

# 合浦珠母贝碱性磷酸酶的分离纯化与性质研究\*

谢莉萍<sup>1</sup> 林静瑜<sup>2</sup> 肖锐<sup>1</sup> 张荣庆<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 清华大学生物科学与技术系,清华大学海洋科学与工程研究中心,北京 100084)

(<sup>2</sup> 厦门大学生物学系 361005)

**摘要** 以合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 为提取酶的原料,经 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 抽提,正丁醇处理,硫酸铵分级沉淀分离,DEAE 纤维素离子交换树脂柱层析,DEAE A25 离子交换分子筛柱层析纯化,得到一定纯度的碱性磷酸酶,比活力达到 1 444 U/mg。酶学性质和动力学性质研究表明,该酶催化对硝基苯磷酸 (pNPP) 的水解反应,最适 pH 值为 9.72,最适温度为 45 °C,水解反应的活化能为  $K = 21.4 \text{ kJ/mol}$ ,初速度为  $6.1 \mu\text{mol/L}$ ,米氏常数  $K_m$  值为  $2.86 \text{ mmol/L}$ , $V_m$  值为  $9.09 \mu\text{mol/L}$ 。产物类似物  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$  对该酶均有明显的抑制作用,表现为竞争性抑制。金属离子对该酶的催化活力有不同的影响,正一价金属离子对该酶活性无影响,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  对该酶有激活作用,  $\text{Zn}^{2+}$  对该酶有明显的抑制作用。

**关键词** 合浦珠母贝,碱性磷酸酶,酶活性

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 是培育海水珍珠的主要贝类。珍珠是贝类外套膜细胞的分泌物形成的,其主要成分是角蛋白和碳酸钙。据小林新二郎等 1960 年报道,碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP) 不仅参与体内的钙磷代谢,维持体内适宜的钙磷比例,而且还与角蛋白等蛋白质的分泌相关。因此 ALP 在珍珠质的形成过程中起了重要的作用。目前我国学者已对多种淡水贝类的 ALP 进行了研究<sup>[1]</sup>,对合浦珠母贝的研究未见报道。

本文以合浦珠母贝为试验材料,分离纯化了碱性磷酸酶,研究了该酶的理化性质及效应物对酶活力的影响,旨在探讨碱性磷酸酶对珍珠形成的作用,为进一步深入研究珍珠形成的机理以提高人工育珠的质量奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料 合浦珠母贝采自广西北海市珍珠总公司珍珠养殖场。

1.1.2 试剂 对硝基苯磷酸 (pNPP) 为 GIBCO 产品; DEAE32 为 Whatman 产品; DEAE A25 为 Pharmacia 产品;其余化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 酶的分离纯化 按参考文献[2]的方法分离纯化,获得酶制剂。

1.2.2 碱性磷酸酶活性的测定 活性测定体系如下:总体积 2 ml,以 pNPP 为底物,含  $0.05 \text{ mol/L}$  pH = 9.72 的  $\text{NaCO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液,  $2 \text{ mmol/L}$  的  $\text{MgSO}_4$ ,在指定温度下,热平衡 5 min,加  $10 \mu\text{l}$  酶液,反应 15 min,用  $1 \text{ ml } 0.2 \text{ mol/L}$  的 NaOH 溶液终止反应,以不加酶液的测活体系为参比,用 754 分光光度计在 405 nm 下测定吸光值,其摩尔消光系数 (为  $88000 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ )<sup>[2]</sup>。酶活力单位的定义为,在上述条件下,每升溶液每分钟底物水解后产物的微摩尔数。比活力的定义为,每毫克酶蛋白所具有的活力单位数。

1.2.3 最适 pH 值与最适温度的测定 在上述活性测定体系中,改变体系的 pH 值,以相对活力对 pH 作图,得酶促反应的最适 pH 值。改变活性测定时的温度,以相对活力对温度作图,得到酶促反应的最适温度。

1.2.4 酶促反应的初速度与米氏常数  $K_m$ ,  $V_m$  的测定在上述测活体系中,40 °C 下 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 20 min 时测定反应速度,以产物浓度对反应时间

