

文章编号: 0438-0479(2004)05-0702-04

# 僧帽牡蛎碱性磷酸酶功能基团的研究

陈巧, 廖金花, 王勤, 陈清西\*

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 采用化学修饰法研究僧帽牡蛎碱性磷酸酶活性功能基团性质. 酶经  $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PCMB 修饰 30 min 后活力仍然保持不变, 提示巯基与酶的活力无关; 用二巯基苏糖醇(DTT)对酶进行修饰, 当 DTT 浓度达到  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 酶活力丧失 98%, 表明硫-硫键与酶活力有密切的关系; 以 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)修饰酶的色氨酸残基, 酶的修饰失活呈一级反应, 当 NBS 浓度达到  $0.65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 酶活力丧失 100%, 并辅以紫外吸收光谱的变化分析, 表明色氨酸残基是酶催化活力所必需的; 醋酸酐、马来酸酐、甲醛等氨基试剂对酶的修饰作用显示氨基是酶的必需基团.

**关键词:** 僧帽牡蛎; 碱性磷酸酶; 功能基团; 化学修饰

**中图分类号:** Q 556.1

**文献标识码:** A

了解酶活性中心功能基团的性质对于研究酶的结构和功能关系, 以及酶的催化作用机理具有重要意义. 应用化学修饰法改变酶分子侧链基团, 是探明酶活性部位的功能基团性质的一种行之有效的办法<sup>[1]</sup>. 现已发现许多特异性和非特异性的化学修饰剂, 并建立了一系列的测定手段, 这对于研究酶的结构与功能的关系具有重要的意义.

碱性磷酸酶(ALP)功能基团的研究, 在大肠杆菌<sup>[2]</sup>、小牛肠<sup>[3]</sup>、文昌鱼<sup>[4]</sup>、长毛对虾<sup>[5]</sup>、锯缘青蟹<sup>[6]</sup>等已有相关的研究报道, 但尚未有从僧帽牡蛎来源的 ALP 方面的研究. 本文在前文研究牡蛎 ALP 基本性质的基础上<sup>[7]</sup>, 通过对该酶活性基团进行化学修饰, 以及修饰后酶紫外光谱变化的研究, 探讨若干种氨基酸残基在该酶活性表现中的作用, 将所得结果与前人的结果进行比较和讨论.

## 1 材料和方法

僧帽牡蛎(*Ostrea cucullate*) ALP 按参考文献<sup>[7]</sup>

收稿日期: 2003-09-23

基金项目: 教育部跨世纪人才计划和厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放基金资助

作者简介: 陈巧(1959-), 女, 副教授, 访问学者. 现工作单位: 福建教育学院生化系.

\* Corresponding author, Tel: / Fax: 0592- 2185487,

E-mail: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

所述的方法提纯, 为电泳和层析单一纯. 对硝基苯磷酸二钠(pNPP)系 E. Merck 产品; 二巯基苏糖醇(DTT)系 Serva 产品; 对氯汞苯甲酸(PCMB)系 Roth 产品; N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)、醋酸酐、马来酸酐、甲醛为上海试剂厂产品. 其它试剂为国产分析纯. 试剂均用重蒸水配制.

酶的化学修饰所采用的条件详见结果部分. 修饰一定时间后, 取 20  $\mu\text{L}$  处理的酶液在正常反应体系下测定酶的剩余活力. 酶活力测定按陈清西<sup>[8]</sup>方法, 以 pNPP 为底物, 在 2 mL 反应体系中包含  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液(pH 10.0),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$  及  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pNPP, 加入 20  $\mu\text{L}$  酶液后于  $37^\circ\text{C}$  反应 10 min; 然后加入 2 mL NaOH 终止反应, 于 751 分光光度计测定波长为 405 nm 的光密度值, 消光系数按  $1.73 \times 10^4 (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm})^{-1}$  计算<sup>[9]</sup>.

