

杂色鲍碱性磷酸酶在醇、醛和酮溶液中的失活作用

陈 巧^{1,2}, 洪燕飞¹, 廖金花¹, 庄总来¹, 陈清西¹

(1. 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生物化学与生物技术学系, 福建 厦门 361005; 2. 福建教育学院生化系, 福建 福州 350001)

摘要:报道了杂色鲍碱性磷酸酶(ALP)在甲醇、乙醇、丙醇、甲醛、丙酮等溶液中的失活动力学。结果表明:酶的剩余活力随着有机溶剂浓度的增大而迅速下降。测得上述5种有机溶剂对该酶的半抑制率(IC_{50})分别为5.41、3.07、1.80、 31.0×10^{-3} 、 2.30 mol/dm^3 。在这些有机溶剂溶液中酶的失活过程都是可逆反应。检测醇、醛、酮对该酶的失活作用机理,结果表明甲醇、乙醇、丙醇对杂色鲍ALP的失活作用均为非竞争性机制,其抑制常数分别为5.36、3.02、 1.80 mol/dm^3 。甲醛、丙酮对杂色鲍ALP的失活作用都呈现为混合型抑制,其对游离酶的抑制常数(K_i)分别为 24.7×10^{-3} 、 1.66 mol/dm^3 ;对酶-底物络合物的抑制常数(K_{is})分别为 56.2×10^{-3} 、 5.40 mol/dm^3 。

关键词:海洋生物;碱性磷酸酶;实验研究;杂色鲍;失活作用;有机溶剂

中图分类号:Q356.1

文献标识码:A

文章编号:1000-8160(2005)04-0469-05

碱性磷酸酶(ALP, EC3.1.3.1)是一种磷酸单酯水解酶,在碱性条件下(pH为9~10),它能催化磷酸基团的水解和转移,使磷酸单酯分解。有关文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)^[1]、长毛对虾(*Fenneropenaeus penicillatus*)^[2]、僧帽牡蛎(*Ostrea cucullate*)^[3]、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[4]等ALP的研究均有报道。前文我们报道了从杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)分离纯化的ALP的基本性质^[5],本文在此基础上,进一步研究杂色鲍ALP在有机溶剂中的活力变化及失活动力学。杂色鲍为海产软体动物,是我国南方优良的海水养殖种类之一。ALP在其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有重要的作用,是杂色鲍赖以生长、生存的重要酶类之一。20世纪90年代以来,随着我国工农业经济的发展我国近海海域的污染日趋严重。而杂色鲍的养殖,特别是工厂化养殖对水质的要求较高。海洋环境受到污染如重金属离子、有机溶剂等污染,杂色鲍ALP的构象及活力势必受到影响,从而影响其生长和生存。本文报道杂色鲍ALP在醇、醛和酮溶液中的失活作用。这对于深入探讨该酶在磷代谢中的作用,研究酶活力的调控机理、酶的分子构象与活力的关系,及阐明酶的结构与功能的关系等均具有重要的科学理论意义,同时对人工养殖鲍鱼具有重要的指导作用和实际应用意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)为E Merck公司产品;甲醇、乙醇、丙醇、甲醛、丙酮为国产AR

收稿日期:2005-01-20

基金项目:教育部跨世纪人才经费和回国启动经费资助项目

作者简介:陈巧(1959~),女,副教授,访问学者。

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

级试剂;鲍鱼 ALP 酶制剂按文献[5]中的方法制备,获得比活力为1 226 U/mg 的丙烯酰胺凝胶电泳单一纯的酶制剂^[5],所用试剂均以玻璃重蒸水配制.

1.2 方法

有机溶剂对酶活力的影响实验方法:分别以有机溶剂(甲醇、乙醇、丙醇、甲醛、丙酮)为效应物,研究酶在不同浓度效应物的测活体系中活力的变化情况.酶活力测定方法同文献[5].酶活力分析在 722 分光光度计(厦门分析仪器厂)测定波长为 405nm 的光密度值.消光系数按 $1.73 \times 10^4 \text{ dm}^3 / (\text{mol} \cdot \text{cm})$ 计算^[6].

酶在有机溶剂中失活机理的判断方法:按文献[7]方法,在含不同浓度效应物的测活体系中测定不同酶含量的反应初速度(v_0),通过酶活力与酶量的关系加以判断.

酶在有机溶剂中抑制作用类型与抑制作用的测定方法:酶的抑制作用动力学以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图加以判断,并根据酶的动力学参数包括表观米氏常数(K_m)和最大反应速度(v_m)的变化进行二次作图,求其效应常数.

