

研究简报

泥鳅碱性磷酸酶的分离纯化及其部分性质

ISOLATION, PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF ALKALINE PHOSPHATASE FROM LOACH

唐云明

(西南师范大学生命科学系, 重庆 630715)

TANG Yun-Ming

(Department of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing, 630715)

关键词 碱性磷酸酶, 纯化, 性质, 泥鳅

KEYWORDS Alkaline phosphatase, Purification, Properties, Loach

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, EC.3.1.3.1, 简称 AKP), 是一种有广泛使用价值的生化试剂, 可专一性地水解磷酸单酯化合物而释放无机磷。主要用于核酸研究, 分析、测定核苷酸顺序及其基因的重组、分离, 也是酶标免疫测定技术的常用工具酶之一, 药用化妆品中添加 AKP 有益于皮肤细胞的再生和新陈代谢, 还可用于核苷酸脱磷生产核苷等。自然界中, AKP 广泛存在于动、植物组织和某些微生物中。国外商品 AKP 多数是从大肠杆菌发酵和小牛(或猪、鸡)肠粘膜、牛脾等动物脏器中提取制备的。鉴于进口试剂十分昂贵[李良铸等 1991], 因此开发利用国内的资源, 特别是来源丰富、价格便宜、含量高的资源更具实际意义。我们在陈定福[1994]、陈定福和唐云明[1995]和颜思旭等[1980]工作的基础上, 从泥鳅体内分离纯化得到 AKP, 并对 AKP 进行了部分性质研究。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

实验材料: 泥鳅(*Cobitis anguillicauda*)购自重庆北碚鲜鱼市场。

试剂: DEAE-琼脂糖(DEAE-Sepharose Fast Flow)、Sephacryl S-200 凝胶、蛋白质等电点标准试剂盒(pH 值为 3~10)和两性载体电解质为 Pharmacia 产品; 丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺为 Serva 产品; TEMED 为 BDH 产品; 其它试剂为国产分析纯。

1.2 方 法

酶活性测定: 酶活性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]。酶活力单位定义: 1 mL 0.1 mol/L 的碳酸盐缓冲液(pH 值 10.0), 加入 1 mL 0.01 mol/L 的磷酸苯二钠, 37℃ 预热 5 min, 然后加入 0.1 mL 酶液, 混匀后于 37℃ 保温 15 min, 再加入 3 mL 铁氢化钾, 最后在 510 nm 波长下测定, 产生 1 μmol 酚的酶量为一个活力单位(U)。

收稿日期: 1996-02-29

蛋白质含量测定:采用分光光度法[Layne 1957]和 Lowry 法[1951],以牛血清白蛋白为标准样品。

酶的分离纯化:活泥鳅用蒸馏水漂洗干净。按 1:3(g:v)的比例加入预冷的 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 7.5),用 JJ-2 型组织捣碎机捣碎两次,每次 1 min,转速 3 000 r/min,置冰箱过夜;然后在 15 000 × g 下,离心 20min,收集上清液;再加入预冷的正丁醇,使其终浓度为 25%(v:v),抽提后 15 000 × g 离心 30min,弃正丁醇层,重复 2 次正丁醇抽提,得粗酶液。粗酶液用 0.35 和 0.75 饱和度的硫酸铵分级沉淀,20 000 × g 离心 30min,收集 0.75 饱和度的硫酸铵沉淀;该沉淀溶于 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.5)中,并对此缓冲液透析除去(NH₄)₂SO₄;然后上 DEAE-琼脂糖柱(26 mm × 140 mm)层析,用 0~0.4 mol/L 线性梯度的 NaCl 溶液(内含 0.05 mol/L 的 Tris-HCl,pH 值 7.5)洗脱,流速 30 mL/h,每管收集 5 mL,紫外监测波长为 280 nm(所有层析在 LKB-柱层析系统上操作);测定各管的 AKP 活性和蛋白质含量;收集活性较高的各管酶液,透析除去 NaCl,再用冷冻干燥仪浓缩,得到初步纯化的酶液。该酶液再用 Sephacryl S-200 分子筛层析纯化,以 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液(内含 0.05 mol/L 的 Tris-HCl,pH 值 7.5)洗脱,流速 18 mL/h,每管收集 3 mL;测定 AKP 活性和蛋白质含量,将活性高的各管洗脱液集中,透析、浓缩、干燥,这样就得到纯化的 AKP。

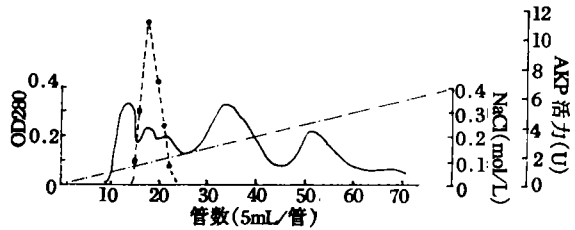


图 1 泥鳅 AKP 的 DEAE-琼脂糖柱层析

Fig.1 Column chromatography of AKP in loach on DEAE-Sepharose

—OD280; - - - - - AKP 活力; ······NaCl

聚丙烯酰胺凝胶电泳:按吴少伯[1979]方法进行,分离胶浓度为 7.5%。

等电聚焦电泳:按王重庆等[1994]的方法进行。

AKP 其它性质的测定:按张树政等[1987]的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 酶的分离纯化

粗酶液经透析脱盐后,通过 DEAE-琼脂糖柱层析,结果如图 1 所示。初步纯化的酶样品经透析浓缩后过 Sephacryl S-200 分子筛层析柱,结果如图 2 所示。整个纯化结果见表 1。从 500 g 鲜泥鳅中得到 6.9 mg AKP,比活力为 192.98 U/mg 蛋白。所得酶样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳显示一条带(图 3),经等电聚焦电泳也显示一条带(图 4),说明该酶样品达到均一程度。

