

研究简报

中国对虾酸性和碱性磷酸酶的特性研究*

何海琪 孙 凤

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

磷酸酶, 又称正磷酸单酯水解酶, 是一种能催化各种含磷化合物水解的酶类, 根据它们起催化作用的最适 pH 特性, 又可分为酸性磷酸酶 (EC 3. 1. 32) 和碱性磷酸酶 (EC 3. 1. 31) 两类。磷酸酶具有非常重要的生理功能, 它广泛存在于各种动物体内, 是动物体内重要的解毒体系, 并且在动物机体的骨化过程及在磷化物和其它一些营养物质的消化、吸收和转运过程中都起着重要作用。此外, 通过催化磷蛋白的水解, 磷酸酶在细胞调节过程中也具有一定作用^[3,9,11]。尽管磷酸酶的研究有很久的历史, 但绝大多数的研究几乎都集中在陆生的高等脊椎动物哺乳类身上。在无脊椎动物体中这方面研究的很少, 而有关甲壳类动物磷酸酶的研究文献几乎没有。

本文对中国对虾肌肉和肝胰脏中酸性和碱性磷酸酶的动力学特性、热稳定性、激活剂和抑制剂等的影响进行了研究, 以便对中国对虾磷酸酶类有一个初步的认识, 并进一步了解中国对虾的生理生化特性。

一、材料和方法

中国对虾 (*Penaeus orientalis*) 取自本所黄岛海洋生物生态实验站, 体长约 10cm, 饲养于流动海水的水族箱内, 每日两次投喂颗粒饵料。

底物对硝基苯磷酸酯 (P-NPP) 为美国 Sigma 公司产品, 其它试剂均为分析纯。

酶液制备, 对虾肌肉或肝胰脏加适量缓冲液, 以 10000r/min 冰浴匀浆 2min, 于 4℃ 放置 4h, 间或搅动一下。然后于 0℃ 以 10000r/min 离心 15min, 得粗酶液供各组试验用。

应用分光光度法测定磷酸酶水解底物 P-NPP 生成的对硝基酚^[7]酸性缓冲液 (测定酸性磷酸酶), 50mmol/L; 或 25mmol/L 的 Tris 缓冲液 (测定碱性磷酸酶), 5mmol/L 的底物和适量的酶液, 最终反应体积为 1ml。反应液在 37℃ 下保温一定时间, 加 4ml 0.1 mol/L NaOH 终止反应。反应生成的对硝基酚在 400nm 波长下测定。

pH 对对虾磷酸酶活性影响的测定, 应用 3 种不同的方法来提取对虾肌肉中的磷酸酶: A 法^[13]的提取液为 pH = 7.5 的 50mmol/L Tris-HCl (含 14mmol/L KCl, 140mmol/L NaCl, 1mmol/L MgCl₂ 和 0.5% Tritone-100) 缓冲液; B 法^[9]的提取液为 pH = 5.0

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1567 号。本研究系博士学位论文的一部分, 是在刘瑞玉研究员指导下完成的。

接受日期: 1989 年 11 月 30 日。

的 100 mmol/L NaAc (含 0.01% Tritone) 缓冲液; C 法¹⁾的提取液为含 20% 正丁醇的 100mmol/L 蔗糖溶液。

在测定磷酸酶的最适 pH 时,酶活性的测定除缓冲液的 pH 不同外,其它条件均保持一致。所用缓冲液体系为醋酸 (pH = 2.2—6.5)、磷酸 (pH = 5.8—8.0) 和 Tris (pH = 7.0—10.5) 缓冲液。

酶蛋白含量按 Lowry 法测定^[8]。

二、结果与讨论

1. pH 对中国对虾磷酸酶活性的影响

对虾肌肉磷酸酶在不同 pH 下的活性测定结果见图 1。图中 a, b, c 三条曲线分别为 A, B, C 三种方法提取的磷酸酶相对活性比值。从图中可以看出,用三种方法提取的对虾肌肉磷酸酶在酸性 pH 区域内均有两个酶活性峰 (I, II, 图 1a—c), 位于 pH = 2.6 和 pH = 4.3 左右;不同的是, A 法提取的酸性磷酸酶在 pH = 6.0 处还有一个活性峰 (III, 图 1a)。值得注意的是, 三种方法提取的对虾磷酸酶在碱性 pH 区域内均无活性峰。另外,从实验结果看, C 法提取的磷酸酶活性较低,即 C 法提取的效力较差。

