

锯缘青蟹碱性磷酸酶分离纯化及部分理化性质研究*

陈清西 张喆 庄总来 陈祥仁

(厦门大学生物系 厦门 361005)

摘要 于1995年2月在厦门海域采集锯缘青蟹,取其内脏经正丁醇抽提、硫酸铵分级分离、DEAE-52离子交换柱层析及Sephadex G-200凝胶过滤柱层析纯化,获得碱性磷酸酶制剂,以快速蛋白液相色谱及聚丙烯酰胺凝胶电泳检验其纯度,获得单一蛋白纯的酶制剂。研究酶的物理性质得出该酶的紫外特征吸收峰在278nm处,荧光激发光谱特征峰在282nm处,荧光发射光谱特征峰在343nm处,全酶分子量为78kD。研究酶催化对-硝基苯磷酸二钠水解的动力学性质,金属离子及有机溶剂对其活力的影响,得知该酶水解对-硝基苯磷酸二的最适温度为52℃,最适pH为9.2,米氏常数为 6.67×10^{-4} mol/L,酶活性中心的转换常数为 460min^{-1} ; Mg^{2+} 对酶有显著的激活作用; Cu^{2+} , Hg^{2+} 和甲醇、乙醇、乙二醇对酶有不同程度的抑制,说明在一定条件下,效应物引起酶分子构象发生了不同程度的变化。

关键词 锯缘青蟹 碱性磷酸酶 分离 纯化 理化性质

学科分类号 Q556.3

碱性磷酸酶(ALPase)广泛存在于微生物和动物界,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(Fernley, 1971)。生活在海洋的甲壳动物——锯缘青蟹(下称青蟹)在生长过程中都要经历蜕壳过程,其体内ALPase对其生存具有特别重要的意义,它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具重要的作用,是青蟹赖以生长、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,ALPase的构象及活力势必受到影响,从而影响到青蟹的生长和生存。关于青蟹ALPase功能基团性质、效应物的作用动力学、酶的构象与活力的关系,作者已进行系列的研究报道(Chen *et al*, 1996, 1996a, 1996b, 1997; Zheng *et al*, 1997)。本文报告青蟹碱性磷酸酶的分离纯化及部分理化性质,以期对海洋污染的监测与防患、人工养殖青蟹等方面提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

于1995年2月在厦门采集锯缘青蟹(*Scylla serrata*),以其内脏为提取碱性磷酸酶的材料。对-硝基苯磷酸二钠(pNPP)为E. Merck产品; DEAE-纤维素(DEAE-52)系

* 国家自然科学基金资助项目,39470561号。陈清西,男,出生于1959年2月,硕士,副教授, Fax:0086-020-84451672

收稿日期:1995-09-10,收修改稿日期:1998-02-08

Whatman 产品;葡聚糖凝胶(Sephadex G-200)系 Pharmacia 产品;牛血清白蛋白为上海生物化学研究所提供;卵清蛋白、人血丙种球蛋白、牛肠 ALPase 为 Sigma 产品;其它各种试剂均为国产 AR 级。

1.2 方法

1.2.1 酶的分离纯化 (1)抽提,解剖取出青蟹内脏物,加入 1:1 (V/W) 预冷的 0.05mol/L Tris-HCl (pH=7.5), 内含 0.1mol/L NaCl 及 1:1 (W/W) 石英砂,于研钵中研磨,置 4℃ 保存。加入 20% (V/V) 正丁醇进行抽提,使结合酶释放完全,于 4 000 r/min 转速离心 20 min, 得到酶的提取液。(2)分离,采用 0.35, 0.70 饱和度的硫酸铵分级分离法(颜思旭等, 1985) 分离出酶蛋白,再经透析、离心得到粗酶制剂。(3)纯化,参考颜思旭等(1985)方法,先经过 DEAE-52 离子交换柱层析纯化(柱规格 2×30cm),洗脱液为 0.01mol/L Tris-HCl, pH=7.5;采用 NaCl 浓度由 0—1mol/L 直线梯度洗脱,部分收集,每管 3ml,流速为 0.25ml/min。合并活力峰,进一步经 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析纯化(柱规格为 2.5×60cm),洗脱液为 0.01mol/L Tris-HCl, pH=7.5, 内含 0.2mol/L NaCl;采用恒压、恒流装置,部分收集,每管 2.5ml,流速为 0.15ml/min。合并活力峰得到纯酶制剂。酶的纯度鉴定采用快速蛋白液相色谱(FPLC)(Waters 650E)及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.2 蛋白质浓度测定 按 Lowry 等(1951)¹⁾法,以牛血清白蛋白为对照。酶活力测定按陈清西等(1986)所用方法,以 pNPP 为底物,在 2ml 反应体系中包含 50mmol/L Na₂CO₃ - NaHCO₃ (pH=9.5), 1mmol/L MgCl₂ 及 5mmol/L pNPP,加入适量酶液后于 37℃ 反应 10min;然后加入 2ml 0.1mol/L NaOH 终止反应,于 722 型分光光度计测定波长为 405nm 的光密度值(OD)。