2 结果

2.1 有机溶剂对酶活力影响的浓度效应

以甲醇、乙醇、丙醇、甲醛、丙酮为效应物,在测活体系中加入不同浓度的效应物,研究对杂色鲍 ALP 酶活力的影响.结果(图 1)表明随着有机溶剂浓度增大,酶活力呈指数下降.测定导致酶活力下降 50% 的上述 5 种溶剂 IC_{50} 值依次为 5.41 、 3.07 、 1.80 、 31.0×10^{-3} 、 2.30 mol/dm^3 .这说明醇、醛、酮对杂色鲍 ALP 活力有明显的失活作用.酶在醇类有机溶剂溶液中的失活作用强度顺序是:丙醇 > 乙醇 > 甲醇,说明随着溶剂极性的下降,对酶的抑制作用加强.

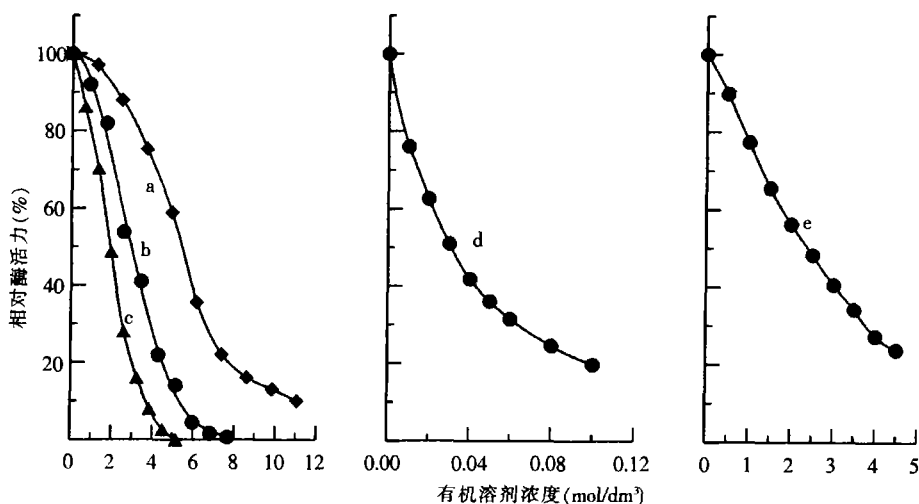


图 1 醇、醛和酮对杂色鲍 ALP 酶活力的影响

Fig.1 Effect of organic solvent on the enzyme

a. 甲醇, b. 乙醇, c. 丙醇, d. 甲醛, e. 丙酮

2.2 酶在有机溶剂溶液中的失活作用呈可逆效应

在含 0.5 mmol/dm^3 pNPP 的测活体系中,加入不同量的有机溶剂,改变加入的酶量,测定酶促反应的初速度,以酶活力对加入的酶量作图判断酶的失活作用.图 2 是酶在不同浓度甲醛溶

液中的失活作用,酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线,随着甲醛浓度的增大,直线的斜率降低.这表明甲醛是通过酶的失活作用而导致催化效率的降低,而不是通过降低有效的酶量导致酶活力的下降.其说明酶在甲醛溶液中的失活作用属于可逆过程,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高而增大.酶在其他有机溶剂溶液中也有相同的行为,均为可逆的失活作用.

2.3 酶在醇溶液中的失活作用类型与失活常数的测定

研究酶在甲醇、乙醇和丙醇溶液中的失活作用类型,在含不同浓度醇的测活体系中,改变底物(pNPP)浓度[s],测定酶促反应的初速度(v_0),以Lineweaver-Burk 双倒数作图,确定其失活作用类型.图3为酶在甲醇溶液中失活作用的Lineweaver-Burk 双倒数关系图,得到一组相交于横轴的直线,说明米氏常数 K_m 不变而表现最大反应速度(v_m)降低.这表明酶在甲醇溶液中的失活作用属于非竞争性,酶对底物的亲和力不受影响,而酶催化活力下降.以 $1/v_m$ 对甲醇浓度作图,可以求得酶在甲醇溶液中的失活常数,测定结果总结于表1.酶在乙醇、丙醇溶液中的失活作用也表现出相同的机制,以同样的方法可以求得它们的失活常数,结果也列于表1.

