

鲍鱼碱性磷酸酶的分离纯化和性质研究

廖金花, 陈巧, 林丽蓉, 洪燕飞, 陈清西*

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

摘要: 以杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 内脏为原料, 经 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 含 0.1 mol/L NaCl) 抽提, 正丁醇处理, 硫酸铵分级沉淀分离, DE-32 离子交换、Sephadex G-150 分子筛、DE-32 纯化, 得到电泳单一纯的碱性磷酸酶制剂, 比活力为 1 226 U/mg。酶学性质和动力学性质研究表明: 该酶催化对硝基苯磷酸水解反应的最适 pH 值为 10.08, 最适温度为 48 ℃。米氏常数 K_m 值为 0.80 mmol/L, V_m 值为 20.1 mmol/L · min⁻¹ (pH 10.0, 37 ℃)。酶的热稳定性研究表明: 该酶在 pH 7~11 区间和在温度低于 55 ℃ 下稳定。金属离子对酶活力的影响结果表明: Li⁺、Na⁺ 和 K⁺ 对酶活力没有影响, Mg²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺ 和 Co²⁺ 对酶有不同程度的激活作用, 而 Cu²⁺、Cd²⁺、Zn²⁺、Hg²⁺、Ag⁺、Bi²⁺ 和 Pb²⁺ 等对酶起抑制作用。

关键词: 杂色鲍; 碱性磷酸酶; 分离纯化; 酶活性; 稳定性; 金属离子

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)02-0272-04

碱性磷酸酶 (EC 3.1.3.1, 简称 ALP) 是一种膜结合蛋白, 在生物体内直接参与磷酸基团的转移和代谢的生理过程, 它与海水中磷质与钙质的吸取、磷酸钙的生成、甲壳素的形成和分泌直接相关, 且参与体内的钙磷代谢, 维持体内适宜的钙磷比例相关^[1]。目前我国学者已对多种贝类的 ALP 进行了研究^[2~4], 对鲍鱼的研究未见报道。以鲍鱼为试验材料, 分离纯化了 ALP, 研究其酶学性质, 对深入探讨该酶在磷代谢中的作用、研究酶活力的调控机理及酶的分子构象与活力的关系, 及了解 ALP 与鲍鱼生长及发病的关系, 对人工养殖鲍鱼具有重要的指导作用和实际应用意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲍鱼 (*Haliotis diversicolor*) 采自同安养殖场。对硝基苯磷酸二钠 (pNPP) 为 E. Merck 产品; 二乙基氨基纤维素 (DE-32) 为 Whatman 产品; 葡聚糖凝胶 (Sephadex G-150、G-200) 系 Pharmacia 产品; SDS-PAGE 电泳低分子量标准蛋白质, 对硝基苯磷酸 (pNPP) 为 GIBCO 产品; 甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 为 Fluka 产品; 两性电解质载体 (Amphalime pH 3~9) 为上海丽珠东风生物技术有限公司产品; 丙烯酰胺 (Acr)

等为上海试剂一厂产; 其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

酶的分离纯化: 按参考文献[1]的方法, 以鲍鱼内脏及壳膜为材料, 采用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 含 0.1 mol/L NaCl) 抽提、硫酸铵分级分离获得粗酶制剂。进一步采用 DE-32 离子交换柱层析、Sephadex G-150 分子筛凝胶过滤柱层析纯化。酶蛋白的纯度鉴定采用 PAGE 电泳, 分离胶浓度为 8% Acr-0.184% Bis Tris-HCl buffer (pH 8.9), 浓缩胶浓度为 2.5% Acr-0.625% Bis Tris-HCl buffer 含 20% 蔗糖 (pH 6.7), 蛋白带检测采用考马斯亮兰染色法。

ALP 活性的测定: 参考文献[1]方法, 在 2 mL 的反应体系中, 包含 0.05 mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液 (pH 10.0), 1.0 mmol/L MgCl₂ 及 5 mmol/L 的 pNPP, 在 37 ℃ 下, 加入 10 μL 酶液, 准确反应 10 min, 然后用 2 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液终止反应, 用 722 光栅分光光度计在 405 nm 下测定吸光值。产物的摩尔消光系数按 17 300 (mol · L⁻¹ · cm)⁻¹ 计算^[5]。酶活力单位的定义为, 在上述条件下, 每升溶液每分钟催化底物水解产生 1 μmol 产物的酶量。比活力的定义为, 每毫克酶蛋白所具有的活力单位数。

