

金属离子对文昌鱼碱性磷酸酶的影响*

颜思旭 陈清西

(生物学系)

摘 要

研究表明: Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 对酶活力没有影响, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 为激活作用, Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Bi^{2+} 、 Cd^{2+} 为抑制作用。酶液经 EDTANa_2 透析处理后活力完全丧失, 失活的酶可用加入 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 复活。 Mg^{2+} 是较有效的激活剂, 表现为部分非竞争性效应, 激活常数 K_a 为 $7.11 \times 10^{-4}(\text{M})$, 酶活性中心的转换数当无 Mg^{2+} 存在时为 $8.43 \times 10^2(\text{min}^{-1})$ 有 Mg^{2+} 时增至 $1.78 \times 10^3(\text{min}^{-1})$ 。 Cu^{2+} 的抑制作用为非竞争性, 其抑制常数 K_i 为 $7.12 \times 10^{-4}(\text{M})$ 。

碱性磷酸酶 (E.C.3.1.3.1 ALPase) 是一种金属酶, 其结构的维持和酶活性的表现均需要金属离子^[1,2], 酶活性的充分发挥需要二种金属离子: Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 。但它们的作用地位不同, Zn^{2+} 离子是酶的辅基, 维持酶的结构和参与催化作用, 是酶活性所必需的; Mg^{2+} 离子在酶催化反应中起了激活作用, 它是一种有效的激活剂。本文在前文^[3]获得电泳纯酶制剂的基础上, 从动力学角度研究各类金属离子对酶活力的影响, 探讨 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的效应, 为阐明酶的催化机理提供一些有益的信息。

材料与方法

文昌鱼 ALPase 按前文^[3]方法提纯, 比活力为4996单位/毫克蛋白。

对-硝基苯磷酸二钠(pNPP)系 E. Merck 产品, 用为酶活力测定底物。各种金属离子的无机盐、二乙胺四乙酸二钠(EDTANa₂)均为国产 AR 试剂。各种试剂的水溶液均用玻璃重蒸水配制。

酶活力测定 2.0ml 反应体系中包含50mM Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液(或者Gly-

* 本文摘要被编入第三次酶结构与功能学术讨论会论文摘要汇编(1985年), 本文于1985年7月收到。

NaOH 缓冲液), pH10.1, 2.0mM pNPP 和不同浓度的金属离子, 加入50 μ l 酶液在37 $^{\circ}$ C 反应8min, 然后加入2.0ml 0.1N NaOH 终止反应。系列反应液, 以 pNP 为对照, 于 72-1 型分光光度计在波长 403nm 处比色。Cd $^{2+}$ 、Ca $^{2+}$ 、Sr $^{2+}$ 、Ba $^{2+}$ 、Al $^{3+}$ 、Bi $^{2+}$ 的效应是在 Gly-NaOH 缓冲液中测定, 其它的金属离子效应均在 Na $_2$ CO $_3$ -NaHCO $_3$ 缓冲液中测定。

酶的可见、紫外吸收光谱于 Backman DU8B 型分光光度计自动扫描记录。

结果与讨论

(一) 金属离子对酶活力的影响

选用 Li $_2$ SO $_4$ 、NaCl、NaNO $_3$ 、KCl 等无机盐为效应物, 检测了 Li $^{+}$ 、Na $^{+}$ 、K $^{+}$ 等对酶活力的作用。结果表明在1.0—50.0mM 范围内, 它们对酶活力均没有影响。

用 Al(NO $_3$) $_3$ 为效应物, 研究了对酶活力的影响。实验结果表明 Al $^{3+}$ 对酶活力有明显的抑制作用。当 Al $^{3+}$ 浓度为4.0mM 时, 酶活力被抑制了45.5%。

以 MgCl $_2$ 、CaCl $_2$ 、Sr(NO $_3$) $_2$ 、Ba(NO $_3$) $_2$ 为效应物, 观测了 Mg $^{2+}$ 、Ca $^{2+}$ 、Sr $^{2+}$ 、Ba $^{2+}$ 等正二价碱土金属离子对酶活力的作用。结果(图1)表明它们对酶均有激活作用, 激活程度是 Mg $^{2+}$ >Ca $^{2+}$ >Sr $^{2+}$ >Ba $^{2+}$ 。