1.2.3 酶的物理性质测定 (1)特征参数的测定,酶的紫外吸收光谱采用岛津 UV-240 型分光光度计自动扫描记录,荧光光谱采用日立 F-4010 型荧光仪自动扫描记录。(2)酶(W_m)分子量的测定应用 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析法测定,柱规格为 2.4×74.5cm,总床体积为 340ml;洗脱采用恒压装置,洗脱液为 0.01mol/L Tris-HCl, pH=7.5, 内含 0.2mol/L NaCl;洗脱时间(t)为 28min。用胃蛋白酶(PEP, 35kD)、卵清蛋白(OA, 45kD)、牛血清白蛋白(BSA, 68 kD)、牛肠 ALPase(BLALP, 115 kD)及人血丙种球蛋白(HGG, 165 kD)为标准蛋白,检测各种标准蛋白的洗脱体积(V_e),以洗脱体积对已知蛋白分子量之对数作图,得直线关系,从而求得全酶的分子量。

1.2.4 酶的动力学性质测定 (1)最适温度的测定,在 50mmol/L 的 Na₂CO₃ - NaHCO₃ 缓冲体系(pH=9.5)中,测定不同温度(35, 40, 45, 50, 55, 60℃)对酶活力的影响,以酶促反应的初速度(v₀)对相应的温度(T)作图,从而求出该酶在此反应条件下的最适温度。(2)最适 pH 的测定,在 37℃ 恒温下,不同 pH 的缓冲体系中,测定不同 pH 对酶活力的影响,以酶促反应的初速度(v₀)对相应的 pH 作图,从而求出该酶在此反应条件下的最适 pH。(3)米氏常数 K_M 的测定,在 pH=9.0, 37℃ 下,改变底物浓度[S],测定酶促反应的初速度 v₀, 以 v₀ 对 [S] 作图,求得该酶催化 pNPP 水解的 K_M, 酶活性中心的分子转换数(K_{cat})及二级速度常数酶催化 pNPP 水解的二级速度常数(k₂)。

1) Lowry O H *et al.*, 1951. Protein measurement with the Folin-Plenol reagent. J Biol Chem, 193: 265—269

1.2.5 效应物对酶活力的影响测定 在正常测活体系中测定不同浓度的效应物(金属离子如 Mg^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} ; 有机溶剂如甲醇、乙醇、乙二醇)对酶作用后酶相对活力(A_r)的变化。其中 Mg^{2+} 浓度分别为: 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 1.0mmol/L; Cu^{2+} 浓度分别为 0, 0.5, 2.0, 4.0, 5.0mmol/L; Hg^{2+} 浓度分别为 0, 0.10, 0.20, 0.25, 0.50, 0.80, 1.20mmol/L。甲醇、乙醇、乙二醇的浓度均分别为 10%, 20%, 30%, 40% 和 50%。

2 结果与讨论

2.1 酶的分离及纯度鉴定结果

将分离得到的粗酶制剂经 DEAE-52 离子交换柱层析初步纯化, 其洗脱图谱见图 1a, 活力峰在管号 25—29 之间。由 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析纯化, 其洗脱图谱见图 1b, 活力峰在管号 24—30 之间。经各步分离纯化, 最终可得到提纯 220 倍、比活力为 3 320U/mg 的酶制剂, 该酶经 FPLC 层析鉴定为单一蛋白峰, 见图 2; 以聚丙烯酰胺凝胶电

