

# 乙醇对文昌鱼酸性磷酸酶活力与构象的影响

薛雄志\* 符乃阳\*\* 李筱泉\*\* 陈素丽\*\*

\* (厦门大学环境科学研究中心, 厦门, 361005)

\*\* (厦门大学生物系, 厦门, 361005)

**摘要** 文昌鱼酸性磷酸酶(ACPase, E. C. 3. 1. 3. 2)是一种含有铁离子的金属酶, 酶的紫外-可见光谱(200~600nm)扫描, 280nm, 500nm有最大吸收峰, 320nm有肩峰。荧光扫描: 在281nm激发下, 330nm有发射峰, 在480nm激发下, 515nm有一发射峰。可见光谱500nm的吸收峰以及荧光515nm的发射峰为酶分子含铁的特征峰, 与酶活力关系密切。不同浓度的乙醇对酶活力有明显的抑制作用, 表现为反竞争抑制类型, 其抑制常数为16%, 测定酶随时间的变化的失活程度。可见光谱500nm吸收值随酶体系中乙醇含量增加而增加, 当乙醇浓度达40%时, 吸收值明显下降。在乙醇作用下, 监测荧光330nm及515nm处的强度随时间变化的过程作为酶构象变化的指标, 酶的330nm荧光发射峰值随乙醇浓度的增强而下降, 515nm的荧光发射峰值随着乙醇浓度的增强而下降, 峰位不变。在不同浓度乙醇作用下, 酶的构象变化快于活力变化。

**关键词** 文昌鱼酸性磷酸酶 乙醇 构象与活力 光谱

酶工程研究表明, 酶在有机相中的催化反应已被国内外广泛重视与应用<sup>[1~4]</sup>。本文为文昌鱼酸性磷酸酶系列研究之一, 探讨ACPase在乙醇溶液中构象与活力的变化情况, 以期为该酶在有机相中的催化反应研究提供依据。

此外, 从环境科学的角度来看, 由于全球性的环境问题对人类的威胁越来越严重, 人们对环境科学的研究迫切需要在生物学方面有所突破, 朝着更灵敏、更客观、更综合的方向发展。生物化学如何在环境科学中发挥作用已受到各国研究人员的重视<sup>[5]</sup>, 专家们预测, 将来对环境污染程度的准确反应可能来自对生物活性物质的检测。因此酶作为一种对周围环境变化相当敏感的生物活性物质之一, 其活力构象等对各种污染物质作用的反应研究近年来常见诸报道<sup>[5, 6]</sup>。本文研究的是乙醇对文昌鱼酸性磷酸酶活力与构象的影响, 我们希望通过研究了解酶对环境中某种有机物质作用的反应机理, 对探索环境生物指标建立的研究工作也将具有重要的意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

文昌鱼 *Branchiostoma belcheri* (Gray) 产于厦门海区, 对硝基苯磷酸二钠 PNPP 为 E, Mer-

本文于1996年1月4日收到。

ck 产品, Sephadex G-75 为 Pharmacia 产品, 其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

(1) 整体文昌鱼分离得酶制剂<sup>[7]</sup>, 经两次 Sephadex G-75 柱(2.5×85cm)纯化, 聚丙烯酰胺凝胶电泳后于 Beckman DU-8B 紫外分光光度计扫描为单一区带。

(2) 所有试剂以双重蒸馏水配置, 以反应终浓度计算。以半对数作图法计算酶的构象变化常数, 按一级反应作图法求失活常数。

(3) 荧光扫描于日立 F-4010 型荧光分光光度计进行, 紫外-可见光谱扫描于 UV-240 型紫外分光光度计进行, 25℃, 测定过程扣除相应本底。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乙醇对酶的抑制作用及抑制类型

以 PNPP 为底物, 含 pH5.0、0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaAc-HAc 及不同浓度乙醇的测活体系中, 监测产物生成量与时间的关系, 并求其剩余活力, 根据一级反应作图法求其失活常数。进一步在含有不同浓度乙醇的测活体系中, 改变底物浓度, 测定酶促反应的初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 确定其抑制类型。实验结果表明, 乙醇对酶的抑制作用, 以 1/V 对 1/S 作图为反竞争性抑制类型(图 1), 以 1/V<sub>mp</sub>对[1]作图, 求得抑制常数 K<sub>i</sub> 为 16%。