2.4 酶在甲醛和丙酮溶液中的失活作用类型及失活常数测定

分别研究酶在甲醛和丙酮溶液中的失活作用类型.图4为酶在不同浓度甲醛溶液中的Lineweaver-Burk 双倒数关系图,得到一组相交于第二象限的直线,说明 K_m 和 v_m 都发生变化.这表明酶在甲醛溶液中的失活作用属于混合型,酶对底物的亲和力下降(K_m 值增大、 v_m 值下降).分别以直线的斜率(内插图 b)和纵轴截距(内插图 c)对甲醛浓度作图,可以求得游离酶和 ES 络合物在甲醛溶液中的失活常数(K_i 和 K_{is}),测定结果总结于表1.酶在丙酮溶液中的失活作用也表现出混合类型,采用同样的方法可以求得它们的失活常数,结果也总结于表1.

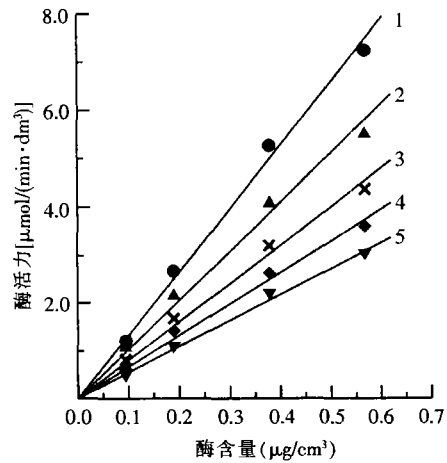


图2 甲醛对杂色鲍 ALP 失活机理的判断
Fig.2 Determination of inactivation mechanism of aldehyde on the enzyme

图中线 1~5 甲醛浓度分别为: 0、10、20、30、40 mmol/ dm³

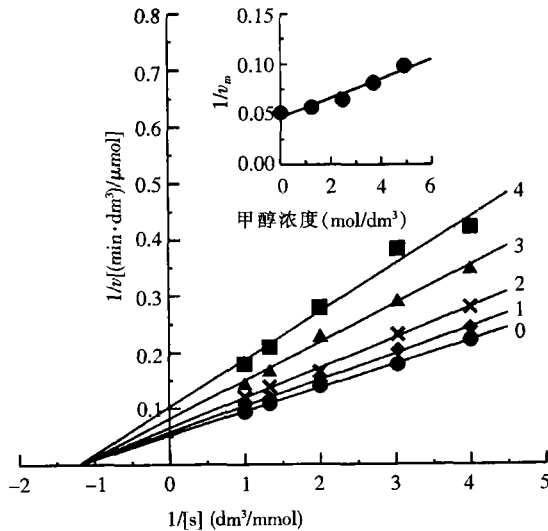


图3 甲醇对杂色鲍 ALP 失活效应的Lineweaver-Burk 关系图
Fig.3 Lineweaver-Burk plots for inactivation of ALP by methanol

图中线 0~4 甲醇浓度分别为: 0、1.23、2.46、3.69、4.92 mol/dm³, 内插图为 $1/v_m$ 与甲醇浓度的关系

表 1 杂色鲍碱性磷酸酶在有机溶剂中的失活作用

Tab. 1 Inactivation of ALP in some organic solvents

化合物	IC_{50} 值 (mol/dm^3)	失活作用	作用类型	抑制常数	
				K_I (mol/dm^3)	K_{IS} (mol/dm^3)
甲醇	5.41	可逆	非竞争性	5.36	-
乙醇	3.07	可逆	非竞争性	3.02	-
丙醇	1.80	可逆	非竞争性	1.80	-
甲醛	$31.0^{\text{①}}$	可逆	混合型	$24.7^{\text{①}}$	$56.2^{\text{①}}$
丙酮	2.30	可逆	混合型	1.66	5.40