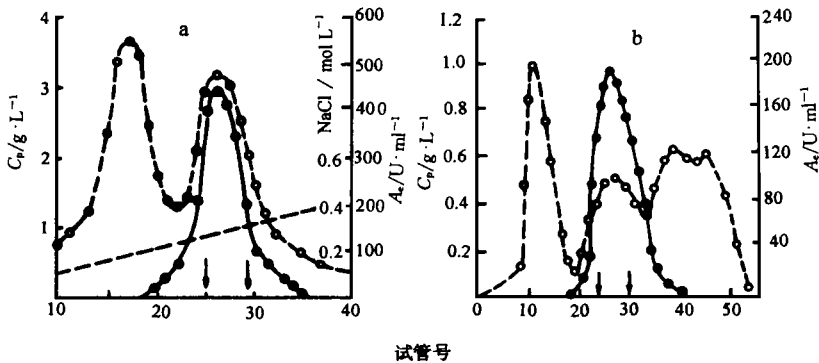


图1 青蟹ALPase 经DEAE-52(a)及Sephadex G-200(b)纯化的图谱

Fig.1 Purification chromatographs of the ALPase from *S. serrata* on DEAE-cellulose (DEAE-52) ion exchange column (a) and on Sephadex G-200 gel filtration column (b)

---为蛋白质浓度; -·-为酶活力; ----为NaCl梯度

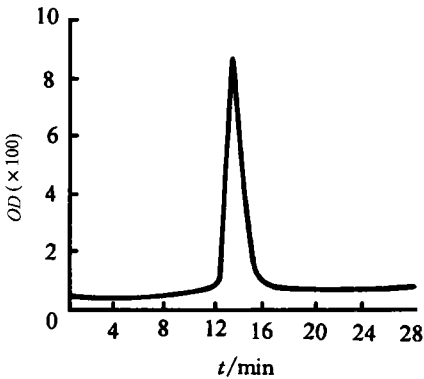


图2 青蟹ALPase快速蛋白液相色谱图

Fig.2 Chromatography of ALPase from *S. serrata* on FPLC

泳鉴定为单一蛋白带, 说明该酶制剂已达蛋白质单一纯。可见以此二步纯化法纯化青蟹 ALPase 是有效的。

2.2 酶的理化性质

2.2.1 物理性质 该纯酶制剂的紫外吸收光谱测定结果表明, 在 278nm 处有一个特征吸收峰, 酶的荧光特征研究表明, 该酶的荧光激发光谱只有一个特征峰, 波长为 282nm; 在 282nm 波长激发下, 酶的荧光发射光谱只在 343nm 处有一个特征的发射峰。测定青蟹 ALPase 全酶分子量为 78kD, 见图 3。

2.2.2 酶催化 pNPP 水解的动力学性质 在 pH=9.5 条件下, 测定不同温度对酶活力的影响,

以酶促反应的初速度 (v_0) 对相应的温度 (T) 作图, 得到一个钟罩形曲线, 求得该酶催化 pNPP 水解的最适温度为 52℃; 40℃ 与 50℃ 之间的温度系数 (Q_{10}) 为 1.23, 说明温度对酶活力的影响并不显著。在 37℃ 恒温下, 测定不同 pH 对酶活力的影响, 结果也呈钟罩形曲线, 求得最适 pH 为 9.2。

在 pH=9.0, 37℃ 下, 改变底物浓度 $[S]$, 测定酶促反应的初速度 v_0 与 $[S]$ 的关系, 以 v_0 对 $[S]$ 作图得曲型双曲线, 说明酶促反应遵循 Michaelis-Menten 方程式, 以 Lineweaver-Burk 法作图, 可得一直线, 求得 K_M 为 6.67×10^{-4} mol/L, K_{cat} 为 460 min^{-1} , k_2 (用来衡量酶对底物的亲和力大小) 为 $6.90 \times 10^5 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.3 效应物对酶活力的影响结果

2.3.1 金属离子对酶活力的影响结果 Mg^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} 对酶活力的影响结果 (图 4) 表明: Mg^{2+} 对酶有显著的激活作用, 当 Mg^{2+} 浓度达到 10mmol/L 时, 酶活力提高到 418%。 Cu^{2+} , Hg^{2+} 对酶活力有抑制作用: 1mmol/L Cu^{2+} 可以使酶活力丧失 20%, 当 Cu^{2+} 浓度达 5mmol/L 时, 酶活力丧失约 40%; Hg^{2+} 对酶活力的抑制更为显著, 0.4mmol/L Hg^{2+} 即可使酶活力丧失 75%, 而 1.2mmol/L Hg^{2+} 几乎可以使酶活力完全丧失。