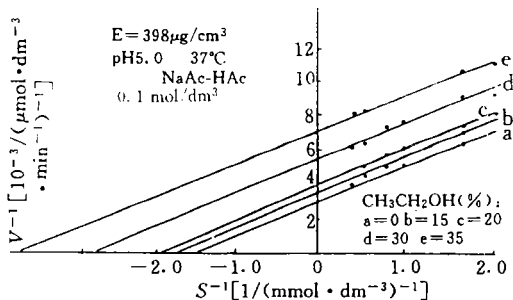


图 1 乙醇对 ACPase 抑制动力学(双倒数作图法)

Fig. 1 Inhibition of ethanol on ACPase

表 1 文昌鱼酸性磷酸酶在乙醇溶液中的相对活力

Tab. 1 Relative activities of ACPase in ethanol solutions

乙醇浓度(%) (V/V)	0	5	10	20	30	35	40	50
相对活力(%)	100	97	95	84	73	59	41	24

注: 酶, 7.12×10<sup>-6</sup> mol/dm<sup>3</sup>, PNPP, 2mmol/dm<sup>3</sup>, 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaAc-HAc pH 5.0, 37℃

表 2 文昌鱼酸性磷酸酶在乙醇溶液中的动力学参数

Tab. 2 Kinetic parameters of ACPase in ethanol solutions

乙醇浓度 (%) (V/V)	K <sub>m</sub> (μmol/dm <sup>3</sup> )	V <sub>max</sub> [μmol/(dm <sup>3</sup> · min)]	K <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	K <sub>i</sub> <sup>*</sup> (min <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> <sup>*</sup> [μmol/(dm <sup>3</sup> · min)]
0	6.7×10 <sup>2</sup>	2.89×10 <sup>2</sup>	4.26×10 <sup>2</sup>	4.31×10 <sup>-1</sup>	6.35×10 <sup>-1</sup>
15	5.6×10 <sup>2</sup>	2.39×10 <sup>2</sup>	3.52×10 <sup>2</sup>	4.27×10 <sup>-1</sup>	6.29×10 <sup>-1</sup>
20	5.0×10 <sup>2</sup>	2.14×10 <sup>2</sup>	3.15×10 <sup>2</sup>	4.28×10 <sup>-1</sup>	6.30×10 <sup>-1</sup>
30	3.6×10 <sup>2</sup>	1.63×10 <sup>2</sup>	2.40×10 <sup>2</sup>	4.53×10 <sup>-1</sup>	6.67×10 <sup>-1</sup>
35	2.8×10 <sup>2</sup>	1.26×10 <sup>2</sup>	1.86×10 <sup>2</sup>	4.50×10 <sup>-1</sup>	6.63×10 <sup>-1</sup>

注: \* K<sub>1</sub> = V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> (min<sup>-1</sup>); K<sub>2</sub> = K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> [μmol/(dm<sup>3</sup> · min)]

### 2.2 酶的荧光光谱及变性动力学

酶于 pH 5.0、0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaAc-HAc, 含有不同浓度的乙醇中于室温 24 h 后, 荧光光谱测定在日立 F-4010 型荧光分光光度计上进行, 25℃, 酶经不同浓度的乙醇微扰后的荧光发射光谱变化情况: 于 281nm 激发下, 300~400nm 范围扫描, 结果表明, 330nm 处的发射光谱, 随着乙醇浓度的增加, 荧光强度下降, (10%~30% 高于正常酶, 35% 低于正常酶)(图 2a)。