\* 国家海洋“863”资助项目 819-02-03

收稿日期: 2000-08-01; 修回日期: 2000-08-22

作图,可求出酶促反应的初速度。在上述测活体系中,改变 pNPP 的浓度在 40 °C 下反应 15 min 后,分别测定 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 mmol/L 的活性,并按 Line weaver Burk 法(又称双倒数作图法,据沈同等生物化学 1990 年报道)作图,求出  $K_m$  与  $V_m$ 。

1.2.5 酶促反应活化能测定 根据 Arrhenius 公式,酶促反应速度常数  $k$  和反应的活化能关系为:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

在反应底物浓度一定的情况下,有则有  $v = k \cdot \text{const}$  则有:

$$\ln \frac{v}{\text{const}} = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

$$\text{即 } \ln v = \text{const} - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

用反应速度的对数  $\ln v$  对  $1/T$  作图,得一直线,直线的斜率为  $E_a/R$ ,其中,  $R = 8.314 (J \cdot K) / \text{mol}$ ,  $T$  为绝对温度。改变酶促反应温度,按 Line weaver Burk 法作图,求出不同温度下  $V_m$ ,以  $\lg V_m \sim 1/T$  作图,得到直线关系,从直线斜率求出酶促反应的活化能  $E_a$ 。

1.2.6 效应物对酶活力的影响 在上述测活体系中加入不同浓度的效应物,测酶活力,以不加任何效应物的测活体系的测活结果为 1,计算相对活力,以相对活力对效应物浓度作图。本实验采用的效应物有产物类似物  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{Na}_3\text{WO}_4$ ,及其他金属离子,如  $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 。

1.2.7 效应物对酶作用类型的测定 在上述测活体系中,同时改变 pNPP 与效应物的浓度,按 Line weaver Burk 法作图,得一组直线,根据这组直线间的关系,推出该效应物对酶的作用类型。本实验采用的效应物为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{Na}_3\text{WO}_4$ 。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 实验结果

2.1.1 分离纯化结果 酶分离纯化的效果见表 1,可见经多步的分离纯化,酶的比活达 1 444 U/mg,纯化了 48.56 倍。

2.1.2 pH 值对酶活力的影响 pH 值对酶活力的影响见图 1,结果表明,该酶催化反应的最适 pH 值为 9.72。与淡水珍珠贝相比,最适 pH 值有较大的不同。如背角无齿蚌 ALP 的最适 pH 为 9.5,三角帆蚌 ALP 的最适 pH 为 10.1。

2.1.3 温度对酶活力的影响 温度对该酶活力的影响见图 2,结果表明,该酶催化反应的最适温度约在 45 °C。

2.1.4 ALP 催化反应的初速度、 $K_m$  值、 $V_m$  值的测定 酶促反应初速度的测定结果见图 3,可得出其初速度为  $6.1 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。米氏常数  $K_m$ 、 $V_m$  值结果见图 4,通过直线与轴的交点可求出  $K_m = 2.86 \text{ mmol/L}$ ,  $V_m = 9.09 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

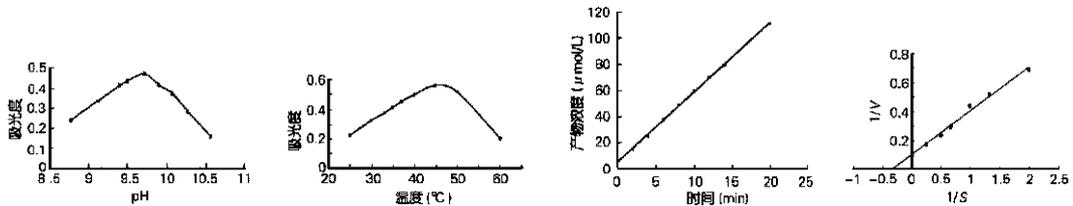


图 1 pH 值对酶活力的影响 图 2 温度对酶活力的影响 图 3 酶促反应初速度的测定 图 4 酶促反应米氏常数的测定  
Fig. 1 Effect of pH value on the activity of ALP Fig. 2 Effect of temperature on the activity of ALP Fig. 3 Initial velocity of ALP for the hydrolysis of pNPP Fig. 4  $K_m$  and  $V_m$  of ALP for the hydrolysis of pNPP

