

长毛对虾酸性磷酸酶的纯化与性质^①

陈素丽 陈清西 胡天惠 公磊 颜思旭

(厦门大学生物学系 厦门 361005)

摘要 分别从健康和患病长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)肌肉提取一种酸性磷酸酶(ACPase, EC. 3. 1. 3. 2.), 进一步用硫酸铵分级分离, Sephadex G-200 柱纯化, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并于 Beckman DU-8B 紫外分光光度计扫描为单一区带酶液。该酶紫外吸峰在 280 nm 处, 荧光激发峰在 284 nm 处, 发射峰在 347 nm 处。酶的分子量为 73 000 道尔顿, 等电点为 4.7 酶水解对硝基苯磷酸二钠(PNPP)最适 pH 为 4.5, 最适温度 40 。健康虾与病虾酶的活化能分别为 41.03 kJ/mol · L 和 45.78 kJ/mol · L, 米多常数 k_m 值分别为 0.80×10^{-4} mol/L 和 1.43×10^{-4} mol/L。重金属离子 Cu^{2+} , Hg^{2+} , 有机溶剂甲醇, 乙醇, 乙二醇等对 ACPase 有明显的抑制作用。

关键词 长毛对虾, 酸性磷酸酶, 纯化与性质

中国图书分类号 Q 556.1

酸性磷酸酶广泛存在于生物界, 从低等生物大肠杆菌, 酵母到高等动植物组织, 体液以及人类肝脏、前列腺等都发现有 ACPase 的存在^[1-5]。ACPase 与物质代谢关系密切, 通过催化蛋白的水解, 在细胞调节过程中起着重要的作用。对虾经济价值高, 我国沿海养殖面积超过 $1.5 \times 10^5 \text{ km}^2$, 1992 年前, 年产量达 20 万 t, 一度使我国成为第一养虾大国, 由于近几年来虾病暴发大流行, 至 1994 年, 产量仅为 6 万 t, 造成巨大的经济损失, 许多科研部门已经开展虾病的病原, 病理以及防治技术的研究, 而对虾生物化学方面的研究却很少涉及。本文通过对健康和患病对虾酸性磷酸酶的比较研究, 探索酸性磷酸酶的活动; 理化性质及动力学特征与虾病的关系, 以祈为虾病的监测提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

厦门海区养殖长毛对虾(*Penaeus penicillatus*), Sephadex G-100, G-200, 为 Pharmacia 产品, 纤维 DEAE-32 为 Sigma 产品, CM-52 为 Whatman 产品, 对硝基苯磷酸二钠(PNPP)为德国 E. Merck 产品, 丙烯酰胺为 Serva 产品, 其余试剂为我国分析纯。试液均用双重蒸馏水配制。

1.2 方 法

实验过程中各试剂均以终浓度计算

酶活力及酶蛋白浓度测定: 酶活力测定以 2 mmol/L 对硝基苯磷酸二钠(PNPP)为底物, 0.1 mol/L Nac-HAc pH4.5 缓冲液, 37 反应 20 min, 用 0.2 mol/L NaOH 终止反应, 于 721-

型分光光度计 405 nm 处测定 OD 值。蛋白浓度测定以牛血清蛋白为标准蛋白, 采用 Lowry 法^[6]及 UV-240 型紫外分光光度计于 280 nm 处测定吸收值。

酶的分离提纯参照文献[7], 步骤如下:

1) 对虾肌肉 洗净, 称重, 按 1 : 5 (W : V) 加入 0.01mol/L pH5.0 NaAc-HAc 缓冲液(含 30% 甘油, 5 mmol/L 巯基乙醇 ME), 高速匀浆 1.5 min, 置冰箱 4 h, 隔时搅匀, 4 , 8 000r/min 离心 20 min。

2) 上清液 用 1 mol/L HAc 调 pH 至 5.0, 4 , 8 000r/min 离心 20min

3) 上清液 加(NH₄)₂SO₄ 至 0.8 饱和度, 置冰箱过夜, 4 , 12 000r/min 离心 30min。

4) 沉淀 溶于 0.1mol/L pH5.0NaAc-HAc 缓冲液中(含 2mmol/L ME) 对 0.005mol/L pH5.0 NaAc-HAc 缓冲液(含 2mol/L ME, 0.5% NaCl) 透析, 除尽 SO₄²⁻, 于 4 , 20 000r/min 离心 30min。

5) 酶制剂 Sephadex G-200 柱(2.5 × 78cm) 纯化, 以 0.1mol/L, pH5.0 NaAc-HAc(含 2mmol/L ME) 洗脱, 每管 3ml, 流速 0.4 ml/min。