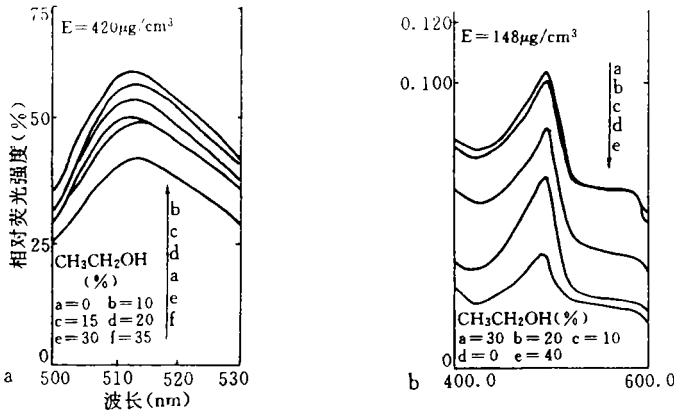


图 2 乙醇变性的荧光发射图谱

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of ACPase

在 480nm 激发下<sup>[8]</sup>,于 500~530nm 范围扫描。结果表明,低浓度的乙醇(10%~20%)变性酶使 515nm 处的发射峰值高于正常酶(但随着乙醇浓度上升而下降),当乙醇浓度达 35% 时,515nm 处的峰值明显下降(低于正常酶)(图 2b)。

酶在不同浓度的乙醇中(含 pH5.0、0.1mol/dm<sup>3</sup>NaAc-HAc),25℃,分别测定 330nm 及 515nm 发射峰荧光强度随时间的变化,并以半对数作图法计算酶的构象变化速度常数,在 30%乙醇作用下,酶的失活常数为 7.87×10<sup>-3</sup>/s,荧光 515nm 及 330nm 测定构象变化常数分别为 1.05×10<sup>-2</sup>/s 和 1.50×10<sup>-2</sup>/s。结果表明,在乙醇的微扰下,酶的构象变化速度快于失活速度。

### 2.3 酶在不同浓度乙醇中的紫外-可见光谱

酶在不同浓度乙醇中(同上缓冲液)室温 24h 后,于 UV-240 型紫外分光光度计进行紫外-可见光谱(200~600nm)扫描。结果表明,酶分子含有铁离子活性部位的 500nm 处<sup>[9]</sup>的吸收峰值,随乙醇浓度(10%~30%)的上升,其吸收峰值也上升,但峰位不变(图 3),当乙醇浓度上升至 40%时,峰值明显下降,表明乙醇对酶的影响有一个极限值。280nm 处的吸收值也产生相应变化。

ACPase 于 281nm 激发下,在 330nm 处的荧光发射峰,主要反映的是 ACPase 色氨酸残基的荧光,而在 480nm 激发下,515nm 处的荧光发射峰<sup>[8]</sup>,可能反映了与铁离子配位的酪氨酸(或色氨酸)荧光。酶在不同浓度的乙醇作用下,引起荧光的相应变化,表明酶的空间构象发生了变化,改变了生色基因的微环境,从而导致了内源荧光淬灭因子的

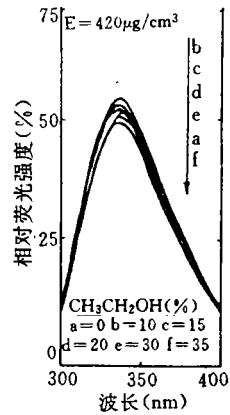


图 3 乙醇变性酶活性部位的可见光谱

Fig. 3 UV-240 absorbance spectra of ACPase (400~600nm)

消失或增强,以及荧光发生基团的外露或内埋所致。虽然荧光强度的升降与活力变化没有一一对应的必然关系,但是在乙醇作用下,515nm 荧光发射峰值产生变化(或上升或下降),可见

光谱 500nm 处峰值的变化并伴随着酶活力的变化,这有助于进一步了解和揭示酶的活性部位构象变化与活力变化的关系。在乙醇作用下,ACPase 构象变化速度快于失活速度,表明酶的活性部位对某些变性剂处于较不敏感的区域。

