

长吻鲢碱性磷酸酶的动力学研究*

陈 定 福

(西南师范大学生物系, 重庆 630715)

提 要

采用生化手段,从长吻鲢 (*Leiocassis longirostris* Günther) 肝中提取出碱性磷酸酶 (AKP)。提纯倍数为 62.08 倍,比活为 66.43 单位/mg 蛋白,提取酶液经 PAGE 和 SDS-PAGE 只呈现一条区带。该酶的最适 pH 为 10.05; $7.0 > \text{pH} > 11.0$ 时不稳定;最适温度为 40℃;对热不很稳定;以磷酸苯二钠为底物其 K_m 值为 $1.82 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 。 Mg^{2+} 为该酶的激活剂, L-Cys、 KH_2PO_4 、DFP、ME、EDTA- Na_2 为抑制剂。选用 KH_2PO_4 和 DFP 作抑制类型的判断,结果表明, KH_2PO_4 属竞争性抑制剂,其抑制常数为 2.41mmol/L; DFP 为非竞争性抑制剂,抑制常数为 1.01mmol/L。

关键词 长吻鲢,肝脏,碱性磷酸酶,动力学

碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1, 简称 AKP) 广泛存在于动物、植物及微生物体中,是一种对底物专一性较低的磷酸单酯水解酶,在生物体内直接参与磷酸基团的转移和代谢过程,在脊椎动物的骨化作用中起着重要作用^[1]。提纯的 AKP 常被应用于核酸、毒物学、医学研究,是遗传工程常用的工具酶^[2]。添加 AKP 的药用化妆品,有益于皮肤细胞的再生和新陈代谢^[3]。关于微生物、软体动物、脊索动物、哺乳动物的 AKP 的研究,国内外均有报道,而鱼类 AKP 的研究,国内文献中迄今未查到,国外有见 skipjack (鲣鱼)的报道^[4]。本研究从长吻鲢肝脏中分离纯化了碱性磷酸酶,并对其动力学性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 长吻鲢(♀)肝脏为酶的提取材料。该鱼购自重庆北碚鲜鱼市场,产自嘉陵江北碚至合川段。

1.2 试剂 DEAE-纤维素 (DE-32) 为美国 whatman 产品进口分装; DFP (二异丙基氟磷酸)系英国 B. D. H 厂产品; Sephacryl S-200 为 pharmacia 产品; ME (巯基醇)等其他试剂为国产分析纯。

1.3 酶的分离纯化 按颜思旭等^[4]和徐伟军等^[5]的方法进行,并有修改。将长吻鲢的肝用冷蒸馏水漂洗后切细,按 1:3 (重量:体积)加入 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5,

内含 0.1mol/L NaCl), 于高速组织捣碎机内匀浆, 置冰箱内过夜; 向匀浆中加入冷正乙醇 20%(v/v), 于 37℃ 保温 0.5h, 冰箱内放置过夜; 次日离心 (4℃, 8000r/min, 30min), 用分液漏斗除去上清液上面的正丁醇和漂浮的细胞碎片, 取上清液(粗酶液), 向其中加入固体硫酸铵至 0.35 饱和度, 离心 (4℃, 8000r/min, 30min); 取上清液、调 pH5.0—5.5, 加入固体硫酸铵至 0.70 饱和度, 离心 (4℃, 10000r/min, 40min), 取沉淀; 将沉淀溶于 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5), 并对 0.5% NaCl 透析至无 NH_4^+ 和 SO_4^{2-} , 于零度离心 30min (10000r/min), 所得上清液适当浓缩后, 进行 DE-32 纤维素柱层析 (2.8 × 30cm; LKB 柱层析系统), 用含有 0—0.3mol/L NaCl 的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 进行线形梯度洗脱, 流速 0.3ml/min, 4ml/tube, 部分收集, 经 280nm 紫外检测后, 对各蛋白吸收峰进行酶活性测定, 收集酶活性峰部分并上 Sephacryl S-200 柱 (2.6 × 60cm; LKB 柱层析系统), 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 洗脱 (0.3 ml/min; 4ml/tube), 分管收集, 追踪和收集酶活性部分, 经适当浓缩后, 进行该酶的有关测定。

1.4 酶的纯度鉴定 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)^[6], 分离胶浓度 7%, 考马斯亮蓝 G-250 染色。SDS-PAGE^[7], 分离胶浓度 10%, 考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.5 酶活力测定 采用磷酸苯二钠为底物的金氏法^[8], 并在此法规定的条件下, 每 15min 生成 1μmol 酚所需的酶量为一个酶活力单位 (U)^[9]。