注:有上标“①”的单位为 mmol/dm^3

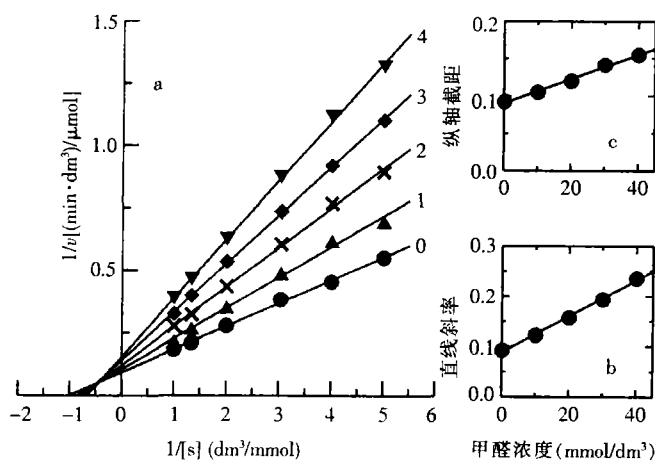


图 4 杂色鲍 ALP 在甲醛溶液中的失活作用

Fig.4 Inactivation of the enzyme by aldehyde

(a)Lineweaver-Burk 关系图,线 0~4 甲醛浓度分别为: 0、10、20、30、40 mmol/dm^3 ; (b)斜率对甲醛浓度作图; (c) 截距对甲醛浓度作图

3 讨论

从表 1 可以看到杂色鲍碱性磷酸酶在醇、醛和酮溶液中均表现出失活作用. 在醇溶液中的失活作用强度呈丙醇 > 乙醇 > 甲醇, 说明极性越低的醇对酶的失活作用越高, 可见酶分子中疏水键对维持酶的三维构象起了重要作用. 在酶的水介质中, 以氢键、静电力和疏水键等维持其形成稳定的三维构象, 并在酶分子表面形成一个极性水化层. 当引入有机溶剂后, 破坏了该水化层, 降低了溶液的极性, 使酶分子中维系构象的次级键被破坏, 从而改变酶的构象, 酶活性中心的微环境构象变化引起酶活力的下降^[8]. 酶在甲醛、丙酮溶液中的失活作用表现为混合型, 但抑制强度有很大的差异, 从 IC_{50} 值的大小来看, 酶在甲醛溶液中失活率是在丙酮溶液中失活率的 100 倍强. 可见, 醛类物质对养殖动物如鲍鱼、对虾等毒性更大. 甲醛对该酶抑制作用更明显, 环境中甲醛在较低浓度就可以使该酶的活力呈指数下降. 正如文献[9]所示: 当乙醇浓度达 30% (V/V), 即约为 $5.13 \text{mol}/\text{dm}^3$ 时, 健康虾酶活力完全丧失, 其失活的酶蛋白在乙醇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.

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 陈清西,陈素丽,石艳,等.长毛对虾碱性磷酸酶性质[J].厦门大学学报(自然科学版),1996,35(2):257~261.
- [3] 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.
- [4] 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(8):879~885.
- [5] 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):272~275.
- [6] 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.
- [7] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. J Enzy Inhib Med Chem, 2003,18(6):491~496.
- [8] 郑文竹,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.
- [9] Chen Q X, Zhang R Q, Yang P Z, et al. Effect of ethanol on the activity and conformation of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase [J]. Int J Biol Macromol, 1999,26(2):103~107.

Inactivation effect of alkaline phosphatase from *Haliotis diversicolor* in the solutions of alcohol, aldehyde and ketone

CHEN Qiao^{1,2}, HONG Yan-fei¹, LIAO Jin-hua¹, ZHUANG Zong-lai¹, CHEN Qing-xi¹

(1. Key Lab of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering/
Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University,
Xiamen 361005, China; 2. Fujian Education Institute, Fuzhou 350001, China)

Abstract: The inactivation effects of alkaline phosphatase (ALP) from *Haliotis diversicolor* in organic solvents (methanol, ethanol, propanol, aldehyde, acetone) were studied using the kinetic method of Lineweaver-Burk plot. And their inhibition types and inhibition constants were determined. Results showed that the enzyme activity rapidly declined with increasing organic solvent concentrations. The IC_{50} , the concentrations leading to 50% activity lost, of methanol, ethanol, propanol, aldehyde, and acetone were estimated as 5.41, 3.07, 1.80, 31.0×10^{-3} , 2.30 mol/dm^3 respectively. The inactivation of the enzyme in these organic solvents was reversible reaction. The inactivation of the enzyme in methanol, ethanol and propanol solvents belonged to be noncompetitive type, while that in aldehyde and acetone solvents was mixed type. The K_i of methanol, ethanol and propanol were 5.36, 3.02, 1.80 mol/dm^3 respectively. The K_i of aldehyde and acetone were determined to be 24.7×10^{-3} , 1.66 mol/dm^3 respectively; and K_{is} were determined to be 56.2×10^{-3} , 5.4 mol/dm^3 respectively.

Key words: marine organism; alkaline phosphatase; experimental research; *Haliotis diversicolor*; inactivation; organic solvents

(责任编辑:郭水伙)