选用 MnSO $_4$ 、Co(NO $_3$) $_2$ 、Ni(NO $_3$) $_2$ 、CuSO $_4$ 、ZnCl $_2$ 等无机盐为效应物, 研究第一过渡金属离子对酶活力的影响。结果(图2)表明 Mn $^{2+}$ 、Co $^{2+}$ 、Ni $^{2+}$ 有不同程度的激活作用, 而 Cu $^{2+}$ 和过量的 Zn $^{2+}$ 则为抑制作用。

以 HgCl $_2$ 、AgNO $_3$ 、CdCl $_2$ 、Bi(NO $_3$) $_2$ 为效应物, 研究重金属离子对酶活力的影

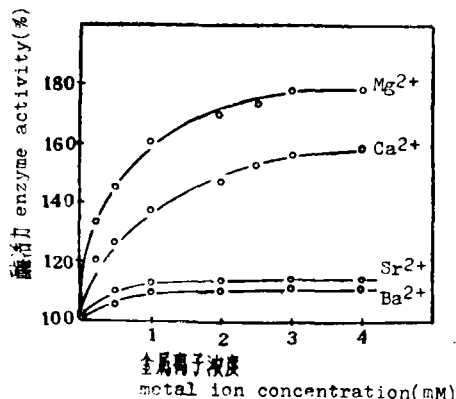


图1 碱土金属对酶活力的影响

Fig.1 Influence of alkaline-earth metal ions on enzyme activity

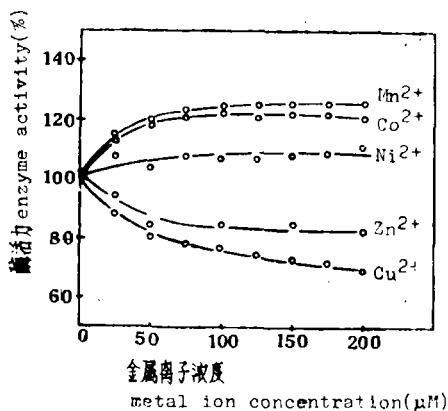


图2 过渡金属离子对酶活力的影响

Fig.2 Influence of transitional metal ions on enzyme activity

响。结果(图3)表明: Hg^{2+} 有强烈的抑制作用, 终浓度为 $250\mu M$ 时, 抑制率达 68.3% ; 为 $1mM$ 时抑制了 96.3% ; 更高浓度时, 酶活力完全丧失。 Ag^+ 、 Bi^{2+} 离子对酶也有明显的抑制作用, Ag^+ 终浓度为 $200\mu M$ 时, 酶活力被抑制了 34% 。 Bi^{2+} 离子浓度为 $1mM$ 时, 对酶的抑制率为 32% 。 Cd^{2+} 效应较小, 在 $200\mu M$ 时只抑制 7.5% 。

(二) Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶效应的动力学

1. Mg^{2+} 的激活作用类型及激活常数 K_a 在含不同浓度的 Mg^{2+} 离子的碳酸盐缓冲液(pH 10.1)中, 改变底物浓度, 测定酶反应的初速度, 以双倒数法作图(图4)。结

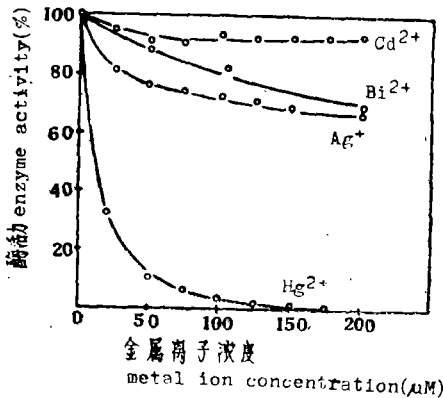


图3 重金属离子对酶活力的影响
Fig.3 Influence of heavy metal ions on enzyme activity
[Hg^{2+}] = abscissa $\times 10$;
[Bi^{2+}] = abscissa $\times 5$.

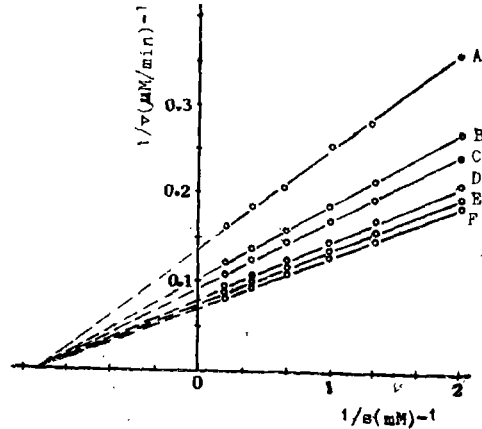
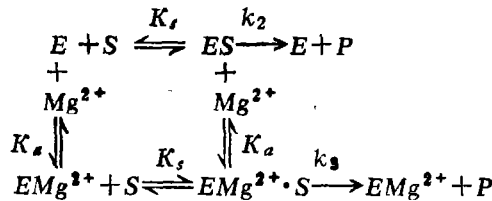


图4 Mg^{2+} 对酶的效应
Fig.4 Effect of magnesium ion on enzyme activity
[Mg^{2+}]: A, 0; B, 0.25mM; C, 0.50mM; D, 1.50mM; E, 2.0mM; F, 4.0mM.