1.6 蛋白质含量测定 按 Lowry 法^[10], 以牛血清白蛋白为标准。

1.7 AKP 其他性质的测定 均按蔡武城等^[11]的方法进行。

2 结果

2.1 酶的纯化

按“材料和方法”所述步骤, 鱼肝匀浆后用正丁醇抽提, 得到活性较高的 AKP 粗酶液, 该酶液经硫酸铵分级沉淀, 回收率为 45.34%, 盐析透析液经离心后, 其上清液以 DE-32 纤维素柱层析, 出孔 1 个酶峰, 2 个蛋白峰, 酶活性峰出孔在 0.16mol/L NaCl 附近(图 1)。收集酶峰, 再经 Sephacryl S-200 柱层析(图 2), 并将所得酶活性峰部分适当浓缩,

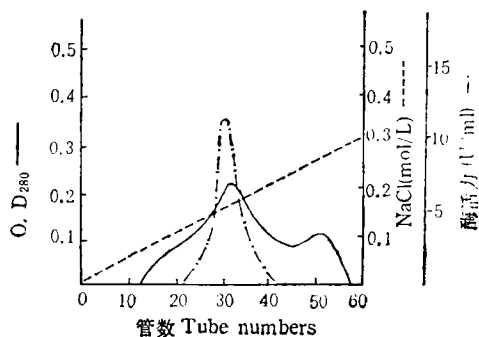


图 1 DEAE-纤维素 (DE-2) 柱层析
Fig. 1 Chromatography of AKP on DE-32 column

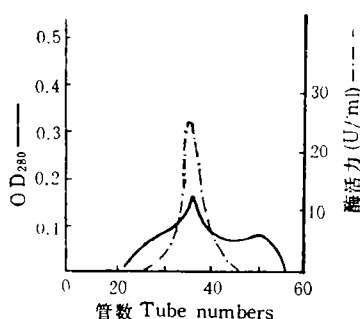
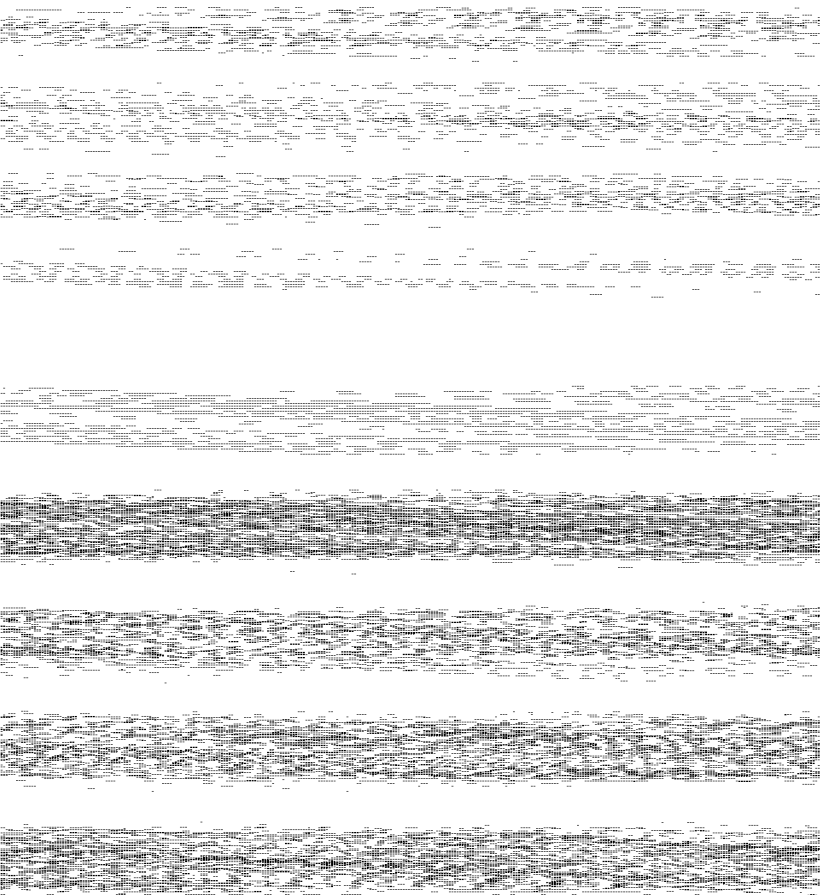