肝胰脏中的磷酸酶用 A 法提取,其 pH-酶活性曲线如图 1d 所示。由图可见,对虾肝胰脏磷酸酶在酸性 pH 区域有两个活性峰 (I', II'), 分别约位于 pH = 3.4 和 pH = 6.5。与肌肉不同的是,后者在碱性 pH 区域内存在一个活性很高的磷酸酶活性峰 (III'), 其最适 pH 在 9.5 左右;由此表明该碱性磷酸酶具有组织特异性。

从实验结果看,对虾肌肉和肝胰脏中的酸性磷酸酶在较宽的酸性 pH 区域内具有相当高的活性。已知最适 pH 是区别同工酶的重要特征之一,肌肉酸性磷酸酶在 pH = 2.6, pH = 4.3, pH = 6.0 处显示出的活性峰和肝胰脏酸性磷酸酶在 pH = 3.4 和 pH = 6.5 处出现的活性峰,可能是由于不同酸性磷酸酶同工酶作用的结果。为讨论方便起见,将肌肉中最适 pH 为 2.6, 4.3 和 6.0 的酸性磷酸酶分别定义为酶 I、酶 II 和酶 III;将肝胰脏中最适 pH 为 3.4 和 6.5 的酸性磷酸酶定义为酶 I' 和酶 II', 最适 pH 为 9.3 的碱性磷酸酶定义为酶 III'。这一结果与许多脊椎动物中存在着结构不同的磷酸酶同工酶^[4,5,10]的结论是吻合的。

无论对虾肌肉还是肝胰脏,均存在着一种最适 pH 极偏酸的酸性磷酸酶,这比其它动物的酸性磷酸酶的最适 pH 值要高得多^[4,5,12]。据报道,对虾体内的多数酶类其最适 pH 都稍偏酸性^[2]。此现象是比较独特的,是否与对虾体内环境 pH 值的偏酸性有关尚待进一步研究。

用三种方法提取对虾肌肉磷酸酶,其中只有用含较高浓度的 Tritone-100 A 法提取,才能得到最适 pH = 6.0 的肌肉酸性磷酸酶 III, 说明这可能是一种与膜结合较紧的酸性磷酸酶。

对虾的碱性磷酸酶在肌肉中几乎测不出活性,而在肝胰脏中却活性很高,由此表明对虾肝胰脏碱性磷酸酶具有组织特异性的。

2. 温度对磷酸酶活性的影响

1) 刘汝高, 1987, 贻贝 (*Mytilus edulis* Lime) 足丝固化过程中酶化学性质的初步研究, 硕士研究生论文。

对虾肌肉中 3 种酸性磷酸酶 (I, II, III) 在各自最适 pH 条件下, 反应的最适温度分别为 45°C, 50°C 和 40°C。肝胰脏中两种酸性磷酸酶 (I', II') 在各自最适 pH 条件下, 反应的最适温度分别为 35°C 和 38°C; 碱性磷酸酶 (III') 反应的最适温度约在 40°C。上述结果表明, 对虾肌肉中酸性磷酸酶的适温性要比肝胰脏中酸性磷酸酶的适温性高得多, 且同工酶间的最适温度也是有差异的。

3. 对虾磷酸酶的热稳定性

对虾磷酸酶对温度的热稳定性测定结果表明, 肌肉酸性磷酸酶 II 的热稳定性最好, 肝胰脏中碱性磷酸酶的热稳定性比酸性磷酸酶好。在 50°C 条件下保温 1h, 对虾各种磷酸酶的失活率分别为: 酶 I 约为 52%; II 为 21%; III 为 68%; I' 为 44%; II' 为 66%; III' 为 30%。

4. 底物浓度对对虾磷酸酶反应速度的影响

米氏常数 K_m 是鉴别不同酶的重要物理常数, K_m 值的大小反映出酶和底物亲和力的强弱。 K_m 值越大, 酶和底物的亲和力越小, 表示酶促反应达到最大速度时所需要的底物浓度越高。在本实验条件下, 根据底物浓度与酶反应速度关系, 应用双倒数作图法^[1] (图略) 求得各磷酸酶 K_m 值: 酶 I 为 0.17mmol/L, 酶 II 为 0.56mmol/L, 酶 III 为 1.4mmol/L; 酶 I' 为 0.22mmol/L, 酶 II' 为 0.38mmol/L, 酶 III' 为 0.9mmol/L; 其最大反应速度 V_{max} 分别为 0.0045, 0.0154, 0.0417, 0.0054, 0.0118, 0.0222 μ g/min。显然对虾体内各种磷酸酶催化特性是有差异的。

