

金属离子对鲍鱼碱性磷酸酶活力的影响

廖金花,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:碱性磷酸酶(ALP, EC 3.1.3.1)是一种金属酶,其结构的维持和酶活性的表现均需金属离子.本文研究了儿种金属离子分别对鲍鱼 ALP 活力的影响.结果表明, Li^+ , Na^+ 和 K^+ 等正一价碱金属离子对酶活力没有任何效应;碱土金属离子 Mg^{2+} , Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对酶有激活作用,其激活程度依次为: $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$, 而且 Mg^{2+} 在 5.0 mmol/L 时可以使酶活力提高 267%;在过渡金属离子中, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶的效应不同, Zn^{2+} , Cu^{2+} 为抑制作用,而 Co^{2+} , Mn^{2+} 表现为激活作用;重金属离子 Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ 和 Cd^{2+} 对酶有抑制作用,其中 Hg^{2+} 的抑制效应最强, 1.0 mmol/L Hg^{2+} 可使酶活力抑制 94%. 研究 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 的抑制类型表明, Mn^{2+} 为混合型激活作用,而 Cu^{2+} 对酶的抑制类型为非竞争性抑制作用,其抑制常数 (K_i) 为 0.316 mmol/L.

关键词: 鲍鱼;碱性磷酸酶;金属离子

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

碱性磷酸酶(E. C. 3. 1. 3. 1 Alkaline phosphatase, 简称 ALP), 是微生物和动物界中普遍存在的一种金属酶^[1,2]. 其结构的维持和酶活性的充分发挥需要两种金属离子: Mg^{2+} 和 Zn^{2+} . 但它们的作用地位不同. 在微生物的碱性磷酸酶中, 酶活性中心为一个口袋状结构, 包含两个 Zn^{2+} 离子和一个 Mg^{2+} 离子, 两个 Zn^{2+} 离子相距 0.39 nm, 而 Mg^{2+} 离子与两个 Zn^{2+} 离子分别相距 0.5 nm 和 0.7 nm^[3]. 鲍鱼 ALP 与鲍鱼体内的钙磷代谢、甲壳素的形成及分泌直接相关, 是鲍鱼赖以生长、生存的重要酶类之一. 一旦海洋环境受到污染如重金属离子、有机溶剂、环境的酸碱度改变等, 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. 本文从动力学角度研究金属离子对鲍鱼 ALP 酶活力的影响, 探讨 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶的效应机理, 以为海洋污染的监测与防患、人工养殖鲍鱼等方面提供科学依据, 具有重要的理论指导意义和实际应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)为 E. Merck 产品; 各种金属离子的无机盐均为国产分析纯, 溶液均用玻璃重蒸水配制.

1.2 方法

鲍鱼(*Haliotis diversicolor*)碱性磷酸酶的纯化参考文献[4], 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一蛋白成分.

金属离子对酶活力的影响: 在 2 mL 测活体系中, 含终浓度为 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液(pH 10.0)或 Gly-NaOH 缓冲液(pH 9.4), 1.0 mmol/L pNPP, 加入不同浓度的金属离子为效应物, 于 37℃ 恒温水浴中预热 5 min 后, 加入 10 μL 酶液, 37℃ 反应 10 min 后加入 2 mL 0.1 mmol/L NaOH 溶液终止反应, 然后在 722 型分光光度计上测定波长为 405 nm 的光密度值, 光径为 1 cm, 并以标准对硝基苯酚(pNP)为对照. 在该条件下产物的消光系数为 $1.73 \times 10^4 (\text{mol/L})^{-1} \text{cm}^{-1}$ ^[5].

金属离子对酶的作用动力学测定: 在含不同浓度的金属离子的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液(pH 10.0)测活体系中, 改变底物浓度, 测定酶促反应的初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 判断其

收稿日期: 2004-05-09

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

作者简介: 廖金花(1980-), 女, 硕士研究生.

