

氨基酸对鲍鱼碱性磷酸酶活力的影响

林丽蓉, 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: 选用 L-Ala、L-Val、L-Leu 等 15 种氨基酸为效应物, 研究它们对杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 碱性磷酸酶 (EC. 3. 1. 3. 1) 催化 pNPP 水解反应的影响. 结果表明: 上述这些氨基酸对鲍鱼碱性磷酸酶均有一定程度的抑制作用, 抑制程度随着试剂浓度增大而加剧. 当浓度为 10.0 mmol/L 时, 分别可以使酶活力下降: 7.77%、36.75%、22.79%、39.86%、16.16%、19.33%、94.77%、20.19%、17.02%、40.15%、31.08%、17.52%、30.56%、36.77% 和 12.59%. 尤其以 L-Cys 对酶的抑制作用最为显著 (抑制率为 94.77%), 其次是 L-Ile 和 L-His, 它们均能使酶活力下降 40%; 对酶抑制率在 30% 以上的氨基酸还有 L-Val、L-Trp、L-Phe 和 L-Lys. 其它选用的氨基酸对酶的抑制率小于 25%. 选择对杂色鲍 ALP 具有较明显的抑制作用的氨基酸 L-Val、L-Ile、L-Trp 和 L-Cys 等氨基酸为研究对象, 研究它们对酶催化 pNPP 水解反应的抑制作用机理, 并测定其抑制常数. 结果表明 L-Cys 的抑制作用为混合型效应, 其 K_I 和 K_{IS} 值分别为 0.042 mmol/L 和 0.139 mmol/L; 而 L-Val、L-Ile、L-Trp 为反竞争性, 其 K_{IS} 分别为 9.56、8.55、8.09 mmol/L.

关键词: 鲍鱼碱性磷酸酶; 氨基酸; 抑制作用机理

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

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, 它与海水中磷质与钙质的吸取、磷酸钙的生成、甲壳素的形成和分泌直接相关. 目前我国学者已对多种贝类的 ALP 进行了研究^[2,3], 对鲍鱼 ALP 的研究还处于空白. 我们在对鲍鱼 ALP 分离纯化和研究部分酶学性质的基础上, 进一步研究各种氨基酸对酶活力的影响, 探讨对酶有较强抑制作用的氨基酸对酶的抑制作用机理. 该研究对深入探讨该酶的催化作用机理、酶的结构与功能、酶活力的调控有重要的指导作用和实际应用意义.

1 材料与方法

对-硝基苯磷酸二钠 (pNPP) 为德国 E. Merck 产品; 各种氨基酸及其余试剂均为国产分析纯试剂, 使用的蒸馏水为玻璃重蒸水. 鲍鱼 ALP 酶制剂参考文献 [1] 制备, 经 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 含 0.1 mol/L NaCl) 抽提、正丁醇处理、硫酸铵分级沉淀分离、DEAE-纤维素离子交换、葡聚糖凝胶分子筛和再次的 DEAE-纤维素离子交换柱层析纯化, 得到电泳单一纯的碱性磷酸酶, 比活力为 1 226 U/mg. 碱性磷酸酶的活力测定方法参考文献 [2], 以 pNPP 为底物, 在 2 mL 的测活体系中包含 0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液 (pH = 10)、2 mmol/L Mg-Cl_2 、5 mmol/L 的底物, 加入 10 μL 酶液, 在 37 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴中准确反应 10 min, 加入 2 mL 0.1 mol/L 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. 消光系数按 1.73×10^4 (mol/L cm)⁻¹ 计算^[2]. 效应物对酶的抑制作用的机理是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 比较酶催化的动力学参数, 包括表观米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_m) 的变化来判断.

收稿日期: 2004-05-09

基金项目: 教育部跨世纪人才计划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: 林丽蓉 (1976 -), 女, 硕士研究生. 现在厦门中山医院临床检验中心工作.