5. 激活剂和抑制剂对对虾磷酸酶的影响

27 种化合物和无机元素对对虾磷酸酶活性的影响见表 1、表 2。每种激活剂或抑制剂均与酶液预温 20min, 然后向其中加入 5mmol/L 底物并反应 10min, 测定酶活性。与对照组 (假定酶反应活性为 100) 比较。

表 1 的结果看, 抗坏血酸 Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} 对肌肉酸性磷酸酶 I, II, III 都有激活作用; Pb^{2+} 对酶 I 和 III 有激活作用, 对 II 作用不明显; Ca^{2+} 对酶 II 有激活作用, 但对

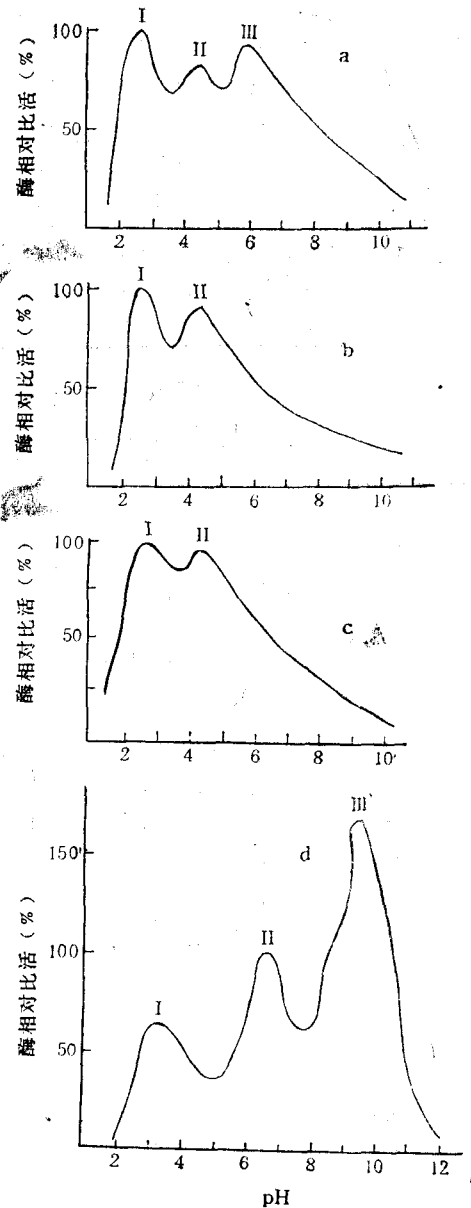


图 1 不同 pH 对对虾肌肉 (a-c) 和肝胰脏中 (d) 磷酸酶活性的影响

Fig. 1. Effects of pH on the muscular phosphatases (a-c) and hepatopancreatic phosphatases (d) of shrimp (*Penaeus orientalis*)

I 却有抑制作用; Zn^{2+} 是酶 II 的激活剂, 是酶 I 和 III 的抑制剂; EDTA 仅对酶 III 有激活作用, 而对酶 I 和酶 II 没有影响; 另外, 酶 I 和 II 的抑制剂 Al^{3+} 和 Cr^{3+} 对酶 III 有一定的激活作用; 通常作为蛋白变性剂的硫脲对酶 II 和 III 有激活作用。半胱氨酸、酒石酸、碘乙酸、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Se^{4+} 是肌肉酸性磷酸酶的共同抑制剂; 草酸对酶 I 和 II 的抑制作用明显, 对 III 的抑制不明显; Cd^{2+} 对酶 III 有抑制作用, 但对酶 I 和 II 却无影响; 二硫苏糖醇和巯基乙醇是肌肉酸性磷酸酶的弱抑制剂。

表 1 激活剂和抑制剂对对虾肌肉酸性磷酸酶 I, II, III 活性的影响(浓度单位: mmol/L)^{a)}

Tab. 1 Effects of activators and inhibitors on the muscular phosphatases I, II, III of shrimp (*Penaeus orientalis*) (unit: mmol/L)

