

# 草鱼碱性磷酸酶的分离纯化与部分性质研究

张继平,林建成,谢进金,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:**用 Tris-HCl 缓冲液抽提,硫酸铵分级沉淀,DEAE-纤维素和葡聚糖凝胶层析,从草鱼肠中提取出碱性磷酸酶(ALP).提取倍数为 6.74,比活为 684 U/mg 蛋白.酶液经 PAGE 呈现单一带,该酶催化对硝基苯磷酸二钠(pNPP)水解反应的最适 pH 值为 10.41,最适温度为 27℃,K<sub>m</sub> 值为 1.01 mmol/L.酶的热稳定性与 pH 稳定性研究表明:该酶在 pH 6.6~11.5 区间和在温度低于 45℃ 下稳定.研究金属离子对酶活力影响的结果表明:一价金属离子 Li<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 对酶活力没有影响;二价金属离子 Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 和 Co<sup>2+</sup> 对酶有不同程度的激活作用;Zn<sup>2+</sup> 对酶有抑制作用.

**关键词:**草鱼;碱性磷酸酶;分离纯化;温度;pH;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)05-0684-04

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1, 简称 ALP)广泛存在于动物、植物及微生物体内,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等生理过程,对体内钙磷的吸收与代谢、维持体内适宜的钙磷比例起重要作用<sup>[1]</sup>.目前国内外学者已对多种贝类及几种鱼类的 ALP 进行了研究<sup>[2~4]</sup>,但对无胃鱼类草鱼的研究未见报道.草鱼是我国的淡水养殖主养鱼类,由于草鱼的养殖大都以投喂配合饲料为主,其排泄物较高含量的磷对水体造成较大的污染,不利于养殖业的可持续发展.本研究以草鱼为试验材料,分离纯化了 ALP,研究其酶学性质与活力影响因素,旨在探讨该酶活力调控机理,为草鱼配合饲料的改良、加强磷的吸收和减少磷的污染提供理论指导.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)购自厦门白城水产市场.对-硝基苯磷酸二钠(pNPP)为 E. Merck 产品;二乙基氨基乙基纤维素(DEAE-32)为 Whatman 产品;葡聚糖凝胶(Sephadex G-150)为 Pharmacia 产品;甲叉双丙烯酰胺(Bis)为 Fluka 产品;丙烯酰胺(Acr)等为上海试剂一厂产品;其余化学试剂均为国产分析纯.

收稿日期:2004-08-18

基金项目:教育部跨世纪人才经费和厦门大学科技创新工程基金(XDKJ CX20043001)

作者简介:张继平(1972-),男,博士研究生.现工作单位:广东佛山科学技术学院动物科学系.

\*通讯作者:chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 酶的分离纯化

参照文献[1]的方法,适当修改.用草鱼肠为提取酶的材料,用冷蒸馏水漂洗后,按 1:1 加入 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5,含 0.2 mol/L NaCl)4 抽提 4 h,离心(15 000 g, 4℃, 30 min)后取上清液(粗酶液).粗酶液加无水乙醇至 1% 浓度后用 0.20 和 0.50 硫酸铵分级分离获得粗酶制剂.然后透析并适当浓缩后进行 DEAE-纤维素(DEAE-32)离子交换柱层析(2.5 cm × 30.0 cm),采用 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5),含 NaCl 浓度由 0 至 1 mol/L 的直线梯度洗脱,流速为 0.25 mL/min,部分收集,每管收集 4 mL.活力峰合并后通过 Sephadex G-150 凝胶过滤柱层析(2.5 cm × 60.0 cm),采用恒压装置,压差为 20 cm.洗脱液为 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5,含 0.2 mol/L NaCl),流速为 0.25 mL/min,部分收集,每管体积分约 4 mL.合并活力峰,适当浓缩透析后再过 DEAE-32 柱,洗脱同前,收集活力峰透析后进行有关测定分析.

#### 1.2.2 酶活力与蛋白浓度的测定

ALP 活性的测定参考文献[1]方法,测活温度改为 27℃.酶活力单位定义为: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.蛋白浓度测定按 Lowry 法<sup>[5]</sup>,以牛血清白蛋白为对照.

#### 1.2.3 酶的纯度鉴定

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),分离胶浓度为 8% Acr-0.184% Bis,浓缩胶浓度为 2.5% Acr-0.625% Bis,蛋白带检测采用考马斯亮兰染色法.

