

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0135-06

长毛对虾磷酸酯酶的研究^{*}

陈素丽, 陈清西, 杨佩真

(厦门大学生物学系, 厦门 361005)

摘 要: 从长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*) 头胸部、肌肉分别提取纯化碱性磷酸酶 ALPase (EC 3. 1. 3. 1) 和酸性磷酸酶 ACPase (EC 3. 1. 3. 2), 经快速蛋白液相色谱 (FPLC) 检测 ALPase, 聚丙烯酰胺凝胶电泳以及等电聚焦电泳检测 ACPase, 得到单一纯酶. ALPase 紫外特征吸收峰在 278 nm 处, 荧光激发峰在 282 nm 处, 发射光谱特征峰在 340 nm 处. ACPase 在 280 nm 处有紫外吸收特征峰, 荧光激发峰在 284 nm 处, 发射峰在 347 nm 处. 分别测定了酶的相对分子质量、亚基数、氨基酸组成、等电点、酶水解对硝基苯磷酸二钠 (pNPP) 的最适温度, 最适 pH, 米氏常数 K_m 值, 金属离子 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} , 有机溶剂甲醇、乙醇、乙二醇, 化学修饰剂 BrAe、NBS、pCMB 等以及蛋白质变性剂胍、脲等对酶活力的影响. 比较研究健康虾和病虾 ACPase 酶活力及酶动力学特征常数的变化 (健康虾酶 $K_m = 0.08 \text{ mmol/L}$, 病虾酶 $K_m = 0.143 \text{ mmol/L}$). 病虾酶 K_m 值明显增大, 表现对底物亲和力下降. 活化能明显增大 (健康虾酶 $41.03 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, 病虾酶 $45.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) 表明酶的催化能力下降.

关键词: 长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*); 磷酸酯酶

中图分类号: Q556.1 **文献标识码:** A

90 年代初我国对虾养殖超过 16 万 hm^2 , 年产量达 20 万 t, 是世界养殖大国. 几年来由于对虾养殖发生了暴发性流行病, 产量急剧减少, 至 1994 年产量仅为 6 万 t, 造成了巨大的经济损失. 不少科研单位进行病原学、流行病学、病理学以及环境控制技术等方面的研究, 而对虾生物化学的研究则很少. 何海琪等研究中国对虾酸性和碱性磷酸酶的特性^[1], 我们通过长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*) 磷酸酶的研究, 比较健康虾和病虾酶活力, 理化性质以及酶的动力学特征常数与虾病的关系. 生物的生命活动离不开酶, 酶的活性与物质代谢密切相关. 磷酸酶广泛存在于生物体内, 它催化磷酸单酯水解, 是生物磷代谢的重要酶类. 由于海洋环境受到污染, 如某些化学物质、有机溶剂、重金属离子、蛋白质变性剂等影响磷酸酶的活力与构象, 进一步影响虾的正常生理活动与物质代谢, 虾体健康程度下降, 容易受到病原体的侵蚀而感染发病, 导致大量死亡. 病毒进入虾池是引发对虾病毒病的主要途径, 而养殖环境恶变和对虾体弱抗病力下降, 却是引发对虾病毒病的主要原因. 开展对虾酶学研究, 不仅在酶的结构与功能方面具有重要的科学理论意义, 而且

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39570569); 福建省自然科学基金资助项目 (C94061)

收稿日期: 1999-09-15

在对虾养殖的病害防治与环境污染预防方面亦具有重要的实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

长毛对虾是厦门人工养殖样品,对硝基苯磷酸二钠(pNPP)为E Merck产品,对氯汞苯甲酸(pCMB)为Karl Roth产品;Sephadex G-200, G-150为Pharmacia产品,DEAE—纤维素(DE-52)为Whatman产品;丙烯酰胺为Serva产品;卵清蛋白,人丙种球蛋白、牛肠ALPase、盐酸胍、豚为Sigma产品,其余试剂为国产分析纯,试剂均用玻璃重蒸水配制。

1.2 方法

酶的分离及纯度鉴定,相对分子质量测定,酶活力测定,蛋白质浓度测定等按文献[2, 3]方法进行。紫外光谱扫描于岛津UV-240型紫外分光光度计进行,荧光发射光谱于日立F-4010型荧光仪测定,紫外差分光谱于Beckman Du-8B型紫外分光光度计进行,CD光谱于Jasco 500C型圆二色仪测定。