蛋白质浓度的测定按 Lowry 法^[6]测定蛋白质浓度, 以牛血清白蛋白为对照。分子量采用 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析法测定, 亚基数及其分子量采用 SDS-PAGE 电泳测定^[7]。

2 实验结果与讨论

2.1 酶的分离纯化及纯化结果鉴定

收稿日期: 2004-03-10

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目, 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室开发课题

作者简介: 廖金花 (1980-), 女, 硕士研究生。

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

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

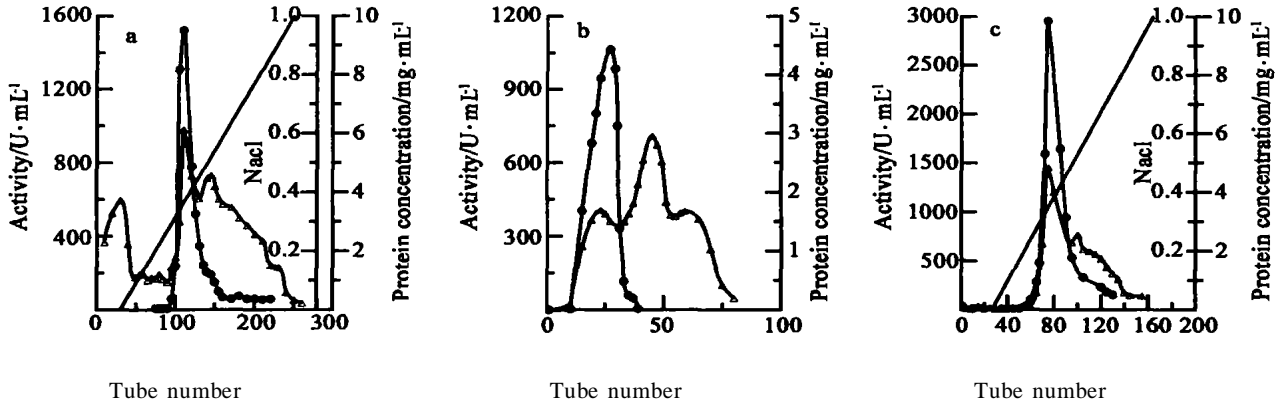


图 1 鲍鱼 ALP 分离纯化的洗脱图谱

--- 酶活力; --- 蛋白浓度; NaCl 浓度梯度

Fig. 1 Chromatography of alkaline phosphatase from *Haliotis diversicolor*

(a) DEAE-cellulose (DE-32); (b) Sephadex G-150; (c) DEAE-cellulose

从鲍鱼内脏及壳膜分离提取 ALP 粗酶制剂,经 DE-32、Sephadex G-150 和再次 DE-32 柱层析纯化,洗脱图谱见图 1. 得到比活达 1 226 U/mg, 纯化了 74.1 倍的酶液.

经上述几步纯化的酶制剂经聚丙烯酰胺凝胶电泳得到单一条带,如图 2a 所示,表明该酶制剂已达到电泳单一纯. 纯酶经 SDS 平板电泳鉴定为单一蛋白带,见图 2b. 从标准样品蛋白的迁移率,求得酶分子的亚基分子量约为 92 kD. 全酶分子量采用 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析法测定,求得全酶的分子量约为 180 kD. 说明该酶是二聚体酶,含有两个同型的亚基.

2.2 酶催化 pNPP 水解的动力学特征

在 37 °C, pH 10.0 的测活体系中,测定不同底物浓度下的初速度(v_0),以 v_0 对 $[S]$ 作图(图 3). 说明该酶符合米氏动力学. 以 $1/v_0$ 对 $1/[S]$ 作图(见图 3

的内插图),求得该酶催化 pNPP 水解的 K_m 和 V_m 分别为 0.80 mmol/L 和 20.1 $\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}^{-1}$.

