

SDS 变性剂对杂色鲍碱性磷酸酶的 活力与构象的影响*

洪燕飞^{1,2}, 廖金花¹, 吴国欣², 陈清西¹

(1. 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; 2 福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007)

摘要:以十二烷基磺酸钠 (SDS) 为变性剂, 研究其对杂色鲍碱性磷酸酶 (ALP) 活力的影响, 结果表明酶的剩余活力随着 SDS 浓度增高而下降, 但当下降到 67% 时, 随着 SDS 浓度增高, 酶活力几乎不再发生明显变化. 这说明杂色鲍 ALP 对 SDS 具有高度的耐受性. 研究 SDS 对杂色鲍 ALP 的 pH 稳定性的影响, 发现该酶的 pH 稳定性区域由 5.9~10.0 区域漂移到 7.6~10.6 区域, 显示酶的 pH 稳定性往碱性区域偏移. 进一步以荧光和紫外光谱为监测手段, 研究杂色鲍 ALP 经 SDS 微扰后的分子构象变化情况. 其结果表明随着 SDS 浓度增高, 荧光发射强度逐渐发生变化, 但发射峰未发生明显变化; 紫外吸收强度发生变化, 但吸收峰也未发生明显变化. 这说明该酶活性中心对 SDS 变性剂并不敏感. 这在以往文献中未见过报道.

关键词: 海洋生物; 碱性磷酸酶; 实验研究; 杂色鲍; 酶活力; SDS 构象; 变性剂

中图分类号: Q356.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2005)02-0140-05

碱性磷酸酶 (ALP, EC 3.1.3.1) 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, 与维持体内适宜的钙磷比例相关, 并在免疫反应中发挥作用^[1]. 目前我国学者已对多种海洋生物的 ALP 进行了系列的研究^[2~4], 它在海洋生物对海水中钙质的吸取、磷酸钙的形成、甲壳素的分泌及形成等方面均具重要的作用, 也是杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 赖以生长、生存的重要酶类之一. 当海洋环境受到污染, 如某些化学物质、有机溶剂、重金属离子、蛋白质变性剂等会影响磷酸酶的活力与构象, 从而进一步影响到杂色鲍的正常生理活动与物质代谢.

本文在分离纯化杂色鲍 ALP 并研究酶的部分性质的基础上, 进一步研究十二烷基磺酸钠 (SDS) 对酶活力的调控, 及酶经 SDS 微扰后分子构象的变化. 不仅在酶的结构与功能方面具有重要的科学理论意义, 也为了解杂色鲍 ALP 与其生长及发病的关系和人工养殖提供了一些有益的参考资料.

* 收稿日期: 2004-10-19

基金项目: 教育部跨世纪人才经费和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项目 (2004105)

作者简介: 洪燕飞 (1979~), 女, 硕士生.

通讯作者: 陈清西, 男, 教授 (博导); E-mail: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

杂色鲍 ALP酶制剂按文献[5]的方法制备,得到比活力为 1 226U/mg的电泳单一纯的酶制剂。对硝基苯磷酸二钠(pNPP)为 E Merck公司产品; SDS为 Sigma公司产品;其他试剂均为国产分析纯试剂。所用试剂均以玻璃重蒸水配制。

1.2 酶活力测定

酶活力的测定按文献[5]的方法,即在 2cm^3 的反应体系中,包含 $0.05\text{mol/dm}^3\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液($\text{pH}=10.0$), $1.0\text{mmol/dm}^3\text{MgCl}_2$ 及 5mmol/dm^3 的 pNPP。在 37°C 条件下,加入 10mm^3 酶液,准确反应 10min ,然后加入 $2\text{cm}^3 0.1\text{mol/dm}^3\text{NaOH}$ 溶液终止反应,用 722光栅分光光度计在 405nm 的波长下测定吸光值(A)。产物的摩尔消光系数按 $1.73 \times 10^4\text{mol}/(\text{dm}^3 \cdot \text{cm})$ 计算^[3]。