化合物	酸 性 磷 酸 酶											
	I				II				III			
	1	5	10	20	1	5	10	20	1	5	10	20
二硫苏糖醇	94	92	90	83	109	94	94	66	96	100	99	99
巯基乙醇	103	94	89	91	98	101	97	97	106	94	101	98
巯基乙二醇	100	100	100	108	100	102	98	98	108	106	106	106
甲醛	108	104	104	104	100	99	99	100	105	107	126	142
半胱氨酸	110	119	82	44	98	97	95	73	95	62	62	60
苯丙氨酸	110	117	124	120	104	100	97	97	96	97	99	
酒石酸	109	80	49	35	70	53	19	13	90	72	34	
碘乙酸	81	46	15	12	103	105	111	114	88	88	85	
抗坏血酸	125	127	131	155	102	114	124	120	127	186	227	273
草酸	100	79	73	70	95	96	77	73	95	94	96	
硫脲	109	118	97	94	100	99	130	130	112	130	120	120
EDTA	97	94	92	92	79	89	102	107	103	158	185	209
Ba^{2+}	98	98	92	92	100	104	112	112	90	95	98	106
Ca^{2+}	98	89	70	40	127	150	160	163	96	98	100	98
Cd^{2+}	75	59	31	0	106	125	105	100	41	30	0	
Co^{2+}	110	142	190	4	106	122	126	126	172	268	189	145
Cu^{2+}	53	37	0	0	89	76	70	43	55	51	13	0
Fe^{2+}	98	54	50	0	86	71	55	27	100	101		
Mg^{2+}	141	116	124	102	103	119	141	155	100	124	139	140
Mn^{2+}	144	100	93	89	90	110	116	131	300	230	210	200
Pb^{2+}	137	167	133	100	108	103	96		108	120		
Sr^{2+}	90	90	54	54	110	116	129	143	118	120	120	110
Zn^{2+}	105	91	70	50	103	178	207	234	90	80	76	
Al^{3+}	78	3	0		90	17	0		95	103	136	122
Cr^{3+}	112	75	26	25	66	79	79		84	98	123	156
Fe^{3+}	60	20			84	38	26	0	74	76	74	
Se^{4+}	86	62	37	11	46	29	21	14	99	87	77	73

a) 本实验磷酸酶的相对活性为 100。表 2 同。

由表 2 结果看出, 半胱氨酸、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 对对虾肝胰脏的酸性磷酸酶 I' 和 II' 有激活作用; 抗坏血酸、EDTA 和 Zn^{2+} 对 I' 有激活作用, 对 II' 有抑制作用; 硫脲和 Sr^{2+} 对 II' 有激活作用, 对 I' 无效果; 酒石酸、碘乙酸、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、 Se^{4+} 是酶 I' 和 II' 的抑制剂, 这一点基本上与肌肉酸性磷酸酶相似; 苯丙氨酸、草酸、

Ba²⁺ 和 Fe³⁺ 对 I' 有抑制作用,但对酶 II' 不明显;二硫苏糖醇、巯基乙醇和 Cd²⁺ 对酶 II' 有抑制作用,而对 I' 却无影响。另外,值得注意的是肌肉酸性磷酸酶的抑制剂半胱氨酸竟是肝胰脏酸性磷酸酶的有效激活剂。

表 2 激活剂和抑制剂对对虾肝胰脏磷酸酶活性的影响(浓度单位: mmol/L)
Tab. 2 Effects of activators and inhibitors on the hepatopancreatic phosphatases I, II, III of shrimp (*Penaeus orientalis*) (unit: mmol/L)

化合物	磷 酸 酶											
	I				II				III			
	1	5	10	20	1	5	10	20	1	5	10	20
二硫苏糖醇	101	102	102	103	79	70	55	47	73	21	16	14
巯基乙醇	93	93	95	99	80	81	80	75	87	69	53	26
巯基乙二醇	106	103	98	94	65	81	100	99	98	96	102	100
甲醛	97	102	96	96	95	98	98	100	88	65	51	37
半胱氨酸	100	107	122	154	118	250	240	200	101	96	98	98
苯丙氨酸	97	94	85	75	102	102	109	100	95	96	93	89
酒石酸	70	45	32		86	66	53		107	96	94	
碘乙酸	91	87	81	64	106	98	85		98	97	97	
抗坏血酸	100	114	114	132	65	67	73	73	78	45	24	20
草酸	89	90	76	53	108	96	90	89	86	80	80	70
硫脲	110	95	80	80	127	149	162		98	99	100	100
EDTA	108	125	140	230	20	20	9		2	0	0	
Ba ²⁺	98	60	53		90	95	110	94	100	101	101	102
Ca ²⁺	108	96	96	94	98	102	110	118	92	94	96	100
Cd ²⁺	89	90	97	90	25	15	12	8	21	8	4	0
Co ²⁺	148	170	220		280	295	300	330	31	0	0	0
Cu ²⁺	93	68	43	14	33	18	0	0	57	8	0	
Fe ²⁺	100	70			155	60			92	74	70	
Mg ²⁺	280	380	320		160	190	190	200	120	190	210	180
Mn ²⁺	150	200	270	350	109	150	167	178	110	43	24	16
Pb ²⁺	200	225			180	200	150		125	87	74	
Sr ²⁺	102	115	95	95	120	136	150	162	94	85	84	
Zn ²⁺	109	120	123		50	50	45	45	4	2	1	
Al ³⁺	78	51	38		58	33	21		84	80	24	9
Cr ³⁺	110	113	113	170	98	98	137	195	86	36	31	30
Fe ³⁺	50	33			90	90			96	92	102	
Se ⁴⁺	100	91	72	58	44	25	16	13	71	48	31	18

