

研究简报

长吻鲩碱性磷酸酶的分子量及氨基酸组成

MOLECULAR WEIGHT AND AMINO ACID COMPOSITION OF ALKALINE PHOSPHATASE FROM *LEIOCASSIS LONGIROSTRIS* QINTHER

陈定福 唐云明

(西南师范大学生物系, 重庆 630715)

Chen Dingfu and Tang Yunming

(Southwest china normal University, Chongqing 630715)

关键词 长吻鲩, 肝脏, 碱性磷酸酶, 分子量, 氨基酸组成

KEYWORDS *Leiocassis longirostris*, liver, alkaline phosphatase, molecular weight, amino acid composition

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, EC. 3. 1. 3. 1, 简称 AKP)广泛存在于动物、植物及微生物体中, 是一种对底物专一性较低的磷酸单酯水解酶, 在生物体内直接参与磷酸基团的转移和代谢过程, 在脊椎动物的骨化作用中起重要作用。提纯的 AKP 常被应用于核酸、毒物学、医学的研究, 是遗传工程常用的工具酶[覃甲仁、魏琦, 1986]。关于微生物、脊索动物、哺乳动物的 AKP 的性质及分子量的研究已有报道, 而鱼类 AKP 的研究, 国内文献中迄今未查到。本文报道从长吻鲩肝脏中提取的 AKP 的分子量及氨基酸组成的研究结果, 以利进一步开展对该酶结构与功能的研究。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

实验用长吻鲩(♀, 体长63 cm, 重3450克, 性腺发育Ⅳ期末的成熟鱼)产自嘉陵江北碛至合川段, 购自重庆北碚鲜鱼市场, 用其肝脏为酶的提取材料。

1.1.2 试剂

DEAE-纤维素(DE-32)为美国 Whatman 产品进口分装; Sephacryl S-200和测分子量所用的标准品

均为 Pharmacia 产品；其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酶的分离纯化

参照颜思旭等[1980]和徐伟军等[1986]的方法,并有所修改。长吻鲢的肝用冷蒸馏水漂洗后切细,加入3倍体积的0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5,内含0.1 mol/L NaCl)匀浆,向浆液中加入20%(v/v)冷正丁醇抽提,离心(4℃,8000 r/min,30 min)后取上清液(粗酶液)。粗酶液用0.35和0.70饱和度硫酸铵分级沉淀,离心(4℃,10000 r/min,40 min)取沉淀。沉淀溶于0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)并对0.5%NaCl 透析至无 NH_4^+ 和 SO_4^{2-} ,0℃离心30 min(10000 r/min),其上清液适当浓缩后进行DE-32柱层析(2.8×30 cm;LKB 柱层析系统),0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5,内含0-0.3 mol/L NaCl)洗脱(4 ml/管,0.3 ml/min),分管收集,280 nm 紫外检测后,测定蛋白吸收峰的酶活性,将酶活性峰部份上 Sephacryl S-200柱(2.6×60 cm;LKB 柱层析系统),0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)洗脱(0.3 ml/min,4 ml/管),分管收集,追踪和收集酶活性部分,经适当浓缩后,进行该酶分子量及氨基酸组成的测定。

1.2.2 纯度鉴定

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)[张龙翔等,1981],分离胶浓度7%,考马斯亮兰G-250染色;SDS-PAGE[朱广廉等,1982],分离胶浓度10%,考马斯亮兰R-250染色。

1.2.3 分子量及亚基分子量测定

Sephacryl S-200凝胶过滤法[张龙翔等,1981]测定分子量,应用有效分配系数(K_{av})计算出 AKP 的分子量;SDS-PAGE[朱广廉、杨中汉,1982]测定亚基分子量。

1.2.4 氨基酸组成分析

纯酶于水解管中加入6 mol/L HCl,真空封管,110℃水解24小时,用日立835-50型氨基酸自动分析仪测定。按覃甲仁、魏琦法[1986]计算氨基酸残基数。