2 结果与讨论

2.1 长毛对虾碱性磷酸酶性质的研究

长毛对虾头胸部纯化碱性磷酸酶(ALPase),经硫酸铵分级分离,DEAE—纤维素(DE-52)离子交换柱层析, Sephadex G-150凝胶过滤柱层析纯化,获得聚丙烯酰胺凝胶电泳及FPLC层析单一纯酶制剂、测定酶的相对分子质量为82 000;酶的紫外特征吸收峰位于278 nm,荧光发射光谱特征峰在340 nm。酶水解pNPP的最适温度为47℃,最适pH为8.2,酶催化对硝基苯磷酸二钠水解的 K_m 值为0.85 mmol/L Mg^{2+} 对酶有明显的激活作用, Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、甲醇、乙醇、乙二醇表现抑制作用^[3]。 Hg^{2+} 的抑制作用表现为反竞争性类型,抑制常数为 9.0×10^{-5} mol/L。酶活性中必需功能基团的化学修饰研究表明,色氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸残基是酶活性所必须的基团,它们被修饰后酶活力逐渐下降至消失,而巯基与酶活力无关^[4]。

2.2 长毛对虾酸性磷酸性质的研究

从健康和患病长毛对虾肌肉分别分离提纯酸性磷酸酶(ACPase),经硫酸铵分级分离, Sephadex G-200凝胶过滤柱层析纯化,获得经聚丙烯酰胺凝胶电泳及等电聚焦电泳单一纯酶制剂。测定酶的相对分子质量为73 000,由2个同型亚基组成,含662个氨基酸残基;酶在280 nm处有紫外特征吸收峰,荧光发射光谱特征峰在374 nm处,酶的等电点为4.7,酶水解pNPP的最适宜温度为40℃,最适pH值4.5,酶催化硝基苯磷酸二钠水解的 K_m 值为0.08 mmol/L(健康虾酶)和0.143 mmol/L(病虾酶)。

2.3 比较患病对虾ACPase性质变化

患病对虾与健康对虾APCase酶分子特性,等电点、最适pH、热稳定性等基本不变; K_m 明显增大(健康虾0.08 mmol/L,病虾0.143 mmol/L),表明酶对底物亲和力下降。酶催化反应活化能明显增大(健康虾41.03 kJ·mol⁻¹·L⁻¹,病虾45.7 kJ·mol⁻¹·L⁻¹),表明酶的催化能力下降;对某些效应物如溴代乙酸,对氯汞苯甲酸、重金属 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、有机溶剂甲醇、乙醇、乙二醇等的敏感性也有不同程度的下降^[3,5-7]。

2.4 化学修饰剂对 ACPase 活力的影响

应用化学修饰剂，在酸性条件下溴代乙酸 (BrAc)、N-溴代琥珀亚胺 (NBS)、对氯汞苯甲酸 (pCMB)，Wood Ward K 试剂 (N-乙基-5 (3)-磺酸苯基异恶唑)；在碱性条件下乙酰丙酮、乙酸酐研究酶与活力的关系 (见表 1)，进一步研究 NBS 和 BrAc 对 ACPase 的抑制动力学^[8,9]。结果表明，ACPase 的组氨酸、色氨酸、半胱氨酸、门谷氨酸的侧链羧基，精氨酸及赖氨酸残基与酶活力有关。酶被 BrAc 修饰后在酶活力下降的同时 (图 1)，紫外光谱随着 BrAc 浓度加大，280 nm 处特征吸收峰很快消失 (图 2a)，荧光强度下降并伴有轻微蓝移 (图 2b)。