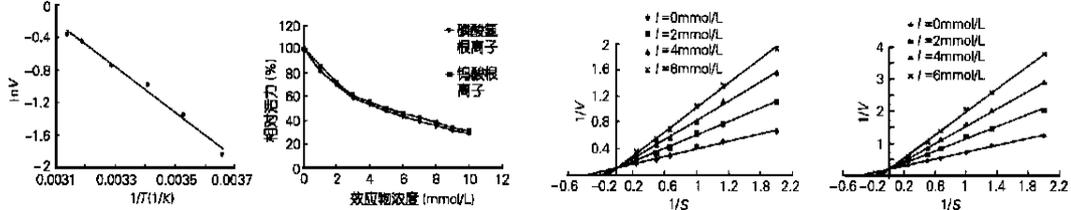


图 5 ALP 催化 pNPP 水解反应活化能 图 6  $\text{HPO}_4^{2-}$  与  $\text{WO}_4^{2-}$  对酶的抑制作用 图 7  $\text{HPO}_4^{2-}$  对酶的抑制类型 图 8  $\text{WO}_4^{2-}$  对酶的抑制类型  
Fig. 5 The activation energy of ALP Fig. 6 Effect of  $\text{HPO}_4^{2-}$  and  $\text{WO}_4^{2-}$  on the activity of ALP Fig. 7 Line weaver Burk plot for inhibition of pNPP hydrolysis by  $\text{HPO}_4^{2-}$  Fig. 8 Line weaver Burk plot for inhibition of pNPP hydrolysis by  $\text{WO}_4^{2-}$

表 1 不同分离纯化方法对合浦珠母贝碱性磷酸酶活力的效果

Tab.1 Effects of different purification methods to the activity of ALP of *P. fucata*

步骤	总体积 (ml)	蛋白浓度 (mg/ml)	总蛋白量 (mg)	酶活力 (U/ml)	总活力 (U)	比活力 (U/mg)	纯化倍数	得率 (%)
正丁醇处理上清	200	30.15	6 020	895.25	179 051	29.74	1	100
35% 硫酸上清	170	18.27	3 106.6	865.05	164 058.8	52.81	1.79	92.13
70% 硫酸沉淀	50	40.48	2 040	3 205.13	160 256.4	78.56	2.62	89.5
DEAE 32	150	4.67	700.5	500	75 000	107.06	3.6	41.89
DEAE A25	70	0.53	30.1	621.12	43 478.3	1 444.46	48.56	24.28

2.1.5 ALP 催化 pNPP 水解反应的活化能 结果见图 5, 由图可以得出, 该酶催化 pNPP 水解反应的活化能  $E_a = 21.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

2.1.6 产物及其类似物对该酶活力的影响  $\text{HPO}_4^{2-}$  是 ALP 催化 PNPP 水解的产物,  $\text{WO}_4^{2-}$  是其类似物, 它们对酶均起了较强的抑制作用, 其中 10 mmol/L 的  $\text{HPO}_4^{2-}$  使酶活力仅余 29%, 而 10 mmol/L 的  $\text{WO}_4^{2-}$  使酶活力仅余 33%。 $\text{HPO}_4^{2-}$  与  $\text{WO}_4^{2-}$  对酶的抑制作用见图 6。

2.1.7  $\text{HPO}_4^{2-}$  与  $\text{WO}_4^{2-}$  对酶的抑制类型 以  $\text{HPO}_4^{2-}$  与  $\text{WO}_4^{2-}$  为效应物, 研究它们对 ALP 活性的抑制类型, 利用 Lineweaver-Burk 法作图, 可得到直线

关系, 并从中判断出  $\text{HPO}_4^{2-}$  与  $\text{WO}_4^{2-}$  对 ALP 均起了竞争性抑制作用, 其抑制常数分别为 0.894, 1.203 mmol/L (见图 7、图 8)。

2.1.8 金属离子对酶活力的影响 在不含  $\text{Mg}^{2+}$  的测活体系中, 加入不同浓度的金属离子, 在 40 °C 下反应 15 min, 监测酶活力的变化, 结果见图 9, 10, 11, 12。发现  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  对酶有明显的激活作用, 使酶活力分别提高到 164.7%, 128.64%, 226.2%, 而  $\text{Zn}^{2+}$  对酶则有明显的抑制作用, 酶活力仅余 23.68%。

## 2.2 讨论

ALP 是一种金属酶, 其空间结构的维持与酶活

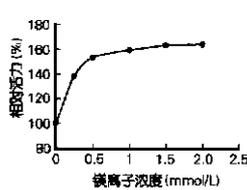


图 9  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对酶活力的影响  
Fig.9 Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  concentration on the activity of ALP