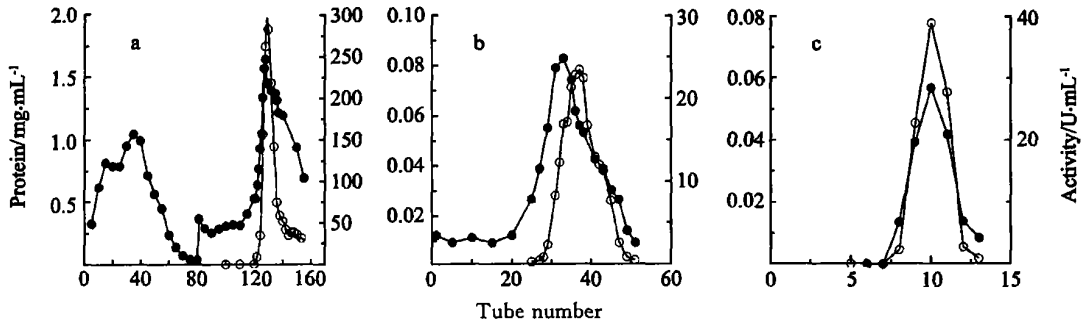


图 1 草鱼 ALP 纯化的洗脱图谱

a, c 为 DEAE-32 柱, b 为 Sephadex G-200 柱

- - - 蛋白浓度(左纵坐标); - - - 酶活力(右纵坐标)

Fig. 1 Purification of the enzyme on DEAE-32 (a, c) and on Sephadex G-200 (b) chromatography

## 2 实验结果

### 2.1 酶的分离纯化结果

以草鱼肠为提酶材料,通过缓冲液抽提、硫酸铵分级分离、DEAE-32 离子交换柱层析和 Sephadex G-200、再经 DEAE-32 纯化,获得碱性磷酸酶制剂,酶比活力为 686 U/mg。几种柱洗脱图谱见图 1。酶液经 PAGE 呈现出一条蛋白主带(图 2)。说明用该方法可以有效地纯化草鱼 ALP。

### 2.2 酶催化 pNPP 水解的动力学特征

在 27 ℃, pH 10.0 的测活体系中,以 pNPP 为底物,测定不同底物浓度下的酶促反应的初速度( $v_0$ ),以  $v_0$  对  $[S]$  作图为典型的米氏双曲线关系,见图 3 内插图。说明该酶催化 pNPP 水解反应符合 Michaelis-Menten 动力学。以  $1/v$  对  $1/[S]$  作图为直线(图 3),求得该酶催化 pNPP 水解的米氏常数( $K_m$ )和最大速度常数( $V_m$ )分别为 1.01 mmol/L 和 5.49  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ 。

### 2.3 pH 和温度对酶活力的影响

在 27 ℃ 的不同 pH 的测活体系中,检测 pH 对酶催化 pNPP 水解的酶活力的影响,结果表明:酶活力对

测活的 pH 关系图(图略)为典型的钟罩型曲线,求得该酶催化 pNPP 水解反应的最适 pH 值为 10.41。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影响,结果表明:酶活力对测活的温度关系为典型的钟罩型曲线(图略),求得该酶催化反应的最适温度为 27 ℃。

### 2.4 酶的 pH 稳定性

取出等量的酶液,加入三倍体积的不同 pH 值的缓冲液,在 4 ℃ 下处理 24 h,然后取出 50  $\mu\text{L}$  处理的酶液在正常的测活体系中(pH 10.0, 27 ℃)测定酶的剩余活力,以酶活力对 pH 作图(图 4)。结果表明,该酶在 pH 6.6~11.5 区间较稳定,而在 pH 低于 6.6 或高于 11.5,酶很不稳定,酶活力丧失较快。

### 2.5 酶的温度稳定性

定量酶在不同温度下保温 30 min 后冷却到室温。取 20  $\mu\text{L}$  热处理的酶液在正常的测活体系(pH 10.0, 27 ℃)检测酶的剩余活力,以酶活力对温度作图(图 5)。实验表明,酶在 45 ℃ 以下热变性 30 min,酶活力基