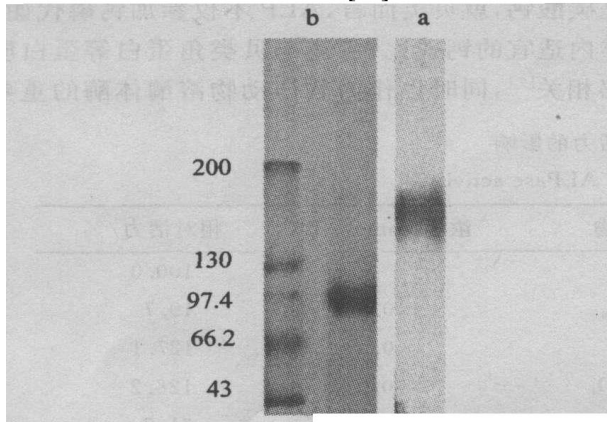
2.3 pH 对酶活力和稳定性的影响

在 37 °C 的测活体系中,改变缓冲液的 pH 值,测定 pH 对酶催化 pNPP 水解的酶活力的影响,结果见图 4. 酶活力对反应的 pH 作图,得到一个钟罩形曲线,求得该酶催化反应的最适 pH 值为 10.08.

将酶液与不同 pH 值的缓冲液置于 3~4 °C 下处理 24 h,然后取出 50 μL 处理的酶液在 pH 10.0, 37 °C 的测活体系中测定酶活力,以酶活力对 pH 作图(图 4b). 表明该酶在 pH 7 至 pH 11 区间较稳定,而在 pH 低于 6.0 或高于 12.0,酶很不稳定,活力迅速丧失.

2.4 温度对酶活力和稳定性的影响

在 pH 10.0 的测活条件下,改变测活条件的反应温度,研究温度对酶活力的效应,结果见图 5,酶活力与反应温度作图为一个钟罩形曲线,求得该酶催化反



Marker(kDa) 样品

图 2 鲍鱼 ALP 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(a)和 SDS-PAGE 凝胶电泳(b)

Fig. 2 The PAGE (a) and SDS-PAGE (b) of alkaline phosphatase from *H. Diversicolor*

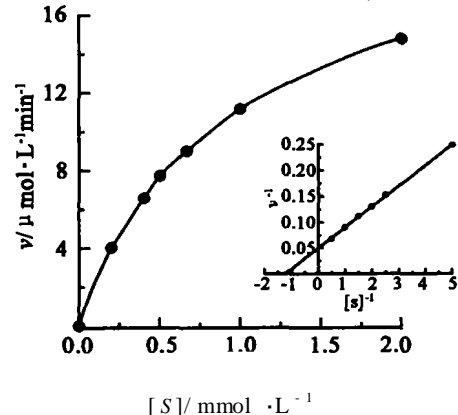


图 3 底物浓度对鲍鱼 ALP 活力的影响
内插图为 Lineweaver-Burk 作图

Fig. 3 Effect of substrate concentration on the activity of ALP

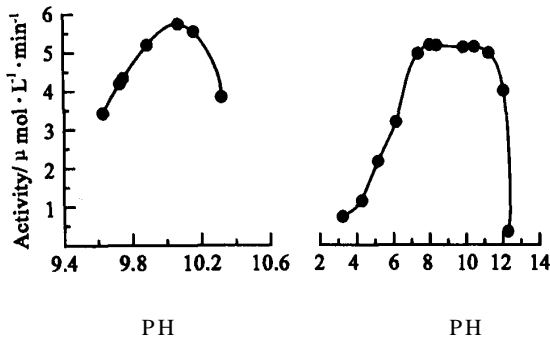


图 4 鲍鱼碱性磷酸酶的最适 pH(a) 和 pH 稳定性(b)
Fig. 4 Effect of pH (a) on ALP activity and effects of pH on ALP stability (b)

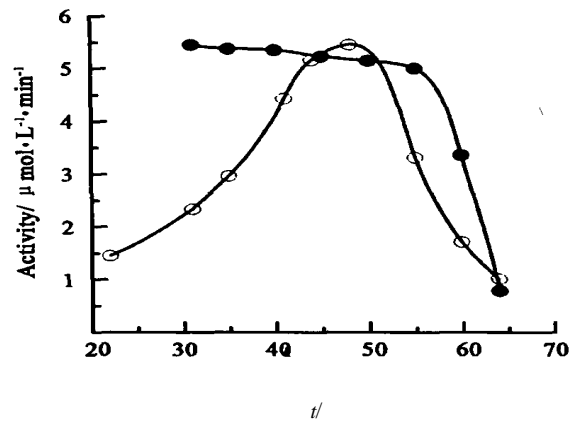


图 5 鲍鱼 ALP 的最适温度 a 和温度稳定性 b
Fig. 5 Effect of temperature (a) on ALP activity and effects of temperature on ALP stability (b)

