

杂色鲍碱性磷酸酶在 DMSO 溶液中的活力与构象变化的研究

陈巧, 洪燕飞, 廖金花, 陈清西*

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

摘要: 以二甲亚砜(DMSO)为效应物, 研究其对杂色鲍碱性磷酸酶(ALP)活力的影响, 结果表明: 该酶的剩余活力随着DMSO浓度增大而迅速下降, 当DMSO浓度达40%, 酶活力几乎完全丧失, 说明DMSO对杂色鲍ALP有明显的失活作用. 导致酶活力丧失50%的DMSO浓度为17%. 在较低DMSO浓度(<20%)的失活是可逆的反应过程. 动力学研究表明, 该酶的失活过程属于混合型. 进一步测定游离酶(E)和酶底物络合物(ES)与DMSO的结合常数(K_1 和 K_{1S}), 结果表明 $K_1 < K_{1S}$, 说明底物存在对酶被DMSO的失活作用有一定的保护作用. 应用荧光发射光谱研究杂色鲍ALP经DMSO微扰后的分子构象变化情况. 随着DMSO浓度增大, 荧光强度逐渐增强, 但发射峰未发生明显变化现象, 说明酶分子中的生色基团残基的微环境发生了一定的变化.

关键词: 杂色鲍; 碱性磷酸酶; 失活作用; 构象; DMSO

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)06-0836-03

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, 在免疫反应中发挥作用^[1]. 目前多种海洋生物的ALP已有深入的研究报道^[2-5]. 本文在分离纯化杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)ALP并研究酶的部分性质的基础上, 进一步研究有机溶剂DMSO对酶活力的调控, 及酶经DMSO微扰后的分子构象变化, 对今后研究效应物对酶的抑制作用时将起重要的指导作用, 并对酶的结构与功能方面的研究具有重要的科学理论意义.

1 材料与方法

1.1 材料

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)为E. Merck产品; DEAE-纤维素(DE-32)为Whatman产品; Sephadex G-200为Pharmacia产品; 乙醇为国产AR纯试剂; 二甲亚砜(DMSO)为Sigma公司产品; 所用试剂均以玻璃重蒸水配制. 杂色鲍ALP酶制剂按文献[6]方法制备, 得到比活力为1 226 U/mg的电泳单一纯酶制剂.

1.2 方法

收稿日期: 2004-12-29

基金项目: 教育部回国启动经费, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放基金(2004105)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.

* 通讯作者: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

酶活力测定见文献[3], 以pNPP为底物, 在2 mL的反应体系中, 包含0.05 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液(pH 10.0), 1.0 mmol/L MgCl_2 及5 mmol/L的pNPP, 在37℃下, 加入10 mL酶液, 准确反应10 min, 然后用2 mL 0.1 mmol/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 $17\ 300 (\text{mol/L} \times \text{cm})^{-1}$ 计算^[7]. DMSO浓度对酶活力的影响实验是在标准测活体系中加入不同浓度的DMSO, 检测酶的剩余活力, 以引起酶活力丧失50%的DMSO浓度(IC_{50})来衡量抑制强度. 酶在DMSO溶液中的抑制作用的机理是通过测定在不同DMSO浓度的测活体系中, 检测酶活力与加入的酶量的关系, 通过作图判断. DMSO对酶的抑制作用类型通过Lineweaver-Burk双倒数作图, 比较酶催化的观米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)的变化来判断. 用日立F-4010型荧光仪测定酶在不同浓度DMSO溶液中的荧光光谱变化.

2 实验结果

2.1 DMSO对酶活力的浓度影响

以DMSO为效应物, 在测活体系中加入不同浓度DMSO, 研究对杂色鲍ALP酶活力的影响, 结果见图1. 随着DMSO浓度增大, 酶活力成指数下降, 导致酶活力下降一半所需的DMSO浓度(IC_{50})为17%. 当DMSO浓度达40%时, 酶活力丧失94%. 说明DMSO

