

# 乙醇对鲍鱼碱性磷酸酶活力与构象的影响

陈巧, 廖金花, 林丽蓉, 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:** 以乙醇为效应物研究对鲍鱼碱性磷酸酶 (ALP) 活力影响的结果表明, 酶的剩余活力随着乙醇浓度增大而迅速下降, 乙醇浓度 40% 可使酶活力完全丧失, 说明乙醇对鲍鱼 ALP 有明显的失活作用,  $IC_{50}$  为 13%。含较低浓度乙醇 (30%) 的失活过程是可逆的反应。测定乙醇对酶的失活作用机理, 结果表明乙醇对鲍鱼 ALP 的失活作用是非竞争性机制, 说明底物存在不影响乙醇对酶的失活作用。应用荧光光谱、紫外吸收光谱研究鲍鱼 ALP 经乙醇微扰后的分子构象变化, 发现乙醇对酶分子构象有显著的影响, 酶的内源荧光强度随乙醇浓度增大而增强, 荧光发射峰逐渐发生红移。紫外吸收光谱在 276 nm 吸收峰随乙醇浓度增大而增强。这些结果表明, 酶蛋白分子中的生色基团残基的微环境发生变化。

**关键词:** 鲍鱼; 碱性磷酸酶; 失活作用; 构象; 乙醇

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)04-0563-03

碱性磷酸酶 (ALP, EC3.1.3.1) 广泛存在于自然界, 它催化磷酸单脂的水解及磷酸基团的转移反应, 在生物体内的磷代谢过程中起着十分重要的作用<sup>[1,2]</sup>。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, 而且还与贝类角蛋白等蛋白质的分泌相关<sup>[3]</sup>, 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<sup>[4,5]</sup>。鲍鱼体内 ALP 对海水中钙质的吸取、磷酸钙的形成、甲壳素的分泌及形成均有重要的作用, 是鲍鱼赖以生长、生存的重要酶类之一。随着我国工农业经济的发展和人民生活水平的提高, 我国近海海域的污染日趋严重。而鲍鱼的养殖, 特别是工厂化养殖对水质的要求较高, 一旦海洋环境受到污染, ALP 的构象及活力势必受到影响, 从而影响到鲍鱼的生长和生存。本文报告鲍鱼 ALP 在乙醇溶液中的失活作用及酶经乙醇微扰后的分子构象变化, 为该酶的结构与功能一致性提供理论依据, 对于鲍鱼的人工养殖有指导作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

对硝基苯磷酸二钠 (pNPP) 为 E. Merck 产品; DE-AE-32 为 Whatman 产品; Sephadex G-200 为 Pharmacia

产品; 乙醇为国产 AR 纯试剂; 所用试剂均以玻璃重蒸水配制。鲍鱼 ALP 酶制剂按前文<sup>[6]</sup>方法制备, 得到比活力为 1 226 U/mg 的电泳单一纯的酶制剂。

### 1.2 方法

蛋白浓度测定按 Lowry 法<sup>[7]</sup>, 以牛血清白蛋白为对照。酶活力测定见前文<sup>[6]</sup>, 酶在不同浓度乙醇溶液中构象变性测定是在 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 7.5, 4℃ 下处理 30 min, 以紫外吸收光谱、荧光光谱分析测定。酶的紫外吸收光谱采用 Beckman DU-650 型分光光度计, 30℃ 恒温, 从 200 nm 扫描到 320 nm, 自动扫描记录, 荧光光谱用日立 F-4010 型荧光仪自动扫描记录。激发光波长 279 nm, 测定温度 25℃。

## 2 结果

### 2.1 乙醇浓度对酶活力的影响

以乙醇为效应物, 在测活体系中加入不同浓度乙醇, 研究对鲍鱼 ALP 酶活力的影响, 结果见图 1。随着乙醇浓度增大, 酶活力成指数下降, 当乙醇浓度达 13% 时, 酶活力丧失 50%, 乙醇浓度达 43% 时, 酶活力丧失 100%。说明乙醇对鲍鱼 ALP 活力有明显的失活作用。进一步探讨在低浓度的乙醇 (20% 以下) 对酶的失活作用机理, 结果见图 2。酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线, 随着乙醇浓度的增大, 直线的斜率降低, 表明乙醇是通过失活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, 说明乙醇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。

收稿日期: 2004-05-26

基金项目: 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开发基金, 厦门大学科技创新工程基金 (20043001) 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: chengq@jingxian.xmu.edu.cn