应的最适温度为 48 ,取一定量的酶液在不同温度下保温 30 min,然后迅速冷却到室温.取出 20 μL 热处理的酶液在正常的测活体系(pH 10.0,37)检测酶的剩余测活,以酶活力对温度作图(图 5b).实验表明酶在 55 以下热变性 30 min,酶活力基本保持不变,在 55 以上酶活力开始下降,随着处理的温度升高,酶活力呈快速下降,64 处理 30 min,酶活力丧失 90 %,68 处理后酶活力完全丧失.

2.5 金属离子对酶活力的影响

在不含 Mg²⁺ 的测活体系中,加入不同浓度的金属离子,在 37 测定酶活力,观察各种金属离子对酶活力的影响,结果见表 1. NaCl、NaNO₃、Na₂SO₄、Li₂SO₄、KCl 等无机盐浓度达 30 mmol/L,酶活力基本不变,说明一价碱金属离子及相应的酸根离子对酶活力都没有效应. MgSO₄、Ca(NO₃)₂、BaCl₂、CoCl₂、MnSO₄ 对酶有不同的激活作用,其中以 Mg²⁺ 最为显著,5 mmol/L Mg²⁺ 可以使酶活力提高 4 倍.而 ZnSO₄、CdCl₂、CuSO₄、AgNO₃、Pb(NO₃)₂、HgCl₂ 等无机盐对该酶活力有不同程度的抑制作用,以 Hg⁺ 的抑制最为显著,0.2 mmol/L 可以使酶活力完全丧失.

3 讨论

ALP 的酶学特性因动物种属不同而异,我们的实验结果表明,鲍鱼 ALP 的最适温度为 48 ,与其它动物来源的酶有一些差异,背角无齿蚌的酶为 40^[2]、合浦珠母贝的酶为 45^[3]、锯缘青蟹的酶为 52^[1]. 鲍鱼 ALP 的最适 pH 值为 10.08,这与其它动物也有差异^[1~4],说明不同种类动物的 ALP 性质并不完全相同.以 pNPP 为底物,测得鲍鱼 ALP 的 K_m 值为 0.80 mmol/L,与文献报道的其它动物来源的酶不同^[1~4],反映了不同物种中的 ALP 的催化能力有差异.

ALP 是生物体内一种重要的代谢调控酶.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.海洋贝类的贝壳主要成分是碳酸钙,就贝类而言,ALP 不仅参加钙磷代谢,维持体内适宜的钙磷比例,还与贝类角蛋白等蛋白质的分泌相关^[7],同时也作为软体动物溶酶体酶的重要组成部分,在免疫反应中发挥作用^[8,9].鲍鱼 ALP 对

表 1 金属离子对鲍鱼 ALP 活力的影响

Tab. 1 Effects of metal ions on the ALPase activity

化合物	浓度/ mmol · L ⁻¹	相对活力/ %	化合物	浓度/ mmol · L ⁻¹	相对活力/ %
对照		100.0	对照		100.0
NaCl	30.0	101.0	ZnSO ₄	0.2	19.7
NaNO ₃	30.0	101.5	CoCl ₂	0.2	127.1
Na ₂ SO ₄	30.0	98.9	MnSO ₄	0.2	126.2
LiSO ₄	30.0	99.4	CdCl ₂	0.2	71.7
KCl	30.0	103.1	CuSO ₄	0.2	57.1
MgSO ₄	5.0	500.5	AgNO ₃	5.0	65.2
Ca(NO ₃) ₂	5.0	172.0	Pb(NO ₃) ₂	5.0	74.3
BaCl ₂	5.0	140.3	HgCl ₂	0.2	1.5