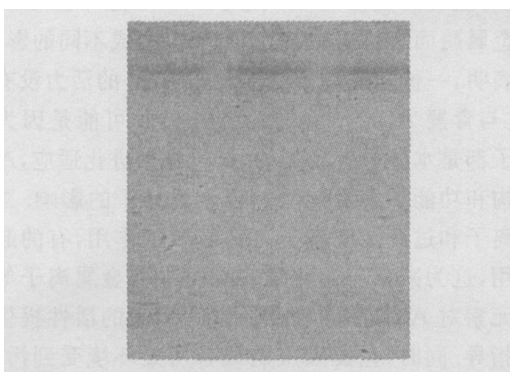


图 2 草鱼 ALP 的电泳鉴定

Fig. 2 PAGE of enzyme

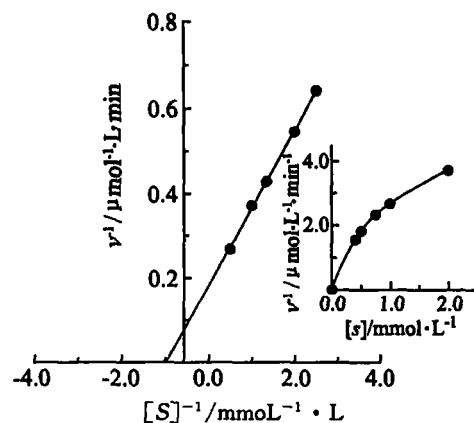


图 3 酶催化 pNPP 水解反应的双倒数关系图内插图为米氏双曲线关系图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot for the enzyme

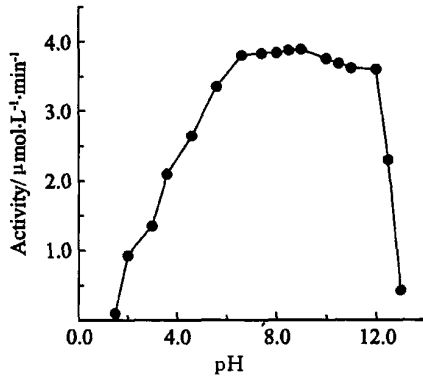


图 4 酶的 pH 稳定性

Fig. 4 The pH stability of the enzyme

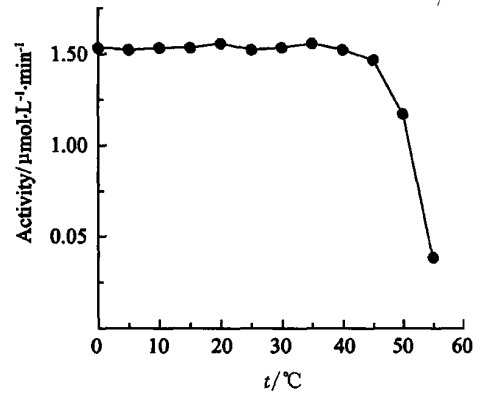


图 5 酶的温度稳定性

Fig. 5 The temperature stability of the enzyme

本保持不变,在 45 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.

### 2.6 几种金属离子对酶活力的影响

在不含  $\text{Mg}^{2+}$  的测活体系中,加入不同浓度的金属离子,在 27 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.  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{LiSO}_4$ ,  $\text{KCl}$  等无机盐对酶活力几乎没有影响,到 30 mmol/L 浓度,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该酶活力无影响.  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  对酶有不同的激活作用,  $\text{ZnSO}_4$  对酶活力有显著的抑制作用.

表 1 金属离子对草鱼 ALP 活力的影响

Tab. 1 Effects of metal ions on the enzyme activity

金属离子	浓度 / ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	相对活力 / %
Control		100.0
NaCl	30.0	100.5
NaNO <sub>3</sub>	30.0	101.8
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30.0	98.5
KCl	30.0	101.5
LiSO <sub>4</sub>	30.0	99.6
MgSO <sub>4</sub>	1.0	151.5
MnCl <sub>2</sub>	1.0	157.2
CoCl <sub>2</sub>	1.0	116.8
ZnSO <sub>4</sub>	1.0	33.3

### 3 讨论

由于草鱼是无胃鱼类,因此,其营养物质的消化吸收都在肠道进行,肠道中的消化酶的种类和数量较多,组成比较复杂,这给 ALP 酶的提取和纯化增加了很大的难度,造成 ALP 最后的得率较低,酶活损失较大. 试

验过程中虽尝试了多种方法去提高 ALP 的稳定性,但效果不明显. 因此,如何提高 ALP 在提取过程中的稳定性,提高酶的得率,有待于进一步研究.