* Corresponding author, Tel/Fax: 0592-2185487,

E-mail: chenqx @jingxian. xmu. edu. cn

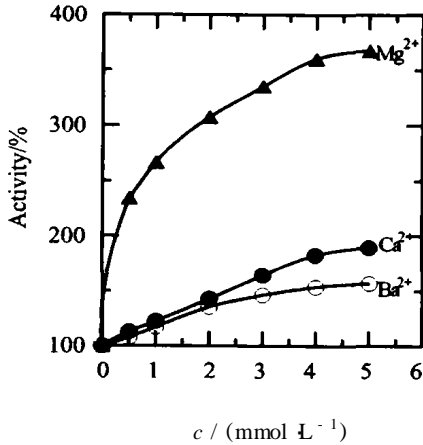


图1 碱土金属离子对鲍鱼碱性磷酸酶活力的影响
Fig. 1 Effects of alkaline-earth metal ions on the activity of ALP from *Haliotis diversicolor*

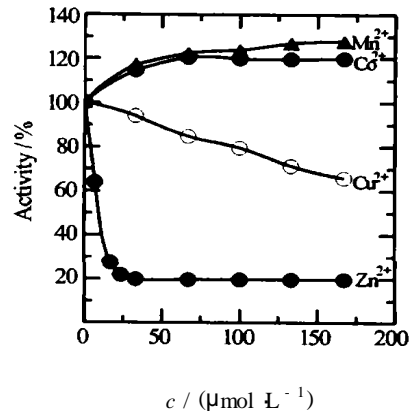


图2 过渡金属离子对鲍鱼碱性磷酸酶活力的影响
Fig. 2 Effects of transition metal ions on the activity of ALP from *Haliotis diversicolor*

效应机理. 并根据酶的动力学参数的变化进行二次作图, 求其效应常数.

2 实验结果

2.1 正二价碱土金属离子对鲍鱼 ALP 活力的影响

在 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液的测活体系中, 分别加入 Li_2SO_4 、 NaCl 、 NaNO_3 、 KCl 等无机盐, 检测它们对酶活力的影响, 当效应物浓度达 10 mmol/L , 酶活力保持不变, 说明 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 等正一价碱金属离子及 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 等酸根离子对鲍鱼碱性磷酸酶催化水解反应的活力都没有任何的影响. 分别以 MgCl_2 、 CaCl_2 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 为效应物, 在 Gly-NaOH 缓冲液的测活体系中测定 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 等碱土金属离子对酶活力的影响, 结果见图 1. 由图可见, 3 种碱土金属离子对该酶均有激活作用, 激活程度依次为 $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$. Mg^{2+} 的激活作用最为显著, 5 mmol/L Mg^{2+} 可以使酶活力提高约 267%.

2.2 过渡金属离子对鲍鱼 ALP 活力的影响

分别以 MnSO_4 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、 CuSO_4 、 ZnCl_2 为效应物, 研究这些过渡金属离子对酶活力的影响. 结果表明, Mn^{2+} 、 Co^{2+} 对该酶有不同程度的激活作用, 而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 则表现为抑制作用(图 2).

2.3 重金属离子对鲍鱼 ALP 活力的影响

在 Gly-NaOH 缓冲液的测活体系中, 以 Hg-Cl_2 、 AgNO_3 、 CdCl_2 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 为效应物, 测定

Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^+ 等重金属离子对酶活力的影响, 结果显示: 4 种重金属离子对该酶均有抑制作用, 其抑制作用由强至弱依次为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$, 其中金属离子终浓度为 300 μmol/L 时, 它们分别可以使酶活力抑制 98%、35%、28% 和 21% (图 3).

2.4 Mn^{2+} 对鲍鱼 ALP 激活作用的动力学

在 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液 (PH 10.0) 的测活体系中, 加入一定量的 Mn^{2+} 离子为效应物, 改变底物浓度, 测定酶反应的初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 结果(图 4)表明, Mn^{2+} 对酶的激活作用使得酶促反应的 V_{max} 增大, 而 K_m 值降低, 其效应为混合型激活作用.