海水中钙质的吸取,磷酸钙的形成等生长代谢过程均具有重要作用.有研究表明鲍鱼壳中的磷的含量随鲍鱼的生长而增加,缺磷会对鲍鱼贝壳的形成造成影响,因此 ALP 作为鲍鱼重要的代谢酶之一,与鲍鱼的生长发育密切相关. ALP 是一金属酶,对于金属酶而言,不同的金属离子对它的影响不同.而有影响的金属离子对酶的结构和功能所起的作用也不同.经试验表明,一价金属离子对鲍鱼的 ALP 的活力没有影响.这与青蟹 ALP^[10]得出的结果相同.可能是因为这些离子都是海水中常见的,经过长期进化适应,一价金属离子对 ALP 的结构和功能不会造成大的影响.二价金属离子和过渡金属有的起激活作用,有的起抑制作用.重金属离子对鲍鱼 ALP 起抑制作用.如果鲍鱼因为疾病或者所处环境受到污染,如金属离子污染^[11,12],其 ALP 活性必定受到影响,可以通过监测鲍鱼 ALP 活性的变化,及时反映鲍鱼健康状况,预测和预防鲍鱼疾病的发生,并可以对海水的重金属离子等污染物进行监测,对指导鲍鱼的养殖具有重要的意义.

参考文献:

- [1] 陈清西,张喆,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.
- [2] 张洪渊,刘克武,石安静,等.背角无齿蚌碱性磷酸酶的分离纯化及其动力学研究[J].水生生物学报,1996,20(1):57-61.
- [3] 谢莉萍,林静瑜,肖锐,等.合浦珠母贝碱性磷酸酶的分离纯化与性质研究[J].海洋科学,2000,24(10):37-39.
- [4] 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):475-479.
- [5] 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.
- [6] Lowry O H. Protein measurement with the Folin-phenol reagent[J].J. Biol. Chem., 1951,193:265-269.
- [7] 刘晓雯,刘克武,闵丽娥,等.黑眉锦蛇小肠碱性磷酸酶的分离纯化及其部分性质研究[J].四川大学学报(自然科学版),2001,38(5):732-737.
- [8] 陈竞春,石安静.贝类免疫生物学研究概况[J].水生生物学报,1996,20(1):74-78.
- [9] 周永灿,潘金培.贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J].水产学报,1997,21(4):449-454.
- [10] Chen Q X,Zheng W Z, Lin J Y,et al. Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase [J]. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 2000(32):879-885.
- [11] Anan Y, Kunito T, Ikemoto T, et al. Elevated concentrations of trace elements in Caspian seals (*Phoca caspica*) found stranded during the mass mortality events in 2000 [J]. Archives of Environ Mental Contamination and Toxicology, 2002, 42:354-362.
- [12] Mora S D, Sheikholeslami M R, Wyse E, et al. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea [J]. Marine Pollution Bulletin, 2004, 48:61-77.

Purification and Characterization of Alkaline Phosphatase from *Haliotis diversicolor*

LIAO Jin-hua, CHEN Qiao, LIN Li-rong, HONG Yan-fei, CHEN Qing-xi*

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

Abstract: An alkaline phosphatase was purified from *Haliotis diversicolor* by following procedures: Tris-HCl buffer (pH 7.5) extraction, n-butanol disposal, ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography on DE-32 cellulose, then by gel filtration through Sephadex G150 following again ion-exchange chromatography on DE-32. The final preparation was homogeneous on PAGE and SDS-PAGE. The specific activity of the enzyme was 1 226 U/mg. The optimum pH is 10.08, and the optimum temperature is 48 °C for the hydrolysis of pNPP. Michaelis-Menten constant (K_m) is 0.8 mmol/L and the maximum velocity (V_m) is 20.1 mmol/L · min⁻¹ at pH 10.0 and 37 °C. The enzyme is stable in the range of pH from 7 to 11 and in temperature below 55 °C. A survey of effects of metal ions on the enzyme showed that the positive monovalent metal ions (Li⁺, Na⁺ and K⁺) have no effect on the enzyme; positive bivalent metal ions (Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺ and Co²⁺) activate the enzyme, Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Ag⁺, Bi²⁺ and Pb²⁺ inhibit the enzyme. The inhibition effect of Hg²⁺ is strongest. When the concentration of Hg²⁺ come to 0.2 mmol/L, the ALP is complete inactivation. The result indicates that different metal ions have different effect on the ALP. The study of ALP from *Haliotis diversicolor* may give some help to *Haliotis diversicolor*'s culture.

Key words: *Haliotis diversicolor*; alkaline phosphatase; purification; activity; stability; metal ions