果表明, Mg^{2+} 离子不影响 K_m 值, 只影响最大反应速度 V_{max} 值, 随 Mg^{2+} 离子浓度增大, V_{max} 值也增大, 表现为部分非竞争性激活作用。其动力学模型可以表示为



根据快速平衡理论可以推出其动力学方程为

$$v = \frac{V_{maxpp} \cdot [S]}{K_1 + [S]}$$

其中 $V_{maxpp} = V_m \cdot \left(\frac{K_a + \frac{k_3}{k_2} [Mg^{2+}]}{K_a + [Mg^{2+}]} \right)$

$$V_m = k_2 \cdot [E]$$

根据 $[Mg^{2+}]$ 与 V_{mapp} 的关系, 确定激活常数 K_a 值为 $7.11 \times 10^{-4} M$, K_3/K_2 为 2.1129. 由于 $k_2 = V_m/[E]_0$, 求得无 Mg^{2+} 存在时, 酶活性中心的转换数 k_2 为 $8.43 \times 10^2 (\text{min}^{-1})$, 所以 k_3 为 $1.78 \times 10^3 (\text{min}^{-1})$.

2. Cu^{2+} 的抑制类型及抑制常数 K_I 在 $50 \text{mM Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液 (pH9.9) 中, 以 $CuSO_4$ 为效应物, 测定其终浓度分别为 $100 \mu\text{M}$ 、 $200 \mu\text{M}$ 、 $400 \mu\text{M}$ 时对酶反应的动力学常数的影响, 结果如图 5. 可见, Cu^{2+} 的抑制作用是非竞争性效应, 只影响酶的催化反应, 而不影响酶与底物的结合作用 (即只改变 V_{max} , 而不影响 K_m), 以 $1/V_{mapp}$ 对 $[Cu^{2+}]$ 作图, 可以求出其抑制常数 K_I 为 $7.12 \times 10^{-4} M$.

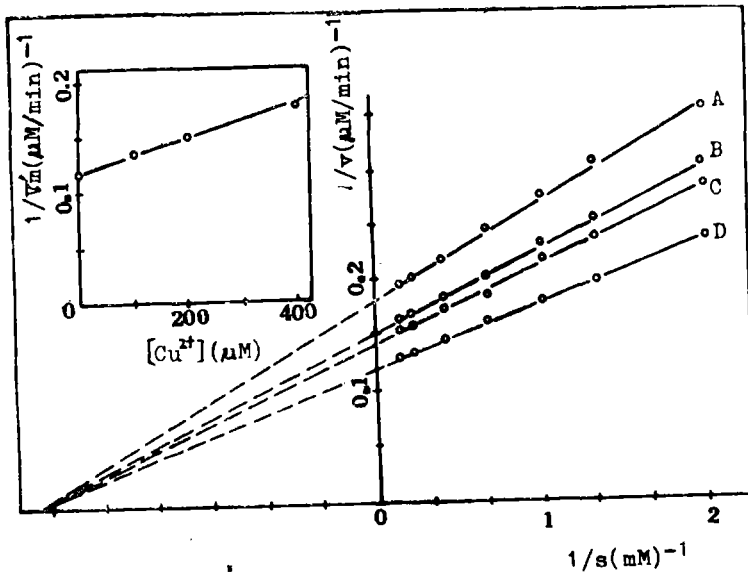


图 5 $CuSO_4$ 对酶的效应

Fig.5 Effect of copper sulfate on enzyme activity
 $[Cu^{2+}]$: A, $400 \mu\text{M}$; B, $200 \mu\text{M}$; C, $100 \mu\text{M}$; D, O.
 内插图 Inset.: Plot of $1/V'max$ versus $[Cu^{2+}]$.