酶的紫外吸收光谱在 Shimadzu UV-240 型分光光度计自动扫描记录.

## 2 结果与讨论

### 2.1 二硫键、巯基与酶活性的关系

用一定浓度的 DTT 在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  pH 9.92 碱性条件下, 于  $37^\circ\text{C}$  对牡蛎 ALP 修饰 20 min, 取出 20  $\mu\text{L}$  修饰的酶液在正常测活体系中检测酶的剩余活力. 结果表明, 酶活力随修饰剂浓度提高而下降. 当 DTT 浓度为  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 酶活力完全丧失(图 1A 线). PCMB 是常用于修

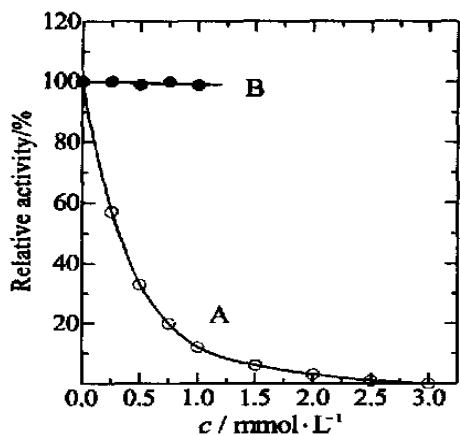


图1 DTT(A)与PCMB(B)对酶的修饰作用

Fig. 1 Modification of dithiothreitol (A) or *p*-chloromercuribenzoate (B) on the enzyme

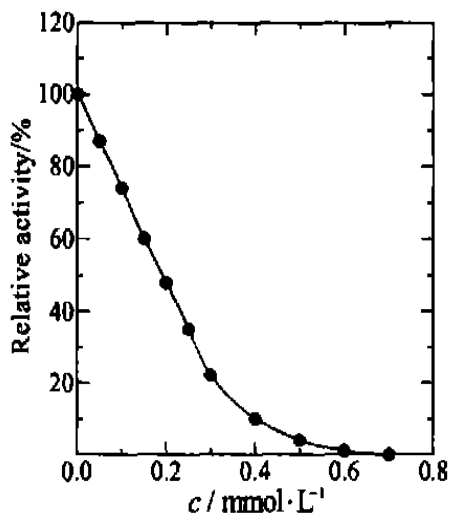


图2 NBS对酶的修饰作用

Fig. 2 Modification of *N*-bromosuccinimide on the enzyme

饰蛋白质分子巯基侧链的试剂<sup>[10]</sup>,采用此试剂在酸性条件下对酶进行修饰(修饰条件:酶与不同浓度PCMB在 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaAc-HAc缓冲液 pH 5.7,  $37^\circ\text{C}$ 作用30 min),观察酶活力的变化情况,结果表明,PCMB对巯基的修饰不影响酶活力(图1B线). DTT能把蛋白质中二硫键还原,从而导致蛋白质构象的变化,进而影响其结构与功能.用该试剂对僧帽牡蛎ALP进行化学修饰,可以使酶活力完全丧失.这表明二硫键与酶活力关系甚为密切,这与我们在文昌鱼ALP研究的结果一致<sup>[4]</sup>.用PCMB修饰僧帽牡蛎ALP的巯基,发现酶活力不受任何的影响.因此,我们认为巯基不是该酶的活性必需基团,这结果与文昌鱼ALP<sup>[4]</sup>以及锯缘青蟹ALP<sup>[6]</sup>研究的结果一致,而不同于鼠肠ALP<sup>[11]</sup>.可见,不同来源的ALP巯基的重要性不一样,这问题有进一步探索的必要.