6) G-200 柱酶(1) 各收集管分别于 UV-240 型紫外分光光度计 280 nm 处测定蛋白吸收值, 同时测定酶活力, 活力峰部分的酶液集中浓缩后, 再经 Sephadex G-200 柱纯化一次。

7) G-200 柱酶(2) 各收集管同上步骤, 分别测定蛋白浓度及酶活力, 酶液经聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳, 胶带于 Beckman DU-8B 扫描得单一区带。酶液于 UV-240 型紫外分光光度计扫描(200 ~ 600 nm) 结果于 280 nm 处为蛋白最大吸收峰。

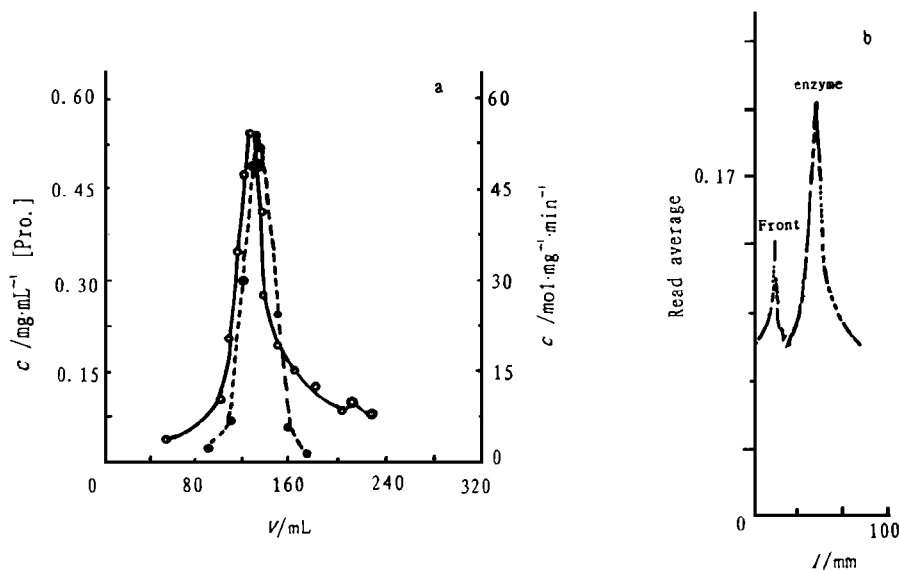


图 1 酶的分离提纯

a Sephadex G-200 柱分离提纯洗脱图(虚线: 酶比活力; 实线: 蛋白浓度; pH= 5.0)

b 聚丙烯酰胺圆盘电泳区带 Beckma Du-8B 扫描图(λ= 500 nm)

Fig. 1 Purification of ACPase

2 结果与讨论

酶的分离提纯 从健康和患病对虾肌肉分别提取 ACPase, 经硫酸铵分级分离后获得的酶制剂, 再经 Sephadex G-200 柱两次纯化, 结果如图 1 a, b。粗酶液纯化过程中, 我们同时采用纤维素 CM-52 和 DEAE-32, 离子交换层析柱纯化, 但纯化条件有待进一步改善, 本文采用 Sephadex G-200 柱两次纯化。

酶的光谱特征 纯化的 ACPase 在岛津 UV-240 型双光速分光光度计于 200 ~ 600 nm 波长扫描的紫外吸收峰在 280 nm 处。于日立 F-4010 型荧光分光光度计测定酶的荧光光谱, 结果表明: 该酶的荧光激发波长在 284 nm 处, 在 284 nm 波长激发下, 酶的荧光发射峰在 347 nm 处。

酶的分子量测定 采用 Sephadex G-200 分子筛凝胶层析(柱 2.5×78 cm), 洗脱液为 0.1 mol/L, pH 5.0 NaAc-HAc 缓冲液(含 2 mmol/L ME), 分别测定已知分子量的标准蛋白: 牛乳酸脱氢酶(BLD, 136 000), 牛血清蛋白(BAS, 67 000), 卵清蛋白(OA, 45 000), 糜蛋白酶(CHy, 25 000), 未知分子量酶的柱脱体积(V_e)及兰色葡聚糖洗脱体积(V_o), 以 V_e/V_o 对蛋白质分子量以数($\log MW$)作图, 得一直线(图 2), 未知酶蛋白分子量从图中求得, 结果表明, 健康虾与病虾 ACPase 分子量均为 73 000 道尔顿。

酶的基本性质 应用等电聚焦法测定酶的等电点(PI), 结果表明, 等电聚焦后的酶蛋白带与酶活力峰位置重合, 健康虾与病虾 ACPase 的等电点均为 pH 4.7 在不同 pH 的 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲体系中, 以对硝基苯磷酸二钠(PNPP)为底物, 37 °C 下测定 pH 对酶活力的影响, 以酶的相对活力对 pH 作图, 求得酶的最适 pH 为 4.5。在酶的最适 pH 下, 测定不同温度对酶活力的影响, 以酶活力对温度作图求得最适温度为 40 °C。在不同温度下, 将酶分别