1.2.5 酶活力测定

采用磷酸苯二钠为底物的金氏法[上海市医学化验所,1979],并在此法规定的条件下每15 min 生成1 μmol 酚所需的酶量为1个酶活力单位(U)。

1.2.6 蛋白质含量测定

按 Lowry 法,牛血清白蛋白为标准。

2 结果

2.1 酶的纯化

鱼肝匀浆后,用正丁醇抽提,得到活性较高的粗酶液,该酶液经硫酸铵分级沉淀,回收率为45.34%。盐析透析液离心后,其上清液以DE-32纤维素柱层析,出现2个蛋白吸收峰,其中1个有酶活性,且酶峰值位于0.16 mol/L NaCl 附近(图1)。收集酶峰,再经 Sephacryl S-200柱层析,得1个酶峰(— · — · —,图2)。AKP 纯化结果如表1。

2.2 酶的纯度

纯化后的 AKP 经 PAGE(图3)和 SDS-PAGE(图4)均为单一区带,说明该酶已达到均一程度。

2.3 酶的分子量及亚基分子量

2.3.1 分子量

用 Sephacryl S-200柱(2.6×60 cm;LKB 柱层析系统)层析测定分子量。柱总体积 V_t 为294.7 ml,外水

体积 V_0 为 121.8 ml, 根据各已知分子量标准蛋白质的洗脱体积 V_e , 按 $K_{av} = V_e - V_0 / V_t - V_0$ 求出各标准蛋白质的有效分配系数 K_{av} (表 2), 以 K_{av} 对分子量的对数 $\lg M_r$ 作图, 得标准曲线 (图 5)。在同一条件下, 测得 AKP 的 $V_e = 146.00$ ml, 按公式求得 $K_{av} = 0.14$, 从标准曲线上查得 $\lg M_r = 5.110$, 从而得 AKP 的分子量为 128800 (测定 2 次, 相对误差 $\pm 3\%$)。