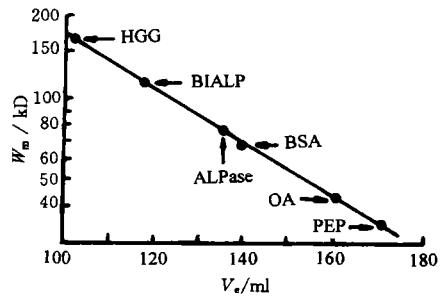


图3 青蟹ALPase 经Sephadex G-200测定的分子量
Fig.3 Molecular weight of ALPase from *S. serrata* determined by chromatography on Sephadex G-200 gel filtration column

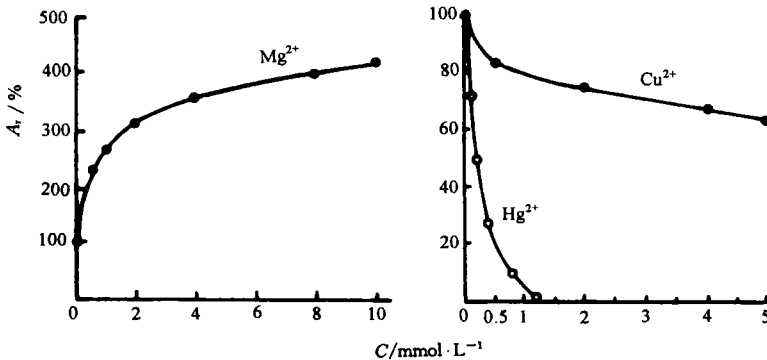


图4 Mg^{2+} , Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 对青蟹 ALPase 活力的影响结果
Fig.4 Effect of Mg^{2+} , Cu^{2+} and Hg^{2+} on the activity of ALPase from *S. serrata*

鉴于 Hg^{2+} 对酶活力抑制较为显著, 进一步通过监测酶的紫外吸收光谱及荧光发射光谱的变化来研究 Hg^{2+} 对酶分子构象的影响。结果表明, 随着 Hg^{2+} 浓度的增大, 酶的紫外吸收特征峰 (278nm) 逐渐消失, 而紫外吸收值则逐渐增大, 可见, Hg^{2+} 的加入使酶分子构象发生了明显的变化, 酶分子的生色基团 Trp, Tyr 及 Phe 残基的微环境由疏水的环境暴露到分子表面, 引起消光值的升高。酶经不同浓度 Hg^{2+} 处理后, 荧光强度变化结果 (图 5) 表明, Hg^{2+} 对酶的荧光发射峰没有位移效应, 但荧光强度值有明显的下降, Hg^{2+} 浓度在 0.2, 0.8 和 1.2mmol/L 时, 分别使酶的荧光强度下降 55%, 25% 和 22%。 Hg^{2+} 浓度在

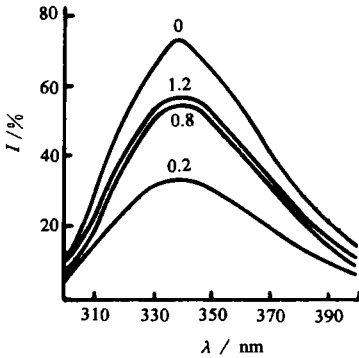


图5 Hg^{2+} 对青蟹ALPase荧光强度的影响结果

Fig.5 Effect of Hg^{2+} on the fluorescence intensity of ALPase from *S. serrata*

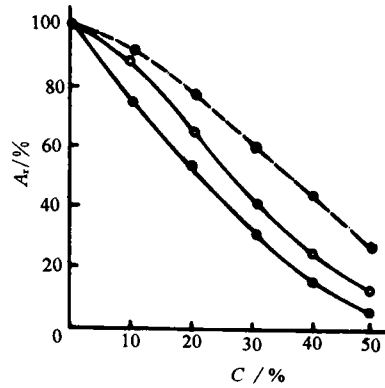


图6 甲醇、乙醇和乙二醇对青蟹ALPase相对活力的影响

Fig.6 Effect of methanol, ethanol and ethylene glycol on the relative activity of ALPase from *S. serrata*

—○— 甲醇; —●— 乙醇; --●-- 乙二醇

0.2mmol/L时,酶的荧光强度下降最显著,随着 Hg^{2+} 浓度增大,酶的荧光强度逐渐回升,这可能是由于 Hg^{2+} 的介入,改变了Trp, Tyr等残基的微环境,内埋的残基暴露到极性环境中,引起荧光淬灭。

