不同 pH 值时的活力, 以最高活力值为 100, 将其余各 pH 值下测得的酶活力, 换算成相对酶活。pH 值选择范围为 8.77 至 9.30。

1.2.5 温度对酶活力的影响 以上项测定中酶活最高的 pH 基质缓冲液, 测定 Sephadex G-100 柱洗脱的酶液在不同温度下的活力, 以最高活力值为 100, 其余各温度下测得的酶活力, 换算成相对酶活。温度范围选择在 6—50℃。

1.2.6 AKP 米氏常数 K_m 的测定 按文献[7]的方法, 以磷酸苯二钠为底物, 选择活力最高的 pH 基质缓冲液, 在上项测定的最适温度下, 测定经 Sephadex G-100 柱洗脱的酶液在不同底物浓度下的反应速度。并按 Lineweaver-Burk 法作图, 求出 V_m 和 K_m 。这里底物浓度选择在 0.25mmol/L 至 3mmol/L 的范围, 反应速度以 510nm 波长下的光吸收值表示。

1.2.7 激活剂和抑制剂对酶活力的影响^[3,7] 以酶活力最佳条件下的 pH 值、温度及底物浓度, 分别加入 $Mg(Ac)_2$ 、 $CaCl_2$ 、 KH_2PO_4 、 $Ba(OH)_2$ 、 $CuSO_4$ 、 $ZnCl_2$ 、ME 和 EDTA, 其终浓度为 1—3mmol/L, 测定经 Sephadex G-100 柱层析酶液的酶活力; 以不加上述化学物质的酶活力为 100, 其余条件下测定的酶活换算成相对酶活。

2 结果

2.1 AKP 的提纯

外套膜组织经过几步分离纯化, 最后经过凝胶过滤, 测定各步的总蛋白、总活力, 并据此计算比活、回收率和纯化倍数 (表 1)。

由 Sephadex G-100 柱纯化的酶液经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 用考马斯亮蓝 R₂₂₅ 染色, 显现三条区带 (图 1), 靠近负极端有两条强窄带, 靠近正极端有一条弱宽带。

2.2 AKP 的动力学特性

2.2.1 酶的最适温度和最适 pH 以 0.01mol/L 磷酸苯二钠为底物, pH 为 9.5, 测定不同温度下酶的活力, 结果表明, 背角无齿蚌外套膜 AKP 的最适温度为 40℃ (图 2)。

表 1 外套膜碱性磷酸酶的纯化结果

Tab.1 Purification of the mantle AKP extract

纯化步骤 Purification step	总体积 Total volume (ml)	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (units)	比活 Specific activity (Units / mg protein)	回收率 Yield (%)	纯化率 Purification multiple
匀浆 Homogenate	134	—	—	—	—	—
正丁醇处理 Butanol treatment	121	28.80	225.0	7.81	100.0	1.00
0.35 饱和度 $0.35(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	102	15.34	185.1	12.06	82.3	1.54
0.70 饱和度 $0.70(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	22	4.84	127.8	26.40	56.8	3.38
Sephadex G-100	2	0.25	37.4	149.60	16.6	19.15