预处理 5, 10, 20, 30 min, 然后迅速冷却至室温, 在 37 °C 下测定酶的剩余活力, 以天然酶活力为 100%, 结果表明, 在 30 °C, 酶活力变化不大, 40 °C 下, 酶活力最终降到 70%, 50 °C 下处理 5 ~ 10 min, 酶剩余活力为 30% ~ 22%, 20 min 后, 酶活力降至 10%, 60 °C 下, 5 min 内酶力迅速丧失(图 3)。健康虾与病虾 ACPase 对热稳定性基本规律相同。根据不同温度测得的酶催化初速度, 求得温度系数 Q_{10} (30 ~ 40 °C) 分别为 1.88 和 1.36。在不同温度下, 相同测活体系中(含 0.1 mol/L pH 4.5 NaAc-HAc), 改变底物浓度测定酶催化反应动力学常数, 根据 Arrhenius 公式,

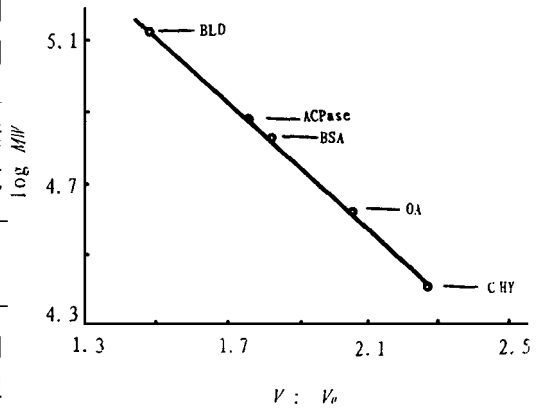


图 2 长毛对虾酸性磷酸酯酶分子量的测定

Fig. 2 Molecular weight determination of ACPase by filtration on Sephadex G-200

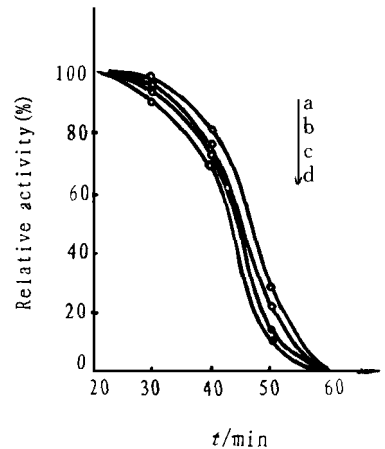


图 3 酶对热的稳定性(30 ~ 60 °C) 保温时间(min): a= 5, b= 10, c= 20, d= 30

Fig. 3 The heat resistance of ACPase

以最大反应速度 $\log V_m$ 对 $1/T$ 作图得一直线(图4)求得该酶活化能,健康虾为 41.03kJ/mol ,病虾为 45.78kJ/mol ,结果表明,对虾 ACPase 活化能,健康虾低于病虾,这可能由于病变,病虾酶分子有所变化,导致活化能上升,对酶的催化反应有所影响。在 37°C , $\text{pH}4.5$, 0.1mol/L NaAc-Hac 缓冲体系中,取不同浓度的 PNPP 测定酶促反应初速度,以酶促反应初速度对底物浓度作图呈双曲线,表明酶促反应遵循 Michaelis-Menten 方程,以 Lineweaver-Burk 双倒作图得一直线,求得该酶水解 PNPP 的米氏常数 k_m 值健康虾为 $0.80 \times 10^{-4}\text{mol/L}$,病虾为 $1.43 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 。病虾肝胰腺为 $2.03 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 。改变底物浓度,测得各 pH 值条件下的 K_m 值,然后以 K_m 值负对数($\log K_m = pK_m$)对 pH 作图,求出该酶活性中心可解离基团的 pK 值为 4.1 (健康虾及病虾酶)该 pK 值接近 β 或 γ -COOH 的 pK 值。该基团或其他基团与酶活力关系还需进一步研究。

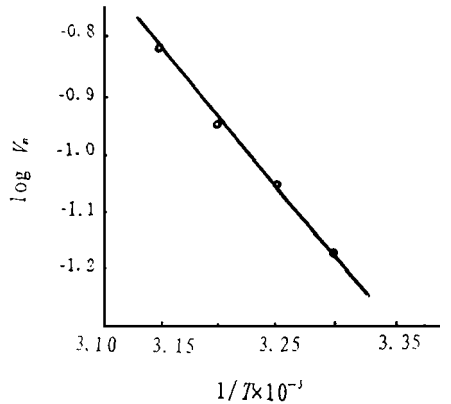


图4 酶的活化能测定

Fig.4 The activation energy of ACPase

金属离子对酶活力的影响 将酶与不同浓度的几种金属离子 37°C 保温 10min ,在相同测活体系中测其剩余活力,以正常酶促活力为 100% ,实验结果表明,重金属离子 Cu^{2+} , Hg^{2+} 对 ACPase 呈强烈抑制,其浓度达 0.5mmol/L 时,健康虾酶剩余活力的 7% 和 4% ,病虾为 64% 和 5% ,健康虾酶对金属离子的敏感性大于病虾。