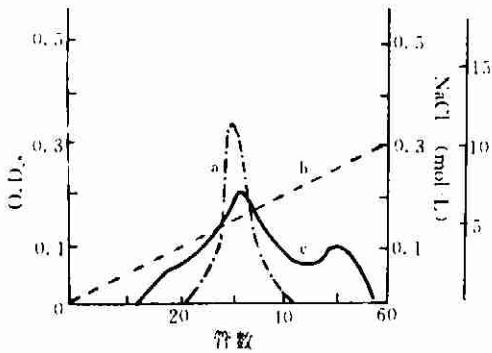


图1 DEAE-纤维素(DE-32)柱层析

Fig. 1 Chromatography of AKP on DE-32 column

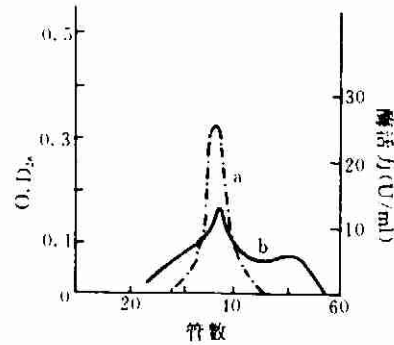


图2 Sephacryl S-200柱层析

Fig. 2 Chromatography of AKP on sephacryl



图3 AKP 凝胶电泳

Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of AKP



图4 AKP 的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of AKP

A. 标准蛋白; B. AKP

表1 长吻鮠肝脏碱性磷酸酶的纯化结果

Table 1 Purification of AKP from Liver of *Leiocassis Longirostris*

| 纯化步骤 | 总体积 (ml) | 总蛋白 (mg) | 总活性 (U) | 比活 (U/mg 蛋白) | 回收率 (%) | 纯化倍数 |
|--------------------|----------|----------|---------|--------------|---------|-------|
| 匀浆 | 402 | | | | | |
| 正丁醇抽提 | 342 | 501.58 | 539.32 | 1.07 | 100 | 1 |
| 0.35饱和度硫酸铵上清液 | 284 | 310.01 | 480.89 | 1.55 | 89.16 | 1.45 |
| 0.70饱和度硫酸铵透析酶液 | 31 | 47.52 | 244.53 | 5.14 | 45.34 | 4.81 |
| DEAE-纤维素(DE-32)柱层析 | 12 | 4.44 | 214.05 | 48.21 | 39.68 | 45.05 |
| Sephacryl S-200柱层析 | 8 | 2.78 | 184.70 | 66.43 | 34.24 | 62.08 |

表2 标准蛋白质及 AKP 的有效分配系数
Table 2 K_{av} of standard proteins and AKP

| 标准蛋白质及 AKP | 分子量(dalton) | 洗脱体积(ml) | 有效分配系数 |
|------------|-------------|----------|--------|
| 核糖核酸酶 | 13700 | 211.7 | 0.52 |
| 胰凝乳蛋白酶原 A | 25000 | 196.1 | 0.43 |
| 卵清蛋白 | 43000 | 178.0 | 0.32 |
| 牛血清白蛋白 | 67000 | 164.2 | 0.24 |
| 醛缩酶 | 160000 | 141.7 | 0.12 |
| AKP | 128800 | 146.0 | 0.14 |

2.3.2 亚基分子量

经 SDS-PAGE, 以标准蛋白质的相对迁移率(R_f)对分子量的对数($\lg M. W$)作图, 得标准曲线(图6), 根据 AKP 在同一电泳条件下的相对迁移率, 从标准曲线上查得 $\lg M. W = 4.810$, 故 AKP 的亚基分子量为 64570 (测定3次, 相对误差 $\pm 4\%$)。表明 AKP 分子由2个相同亚基组成。

2.4 酶的氨基酸组成

用氨基酸自动分析仪对 AKP 酸水解液进行测定, 得出氨基酸组成比例, 再结合 AKP 的分子量及组成 AKP 的各种氨基酸的分子量推算出整个 AKP 分子的氨基酸组成。表3示出长吻鲩肝脏 AKP 由19种氨基酸(色氨酸未测)1144个氨基酸残基组成。其中 Asp. Glu. Thr. Pro. Val 和 Leu 含量较高。

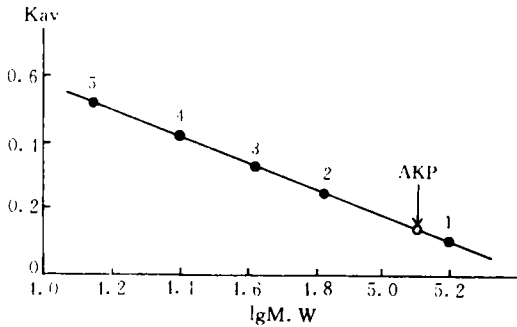


图5 AKP 的分子量测定

Fig. 5 Molecular weight determination of the AKP on sephacryl S-200

标准蛋白质:

1. 醛缩酶(160000)
2. 牛血清白蛋白(67000)
3. 卵清蛋白(43000)
4. 胰凝乳蛋白酶原 A (25000)
5. 核糖核酸酶(13700)

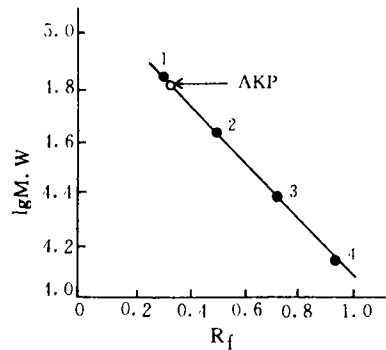


图6 AKP 亚基分子量的测定

Fig. 6 Molecular weight determination of the subunits of AKP by SDS-PAGE

标准蛋白质:

1. 牛血清白蛋白(67000)
2. 卵清蛋白(43000)
3. 胰凝乳蛋白酶原 A (25000)
4. 核糖核酸酶(13700)

表3 长吻鮠肝脏碱性磷酸酶的氨基酸组成
Table 3 Amino acid composition of AKP from
the liver *Leiocassis Longirostris*

| 氨基酸 | 百分含量(%) | 每分子残基数 | 氨基酸 | 百分含量(%) | 每分子残基数 |
|----------|---------|-------------|---------|---------|-----------|
| Asp(Asn) | 11.70 | 130.92(131) | Leu | 6.50 | 73.97(74) |
| Thr | 8.95 | 113.99(114) | Tyr | 5.32 | 41.98(42) |
| Ser | 4.60 | 68.03(68) | Phe | 3.31 | 28.96(29) |
| Glu(Gln) | 11.32 | 112.91(113) | Lys | 3.88 | 38.98(39) |
| Gly | 4.74 | 106.97(107) | His | 1.38 | 12.95(13) |
| Ala | 5.85 | 105.98(106) | Arg | 5.45 | 44.93(45) |
| Cys | 0.80 | 9.98(10) | Pro | 7.16 | 94.94(95) |
| Val | 6.54 | 84.95(85) | Trp(未测) | | |
| Met | 0.92 | 9.03(9) | | | |
| Ile | 5.62 | 63.96(64) | 共计 | 94.04 | 1144 |

3. 讨论

从不同动物或细菌中纯化的 AKP,其分子量从80000到216000不等[徐伟军等,1986],小牛肠粘膜为145000,乳牛胎盘是168000,文昌鱼(整体)为138000[颜思旭等,1985],大肠杆菌是80000(40000×2)。广西眼镜王蛇毒 AKP 的分子量为95000(分子筛法)及91900(凝胶电泳求商法)[覃甲仁、魏琦,1986]。本实验用凝胶过滤法测得长吻鮠肝脏 AKP 的分子量为128800,用 SDS-PAGE 测得其亚基分子量为64570(整酶分子量64570×2),此结果与文昌鱼(脊索动物)接近。但分子量测定方法较多,最好再用聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳、离心沉降平衡等方法加以测定,使其彼此配合、相互对照、相互验证,以作出可靠的结论。

不同来源的 AKP 的氨基酸组成,报道不多,已知文昌鱼(整体)AKP 由20种氨基酸1117个氨基酸残基组成[颜思旭等,1985],广西眼镜王蛇毒 AKP 由至少17种氨基酸(色氨酸未测)约845个氨基酸残基组成[覃甲仁、魏琦,1986]。本文报道的长吻鮠肝脏 AKP 由19种氨基酸(色氨酸未测)1144个氨基酸残基组成,与文昌鱼比较接近。本实验因样品酸水解,除色氨酸被破坏外(未另作测定),丝氨酸和苏氨酸也有一定程度的破坏,所以水解24小时的测得值也常低于真实值(这种误差未作校正)。

参 考 文 献

- [1] 上海市医学化验所,1979.临床生化检验,354-356.上海科技出版社。
- [2] 朱广廉、杨中汉,1982.SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量.植物生理学通讯,(2):43-47。
- [3] 张龙翔等,1981.生化实验方法和技术,62-132.人民教育出版社(京)。
- [4] 徐伟军等,1986.用染料-配基亲和层析柱纯化碱性磷酸单酯酶.生物化学与生物物理学报,18(5):410-413。
- [5] 覃甲仁、魏琦,1986.广西眼镜王蛇毒中碱性磷酸酶的分离纯化与一些性质的研究.生物化学与生物物理学报,18(4):320-321。
- [6] 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。
- [7] 颜思旭等,1980.文昌鱼碱性磷酸酶的动力学初步研究.厦门大学学报(自然科学版),19(3):64-66。