碱性磷酸酶 III' 的激活剂似乎只有 Mg²⁺, 而二硫苏糖醇、巯基乙醇、甲醛、草酸、EDTA、Cd²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺、Al³⁺、Cr³⁺、Se⁴⁺ 以及曾是酸性磷酸酶激活剂的抗坏血酸、Co²⁺、Mn²⁺、Sr²⁺ 均为肝胰脏碱性磷酸酶的抑制剂(表 2)。

参 考 文 献

- [1] 张龙翔、张庭芳、李令媛等, 1983, 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 145—157。
[2] Dall, W. and Moriarty, D. J. W., 1983, Functional Aspects of Nutrition and Digestion in The Biology

- of Crustacea, Vol. 5, Academic Press, pp. 215—251.
- [3] Harada, M. et al., 1981, Protein Phosphatase activity of calf intestinal alkaline phosphatase, *Experientia*, **37**: 547—548.
- [4] Janska, H. et al., 1986, Catfish liver acid phosphatases: differently glycosylated enzyme molecules with altered kinetic properties, *Comp. Biochem. Physiol.*, **85B**: 753—758.
- [5] Kubicz, A. et al., 1981, Multiple molecular forms of the acid phosphatases from *Cyprinus carpio* liver: Isolation and comparison with those of *Rana esculenta*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **68B**: 437—443.
- [6] Kubicz, A. et al., 1985, Isolation and characterization of a homogeneous acid phosphatase from catfish liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **81B**: 177—183.
- [7] Linhardt, K. and Walter, K., 1963, Phosphatase (Phosphomonoestekases) in *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York and London, 779—787.
- [8] Lowry, O. H., et al., 1951, Protein measurement with Folinphenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275.
- [9] Register, T. C. and Wuthier, R. E., 1984, Effect of vandate a potent alkaline phosphatase inhibitor on ^{45}Ca and ^{32}P uptake by a matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage, *J. Biol. Chem.*, **259**: 3 511—3 518.
- [10] Saini, M. S. and Van Etten, R. L., 1978, Dimeric nature and amino acid composition of homogeneous canine prostatic, human liver and rat liver acid phosphatase isoenzymes, Specificity and pH-dependence of the canine enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **526**: 468—478.
- [11] Swarup, G. et al., 1981, Selective dephosphorylation of protetins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatases, *J. Biol. Chem.*, **256**: 8 197—8 201.
- [12] Yokota, Y. and Nakano, E., 1984, Two acid phosphatases in sea urchin eggs and embryos, *Comp. Biochem. Physiol.*, **79B**: 17—22.
- [13] Yora, T. and Sakagishi, Y., 1986, Comparative biochemical study of alkaline phosphatases isozymes in fish, amphibians, reptiles, birds and mammals, *Comp. Biochem. Physiol.*, **85B**: 649—658.

STUDIES ON THE CHARACTERISTICS OF ACID AND ALKALINE PHOSPHATASES IN CHINESE SHRIMP, *PENAEUS CHINENSIS**

He Haiqi and Sun Feng

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

ABSTRACT

Study of acid and alkaline phosphatases from muscle and hepatopancreas of the Chinese shrimp, *Penaeus chinensis* collected from the Huangdao Marine Biocology Experimental Station, Institute of Oceanology, Academia Sinica showed that the pH optimum of the AcPase isozyme (I, II, III) from the muscle were 2.6, 4.3, 5.8 and slightly different with different drawing methods, there were no peaks within the limits of pH alkalinity; that the temperature optima were 45°C, 50°C, 40°C, the thermostabilities were in the order II > I > III; that the pH optima of the AcPase isozyme (I', II') and AlPase (III') from the hepatopancreas were 3.4, 6.5, 9.5; and that the temperature optima were 35°C, 38°C, 40°C and the thermostabilities were in the order III' > I' > II'. In addition, Michaelis constants (Km), maximum velocity, activators and inhibitors such as DTT, 2-mercaptoethanol, 2-mercaptodiethanol, formaldehyde solution, cysteine, phenylalanine, tartrate, iodoacetate, ascorbic acid, oxalic acid, thiourea, EDTA, Ba²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Sr²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Cr³⁺, Fe³⁺, Se⁴⁺ on phosphatases of the shrimp were investigated.

* Contribution No. 1567 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.