参考文献

- 1 Khmel'nitsky Yu L, Levashov A V, Klyachko N L. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.*, 1988,10:710~724
- 2 Dastoli F R, Musto N A, Price S. Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in an organic medium. *Arch Biochem. Biophys.* 1966,115:44~47
- 3 杨 筑, 计亮年. 低水有机介质中的酶催化, 生物化学与生物物理学进展, 1994, 21(2): 98~104
- 4 袁静明, 翟国堂. 有机溶剂微扰葡萄糖淀粉酶时的紫外、荧光和红外光谱. 生物化学与生物物理学进展. 1991, 18(1): 47~50
- 5 Johns gray. Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection. *Marine Pollution Bulletin*, 1992, 25(1~4): 48~50
- 6 Blackstock J, Filion-Myklebust C. Environmental and biochemical investigation of some effects of organic pollution in Inner Oslofjord, Norway. *Marine Biology*, 1983, 73: 155~163
- 7 陈素丽, 龚少静, 曾伟章. 文昌鱼酸性磷酸酶的分离提纯及性质的研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1985, 24(1): 84~90
- 8 力政军, 陈素丽, 颜思旭. 磷酸盐及其结构类似物对文昌鱼酸性磷酸酶的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(5): 791~794
- 9 陈素丽, 郑艺蓉, 邱巍等. 文昌鱼酸性磷酸酶金属辅基初探. 厦门大学学报(自然科学版), 1992, 31(6): 682~686

## Changes of conformation and activity of ACPase from *Branchoistoma belcheri* in ethanol solutions

Xue Xiongzhi

(Research Center of Environmental Sciences Xiamen University, Xiamen, 361005)

Fu Naiyang, Li Xiaoquan and Chen Suli

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

### Abstract

The previous studies by our research team have shown that *Branchiostoma belcheri* Acid Phosphatase (ACPase, E. C. 3. 1. 3. 2) was a kind of metalloenzyme which exhibits an absorption peak with the wavelength at 500nm in its visible spectra and an emission peak with the wavelength at 515nm in its fluorescence spectra because its containing iron. This two charactal peaks are sensitive to the enzyme activity (referance 7~9 for detail). Changes of conformation and activity at the active site of the ACPase in different concentration(V/V) of

ethanol solutions has been investigated by means of fluorescence emission and UV-visible spectra. Kinetic analysis of the inhibition shows that the inhibition of ethanol on the enzyme is found to be of uncompetitive type and the inhibition constants is found to be 16%. The rate constants of denaturation are faster than those of inactivation in the presence of ethanol.

**KEYWORDS** *Branchiostoma belcheri* Acid phosphatase, ethanol, conformation, activity, spectra

## 《现代渔业信息》杂志 1997 年度征订启事

90 年代是信息时代,信息是智慧、是力量、是生产力。科技期刊是普及和提高科学技术知识、交流生产技术经验、推广科学技术成果、探讨学术问题、引入竞争机制、开拓外向型渔业经济,为科技、教育、生产工作者以及各级领导通报渔业信息,启发思路、开阔其视野,均需要现代渔业信息。

《现代渔业信息》杂志系农业部主管、中国水产科学研究院东海水产研究所主办和农业部东海区渔政局等 40 个单位协办的一本供全国农、林、水系统各级领导、高等院校教师、科技人员以及生产单位工作者参阅的渔业科技综合性信息刊物(月刊)。

本刊系全国水产系统优秀刊物,1993 年被美国收入国际期刊名录。向国内外公开发行人。报道的主要内容侧重于国外渔业生产、水产科学技术的新动态、新工艺、新材料和新方法等信息;同时报道国内渔业生产、科技及教育等方面进展动态。90 年代是信息时代,对您单位或个人及时了解国外渔业发展动向,掌握国内外水产科学发展趋势,特别是对各级领导正确决策、科研人员开阔思路、院校教师更新教材以及生产单位技术改造、引入竞争机制等均有参考价值。

欲订者,每期 2.50 元(包括邮费),全年 12 期,共计 30.00 元。请将款通过邮局直接寄往:邮编 200090 上海市军工路 300 号中国水产科学研究院东海水产研究所《现代渔业信息》杂志编辑部发行部。壹佰元以上请信汇,帐号为上海市杨浦区工商银行办事处 2223-08900575。

国际标准刊号:ISSN 1004-8340

《现代渔业信息》杂志编辑部