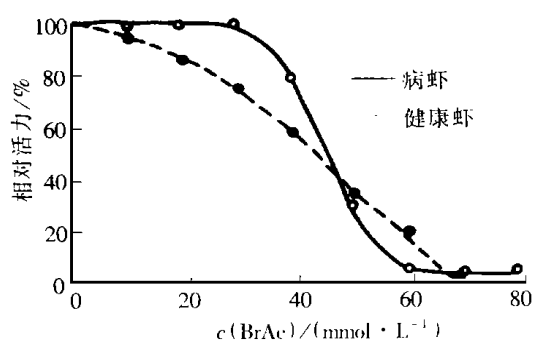


图 1 溴代乙酸对酶活力的影响

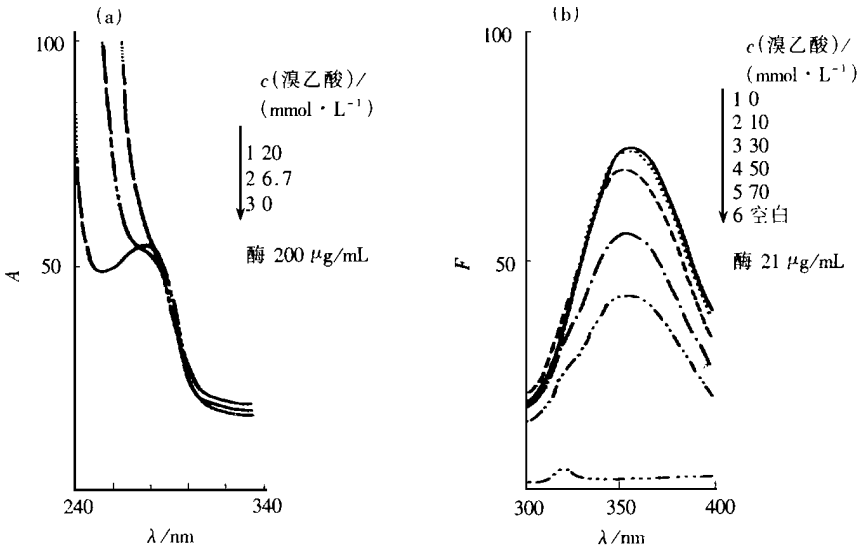


图 2 溴乙酸对病虾酶变性的紫外吸收光谱 (a) 和荧光发射光谱 (b)

随着 Wood Ward K 试剂浓度加大，酶活力迅速下降，K 试剂达 2.4 mg/mL 时，健康虾酶活力为 0，浓度达 4.8 mg/mL 时，病虾酶活力完全丧失。修饰酶的紫外光谱随着 K 试剂浓度加大，280 nm 处紫外特征吸收峰逐渐消失，荧光强度下降，从表 1 看出健康虾酶对试剂敏感性大于病虾酶 (NBS 例外)，紫外光谱与荧光光谱的结果表明酶活力下降的同时，酶构象也发生某些变化^[9]。

2.5 金属离子对 ACPase 活力的影响

酶分别与不同浓度的几种金属离子在 37 °C 温浴 10 min 后在相同测活体系中测其剩余活力，以正常酶促的酶活力为 100%，以相对活力百分比对金属离子浓度作图 (图 3)。几种金属离子对健康虾肌肉 ACPase 没有激活效应，Ni²⁺ 基本不影响，Cu²⁺、Hg²⁺ 呈激烈抑制，其抑制强度依次为 Hg²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ > Pb²⁺ > Mg²⁺ > Cd²⁺ > Ni²⁺，病虾酶为 Hg²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ > Ni²⁺ > Pb²⁺ > Mg²⁺ > Cd²⁺，Mg²⁺ 和 Cd²⁺ 微呈激活 (表 2)。进一步测定 Hg²⁺ 和 Cu²⁺ 对健康虾酶的抑制类型为竞争性抑制，其抑制常数分别为 1.0 × 10⁻⁴ mol/L 和

表 1 酸性磷酸酶的 化学修饰

化学修饰剂	$\frac{c}{(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})}$	剩余活力/ %		化学修饰剂	$\frac{c}{(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})}$	剩余活力/ %	
		健康虾酶	病虾酶			健康虾酶	病虾酶
pCMB	0	100	100	乙酸酐	50	82	100
	0. 1	67	72		100	77	100
	0. 2	46	54		125	70	100
	0. 3	35	46		135	60	10
	0. 4	32	40		150	0	0
BrAc	10	94	100	乙酰丙酮	50	62	100
	30	74	100		100	51	92
	50	35	30		200	37	70
	70	0	2		300	32	62
NBS	0. 2	100	97	Wood Ward	0	100	100
	0. 4	93	75	K 试剂 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0. 6	33	33
	0. 6	60	10		1. 2	13	24
	0. 8	25	5		1. 8	5	13
					2. 4	0	10
					4. 8		0

1. 6×10^{-4} mol/L. 上述几种金属离子对健康虾和病虾抑制规律相似, 但健康虾酶对几种金属离子的敏感性一般大于病虾酶^[7], 这可能由于虾栖息环境的底质及水环境受到污染, 病虾体受到影响, 健康程度下降, 使酶对某些化学物质的敏感性下降.