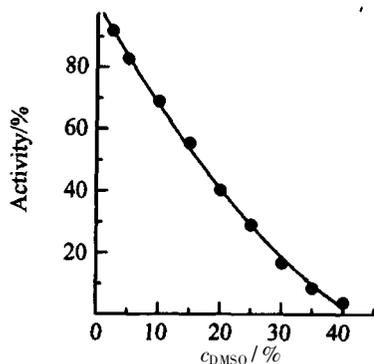


图 1 DMSO 对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of DMSO on the enzyme

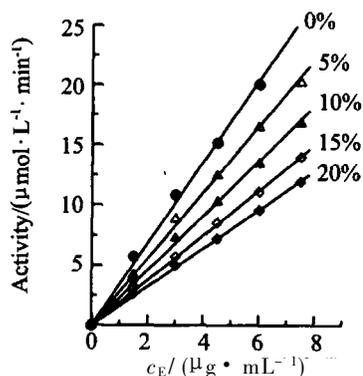


图 2 DMSO 对鲍鱼碱性磷酸酶的效应机理的判断

DMSO 浓度分别注在图中

Fig. 2 Deteminnation of the inhibitory mechanism of DMSO on the enzyme

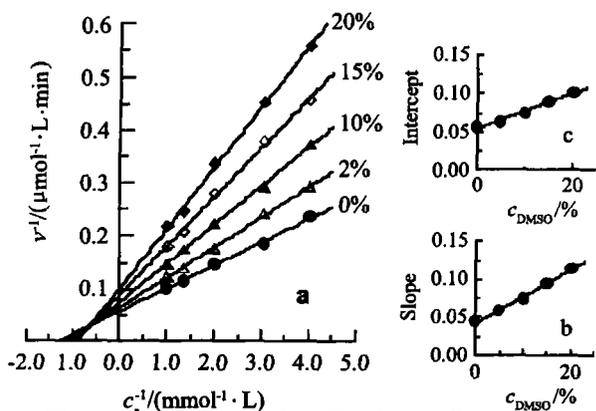


图 3 DMSO 对鲍鱼碱性磷酸酶的抑制作用的 Lineweaver-Burk 关系图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of ALP inhibited by DMSO

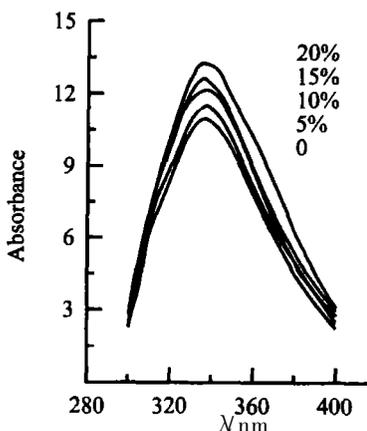


图 4 ALP 在 DMSO 溶液中的荧光发射光谱

Fig. 4 Fluorescence emission spectra of ALP in DMSO solutions

对杂色鲍 ALP 活力有明显的失活作用。

2.2 低浓度 DMSO 对杂色鲍 ALP 的抑制作用表现为可逆效应

进一步探讨在低浓度的 DMSO (20% 以下) 对酶的失活作用机理, 在固定一系列的 DMSO 浓度的测活体系中, 改变酶浓度, 测定酶促反应的初速度, 以剩余酶活力对加入的酶浓度作图 (图 2) 得到一组通过原点的直线。随着 DMSO 浓度增大, 直线的斜率逐渐降低, 说明 DMSO 是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低, 而不是通过降低有效的酶量导致活力的下降, 即 DMSO 对酶的抑制作用属于可逆过程。因为不可逆的失活将会导致有效酶量下降而产生一组平行线, 横轴的截距将随着不可逆失活剂浓度的增大而增大。

2.3 DMSO 对酶的抑制效应的常数测定

研究 DMSO 对酶的抑制作用机理: 以第一底物 (pNPP) 为变化底物, 在第二底物 (水) 饱和的情况下, 探讨 DMSO 对该酶的抑制作用类型。在含不同浓度 DMSO 的测活体系中, 改变底物 (pNPP) 浓度, 测定酶促反应的初速度 (v_0), 以 Lineweaver-Burk 双倒数