(三) 酶的 $EDTANa_2$ 失活及在几种金属离子处理后的复活

酶液预先对 10mM EDTANa_2 水溶液在低温 (4°C) 透析 3h, 再对 1mM EDTANa_2 水溶液透析 2h, 然后对 0.01M Tris-HCl 缓冲液透析平衡. 对照管以水代替 $EDTANa_2$ 水溶液, 处理同上. 经 $EDTANa_2$ 处理的酶液其活力完全丧失, 说明该酶是一种金属酶. 失活的酶液分别与终浓度为 1mM 的 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 $Mg^{2+} + Zn^{2+}$ 在 37°C 下保温不同时间, 测定酶活力恢复情况, 结果总结于表 1.

实验结果表明, 文昌鱼 ALPase 经 $EDTANa_2$ 透析除去金属辅基后, 酶活力完全丧失. 失活的酶液加入金属 Zn^{2+} 离子后, 活力恢复 39% 左右; 而加入 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 活

表1 失活的文昌鱼 ALPase 与二价金属离子共保温后的活力恢复

Tab.1 Reactivation of ALPase by incubating the EDTANa₂ deactivated enzyme with bivalent cations.

时 间 time(min)	酶 活 力 % of enzyme activity			
	Zn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺ + Mg ²⁺
10	39.3	4.2	11.9	72.6
25	32.9	4.7	10.6	92.3
40	36.3	4.6	8.0	98.9
60	35.1	4.3	8.7	97.1

力分别只恢复4.5%和10%左右,若Zn²⁺与Mg²⁺同时加入,则活力几乎恢复至正常。这结果证实,文昌鱼的ALPase是一种含Zn²⁺离子的酶,Mg²⁺有助于Zn²⁺离子络合到酶活性中心上。

图6是文昌鱼ALPase的EDTANa₂处理后加入不同金属离子后吸收光谱。由图6

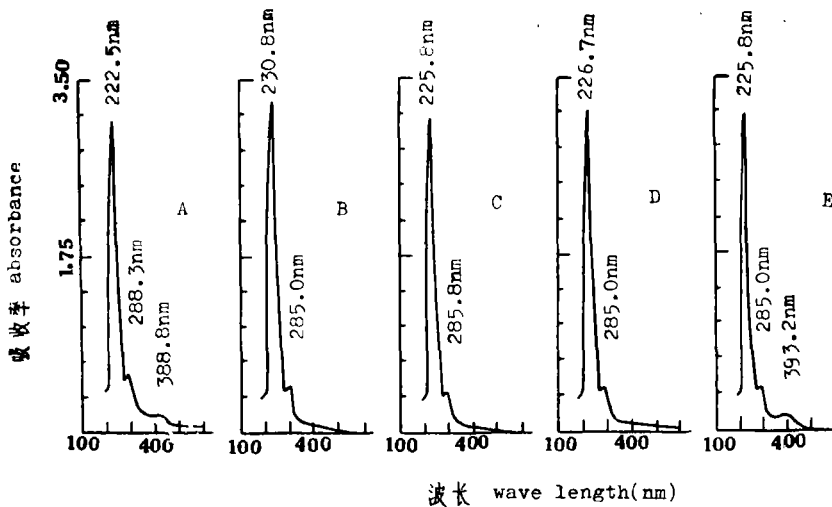
图6 EDTANa₂透析失活的酶液在加入不同金属离子后吸收光谱的变化

Fig.6 Absorption spectra of enzyme solution after addition of cation species A, control, B, EDTANa₂ deactivated enzyme, C, D, E, Mn²⁺, Mg²⁺ or Zn²⁺, reactivated enzyme.

可见,天然酶制剂在288.3nm处有一个特征吸收峰(蛋白质中Trp、Tyr、phe残基侧链吸收特征),222.5nm处有一个肽键吸收峰,388.8nm处有一个较小的吸收峰(图6A)。经EDTANa₂处理后,388.8nm处的吸收峰消失;288.3nm特征吸收峰略有兰移,同时吸收值下降,而肽键吸收峰略有红移,吸收值增大(图6B)。这说明388.8nm的吸收峰

很可能是酶蛋白与金属配基相互作用的结果。经 EDTANa₂ 处理后, 此峰随之消失。在金属离子丢失时, 酶构象似发生一定变化, 因而特征吸收峰和肽键吸收峰略有改变。EDTANa₂ 处理后的酶液加入 Zn²⁺ 离子后, 金属络合的吸收峰再现(图6E), 而加入 Mg²⁺ 或 Mn²⁺ 则此峰仍然没有再现(图6C、D)。这实验证明文昌鱼 ALPase 很可能与其它生物来源的 ALPase 相同^[1,2,4-6], 也是一种含锌的酶。