1.3 SDS对酶活力的影响

在上述的测活体系中,加入不同浓度的 SDS,加入 10mm^3 酶液,测定酶的相对活力,以酶活力对 SDS浓度作图,分析 SDS对酶活力的影响。

1.4 SDS对酶 pH稳定性的影响

在不同浓度的 SDS测活体系中,改变测活缓冲液的 pH值,测定酶的活力,研究酶在不同浓度的 SDS溶液中 pH的稳定性,分析 SDS对酶 pH稳定性的影响。

1.5 SDS对酶的微扰作用

天然酶与不同浓度 SDS溶液在 4°C 下处理 24h ,然后取出 20mm^3 处理的酶液在含相应浓度 SDS的测活体系中检测酶的剩余活力,研究受 SDS微扰后酶活力的变化情况。

1.6 天然酶受 SDS微扰后酶分子构象变化的研究

天然酶与不同浓度的 SDS溶液于 4°C 下共同处理 24h 后,分析酶的紫外吸收光谱和荧光发射光谱的变化。酶的紫外吸收光谱测定仪器为 Beckman UV-650分光光度计,以含相应浓度 SDS的相同溶液为对照。酶的荧光发射光谱测定仪采用日立 F-4010型荧光仪,也以含相应浓度 SDS的相同溶液为对照。

2 实验结果

2.1 SDS对酶活力的影响

在不同浓度 SDS的测活体系中,加入 10mm^3 酶液,测定酶的相对活力,检测 SDS对酶活力影响。发现 SDS浓度低于 20mmol/dm^3 时酶活力基本保持不变,当 SDS浓度达 50mmol/dm^3 时,酶活力开始随着 SDS浓度的增大而下降,SDS浓度增高到 100mmol/dm^3 时,酶的相对活力下降了 18%。随着 SDS浓度继续增高,酶活力不再下降,维持在一定的水平,保持 82% (图 1)。这显示该酶对 SDS具有较好的稳定性。

2.2 SDS对酶的 pH稳定性的影响

在不同浓度的 SDS测活体系中,改变缓冲液的 pH值,测定酶的活力,探讨 SDS对酶的 pH稳定性的影响。结果(图 2)表明:在不含 SDS的溶液中,酶的 pH稳定性区域为 $5.9\sim 10.0$ 而在 SDS浓度为 $100\sim 400\text{mmol/dm}^3$ 的溶液中,酶的 pH稳定性区域为 $7.6\sim 10.6$ 显示酶的 pH稳定性往碱性区域偏移。

2.3 SDS对酶的微扰作用

天然酶与不同浓度的 SDS溶液在 4℃下处理 24h, 然后取出 20mm³处理过的酶液在含对应浓度 SDS的测活体系中检测酶的剩余活力, 研究 SDS对杂色鲍 ALP酶的微扰作用. 其结果(图 3)表明在 SDS浓度低于 300mmol/dm³时, 随着 SDS浓度增高, 酶活力呈指数下降到 67%左右. 但随着 SDS浓度的继续增高, 酶活力未发生明显变化. 这说明杂色鲍 ALP活力对 SDS有明显的耐受作用.

2.4 酶经不同浓度 SDS 微扰后紫外光谱的变化

杂色鲍 ALP在 0.01mol/dm³ Tris-HCl缓冲液 (pH 值为 7.5)与不同浓度的 SDS溶液在 4℃下处理 24h 酶的紫外吸收光谱变化结果见图 4 未经 SDS处理的酶液在 279nm 波长处有特征的紫外吸收峰, 经 SDS处理后, 该峰位置基本不变, 但吸收强度均有不同程度的下降. 随着 SDS浓度的上升, 酶的紫外吸收强度出现逐渐下降后又回升的趋势, 当 SDS浓度为 300mmol/dm³时, 下降到最低点, 但变化不显著. 这显示该酶在 SDS变性剂的作用下, 酶分子构象仅发生轻微的变化, 生色基团的微环境没有发生明显变化. SDS浓度高达 400mmol/dm³也不致以使酶分子构象发生明显的改变, 说明该酶对 SDS有较强的抗变性作用.