图 2 Sephacryl S-200 柱层析
Fig. 2 Chromatography of AKP on Sephacryl S-200 column



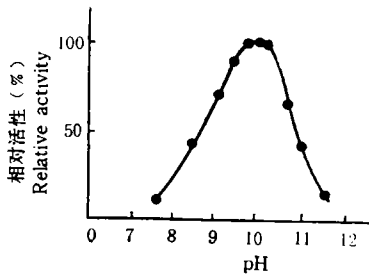


图5 pH-酶活性曲线
Fig. 5 pH-activity curves of AKP

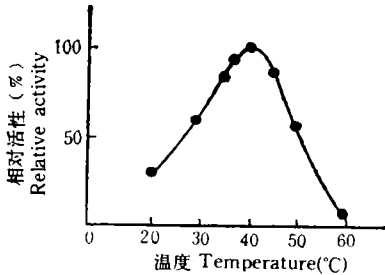


图6 温度-酶活性曲线
Fig. 6 Temperature-activity curves of AKP

本实验条件下有其表现活性的最适pH范围,其代表值为pH10.05。

酶的酸碱稳定性。将一定量纯酶液适当稀释后,分别置于一系列不同 pH (pH7.00—12.00) 缓冲液中, 37℃ 保温处理 1h, 然后再调至 pH10.00 (测酶活时的 pH 值) 进行酶活力测定,结果表明,该酶在 7.00 > pH > 11.00 的条件下不稳定。

2.3.2 温度对酶活性的影响及酶的热稳定性 在不同温度下 (20℃、30℃、35℃、37℃、40℃、45℃、50℃、60℃), 测定酶促反应速度(测定条件及方法与酶活力测定相同), 以温度为横坐标, 反应速度(相对活性)为纵坐标作图(图 6), 得温度-酶活性曲线, 根据此曲线,可知温度对酶活性的影响,并可求得该酶在本实验条件下的最适温度为 40℃。

取一定量酶液,在不同温度下分别保温一定时间。到时,迅速冷却,然后再调至 37℃ 按测酶活的条件和方法测定酶活力, 与同时置 37℃ 的对照样比较, 求出酶的残留活性。结果表明, AKP 于 45℃ 保温 50min 酶活性明显下降, 60℃ 保温 30min 活性完全丧失 (表 2)。提示 AKP 对热不很稳定。

表 2 酶的热稳定性
Tab. 2 Heat stability of AKP

温度(℃) Temperature	30	35	37	40	45	45	50	60
保温时间 Incubation time (min)	80	60	30	20	15	50	30	30
残留活性 Residual activity (%)	100	100	100	100	78	62	38	0

2.3.3 酶的 Km 值 按酶活力测定方法, 分别测定在不同底物浓度(酶反应体系中, 底物的最终浓度分别为 0.48、0.72、0.96、1.45、2.35、3.35、4.78mmol/L)下的酶反应速度, 将测定结果, 按 Lineweaver-Burk 作图法, 求得该酶以磷酸苯二钠为底物的 Km 值为 $1.82 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ (图 7)。

2.3.4 激活剂和抑制剂对酶活力的影响 选用几种化学试剂,在指定浓度下,测其对酶活力的影响 (测定条件及方法与测酶活力相同),结果见表 3。从表 3 可知, Mg^{2+} 对 AKP 有明显的激活作用; Ca^{2+} 在 0.95mmol/L 时有激活作用, 而在 2.38mmol/L 时则产生抑制(抑制该酶活性 16%), 其他试剂均表现出不同程度的抑制作用。其中,尤以 DFP 对酶的抑制最为强烈。

表 3 几种化学试剂对 AKP 活力的影响

Tab. 3 The Effect of some chemical reagents on AKP activity

化学试剂 Chemical reagent	Control	Mg ²⁺	Ca ²⁺	L-C ₇	KH ₂ PO ₄	DFP	ME	EDTA-Na ₂
终浓度 (mmol/L)		0.95	0.95	0.47	0.95	0.47	1.43	0.95
Terminal concentration		1.90	2.38	1.42	1.90	2.38	2.86	2.38
相对活性(%)		220	112	68.6	88.3	28.4	40.6	66.8
Relative activity	100	206	84	48.5	74.6	18.6	26.2	42.4

2.3.5 KH₂PO₄ 和 DFP 的抑制类型和抑制常数 K_i 在抑制剂中, 选用 KH₂PO₄ 和 DFP 作为对酶的抑制类型的判断, 并求出相应的 K_i。在酶反应体系中, 改变底物浓度 (终浓度分别为 0.48、0.72、0.96、1.45、2.35、3.35、4.78m mol/L), 并分别加入 KH₂PO₄ 和 DFP (终浓度分别为 2.00 和 1.20m mol/L), 按酶活力测定条件和方法测定酶活力, 以 1/v 对 1/[s] 作图 (图 8), 由图可知, KH₂PO₄ 属竞争性抑制剂, DFP 为非竞争性抑制剂。并按蔡武城等^[11]的方法求得 KH₂PO₄ 和 DFP 的抑制常数 K_i 分别为 2.41mmol/L 和 1.01m mol/L。