## 2.2 NBS对酶分子的色氨酸残基的修饰

NBS在一定的条件下可作为修饰蛋白质中色氨酸残基的专一试剂<sup>[9,10]</sup>.用NBS在pH 5.7醋酸缓冲液中对酶进行修饰处理2 min.探讨色氨酸的吲哚基与酶活力的关系,结果(图2)表明,酶活力随NBS浓度增高而迅速下降, $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NBS可以导致酶活力下降50%,当NBS浓度为 $0.60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,酶活力完全丧失.这与文昌鱼、对虾及青蟹的碱性磷酸酶不同.文昌鱼的ALP被 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NBS修饰后,酶活被抑制23.8%<sup>[4]</sup>,对虾的ALP被NBS修饰后酶活力完全丧失<sup>[5]</sup>,而青蟹ALP被 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NBS修饰后,酶活力被抑制了90%<sup>[6]</sup>.NBS对酶的修饰作用,除了主要作用于色氨酸的吲哚基,还

能有效地作用半胱氨酸的巯基.从图1B线可见,巯基不是牡蛎碱性磷酸酶功能必需基团,即Cys残基与该酶的活性无关,因此,可以认为NBS修饰后酶活力的下降是由于色氨酸的吲哚基被修饰的结果.

## 2.3 NBS对酶修饰后紫外吸收光谱的变化

酶经NBS修饰后,在酶活力丧失的同时测定酶的紫外特征吸收光谱的变化情况,结果见图3,发现修饰后的酶在276 nm处的特征吸收峰随着修饰剂浓度的增大而逐渐下降至完全消失. Freisheim & Huennekens<sup>[12]</sup>用NBS修饰鸡肝二氢叶酸还原酶及 Viswanatha<sup>[13]</sup>用NBS修饰胰蛋白酶,研究酶分子中色氨酸残基与酶活力的关系时曾指出,NBS能选择地、定量地与蛋白质分子中色氨酸残基起反应,并伴随着276 nm紫外吸收率的下降.本实验结果,僧帽牡蛎ALP经NBS作用后,酶在活力丧失的同时,伴随着276 nm紫外吸收峰的下降直至完全消失(图3).这说明酶活力丧失与色氨酸残基被氧化的程度直接相关.由此,我们认为色氨酸残基是构成酶活性中心的必需基团之一.这一实验结果与在文昌鱼ALP<sup>[4]</sup>和锯缘青蟹ALP<sup>[6]</sup>中所观察到的现象相似.

## 2.4 氨基试剂对酶的修饰作用

用有代表性的可作用于氨基的试剂<sup>[4]</sup>:醋酸酐、马来酸酐、甲醛对酶进行化学修饰,探索其作用效果.修饰条件:醋酸酐对酶的乙酰化作用、马来酸酐

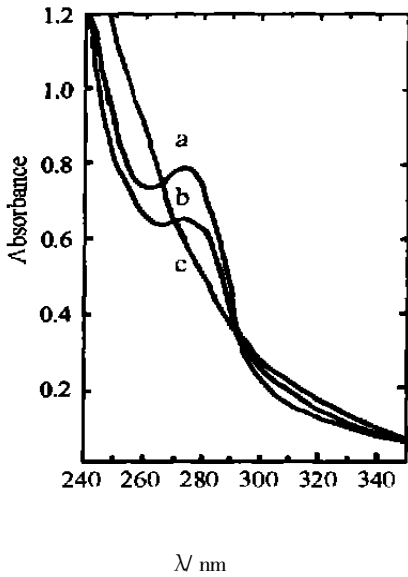


图3 酶活 NBS 处理后紫外吸收光谱的变化  
a: 对照; b: 0.15 mmol/L<sup>-1</sup>; c: 0.60 mmol·L<sup>-1</sup>  
Fig. 3 Changes of UV absorption of the enzyme by NBS