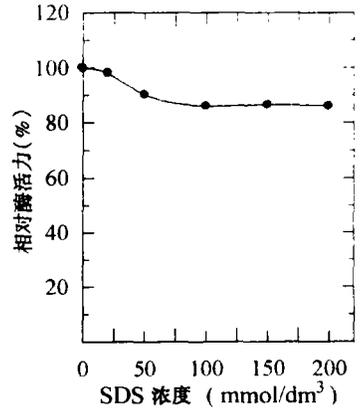


图 1 SDS对杂色鲍 ALP活力的影响

Fig 1 Effect of SDS on ALP activity from *Haliotis diversicolor*

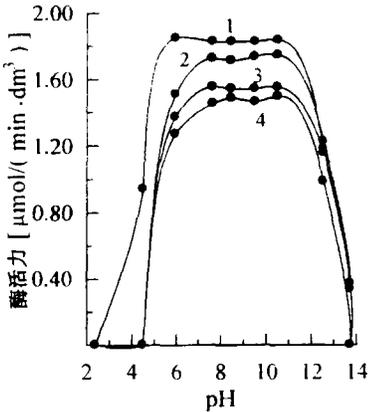


图 2 SDS对杂色鲍 ALP的 pH 稳定性的影响

Fig 2 Effect of SDS on pH stability of ALP from *H. diversicolor*

图中曲线 1~4 的 SDS 浓度分别为 0 100 200 400mmol/dm³

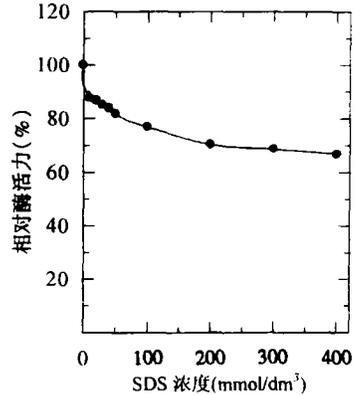


图 3 SDS对杂色鲍 ALP的效应

Fig 3 ALP activity from *H. diversicolor*

after treated by SDS at 4°C for 24h

2.5 酶经不同浓度的 SDS 微扰后荧光发射光谱的变化

杂色鲍 ALP在 0.01mol/dm³ Tris-HCl缓冲液 (pH = 7.5)与不同浓度的 SDS溶液在 4℃下处理 24h, 酶的荧光发射光谱变化结果见图 5 天然酶内源荧光在 335nm 波长处有特征的荧光发射峰, 其荧光强度在 SDS浓度低于 300mmol/dm³时, 随着 SDS浓度的增高而下降, 荧光发射峰无明显变化. 在 SDS浓度达 400mmol/dm³时, 荧光强度有所回升, 并伴随着轻微的蓝移现象. 这说明 SDS只有在较高浓度下, 才能使杂色鲍 ALP的分子处于部分紧缩状态, 但仍未能使

其变性.

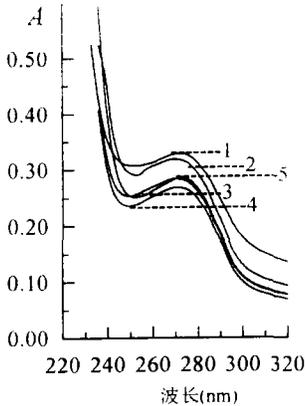


图4 杂色鲍 ALP 在 SDS 溶液中的紫外吸收光谱

Fig. 4 UV absorption spectra of ALP from *H. diversicolor* inactivated by SDS

图中曲线 1~5 的 SDS 浓度分别为

0、100、200、300、400mmol/dm³

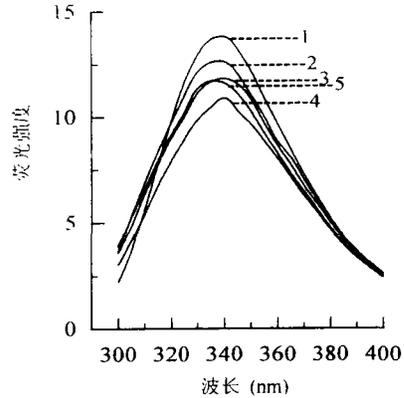


图5 杂色鲍 ALP 在 SDS 溶液中的荧光发射光谱

Fig. 5 Fluorescence emission spectra of ALP from *H. diversicolor* inactivated by SDS