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

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

2 实验结果

2.1 几种氨基酸对酶活力的影响

分别以丙氨酸(L-Ala)、缬氨酸(L-Val)、亮氨酸(L-Leu)、异亮氨酸(L-Ile)、丝氨酸(L-Ser)、苏氨酸(L-Thr)、半胱氨酸(L-Cys)、谷氨酸(L-Glu)、天冬氨酸(L-Asp)、组氨酸(L-His)、赖氨酸(L-Lys)、精氨酸(L-Arg)、苯丙氨酸(L-Phe)、色氨酸(L-Trp)和脯氨酸(L-Pro)为效应物,研究它们对酶活力的影响。结果(图1)表明,上述各氨基酸对鲍鱼ALP的催化活力有不同程度的抑制作用。当抑制剂浓度为10.0 mmol/L时,酶的相对活力分别为92.23%、63.25%、77.21%、60.14%、83.84%、80.67%、5.23%、79.81%、82.98%、59.85%、68.92%、82.48%、69.44%、63.23%和87.41%。非极性氨基酸对该酶的抑制程度依次为L-Ile>L-Val>L-Leu>L-Ala,它们分别可以使酶活力抑制39.9%、36.8%、22.8%和7.8%;在极性氨基酸中,L-Cys的抑制作用最强,可以使酶活力抑制94.8%,而L-Ser、L-Thr分别只使酶活力下降16.2%和19.3%;酸性和碱性氨基酸对酶活力也有不同程度的抑制作用,它们对该酶的抑制程度依次为L-Asp>L-Glu>L-Arg>L-Lys>L-His,表明酸性氨基酸的抑制作用较碱性氨基酸强;

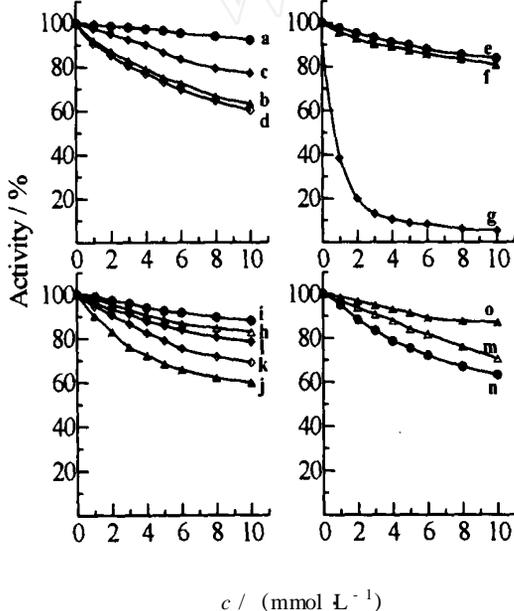


图1 氨基酸对酶活力的影响

Fig. 1 Effects of amino acids on the enzyme activity. L-Ala (a), L-Val (b), L-Leu (c), L-Ile (d), L-Ser (e), L-Thr (f), L-Cys (g), L-Glu (h), L-Asp (i), L-His (j), L-Lys (k), L-Arg (l), L-Phe (m), L-Trp (n), L-Pro (o)

芳香族氨基酸的抑制程度依次为L-Trp>L-Phe.

2.2 疏水氨基酸对鲍鱼碱性磷酸酶抑制作用类型和抑制常数测定

选择L-Val和L-Ile为效应物,探讨其抑制鲍鱼ALP的作用机理。在含不同浓度效应物的测活体系中,改变底物浓度,测定酶促反应的初速度,采用双倒数法作图判断抑制类型。图2为L-Ile对鲍鱼ALP抑制作用动力学的测定结果,测得的 $1/v \sim 1/[S]$ 关系为一组平行的直线,说明L-Ile只能与酶-底物络合物(ES)结合,而不与游离酶结合,对酶活力的效应属于反竞争性抑制类型。以不同浓度的效应物所求的 $1/V_m$ 对效应物浓度作图求得对ES的抑制常数 K_{IS} 为8.55 mmol/L。类似的实验也表明L-Val对鲍鱼ALP的效应也是反竞争性抑制类型,求得的抑制常数 K_{IS} 为9.56 mmol/L。