对酶的琥珀酰化作用是在 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液 pH 8.4, 于 1~ 2℃ 下进行的; 酶的甲醛反应是在 0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaAc-HAc 缓冲液 pH 5.7 于 1~ 2℃ 下进行的. 实验结果表明, 牡蛎 ALP 活力丧失都随着试剂浓度的增加而扩大. 酶经 0.6 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸酐处理 30 min 后, 活力损失 92.2%; 经 2.0 mol·L<sup>-1</sup> 甲醛作用 30 min, 酶活力完全丧失; 经 0.125 mol·L<sup>-1</sup> 马来酸酐处理 30 min 后, 酶活力下降 90%. 据此, 认为酶活性与氨基直接相关, 虽略有不同, 文昌鱼<sup>[4]</sup> 和青蟹的 ALP<sup>[6]</sup> 经 0.6 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸酐处理 30 min 后完全失活; 文昌鱼 ALP 经 3.0 mol·L<sup>-1</sup> 甲醛作用 30 min, 酶活力丧失 80%, 对虾 ALP<sup>[5]</sup> 经 0.4 mol·L<sup>-1</sup> 甲醛作用 30 min, 酶活力丧失, 而青蟹 ALP 经 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 甲醛作用 30 min, 酶活力丧失 100%, 但是这些结果都表明 ALP 的活性与赖氨酸残基的 ε-氨基有关.

### 2.5 甲醛对酶的修饰作用动力学

酶经甲醛修饰作用, 酶失活的程度因作用时间不同而有差异(图 4). 进一步研究甲醛对酶的修饰作用动力学, 表明酶的失活过程呈一级反应, 以半对数法作图(图 5), 从直线斜率可以求得酶经不同浓度的甲醛修饰的失活速度常数. 结果总结于表 1.

综上所述, 二硫键、赖氨酸残基、色氨酸残基是帽牡蛎 ALP 的必需基团. 然而, 这些基团的数目及其在酶分子催化过程中的作用机理还有待进一步探索.

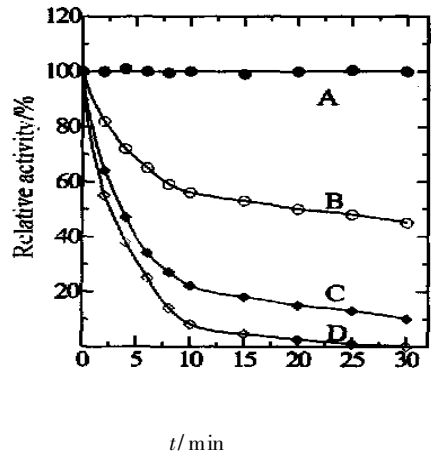


图4 甲醛对酶的修饰作用  
A~ D 甲醛浓度分别为 0、0.5、1.0 和 2.0 mol·L<sup>-1</sup>

Fig. 4 Modification of formaldehyde on the enzyme

表 1 牡蛎碱性磷酸酶在甲醛作用的失活速度常数  
Tab. 1 The inactivation constant of formaldehyde on the the alkaline phosphatase from *Ostrea cucullate*

甲醛浓度/(mol·L <sup>-1</sup> )	速度常数/s <sup>-1</sup>	剩余活力 <sup>#</sup>
0		100
0.5	1.15×10 <sup>-3</sup>	44.5
1.0	2.94×10 <sup>-3</sup>	10.0
2.0	6.11×10 <sup>-3</sup>	0