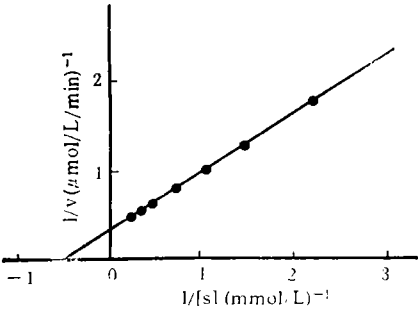


图 7 K_m 值的测定

Fig. 7 Lineweaver-Burk plots of AKP

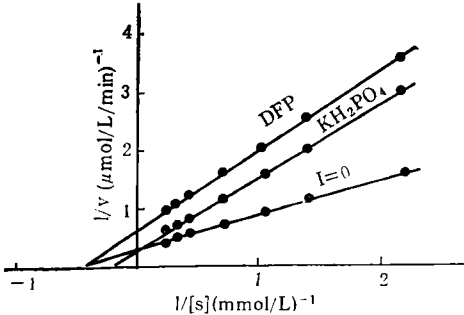


图 8 KH₂PO₄ 和 DFP 对酶的抑制类型

Fig. 8 Inhibition types of AKP by KH₂PO₄ and DFP

3 讨论

本实验证明, Ca²⁺ 的浓度为 0.95m mol/L 时, 可使 AKP 的活力提高 12%, 但浓度为 2.38m mol/L 时, 则对酶产生抑制, 使酶活降低 16%。这种现象正如沈同等^[12]指出的: “同一种酶由于激活剂浓度升高, 可以从被激活转化为被抑制”。笔者认为, 这种激活和抑制的转化, 除与激活剂的浓度有关外, 是否与不同生物材料来源的 AKP 的特异性有关, 有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 陈清西等. 文昌鱼 ALpase 底物特异性及其效应物对酶活力的影响. 厦门大学学报 (自然科学版), 1989, 28(1): 92—93。
 [2] 贾甲仁等. 广西眼镜王蛇毒中碱性磷酸酶的分离纯化与一些性质的研究. 生物化学与生物物理学报, 1986, 18(4): 320。
 [3] 蒋益众等. 高纯度、高活力碱性磷酸单酯酶的制备. 脏器生化制药, 1983, (1): 50—54。

- [4] 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—66。
- [5] 徐伟军等。用染料—配基亲和层析柱纯化碱性磷酸单酯酶。生物化学与生物物理学报, 1986, 18(5): 410—413。
- [6] 张龙翔等。生化实验方法和技术。北京: 人民教育出版社, 1982: 62—132。
- [7] 朱广廉等。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量。植物生理学通讯, 1982, (2): 43—47。
- [8] 上海市医学化验所。临床生化检验(上册)。上海: 上海科学技术出版社, 1979: 354—356。
- [9] 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(自然科学版), 1989, 14(3): 80—83。
- [10] Lowry O H, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265—275。
- [11] 蔡武城等。生物化学实验技术教程。上海: 复旦大学出版社, 1987: 184—208。
- [12] 沈同等。生物化学, 上册。北京: 人民教育出版社, 1981: 244。

THE KINETICS OF ALKALINE PHOSPHATASE FROM *LEIOCASSIS LONGIROSTRIS* GÜNTHER

Chen Dingfu

(Department of Biology, Southwest Teachers University, Chongqing 630715)

Abstract

Alkaline phosphatase (AKP) was purified from the liver of *Leiocassis longirostris* by a biochemical method. The purification multiple was 62.08 and the specific activity was 66.43 unit/mg protein. In PAGE and SDS-PAGE, the liver of *Leiocassis longirostris* AKP formed a single band. The optimum pH for the enzyme was pH10.05; when $7.0 > \text{pH} > 11$, it was unstable. The optimum temperature was about 40°C , it was unstable against heat. The K_m value was $1.82 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ with disodium phenyl phosphate as its substrate. The activator of the enzyme was Mg^{2+} , while the inhibitors were KH_2PO_4 , L-Cys, ME, DFP, and EDTA- Na_2 , KH_2PO_4 and DFP were selected for determining the types of inhibition and the results showed that KH_2PO_4 was a competitive inhibitor with the inhibition constant being 2.41m mol/L , and that DFP was a noncompetitive inhibitor with the inhibition constant being 1.01m mol/L .

Key words *Leiocassis longirostris* Günther, Liver, Alkaline phosphatase, Kinetics