ALP 的酶学特性因动物种属不同有较大的差异. 我们的实验结果表明,草鱼 ALP 的最适温度为 27 ,与其它动物来源的酶有一些差异,如来自于锯缘青蟹的酶为 52<sup>[1]</sup>、合浦珠母贝的酶为 45<sup>[2]</sup>、背角无齿蚌的酶为 40<sup>[3]</sup>. 反映出草鱼 ALP 最适温度跟其生长的最佳温度(28~32 )有一定的相关性. 草鱼 ALP 的最适 pH 值为 10.41,以 pNPP 为底物,草鱼 ALP 的  $K_m$  值为 1.01 mmol/L,这与其它动物也有明显差异<sup>[1-4,6]</sup>,说明不同种类动物的 ALP 的性质不同,其催化能力也有明显差异.

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. 草鱼 ALP 参与食物中钙磷吸收等生长代谢过程并与草鱼的生长发育密切相关. 由于草鱼的食量大,消化吸收又主要都在肠道进行,其排泄量很大,因此,提高 ALP 的活性,从而提高饲料中磷的利用,促进磷的吸收,减少磷对水体的污染,具有重要的理论与实践意义. ALP 是一含 Zn 酶,对于金属酶而言,不同的离子可对它造成不同的影响. 实验表明,一价金属离子对草鱼的 ALP 的活力没有影响,这与青蟹 ALP<sup>[7]</sup>得出的结果相同. 可能是因为这些离子都是水体中较常见的,经过长期进化适应,ALP 的结构和功能不易受这些一价金属离子的影响. 二价金属离子和过渡金属离子有的起激活作用,有的起抑制作用,这为减少与避免饲料中添加的金属离子等矿物质元素对 ALP 酶的抑制、提高 ALP 的活性提供了理论指导. 同时,鱼类因疾病或者所处环境受到污染,例如金属离子、有机物的污染等,其 ALP 活性必定受到影响<sup>[8-10]</sup>. 因此,可以通过监测草鱼 ALP 活性的变

化,及时反映草鱼健康状况,起到预测和预防草鱼疾病的发生,并可以对草鱼所生活的环境中的重金属离子等污染物进行监测,对草鱼的养殖与水体环境的监控具有重要的意义。

### 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] 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):27-39.
- [3] 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.
- [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] Lowry O H. Protein measurement with the Folin-phenol reagent[J]. J. Biol. Chem.,1951,193:265-269.
- [6] 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):732-727.
- [7] 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.
- [8] 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]. Arch. Environ metal Contam. Toxicol.,2002,42:354-362.
- [9] Covelli S,Faganeli J,Horvat M,et al. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea)[J]. Applied Geochem.,2001,16:541-558.
- [10] Mora S D,Sheikholeslami M R,Wyse E,et al. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea[J]. Mar. Pollution Bulletin,2004,48:61-77.

## Purification and Some Characterization of Alkaline Phosphatase from Grass Carps(*Ctenopharyngodon idellus*)

ZHANG Ji-ping, LIN Jian-cheng, XIE Jin-jin, CHEN Qing-xi \*

(Key Lab. of the 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 Grass Carps (*Ctenopharyngodon idellus*) by following procedures: Tris-HCl buffer (pH 7.5) extraction, ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography on DEAE-32 cellulose, followed by gel filtration through Sephadex G-200 and ion-exchange chromatography on DEAE-32. The final preparation was homogeneous on PAGE. The specific activity of the enzyme was 684 U/mg. The optimum pH is 10.41, and the optimum temperature is 27 for the hydrolysis of pNPP. Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) is 1.01 mmol/L and the maximum velocity ( $V_m$ ) is 5.49 mmol/L/min at pH 10.0 and 27. The enzyme is stable in the range of pH from 6.6 to 11.5 and in temperature below 45. 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 ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Co^{2+}$ ) activate the enzyme,  $Zn^{2+}$  inhibit the enzyme. The result indicates that different metal ions have different effect on the ALP. The study of ALP from Grass Carps (*Ctenopharyngodon idellus*) may give some help to Grass Carps culture.

**Key words :** Grass Carps; alkaline phosphatase; purification; activity; stability; metal ions