表 2 金属离子对 ACPase 活力的影响 %

$c(\text{金属离子})$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	健康虾酶			病虾酶		
	0. 1	0. 3	0. 5	0. 1	0. 3	0. 5
Ni^{2+}	100	100	100	95	93	92
Cd^{2+}	95	90	88	104	108	108
Mg^{2+}	95	90	88	103	103	103
Pb^{2+}	92	82	72	98	98	96
Zn^{2+}	88	76	64	93	86	83
Cu^{2+}	42	11	7	90	72	64
Hg^{2+}	58	4	4	20	8	5

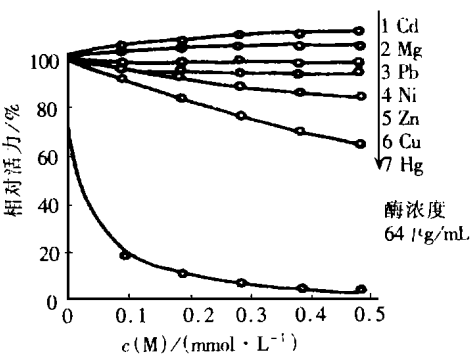


图 3 金属离子对虾酶活力的影响

2. 6 有机溶剂对 ACPase 活力的影响

甲醇、乙醇、乙二醇对酶活力的影响, 在含有 pNPP 底物的测活体系中, 分别加入不同浓度的甲醇、乙醇、乙二醇研究它们对酶活力的影响, 结果如表 3 所示.

表中可看出, 当甲醇、乙醇、乙二醇 φ 达 30% 时, 健康虾酶活力完全丧失, 当甲醇 φ 为 20% 时, 病虾酶活力为 0, 而乙二醇 φ 达 40% 时, 酶活力才消失, 表现为敏感性有不同程度下降. 进一步研究甲醇对酶活力的抑制作用机理, 在含低浓度甲醇的测活体系中, 改变底物浓度, 测定酶促反应的初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 确定其失活类型, 结果表明甲醇抑制后, $1/V$ 对 $1/s$ 关系图为横轴截距不变的一组直线, K_m 不变, V_m 下降, 说明被甲醇失活后酶对底物的结合力不受影响, 但失去了催化能力, 其失活效

力为非竞争性类型，以 $1/V_{\text{map}}$ 对 φ （甲醇）作图，求得甲醇对酶的抑制常数为 8.5%。同法求得乙醇对酶的抑制为非竞争性类型，乙醇对酶的抑制常数为 8.75%。

表 3 有机溶剂对 ACPase 活力的影响 %

有机溶剂	健康虾酶						病虾酶							
	$\varphi/\%$	0	5	10	15	20	30	0	5	10	15	20	30	40
甲醇		100	60	35	21	10	0	100	74	15	5	0		
乙醇		100	64	54	30	12	0	100	96	14	8	8	8	
乙二醇		100	84	70	50	38	0	100	90	78	70	60	32	0

2.7 蛋白质变性剂胍、脲对酶活力的影响

研究酶的构象与活力的关系是研究蛋白质结构与催化功能关系的重要方法，以盐酸胍、脲为变性剂，以荧光发射光谱、紫外差示光谱、CD 光谱等技术，研究酶经胍、脲变性后的构象变化与活力变化的关系，同时测定失活速度常数与变性常数。

一定量酶分别在不同浓度的胍溶液中（0.1 mol/L NaAc-HAc，pH 4.5，37℃）保温不同时间后将酶液于正常测活体系中检测酶的剩余活力，以相对活力（天然酶活力为 100%）对时间作图，得失活动力学曲线，按一级反应作图法求其失活速度常数。酶在不同浓度胍中的变性速度常数系监测酶内源荧光随时间的变化过程，以相对荧光强度对时间作图得变性动力学曲线，按半对数作图法求其变性速度常数。

脲的失活速度常数和变性速度常数测定方法同胍的测定。酶在不同浓度脲中的紫外差示光谱的变化，进一步监测 240 nm 处差吸收随时间变化过程，以半对数作图法求其变性速度常数，以上结果列于表 4。

表 4 健康是 ACPase 在变性剂中变性与失活速度常数

变性剂	$c(\text{变性剂})$ (mol·L ⁻¹)	速度常数/(10 ³ s ⁻¹)			剩余活力/%
		失活	变性 F_{338}	变性 A_{240}	
盐酸胍	0				100
	0.6	2.17	1.83		86
	0.9	3.05	2.25		50
	1.2	3.90	2.40		20
	2.4	44.05	13.89		0
脲	0				100
	1.0	4.8	4.3	3.9	77.8
	2.0	10.8	9.2	8.3	40.8
	3.0	14.2	13.3	10.7	18.5
	4.0	16.7	15.0	12.0	3.0
	6.0	25.0	20.0	14.0	0