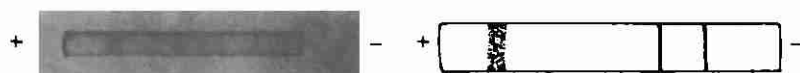


图 1 AKP 的凝胶电泳图谱

Fig.1 Polyacrylamide gel electrophoresis of AKP

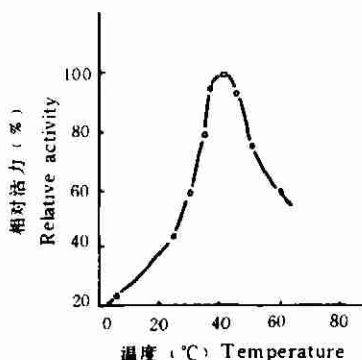


图 2 温度对 AKP 活力的影响

Fig.2 The effect of temperature on AKP activity

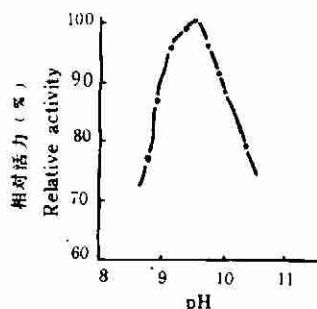


图 3 pH 值对 AKP 活力的影响

Fig.3 The effect of pH value on AKP activity

在 40℃ 时, 测定在不同 pH 值条件下的酶活力, 测得 AKP 的最适 pH 值为 9.5。酶

活力随 pH 值的变化趋势呈现典型的钟罩形规律(图 3)。

2.2.2 酶的米氏常数 以磷酸苯二钠为底物,在 40℃、pH9.5 条件下,分别测定在底物浓度为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00mmol/L 时的反应速度,按测定结果分别计算 1/V 和 1/[S],并按 Lineweaver-Burk 法作图,求得背角无齿蚌 AKP 的 K_m 值为 0.57mmol/L(图 4)。

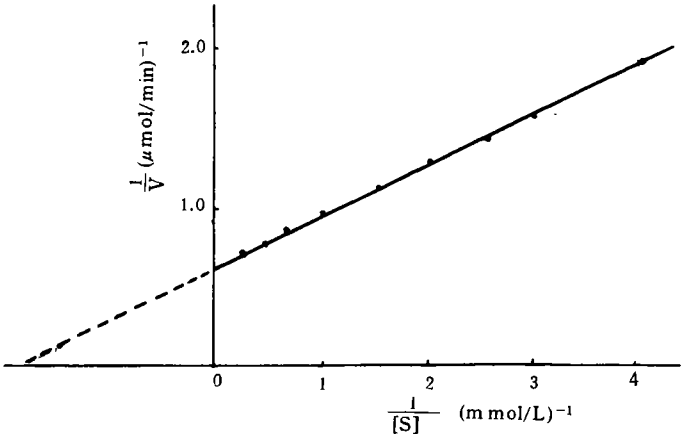


图 4 米氏常数 K_m 的测定

Fig.4 Determination of Michaelis constant

2.2.3 激活剂和抑制剂对酶活力的影响 一些化学物质对 AKP 活力的影响见表 2。由表可见, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对背角无齿蚌 AKP 酶活力有激活作用,且以前者的激活作用更强。 KH_2PO_4 、EDTA、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 ME 都有不同程度的抑制作用,其中 EDTA 的抑制作用最强。

表 2 一些化学物质对 AKP 酶活力的影响

Tab.2 The effect of some chemical reagents on AKP activity

化学物质 Chemical reagent	对照 Control	Mg^{2+}		Ca^{2+}		KH_2PO_4		EDTA		Ba^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	ME
终浓度 Terminal concentration (mmol/L)	—	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	3	2
相对活力 Relative activity	100	148	166	117	143	86	65	64	46	103	60	75	78

3. 讨论

贝壳和珍珠是由贝类外套膜细胞分泌的产物形成的,珍珠的主要成分为壳角蛋白和碳酸钙,而碳酸钙的分泌和积聚与 AKP 有关^[8]。AKP 不仅参与钙磷代谢,维持体内适宜的钙磷比例,而且还与贝类壳角蛋白等蛋白质的分泌相关^[9, 10]。石安静等^[11]对背角无齿

蚌外套膜的组织化学研究指出,外套膜的表皮细胞中,AKP 的反应很强,并且认为 AKP 不仅涉及蛋白质的分泌,还参与蛋白质的合成,以及贝壳和珍珠质前身物质的形成、矿化过程,即 AKP 在珍珠形成过程中,具有重要而广泛的作用。因此,AKP 作为生物体内一种重要的代谢调控酶,研究其特性对了解不同条件下贝类的代谢活性,探索珍珠及贝壳形成的机理具有一定的意义。

AKP 的酶学特性,在不同动物中有明显差异。作者测定背角无齿蚌 AKP 的最适温度为 40°C ,在 $37\text{--}45^{\circ}\text{C}$ 均有较高活性,这与三角帆蚌一致^[3],但贻贝为 38°C ^[2],而猪肠却为 45°C ^[12]。pH 值对酶活力的影响也十分明显。背角无齿蚌 AKP 在 pH9.12—10.1 的范围内均有较高活性,但以 pH9.5 时活性最高。这与三角帆蚌 AKP 有明显差异,后者的较高活力在 pH9.7—10.3 范围,最适 pH 为 10.1^[3]。而贻贝 AKP 最适 pH 为 10.2^[2],猪肠 AKP 更高,为 10.4^[12]。