有机溶剂对酶活力的影响 取不同浓度的甲醇、乙醇、乙二醇分别与一定量的酶于 37°C 保温 10min ,测其剩余活力,以正常酶促活力为 100% 。结果表明,以上三种有机溶剂对 ACPase 都有明显的抑制作用,其中甲醇 20% ,乙二醇浓度达 40% ,健康虾与病虾酶活力全部丧失。在 5% 甲醇和乙醇及 $10 \sim 30\%$ 乙二醇浓度作用下,健康虾酶对有机溶剂的敏感性大于病虾。

酸性磷酸酶的活力变化常被用于检测生物体内某些器官的病变情况,比较健康虾与病虾 ACPase,二者大部分基本性质一致,如等电点,分子量,最适 pH,热稳定性等,但健康虾具有较小的 K_m 值,表明酶与底物的亲和力较好,这与其活化能较小相一致,这可能病虾酶构象发生某些变化,不利于酶与底物的结合。另一方面健康虾酶对某些化学试剂(如溴乙酸,对氯汞苯甲酸等),重金属离子(如铜、汞等)及有机溶剂(如甲醇、乙醇、乙二醇等)的敏感性大于病虾,这从另一侧面揭示了养殖环境受到污染时,可能影响了酶构象,进而影响生物体正常的代谢活动及健康程度。有关环境因素,酶活力,构象与虾病的相关性,我们将进一步深入研究。

杨佩真,林达挺,丘文杰,李昀同志参加部分实验工作。

参 考 文 献

- 1 Dexter R et al. Acid phosphatases of *E. coli*. *Arch Biochem. Biophys.*, 1960, 89: 97 ~ 104
- 2 Yukio Y et al. Two acid phosphatases in sea urchin eggs and embryos. *Comp. Biochim. Physiol.*, 1984, 79B (1): 17 ~ 22
- 3 Hanna J et al. Catfish liver acid phosphatases: Differently glycosylated enzyme molecules with altered kinetic properties. *Com. Biochim. Biophys.*, 1986, 85B(4): 753 ~ 758
- 4 Helen R R et al. Studies on A phosphoprotein phosphatase derived from beef spleen *Biochemica. Biophys Acta*, 1960, 43: 465 ~ 476
- 5 Hansoo L T et al. Hmodimer and heterodimer subunits of human prostate acid phosphatase. *Biochem. J.*, 1991, 277: 759 ~ 765
- 6 Lowry C H et al. Protein estimation with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265 ~ 275
- 7 陈素丽等.文昌鱼酸性磷酸酶的分离提纯及性质的研究.厦门大学学报(自然科学版), 1985, 24(1): 84 ~ 90

Purification and Properties of Acid Phosphatase from *penaeus Penicillatus*(Alcock)

Chen Suli Chen Qingxi Hu Taihui Gong Lei Yan Sixu
(Dept. of Biol. Xiamen Univ, Xiamen 361005)

Abstract Acid phosphatase(E. C. 3. 1. 3. 2.) was isolated from healthy and sick *Penaeus penicillatus* (Alcock), respectively, and purified by ammonium sulfate fractionation. Sephadex G-200 gel filtration column. The purified enzyme sample was shown to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis and Bechman DU-8B scanning. Its characteristic peak of UV-absorption spectrum presents at 280 nm, the fluorescence excitation spectrum at 284 nm and the fluorescence emission band at 347 nm. The molecular weight has been measured to be 73 000 dalton by means of Sephadex G-200 gel filtration, and the isoelectric point (pI) is 4.7 by isoelectric focusing electrophoresis. For hydrolysis of sodium p-nitrophenylphosphate by the enzyme, the optimum pH is 4.5 and the optimum temperature is at 40 °C. The activation energy of the enzyme from the healthy shrimp and the sick are 41.03 KJ/mol · L and 45.78 KJ/mol · L, respectively. At pH 4.5, 37 °C, the Michaelis constant (K_m) of each is 0.80×10^{-4} mol/L and 1.43×10^{-4} mol/L, respectively. The enzyme activity is markedly inhibited by copper ion, mercury ion, methanol, ethanol and ethylene glycol.

Key words *Penaeus penicillatus*, Acid phosphatase, Purification, Properties