2.3.2 有机溶剂对酶活力的影响结果 以甲醇、乙醇、乙二醇等有机溶剂为效应物,研究它们对青蟹ALPase活力的影响,结果(图6)表明,这三种有机溶剂对酶活力均有明显的抑制作用。当甲醇、乙醇、乙二醇的浓度(C)均在50%时,对酶的相对活力(A_r)抑制作用更为明显,分别下降至13.4%, 7.1%, 18.2%,其抑制作用的大小顺序为:乙醇>甲醇>乙二醇。可见,极性度越低对酶抑制程度越高,说明酶分子中疏水键对维持酶的三维构象起了重要的作用。酶在水介质中,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(陈清西等,1993)。

3 结语

以上实验结果表明,环境污染因素重金属离子如 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} ,以及有机溶剂如甲醇、乙醇、乙二醇对锯缘青蟹碱性磷酸酶有明显的抑制作用,其中以 Hg^{2+} 的抑制最为显著,并伴随着酶分子构象及酶活性中心其微环境发生了不同程度的变化。甲醇、乙醇、乙二醇的浓度在50%时,分别可以使酶活力抑制86.6%, 92.9%和81.8%,其抑制作用的大小顺序为:乙醇>甲醇>乙二醇。

参 考 文 献

- 陈清西 颜思旭,1986.文昌鱼碱性磷酸酶的必需基团研究.厦门大学学报(自然科学版),25(5):568—573
 陈清西 颜思旭,1993.果菠萝蛋白酶在有机溶剂微扰时的分子折叠与活力变性的研究.高等学校化学学报,14(3):424—427

颜思旭 陈清西, 1985. 文昌鱼碱性磷酸酶的分子量及氨基酸组成的初步研究. 厦门大学学报(自然科学版), 24(3): 367—372

Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z *et al*, 1996. Kinetics of inhibition of alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*) by n-bromosuccinimide. J Protein Chem, 15(4): 345—350

Chen Q X, Zheng W, Zheng WZ *et al*, 1996a. Comparison of inactivation and unfolding of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase during denaturation by guanidinium chloride. J Protein Chem, 15(4): 359—365

Chen Q X, Zhang W, Wang H R *et al*, 1996b. Kinetics of inactivation of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase during removal of zinc ions by ethylenediaminetetra acetic acid disodium. Intern J Biol Macromol, 19: 257—261

Chen Q X, Zhang W, Yan S X *et al*, 1997. Kinetics of the thermal inactivation of alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*). Enzyme Inhibition, 12: 123—131

Fernley H N, 1971. Mammalian alkaline phosphatase. The Enzyme, 4: 417—444

Zheng W Z, Chen Q X, Zhao H *et al*, 1997. An essential tryptophan residue of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. Biochemi Mole Biol Intern, 41(5): 951—959

STUDIES ON ISOLATION, PURIFICATION AND SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF ALKALINE PHOSPHATASE FROM GREENCRAB (*SCYLLA SERRATA*)

CHEN Qing-xi, ZHANG Zhe, ZHUANG Zong-lai, CHEN Xiang-ren

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract An alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*) was collected from Xiamen sea water in February, 1995. It was prepared and purified by means of the following techniques: n-butanol extraction, ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography on DEAE cellulose column (DEAE-52) and gel filtration chromatography on Sephadex G-200. The preparation was shown to be homogeneous on FPLC and polyacrylamide gel electrophoresis. The characteristic peak of UV-absorption spectrum of the enzyme was found to be at 278 nm, the fluorescence excitation spectrum at 282 nm, and the fluorescence emission spectrum at 343 nm. The molecular weight of the enzyme is 78 kD. At pH=9.5, the optimum pH is 9.2, at 37°C. At pH=9.0, 37°C, the Michaelis constant (K_M) is 6.67×10^{-4} mol/L; K_{cat} , 460min^{-1} . Magnesium ion activates the enzyme significantly. Copper ion, mercury ion, methanol, ethanol and ethylene glycol inhibit the enzyme activity in varying degrees, which indicates that the conformation of the enzyme caused by the effectors changes at different levels. The inhibition mechanism had been preliminarily studied.

Key words *Scylla serrata* Alkaline phosphatase Isolation Purification Physical and chemical properties

Subject classification number Q556.3