2.5 Cu^{2+} 的抑制类型及抑制常数 K_i

在测活体系中, 加入不同浓度的 CuSO_4 , 改变底

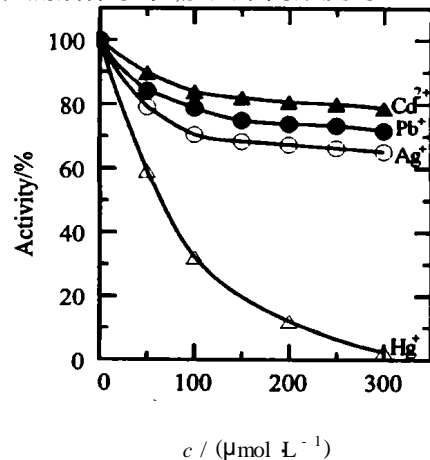


图3 重金属离子对鲍鱼碱性磷酸酶活力的影响
Fig. 3 Effects of heavy metal ions on the activity of ALP from *Haliotis diversicolor*

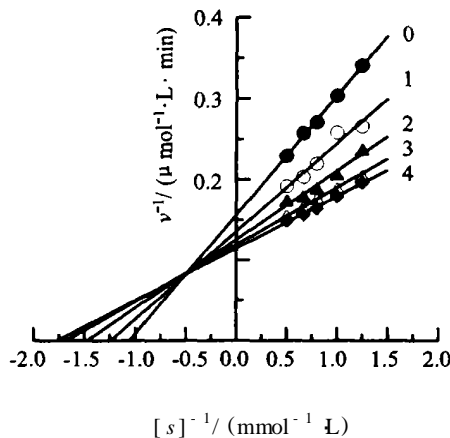


图4 锰离子对鲍鱼碱性磷酸酶酶活力的激活作用
直线0~4的锰离子浓度分别为0,25,50,75,100 μmol/L

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots for activation of Mn^{2+} on the activity of ALP from *Haliotis diversicolor*

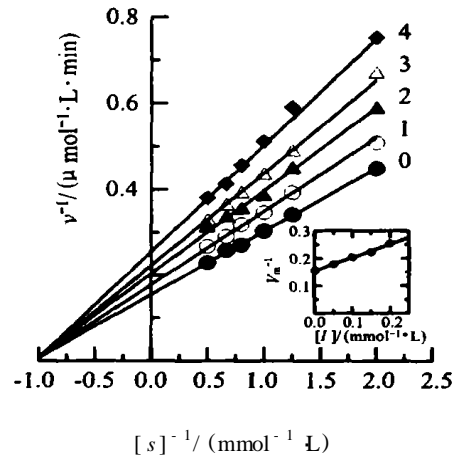


图5 铜离子对鲍鱼碱性磷酸酶酶活力的抑制作用
直线0~4的铜离子浓度分别为0,50,100,150,200 μmol/L

Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for inhibition of $CuSO_4$ on the enzyme for the hydrolysis of pNPP

物浓度,测定酶反应的初速度,以 *Lineweaver-Burk* 双倒数作图。结果(图5)表明, Cu^{2+} 的存在导致 V_{max} 值的下降,但 K_m 值不变,其抑制作用属于非竞争性效应, Cu^{2+} 与酶分子的结合不影响底物与酶分子的结合,它们的结合位点不同。以 $1/V_{max}$ 对 $[Cu^{2+}]$ 作图,求出其抑制常数 (K_i) 为 0.316 mmol/L。