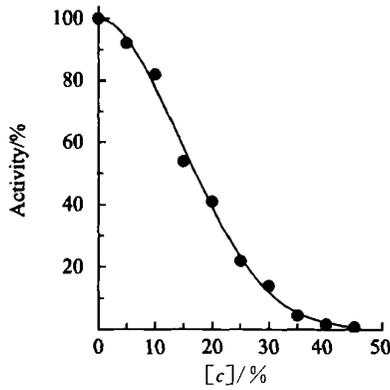


图 1 乙醇对鲍鱼碱性磷酸酶活力的影响

Fig 1 Effects of ethanol on the activity of ALP

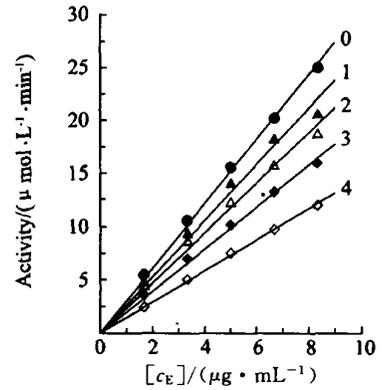


图 2 乙醇对鲍鱼 ALP失活机理的判断

直线 0~ 4乙醇浓度分别为: 0、5%、10%、15% 和 20%

Fig 2 Determination of the inactivation mechanism of ethanol on the enzyme

### 2.2 鲍鱼 ALP在乙醇溶液中失活机制

研究鲍鱼 ALP在乙醇溶液中的失活动力学, 探讨底物浓度对酶被乙醇失活的效应. 在含不同浓度乙醇的测活体系中, 改变底物浓度, 测定酶促反应的初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数法作用, 确定其失活作用类型, 结果 (图 3) 表明酶经乙醇失活后  $1/v_0$  对  $1/S$  关系图交于一点,  $K_m$  不变,  $V_m$  降低, 其效应为非竞争性机制, 说明底物浓度存在并不影响乙醇对酶的失活, 酶的失活不因底物浓度的增大而改变.

### 2.3 酶经乙醇微扰后的荧光发射光谱的变化

鲍鱼 ALP 在不同浓度乙醇溶液中 (0.01 mol/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 处有特征发射峰, 其强度随着乙醇浓度上升而增强. 当乙醇浓度达 40% 时, 荧光强度还继续增强, 荧光发射峰逐渐红移至 340 nm 处. 说明酶分子构象发生了明显的变化.

### 2.4 酶经乙醇微扰后的紫外吸收光谱的变化

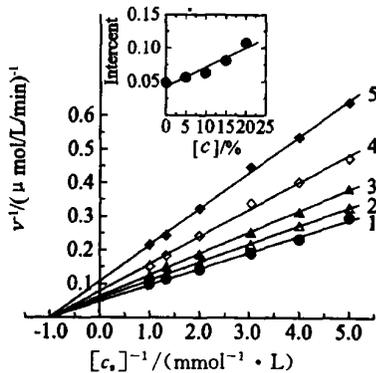


图 3 乙醇对鲍鱼 ALP失活的 Lineweaver-Burk 图

直线 1~ 5乙醇浓度分别为: 0、5%、10%、15% 和 20%

Fig 3 Lineweaver-Burk plot of ALP inactivation in ethanol solution

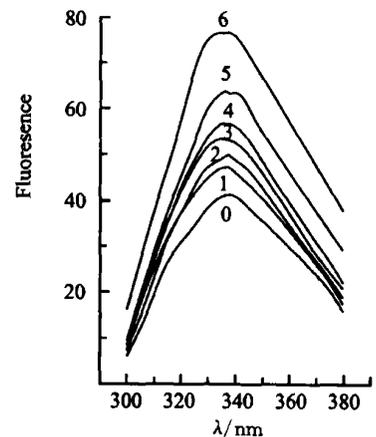


图 4 ALP在乙醇溶液中的荧光发射光谱

曲线 0~ 6的乙醇浓度分别为 0、5%、10%、15%、20%、40% 和 60%

Fig 4 Fluorescence emission spectra of ALP denaturation in ethanol solutions

鲍鱼 ALP 在不同浓度乙醇溶液中的紫外吸收光谱测定结果见图 5 在 278 nm 处的吸收峰随着乙醇浓度增大而增大. 酶分子中生色基团的微环境的极性发生了改变, 由极性环境变为疏水性, 从而使得色氨酸残基的消光系数增大.