图中曲线 1~5 的 SDS 浓度分别为

0、100、200、300、400mmol/dm³

3 讨论

用不同的物理化学监测手段,可以从不同的侧面揭示蛋白质变性的肽链伸展及构象变化概貌.如紫外吸收光谱及荧光光谱的变化反映酶蛋白在变性过程中与酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)等残基有关的构象变化.我们用 279nm 波长激发得到 335nm 荧光发射峰主要由生色基团 Trp 和 Tyr 残基所贡献.文献[6~8]中报道,锯缘青蟹(*Scylla serrata*)碱性磷酸酶在变性剂溶液中的分子构象变化主要表现在酶分子的主肽链以紧密的构象变成松散状态,出现酪氨酸发射峰;酶的荧光强度随着变性剂浓度的增高而逐渐下降,吸收峰位置也出现了一定程度的“红移”和“蓝移”.相比之下,杂色鲍 ALP 在 SDS 浓度为 $\leq 20\text{nmol/dm}^3$ 时,酶活力与构象均不受影响,只有在 SDS 浓度高达 50nmol/dm^3 时,酶活力才略有下降,SDS 浓度高达 400mmol/dm^3 也只使酶活力下降 33%.在如此高的变性剂(SDS)浓度下,酶的荧光光谱才出现轻微的“蓝移”现象,说明酶分子构象未发生较大变化.实验结果表明,杂色鲍 ALP 对 SDS 的变性有很高的抗拒作用.杂色鲍 ALP 酶的活力在含 SDS 变性剂测活体系中 pH 稳定性的范围略有缩小,其稳定区域从 5.9~10.0 变化到 7.6~10.6,显示酶的 pH 稳定性往碱性区域偏移.

参考文献:

- [1] 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
- [2] 陈清西,颜思旭.文昌鱼碱性磷酸酶的底物特异性及其效应物对酶活力的影响[J].厦门大学学报(自然科学版),1989,28(1):92~96
- [3] 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]. Journal of Protein Chemistry, 1996, 15(4): 345~350
- [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] 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.
- [6] Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z, et al. Comparison of inactivation and unfolding of green crab alkaline phosphatase during denaturation by guanidinium chloride [J]. Journal of Protein Chemistry, 1996, 15 (4): 359~ 365.
- [7] 郑文竹, 黄璜, 刘晓丹, 等. 乙醇对锯缘青蟹碱性磷酸酶活力与构象的影响 [J]. 台湾海峡, 2000, 19(4): 489~ 493.
- [8] 周兴旺, 史渊源, 刘晓丹, 等. 钒酸盐和脲对锯缘青蟹碱性磷酸酶的抑制作用 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2000, 39(3): 375~ 380.

Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) denaturant on activity and conformation of alkaline phosphatase from *Halotis diversicolor*

HONG Yan-fei^{1, 2}, LIAO Jin-hua¹, WU Guo-xin², CHEN Qing-xi¹

(1. Key Lab of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell School of Life Sciences Xiamen University, Xiamen 361005, China 2. College of Bioengineering Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract The effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on the activity of alkaline phosphatase (ALP) from *Halotis diversicolor* has been studied. The results showed that residual activity of the enzyme decreased with increasing SDS concentration. When the concentration of SDS was high to 400 mmol/dm³, the enzyme activity just lost 33%. After that with increasing SDS concentrations, the activity was kept at the level of 67% of the nature enzyme, indicating the enzyme had high endurance to SDS. The effect of SDS on the pH stability of the enzyme was discussed and the results showed that the pH stability range changed from pH 5.9~10.0 to pH 7.6~10.6. The conformational changes of the enzyme in different concentrations of SDS solution were measured by fluorescence absorption spectra and ultraviolet absorption spectra. The fluorescence emission peak (at 335 nm) of the enzyme hadn't shifted sharply. The fluorescence intensity decreased with increasing SDS concentrations at low concentration of SDS and rose back at high concentration of SDS. The ultraviolet absorption peak of the enzyme hadn't shifted sharply, too. It was suggested that the enzyme molecule hadn't spread sufficiently, indicating the enzyme conformation was not sensitive to SDS.

Key words: marine biology; alkaline phosphatase (ALP); experimental study; *Halotis diversicolor*; enzyme activity; sodium dodecyl sulfate (SDS); conformation; denaturant