从表 4 中可见，酶在相同浓度变性剂条件下，酶的失活速度常数较变性速度常数快，说明醇的活性中心处于对胍、脲更为敏感的区域，酶活性中心具有柔曲性^[10, 11]。

以长毛对虾磷酸酯生化指标的变化作为对虾患病程度的参考。在对虾受污染因素作用发生病变过程中，酸性磷酸酶的动力学特征发生了明显的变化，通过探讨磷酸酯酶与长毛

对虾生长与生存的相关性,以磷酸酯酶活力变化作为对虾受环境污染影响病变的指标,对人工养殖对虾及环境污染的监测及防患具有生产实践意义。选择高营养全价的对虾饲料以增强对虾体质,提高抗病力是养好对虾不能忽视的。

参考文献:

- [1] 何海琪,孙凤. 中国对虾酸性和碱性磷酸酶的特性研究[J]. 海洋与湖沼, 1992, 23(5): 555~560.
- [2] 陈清西,陈素丽,石艳,等. 长毛对虾碱性磷酸酶性质[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35(2): 257~261.
- [3] 陈素丽,陈清西,胡天惠,等. 长毛对虾酸性磷酸酶的纯化与性质[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, 36(1): 121~125.
- [4] 陈清西,陈素丽,朱凌翔,等. 对虾 ALPase 功能基团的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35(4): 587~591.
- [5] 陈素丽,陈清西,林达挺,等. 长毛对虾酸性磷酸酶功能基团的研究 I [J]. 台湾海峡, 1997, 16(1): 80~84.
- [6] 陈素丽,陈清西,杨佩真,等. 长毛对虾酸性磷酸酶功能基团的研究 II [J]. 台湾海峡, 1997, 16(2): 201.
- [7] 陈素丽,陈清西,丘文杰,等. 金属离子对长毛对虾酸性磷酸酶的影响[J]. 台湾海峡, 1998, 17(1): 96.
- [8] YANG P Z, CHEN Q X, LI Y, et al. Kinetics of inactivation of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase during inhibition by N-bromosuccinimide[J]. Biochem Mol Biol Int, 1998, 45(5): 953~962.
- [9] CHEN Q X, CHEN S L, ZHOU H M. Kinetics of inhibition of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase by bromoacetic acid[J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1998, 46(2): 215~223.
- [10] CHEN S L, CHEN Q X, YANG P Z et al. Unfolding and inactivation of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase during denaturation by guaniding hydrochloride[J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1997, 42(3): 517~525.
- [11] CHEN S L, CHEN Q X, YANG P Z, et al. Comparison of conformational changes and inactivation of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase during unfolding urea[J]. Tsinghua Science and Technology, 1998, 3(3): 1053~1058.

Studies of Phosphatase from *Penaeus penicillatus*

CHEN Su-li^{*}, CHEN Qing-xi, YANG Pei-zhen

Abstract: ALPase (DC. 3. 1. 3. 1) and ACPase (EC. 3. 1. 3. 2) from *Penaeus penicillatus* were prepared and purified. The preparation was shown to be homogenous by FPLC and polyacrylamide gel electrophoresis. ALPase characteristic peak of UV-absorption spectrum of the enzyme is at 278 nm, and that of the fluorescence excitation spectrum at 282 nm and the fluorescence emission spectrum at 340 nm. ACPase characteristic peak of UV-absorption spectrum presents at 280 nm, the fluorescence excitation spectrum at 284 nm and the fluorescence emission band at 347 nm. The molecular weight, enzyme subunit, amino acid compositions, isoelectric point, optimum pH, optimum temperature and the Michaelis constant of the enzymes for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) was measured respectively. The enzyme activity is markedly inhibited by copper ion, mercury ion, methanol, ethanol and ethylene glycol. Denaturation and inactivation kinetics of the enzyme from the healthy shrimp and the sick are $41.03 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ and $45.78 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively at pH 4.5, 37 °C, the Michaelis constant of each is 0.08 mmol/L and 0.143 mmol/L, respectively.

Keywords: *Penaeus penicillatus*; phosphatase

^{*} Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China.