3 讨论

ALP 是一种金属酶,其空间结构的维持与酶活力的表现都需要金属离子的存在。据报道^[6],ALP 含有 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 两种金属离子结合位点,其中 Zn^{2+} 是酶活性所必需的,位于酶活性中心,是酶活性必需基团之一,参与催化作用; Mg^{2+} 的结合位点是在酶活性中心附近,仅起调节作用。各种金属离子对鲍鱼 ALP 的效应实验表明,一价金属离子对其活力没有影响,这些离子在细胞内外都是常见的,细胞对这些离子浓度的变化有着严密的调控机制,通过长期的进化,ALP 已经适应了这些离子浓度的变化^[7]。碱土金属离子对鲍鱼 ALP 有激活作用,其中尤以 Mg^{2+} 的激活作用最为明显。过渡金属离子对鲍鱼 ALP 的效应不同, Mn^{2+} 和 Co^{2+} 对酶有激活作用,而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 则有抑制作用。这些过渡金属离子可能是与酶分子中的 Mg^{2+} 结合位点结合而起不同的生物学效应。重金属离子对 ALP 均产生抑制作

用,它们是有毒的金属离子,常可以使酶变性失活^[8]。我们的实验结果与此一致。 Mn^{2+} 对鲍鱼碱性磷酸酶的效应表现为混合型激活作用,而 Cu^{2+} 表现为非竞争性抑制效应,这说明 Cu^{2+} 与酶的结合位点不同于底物与酶的结合位点。此结果与背角无齿蚌的 ALP 一致^[7]。

参考文献:

- [1] Fernley H N. The Enzymes [M]. New York: The Enzymes, Academic Press, 1971. 4:417 - 444.
- [2] Applebury M L, Coleman T E. E. coli alkaline phosphatase metal binding, protein conformation and quaternary structure[J]. J. Biol. Chem., 1969, 244(2): 308 - 318.
- [3] 林秋眠. 锯缘青蟹池塘养殖及生物学的初步研究[J]. 福建水产, 1986, 1: 20 - 26.
- [4] 陈清西, 张, 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.
- [5] 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]. Protein Chem., 1996, 15: 345 - 350.
- [6] Stec B, Holtz K M, Kantrowitz E R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 299(5): 1303 - 1311.
- [7] 张洪渊, 刘克武, 石安静, 等. 背角无齿蚌碱性磷酸酶分离、纯化及其动力学研究[J]. 水生生物学报, 1996, 20(1): 57 - 62.

- [8] Mazorra M T, Rubio J A, Blasco J. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: Kinetic characteristics and effects of heavy metals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2002, 131:241 - 249.

Effect of Metal Ions on the Activity of Alkaline Phosphatase from *Haliotis diversicolor*

LIAO Jin-hua, CHEN Qing-xi *

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

Abstract : Alkaline phosphatase (EC 3. 1. 3. 1) is a metalloenzyme, which catalyzes the nonspecific hydrolysis of phosphate monoesters. The present paper deals with the study of the effect of some kinds of metal ions on the activity of alkaline phosphatase from *Haliotis diversicolor*. The positive monovalent alkali metal ions (Li^+ , Na^+ and K^+) have no any effect on the enzyme and that the acid radicals: SO_4^{2+} , Cl^- and NO_3^- do not influence the enzyme activity, either; positive bivalent alkaline-earth metal ions (Mg^{2+} , Ca^{2+} and Ba^{2+}) activate the enzyme and the order of the activation intensity is following: $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$. The effect of transition Mn^{2+} and Co^{2+} activate the enzyme, while Cu^{2+} and Zn^{2+} inhibit the enzyme. The activation effects of Mn^{2+} on the enzyme are of mixed type. Heavy metal ions (Hg^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} and Pb^{2+}) inhibit the enzyme too. The inhibition effect of Hg^{2+} is stronger than that of Cu^{2+} . The inhibition of Cu^{2+} on the enzyme appears to be a partial noncompetitive type and the inhibition constant (K_i) was determined to be 0.316 mmol/L.

Key words : *Haliotis diversicolor*; alkaline phosphatase; metal ions