2.3 芳香族氨基酸对鲍鱼碱性磷酸酶也表现为非竞争性抑制作用

以芳香族氨基酸中作用最强的L-Trp为效应物,探讨其对鲍鱼碱性磷酸酶的抑制作用类型。在含不同浓度L-Trp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双倒数作图,判断抑制类型。结果表明,L-Trp也表现为反竞争性抑制作用,因为 $1/v \sim 1/[S]$ 双倒数图为一组

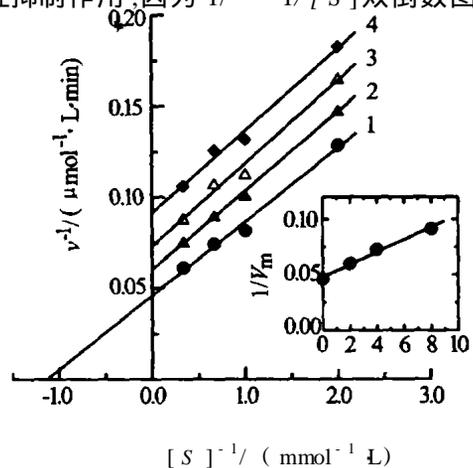


图2 L-Ile对鲍鱼ALP的抑制效应的Lineweaver-Burk图

直线1~4 L-Ile浓度分别为0,2,4和8 mmol/L;内插图为以纵轴截距 $1/V_m$ 对 $[Ile]$ 的2次作图,求 K_{IS}

Fig. 2 Lineweaver-Burk plots for L-Ile on the Haliotis diversicolor alkaline phosphatase. The inset represents the secondary plot of $1/V_m$ versus concentrations of L-Ile to determine the inhibition constant

平行直线,说明 L-Trp 只能与酶-底物络合物(ES)结合,而不与游离酶结合.以相同的方法测得 L-Trp 对鲍鱼 ALP 的抑制常数 K_{IS} 为 8.09 mmol/L.

2.4 半胱氨酸对鲍鱼碱性磷酸酶抑制作用机理研究

在含不同浓度 L-Cys 的测活体系中,固定酶的浓度,改变底物浓度,测定酶促反应的初速度,以 $1/v \sim 1/[S]$ 作图为 1 组相交于第 2 象限的直线(图 3),横轴截距和纵轴截距都因 L-Cys 浓度的变化而改变,米氏常数 (K_m) 随着 L-Cys 浓度增大而增大,最大反应速度 (V_m) 随着 L-Cys 浓度增大而下降,其抑制机理表现为混合型效应.以斜率和纵轴截距分别再对 L-Cys 浓度作图(图 3 内插图)为直线,求得 L-Cys 对游离酶的抑制常数 (K_I) 为 0.042 mmol/L,对酶底物络合物的抑制常数 (K_{IS}) 为 0.139 mmol/L.

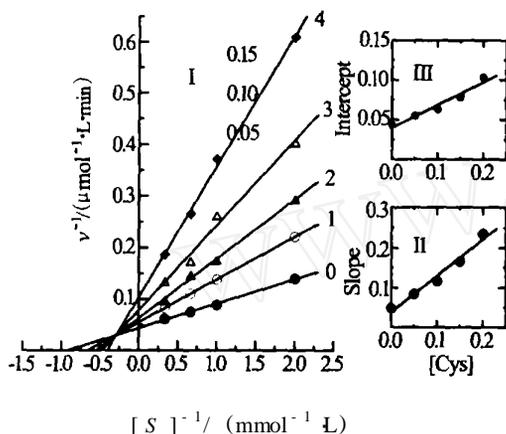


图 3 L-Cys 对鲍鱼 ALP 的抑制效应类型与抑制常数的测定

直线 0~4 代表 L-Cys 浓度分别为 0, 0.05, 0.1, 0.15 和 0.2 mmol/L. 内插图分别为直线的斜率和截距对 [L-Cys] 2 次作图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot for the ALP activity inhibited by L-Cys

3 讨论

一般说来,氨基酸对 ALP 的抑制具有立体异构专一性,只有 L-氨基酸才有明显的抑制作用^[3,4].在测活体系的 pH 为 10 的条件下,氨基酸羧基解离带负电荷,可与酶活性部位附近的带正电荷的基团可逆结合,而阻碍了底物与酶活性中心的结合,从而抑制了酶活力;也可能由于氨基酸的侧链基团与酶的结合,导致酶分子构象的变化而影响酶的催化作