AKP 的米氏常数 K_m ,作者以磷酸苯二钠为底物测得背角无齿蚌为 0.57m mol/L ,而三角帆蚌(磷酸苯二钠为底物)为 1.82m mol/L ^[3],贻贝(对硝基苯磷酸为底物)为 1.62m mol/L ^[2],猪肠(对硝基苯磷酸为底物)为 2.50m mol/L ^[12]。

由以上结果可见,AKP 的酶学性质不仅因动物种属不同而异,而且看来背角无齿蚌外套膜 AKP 具有更为广泛的适应性。它比三角帆蚌具有更广的 pH 值适应范围,具有更高的底物亲和力,这可能与背角无齿蚌的分布范围广、适应能力强有关。这也提示背角无齿蚌比三角帆蚌具有更强的钙磷代谢、蛋白质合成与分泌活性。至于这些差异与不同蚌种在形成珍珠的速度和质量上有什么关系?对同一种蚌而言,在不同季节、不同生理条件以及育珠过程中的不同阶段,AKP 的酶学特性有何变化?有待进一步研究。

从不同化学物质对 AKP 活力的影响来看, Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 有明显的激活作用,而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 KH_2PO_4 、EDTA 和巯基乙醇有不同程度的抑制作用。此结果与三角帆蚌一致^[3]。

参 考 文 献

- [1] 于 力,紫贻贝中的酶。中国海洋药物,1988, (4): 21—22。
- [2] 刘汝高,贻贝足丝固化过程中酶学性质的初步研究。中国海洋药物,1988, (1—2): 36—38。
- [3] 李清漪等,三角帆蚌碱性磷酸酶的初步研究。西南师范大学学报,1989, 14(3): 80—85。
- [4] McKenna M J. et al., Comparison of human alkaline phosphatase classes. *Biochem. J.*, 1979, 181: 67—70。
- [5] 崔福生,医学生化检验手册,天津科学技术出版社,1981, 272—273。
- [6] Lowry O H., Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265—275。
- [7] 颜思旭等,文昌鱼碱性磷酸酶的动力学初步研究。厦门大学学报(自然科学版),1980, 19(3): 64—71。
- [8] 小林新二郎等(熊大仁译),珍珠的研究,农业出版社,1965, 250—259。
- [9] Beedham G E., Observations on the mantle of the lamellibranchia. *Quart. micr. Sci.* 1958, 99: 188—197。
- [10] Kado Y., The distribution of alkaline phosphatase in mantle tissue of bivalves. *Jour. Sci. Hiroshima Univ.*, ser. B, 1954, 15: 183—188。
- [11] 石安静等,背角无齿蚌外套膜的组织化学研究。动物学杂志,1986, (4): 1—3。
- [12] 杨曜中等,猪肠碱性磷酸单酯酶的制备。医药工业,1984, (2): 3—7。

**ISOLATION, PURIFICATION AND SOME KINETIC
PROPERTIES OF ALKALINE
PHOSPHATASE FROM THE MANTLE OF *ANODONTA*
WOODIANA (HEUDE)**

Zhang Hongyuan, Liu Kewu, Shi Anjing,

Gong Youbin and Luo Shengqing

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu, 610064)

Abstract

The present paper describes the isolation and purification of alkaline phosphatase (AKP) from the mantle of *Anodonta woodiana* (Heude), and its kinetic property is also examined. The alkaline phosphatase was partially purified from the mantle by homogenation, nbutanol extraction, salting-out and gel filtration with Sephadex G-100. Gained AKP product has a specific activity of 149.6 unit / mg AKP protein. The optimum pH value of the AKP product is 9.5 as hydrolysed in disodium phenyl phosphate and its optimum temperature is 40℃. The Michaelis-Menten constant (K_m) is 0.57 mmol / L (on the disodium phenyl phosphate). The AKP was activated by Mg^{2+} and Ca^{2+} ions while inhibited by ions of Cu^{2+} , Zn^{2+} and reagents of KH_2PO_4 , EDTA and ME.

Key words *Anodonta woodiana* Heude, Mantle, Alkaline phosphatase