作图, 得到一组纵轴截距不变的直线 (图 3)。表明酶经 DMSO 抑制作用的 $1/v_0$ 对 $1/[S]$ 双倒数图为一组相交于第二象限的直线, 随着 DMSO 浓度的增加, 酶的 K_m 增大, V_m 降低, 其效应为混合型机制。分别以斜率和纵轴截距 DMSO 浓度作图, 求得抑制常数 K_I 和 K_{IS} 分别为 11.6% 和 24.0%。 $K_I < K_{IS}$, 说明底物存在对酶被 DMSO 的失活作用有一定的保护作用。

2.4 DMSO 微扰后酶的荧光发射光谱变化

杂色鲍 ALP 在不同浓度 DMSO 溶液中 (于 0.01 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5) 的荧光发射光谱变化结果见图 4。天然酶内源荧光在 335 nm 处有特征的荧光发射峰, 其强度随着 DMSO 浓度上升而增强。当 DMSO 浓度达 20% 时, 荧光强度还继续增强, 荧光发射峰未发生明显变化。说明 DMSO 使酶分子构象发生了微小变化。

3 讨 论

酶蛋白在 DMSO 溶液中的分子构象变化主要表现在于酶分子的主肽链以紧密的构象变成松散状态,从有序的二级结构变成无规线团.利用不同的物理化学监测手段,可以从不同侧面揭示蛋白质变性的肽链伸展及构象变化概貌.用 279 nm 波长激发得到 335 nm 荧光发射峰主要由生色基团 Trp 和 Tyr 残基所贡献^[8].有机溶剂 DMSO 微扰杂色鲍 ALP 后的荧光强度显著增大,其原因可能是由于 DMSO 介入酶分子,改变酶分子所处环境的介电常数,从而增加了 Tyr、Trp 残基的微环境的极性,以致处于淬灭状态的 Tyr 残基荧光得以恢复,并使其量子率增加.荧光强度的增大随着 DMSO 浓度的增高而增大,酶的荧光发射峰不变,这说明酶的活性中心的柔性太小,不利于酶与底物结合与催化,表现为 K_m 增大、 V_m 降低,使 DMSO 对 ALP 呈混合型抑制,不同浓度的 DMSO 均未使 ALP 荧光光谱的峰位发生红移,提示在该测定条件下酶仍未变性.在 DMSO 浓度达 20% 时,酶活性中心构象已经发生变化,但酶尚保留部分活力,说明整体酶分子构象尚未完全变化,显示酶活性中心处于对 DMSO 较为敏感的区域,酶活力的表现与酶分子构象的完整性密切相关;但若酶活性部位的构象与以荧光强度增加及发射峰位红移为标志的整体构象变化相比较,其活性部位构象的变化明显快于其整体构象的变化,支持酶

活性部位的柔性理论.

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 谢莉萍,林静瑜,张荣庆.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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 陈巧,陈清西,林建成,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.
- [6] 廖金花,陈巧,林丽蓉,等.鲍鱼碱性磷酸酶的分离纯化和性质研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2005,44(2):270-275.
- [7] 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.
- [8] 耿芳宋,王秀丽,童家明,等.盐酸胍对人类胎盘碱性磷酸酶构象与活力的影响[J].生物物理学报,1998,14(3):385-390.

Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Activity and Conformation of Alkaline Phosphatase from *Haliotis diversicolor*

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

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

Abstract: The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the activity of *Haliotis diversicolor* alkaline phosphatase (ALP) was studied. The results showed that the enzyme activity rapidly declined with increasing DMSO concentrations. The inactivation of the enzyme in DMSO solutions was reversible reaction. The inhibition of DMSO on the enzyme was found to be mixed type and the presence of substrate had protection on the enzyme inhibited by DMSO. The conformational changes of the enzyme in different concentrations of DMSO solution were measured by fluorescence absorption spectra. The results showed that the fluorescence emission peak intensity of the enzyme gradually strengthened with increasing DMSO concentrations. Those results were in concordance with the conformational changes of the microenvironments of tyrosine and tryptophan residues of the enzyme. It can be recognized that conformational integrity is important for maintaining the activity of the enzyme and slight changes at the activity site could lead to inactivation of the enzyme.

Key words: *Haliotis diversicolor*; alkaline phosphatase; inactivation; conformation; dimethyl sulfoxide