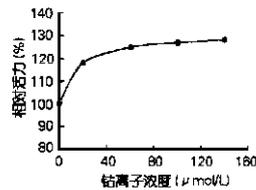


图 10  $\text{Co}^{2+}$  浓度对酶活力的影响  
Fig.10 Effect of  $\text{Co}^{2+}$  concentration on the activity of ALP

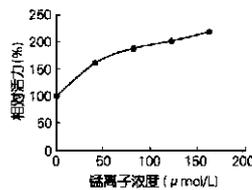


图 11  $\text{Mn}^{2+}$  浓度对酶活力的影响  
Fig.11 Effect of  $\text{Mn}^{2+}$  concentration on the activity of ALP

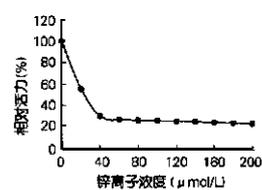


图 12  $\text{Zn}^{2+}$  浓度对酶活力的影响  
Fig.12 Effect of  $\text{Zn}^{2+}$  concentration on the activity of ALP

力的表现都需要金属离子的存在。据报道<sup>[3]</sup>, ALP 含两种金属离子, 即  $\text{Mg}^{2+}$  与  $\text{Zn}^{2+}$ , 其中  $\text{Zn}^{2+}$  是酶活性所必须的, 而  $\text{Mg}^{2+}$  仅起调节作用。在酶促反应的条件下, 在一定浓度范围内,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  对酶起激活作用, 而  $\text{Zn}^{2+}$  却起明显的抑制作用, 可能是由于  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  与酶活性中心的结合, 形成底物-酶-金属离子复合物, 而  $\text{Zn}^{2+}$  与酶活性中心结合力强, 使底物无法与酶的活性中心结合, 从而丧失活力, 这一结果与其他生物来源的 ALP 完全一致。

已知 ALP 是钙的搬运体, 能使钙大量聚集于外

套膜缘, 还参与壳角蛋白的分泌与合成, 在贝壳及珍珠质的形成过程中起重要的作用。不同物种的 ALP 的酶学特性有明显的差异。研究 ALP 的酶学性质, 对于深入探讨珍珠形成的机理, 为寻找适宜的酶激活剂提高珍珠的产量和质量具有重要的指导意义。

## 参考文献

- 1 张洪渊, 刘克武等. 水生生物学报, 1996, 20(1): 57~61
- 2 陈清西等. 厦门大学学报, 1996, 35(4): 257~261
- 3 Kathleeb M. Holtz, Bogulaw Stec, and Evan R. Kantrowitz. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(13): 8 351~8 354

# PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALKALINE PHOSPHATASE FROM *Pinctada fucata*

XIE Li-ping<sup>1</sup> LIN Jing-yu<sup>2</sup> XIAO Rui<sup>1</sup> ZHANG Rong-qing<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Science and Biotechnology, Center for Ocean Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing, 100084

<sup>2</sup> Department of Biology, Xi'an University, 361005

Received: Aug. 1, 2000

**Key Words:** *Pinctada fucata*, Alkaline phosphatase (ALP), Enzyme activity

## Abstract

*Pinctada fucata* alkaline phosphatase has been isolated and purified by means of the following procedure: Tris-HCl buffer (pH 7.5) extraction, n-butanol disposal, ammonium sulfate precipitation, ionexchange chromatography on DEAE32 cellulose column, ionexchange-gel-filtration chromatography on DEAE A25. The special activity of the final preparation was up to 1444 U per milligram protein. The optimum temperature is 45 °C, and the optimum pH is 9.72 for the hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate (pNPP) by the ALP. The initial velocity is 6.1 μmol/L, Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) is 2.86 mmol/L and the maximum velocity ( $V_m$ ) is 9.09 μmol/L. The activation energy of the enzyme is 21.4 kJ · mol<sup>-1</sup>.  $\text{HPO}_4^{2-}$  and  $\text{WO}_4^{2-}$  can inhibit the activity of ALP, their effect appears to be competitive type.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  can activate the enzyme, but  $\text{Zn}^{2+}$  inhibits the enzyme activity.

(本文编辑:李本川)