用^[4~7].不同结构的氨基酸对于鲍鱼 ALP 有不同程度的抑制作用,非极性疏水性氨基酸中 L-Ile 的作用最强,具极性的中性氨基酸作用最大的是 L-Cys,而 L-His 则是酸性和碱性氨基酸抑制作用最大的一种.因此氨基酸对于鲍鱼 ALP 抑制作用程度不仅与其侧链的理化性质有关,还与特殊的基团有关,如苯环、巯基等.进一步研究氨基酸的抑制机理,L-Cys 对酶的效应是混合型抑制作用,与锯缘青蟹 ALP 的结果相一致^[2].可见,L-Cys 不仅与酶结合(EI),其络合物还可进一步与底物结合(EIS),L-Cys 对游离酶的抑制强度是对酶底物络合物的抑制强度的 3 倍.说明底物的存在可以降低 L-Cys 对酶的抑制作用.而 L-Val、L-Ile、和 L-Trp 对鲍鱼 ALP 的抑制作用表现为反竞争性机理,说明这些较大的疏水氨基酸及芳香族氨基酸不与游离酶结合,而仅与酶-底物络合物结合,这些结果与文献报道的锯缘青蟹 ALP 具有相同的结果^[2].

参考文献:

- [1] 陈清西,颜思旭.文昌鱼碱性磷酸酶的必需基团研究[J].厦门大学学报(自然科学版),1986,25(5):568-573.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Hoylaerts M F, Manes T, Millan J L. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ cell alkaline phosphatase [J]. Biochem, 1992, 286: 23-28.
- [5] Fishman W H. On the importance of being stereo specific [J]. Clinica Chimica Acta, 1989, 186(2):129-135.
- [6] 耿芳宋,修波,王秀丽,等.小牛肠碱性磷酸酶激活与抑制的动力学观察[J].青岛医学院学报,1995,31(3):191-194.
- [7] 李清漪,曾和期.大瓶螺碱性磷酸酶的分离纯化和部分性质研究[J].生物化学,1995,11(3):363-365.

Inhibition of Alkaline Phosphatase by Amino Acids

LIN Li-rong ,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 (ALP ,EC3. 1. 3. 1) is a metalloenzyme which catalyzes the nonspecific hydrolysis of phosphate monoesters. It is also concerned with the absorption of phosphate and calcium from seawater and exuviating cell of *Haliotis diversicolor*. The effects of some amino acids on the activity of alkaline phosphatase from *Haliotis diversicolor* were studied. The results showed that all the amino acids tested had inhibitory effects on the enzyme activity , and that the inhibitory intensity enhanced with increasing the concentrations of amino acids. At the concentration reached to 10.0 mmol/L ,the inhibition ratios were determined to be 94.77 % (L-Cys) ,40.15 % (L-His) ,39.86 % (L-Ile) ,36.77 % (L-Trp) ,36.75 % (L-Val) ,31.08 % (L-Lys) ,30.56 % (L-Phe) ,22.79 % (L-Leu) ,20.19 % (L-Glu) ,19.33 % (L-Thr) ,17.52 % (L-Arg) ,17.02 % (L-Asp) ,16.16 % (L-Ser) ,12.59 % (L-Pro) and 7.77 % (L-Ala) . The inhibitory kinetics of L-Cys ,L-Val ,L-Ile ,L-Trp ,on the enzyme were further studied. The results showed that the inhibition of L-Cys on the enzyme is found to be a mixed type. The inhibition constants of free enzyme (K_I) and enzyme-substrate complex (K_{IS}) by L-Cys were determined to be 0.042 mmol/L and 0.139 mmol/L ,respectively. L-Val ,L-Ile ,and L-Trp were found to be uncompetitive inhibitors of the enzyme ,and their inhibition constants (K_{IS}) were determined to be 9.56 ,8.55 and 8.09 mmol/L , respectively.

Key words : *Haliotis diversicolor* alkaline phosphatase ;amino acids ;inhibitory kinetics