## 3 讨论

酶蛋白在乙醇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<sup>[8]</sup>. 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. 我们用 279 nm 波长激发得到 335 nm 荧光发射峰主要由 Trp 和 Tyr 残基所贡献. 有机溶

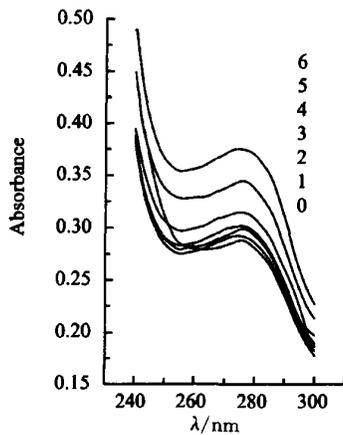


图 5 ALP 在乙醇溶液中的紫外吸收光谱  
曲线 0~6 的乙醇浓度分别为 0%、5%、10%、15%、  
20%、40% 和 60%

Fig 5 UV-absorption spectra of ALP denaturation in ethanol solutions

剂乙醇微扰鲍鱼 ALP 后的荧光强度显著增大,其原因可能是由于乙醇介入酶分子,改变酶分子所处环境的介电常数,引起肽链伸展,从而降低了 Tyr Trp 残基的微环境的极性,使得 Tyr 残基形成的氢键遭到破坏,以致处于淬灭状态的 Tyr 残基荧光得以恢复,使其量子率增加. 荧光强度的增大随着乙醇浓度的增高而增大,酶的荧光发射峰也出现红移,当乙醇浓度达 60% 时,荧光发射峰的增大和红移现象尚未达到稳定. 紫外吸收光谱显示在 278 nm 的吸收峰随着乙醇浓度

的增大而逐渐增大,这与 Trp 残基微环境变化相关. Trp 微环境,由极性变为疏水性,使得色氨酸残基消光系数增大,导致酶的紫外特征吸收峰增大,当乙醇浓度达 60% 时,酶的紫外吸收峰增大尚未达到终态. 鲍鱼 ALP 在乙醇浓度达 45% 时,酶活力已经全丧失,说明酶活性中心构象已变性达终态,但整体酶分子构象尚未完全变化,显示酶活性中心处于对乙醇较为敏感区域,酶活力的表现与酶分子构象的完整性密切相关.

### 参考文献:

- [1] Femley H N. Mammalian alkaline phosphatase The Enzymes [M]. New York Academic Press, 1971. 4: 417-444.
- [2] Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z et al Kinetics of inhibition of alkaline phosphatase from green crab by N-Bromosuccinimide [J]. J Protein Chem., 1996 15(4): 345-350.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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: 362-367.
- [7] Lowry O H. Protein measurement with the Folin-phenol reagent [J]. J Biol Chem., 1951, 193: 265-270.
- [8] 陈清西, 颜思旭. 果菠萝蛋白酶在有机溶剂微扰时的分子折叠与活力变化的研究 [J]. 高等学校化学学报, 1993, 14(3): 424-427.

## Effect of Ethanol on Activity and Conformation of Alkaline Phosphatase from *Halotis diversicolor*

CHEN Qiao, LAO Jinhua, LIN Lirong, CHEN Qingxi\*

(Key Lab. 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 ethanol on the activity of *H. diversicolor* alkaline phosphatase has been studied. The results showed that the enzyme activity rapidly declined with increasing ethanol concentrations. The inactivation of the enzyme in ethanol solutions was a reversible reaction. The inactivation of ethanol on the enzyme was found to be noncompetitive type and the presence of substrate did not influence the inactivation of the enzyme. The conformational changes of the enzyme in different concentrations of ethanol solution were measured by fluorescence absorption spectra and ultraviolet absorption spectra. The fluorescence emission peak intensity of the enzyme gradually strengthened with increasing ethanol concentrations, accompanied by the peak being gradually red-shifted. The ultraviolet absorption spectra peak at 278 nm of the enzyme denatured in ethanol solution increased with increasing ethanol concentrations. Those results were in concordance with the conformational changes of the microenvironments of tyrosine and tryptophan residues of the enzyme. We can recognize that conformational integrity is important for maintaining the activity of the enzyme and slight changes at the activity site could lead to complete inactivation of the enzyme. The study of relationship between conformation and activity of the enzyme may give us some information and would be of great benefit to the *H. diversicolor*'s culture.

**Key words** alkaline phosphatase *Halotis diversicolor*; inactivation; conformation; ethanol