Mg²⁺ 离子在哺乳动物来源的 ALPase 分子中的作用已有深入的研究^[7-9], 一般认为: Mg²⁺ 离子的结合位点与 Zn²⁺ 的结合位点不同, 也与底物的结合位点不同, 在没有 Mg²⁺ 离子存在时, 底物也能结合到酶分子上, 也能被催化水解, 但效率较低, 当 Mg²⁺ 离子结合到酶分子上 Mg²⁺ 结合位点时, 可以调节酶分子发生空间结构的变化, 主要引起酶活性中心构象的变化, 使得酶的催化基团更加靠近于底物被作用的敏感键, 有利于催化作用, 从而提高酶活性。也有文献报道^[1], 在哺乳动物胎盘 ALPase 分子中, Mg²⁺ 的激活作用的一个重要特征是它不影响酶对底物的亲和力, 其激活作用是通过增加活性中心的数目, 或使 Zn²⁺ 离子与必需位点结合。我们的实验表明了 Mg²⁺ 对文昌鱼 ALPase 的激活机理为类似部分非竞争性的类型。酶催化 pNPP 水解反应的 K_s 值不随 Mg²⁺ 浓度增大而改变, 而 V_{max} 值增大, 酶活性中心转换数由无 Mg²⁺ 存在时的 $8.43 \times 10^3 (\text{min}^{-1})$ 增加到有 Mg²⁺ 存在时的 $1.78 \times 10^3 (\text{min}^{-1})$ 。Mg²⁺ 离子不影响酶对底物的亲和力, Mg²⁺ 与酶结合同底物与酶结合是彼此分开的, 互不干涉, 互不影响, 这与哺乳动物来源的 ALPase 具有相同的作用机理。

在哺乳动物 ALPase 分子中^[9], 酶分子上的 Mg²⁺ 结合位点也可以与其它金属离子结合, 这些离子主要的是 Co²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺ 和 Zn²⁺, 但取代的效果不同。被 Mn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺ 取代者都有激活作用, 只是激活程度较 Mg²⁺ 为低而已。被 Cu²⁺、Zn²⁺ 取代, 都则为抑制作用。我们的实验结果也与此相同。Cu²⁺ 表现非竞争性的抑制效应, 进一步说明了 Cu²⁺ 与酶的结合位点不同于底物与酶的结合位点。

参 考 文 献

- [1] Fernley H N, *The Enzymes* (ed. Boyer PD) 4(1971) 417—444
- [2] Rein T W, Wilson I B, *The Enzymes* (ed. Boyer PD) 4 (1971) 373—416
- [3] 颜思旭、陈清西, 厦门大学学报(自然科学报) 24 (1985) 367—372
- [4] Cyboron G W et al., *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 7262—7268
- [5] Fosset M et al., *Biochemistry* 13 (1974) 1783—1788
- [6] Mc Cracken S, Meighen E A, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 3945—3950

- [7] Ahlers J, *Biochem. J.* 141 (1974) 257—263
[8] Cathala G, Brunel C, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 6040—6045
[9] Cathala G, Brunel C, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 6046—6053

Effect of Metal Ions on the *Amphioxus* Alkaline phosphatase

Yan Sixu Chen Qingxi
(*Department of Biology*)

Abstract

A survey of effect of metal ions on the *Amphioxus* alkaline phosphatase activity shows that Li^+ , Na^+ and K^+ have not any effect on the enzyme activity; Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} activate the enzyme; Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Bi^{2+} and Cd^{2+} inhibit the enzyme. After dialysis-treatment with EDTA- Na_2 , the enzyme is totally inactivated. The inactivated enzyme can be reactivated by adding Zn^{2+} and Mg^{2+} . The magnesium ion is a more efficacious activator, and the effect is classified as partly noncompetitive type. The activate constant is found to be $7.11 \times 10^{-4}(\text{M})$. The turnover number of the enzyme active center increases from $8.43 \times 10^2(\text{min}^{-1})$ in the absence of Mg^{2+} ion to $1.78 \times 10^3(\text{min}^{-1})$ in the presence of Mg^{2+} ion. The inhibition of Cu^{2+} ion on the enzyme is found to be of noncompetitive type, and the inhibition constant is found to be $7.12 \times 10^{-4}(\text{M})$.