# : 作用时间 30 min.

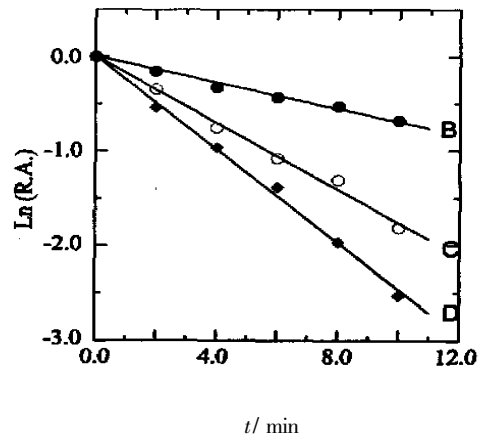


图5 甲醛对酶的修饰的失活速度常数测定  
B, C, D 甲醛浓度分别为 0、0.5、1.0 和 2.0 mol·L<sup>-1</sup>

Fig. 5 Detemination of the inactivation constant of formaldehyde on the enzyme

## 参考文献:

- [1] 周海梦, 王洪睿, 编著. 蛋白质化学修饰[M]. 北京: 清华大学出版社, 1998.
- [2] Rein T W, Wilson I B. E. Coli alkaline phosphatase[J]. The Enzymes. (ed. Boyer PD), 1971, 4: 373- 416.
- [3] Chappellet T D. Intestinal alkaline phosphatase catalytic properties and half of the sites reactivity[J]. Biochemistry, 1974, 13(9): 1 789- 1 795.
- [4] 陈清西, 颜思旭. 文昌鱼碱性磷酸酶的必需基团研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1986, 25(5): 568- 573.
- [5] 陈清西, 陈素丽, 朱凌翔, 等. 长毛对虾碱性磷酸酶功能基团的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35(4): 587- 591.
- [6] 陈清西, 郑文竹, 张, 等. 锯缘青蟹碱性磷酸酶活性功能基团的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, 36(1): 126- 130.
- [7] 陈巧, 陈清西, 林建城, 等. 僧帽牡蛎碱性磷酸酶性质的研究[J]. 台湾海峡, 2003, 22(4): 475- 481.
- [8] 陈清西, 张, 庄总来, 等. 锯缘青蟹碱性磷酸酶分离纯化及部分性质研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(4): 362- 367.
- [9] Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z, et al. Kinetics of inhibition of alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*) by N-Bromosuccinimide[J]. J. Protein Chem., 1996, 15(4): 345- 350.
- [10] Zheng Wen-zhu, Chen Qing-xi, Zhao Hong, et al. An essential tryptophan residue of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase[J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1997, 41(5): 951- 959.
- [11] Fishman W H, Ghosh N K. Influence of reagents reacting with metal, thiol amino sites on catalytic activity and L-phenylalanine of rat intestinal alkaline phosphatase[J]. Biochem J., 1967, 105: 1 163- 1 170.
- [12] Freisheim J H, Huenekens F M. Effect of N-Bromosuccinimide on trypsinogen and its derivatives[J]. Biochemistry, 1969, 8: 2 271- 2 276.
- [13] Viswanatha T. The action of N-Bromosuccinimide on trypsinogen and its derivatives[J]. Biochem, Biophys. Acta., 1960, 40: 2 16- 224.

## Studies on the Essential Groups of the Alkaline Phosphatase from *Ostrea cucullate*

CHEN Qiao, LIAO Jin-hua, WANG Qin, CHEN Qing-xi\*

(The Key Lab. of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The alkaline phosphatase from *Ostrea cucullate* were selectively modified by DTT, PCMB, NBS, acetic anhydride, succinic anhydride and formaldehyde, after that the changes in their activities have been detected. The enzyme was modified by PCMB in the concentrate of  $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 30 min, and the enzyme activity was not influenced, indicating that the-SH group is not essential to the enzyme's faction. Modification of dithiothreitol (DTT) on the enzyme resulted in 98% inhibition of the enzyme activity in the concentration of  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  of DTT. The result shows that the disulfide bonds are essential to the enzyme activity. By chemical modification with N-bromosuccinimide, the enzyme can be totally inactivated, followed by the UV absorption spectrum change, suggesting that the residue of tryptophan is essential for the activity and may be at the active site of the enzyme. The results of the chemical modification of the enzyme by acetic anhydride, succinic anhydride and formaldehyde demonstrate that the amino group is one of the enzyme's functional groups. Studies of inactivation of the enzyme by chemical modification demonstrated that Ser, Lys and Trp residues are essential functional groups of the enzyme. Partial disulfide bonds are essential for the function of this enzyme.

**Key words:** *Ostrea cucullate*; alkaline phosphatase; essential groups; chemical modification