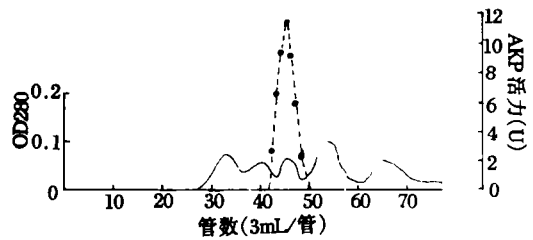


图 2 经 DEAE-琼脂糖柱分离的 AKP 的 Sephacryl S-200 凝胶过滤

Fig.2 Gel-filtration patterns of AKP Sephacryl S-200 column after being isolated on DEAE-Sepharose column

—OD280; - - - - - AKP 活力

表 1 泥鳅碱性磷酸酶的纯化

Table 1 Purification of AKP from loach

(500g)

纯化步骤	总活力(U)	总蛋白(mg)	比活力 U/mg 蛋白	回收率(%)	纯化倍数
粗酶液	3312	17640	0.19	100	1
0.35~0.75(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	3146	8592	0.37	94.98	1.95
DEAE-琼脂糖层析	2106	51.95	40.54	63.59	213.37
Sephacryl S-200	1333	6.90	192.98	40.25	1015.68

2.2 酶的性质

2.2.1 等电聚焦分析

该酶在等电聚焦电泳中呈现1条蛋白带,其pH值为7.40(图4)。实验重复2次,重复性好。

2.2.2 米氏常数 Km 测定

改变底物浓度(酶反应体系中底物的最终浓度分别为0.45、0.60、0.90、1.19、1.79、2.38、3.57、4.76 mmol/L),按照酶活力测定的条件分别测定其产物量,将测定结果,按 Lineweaver-Burk 法,求得该酶以磷酸苯二钠为底物的 Km 值为 2.0×10^{-3} mol/L(图5)。

2.2.3 温度对酶反应速度的影响

不同保温温度(20、25、30、35、40、45、50、55、60℃)在相同反应条件下测定酶活力表明,在本实验条件下泥鳅 AKP 在 40℃ 时活性最高(图6),这与南方鲇[陈定福 1994]、文昌鱼[顾思旭等 1980]的 AKP 相似。最适反应温度范围 37~45℃。

将酶液在同 pH 值(10.0)、不同温度(25、35、45、50、55、60℃)以及同一温度不同保温时间(1、2、3、4、5h)处理后,再按照酶活性测定相同条件下测定酶对热的稳定性,以直接反应的酶活力为 100%,其余所得数据折合成对照的百分数,再对保温时间作图(图7)。结果表明:该酶在温度低于或等于 25℃,放置 5h 不改变酶活性,但超过 50℃ 时活性明显下降,在 25~45℃ 及 5h 内酶活性变化不很显著。在 60℃ 保温时酶活力急剧下降,保温 1h,仅剩下 10% 的活力,保温 4h 活力全部丧失。



图3 AKP 凝胶电泳

Fig.3 polyacrylamide gel electrophoresis of AKP

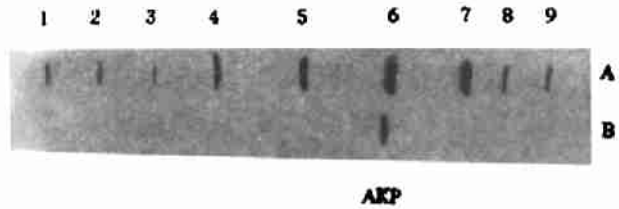


图4 AKP 等电聚焦电泳

Fig.4 Isoelectric focusing of AKP

A: 标准蛋白; B: AKP。

等电点标准蛋白质: 1. 淀粉葡萄糖苷酶(3.50);

2. 大豆胰蛋白酶抑制剂(4.55); 3. 乳球蛋白 A(5.20);

4. 牛碳酸酐酶 B(5.85); 5. 人碳酸酐酶 B(6.55);

6. 马肌红蛋白(碱性带)(7.35); 7. 植物外源凝集素酸性带(8.15);

8. 植物外源凝集素(中性带)(8.45); 9. 植物外源凝集素(碱性带)(8.65)

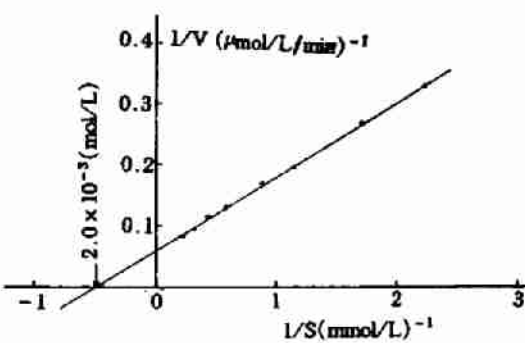


图5 双倒数法测定 AKP 的米氏常数

Fig.5 Km determination of AKP according to the equation of Lineweaver-Burk.

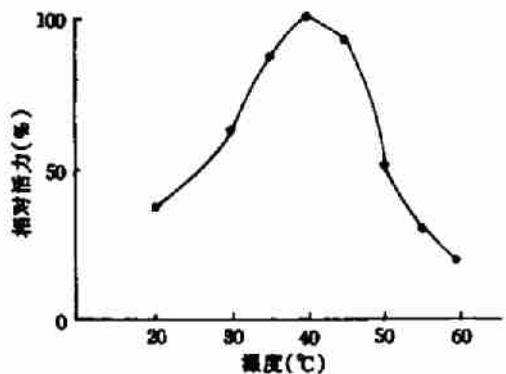


图6 AKP 作用最适温度曲线

Fig.6 The effect of temperature on AKP activity

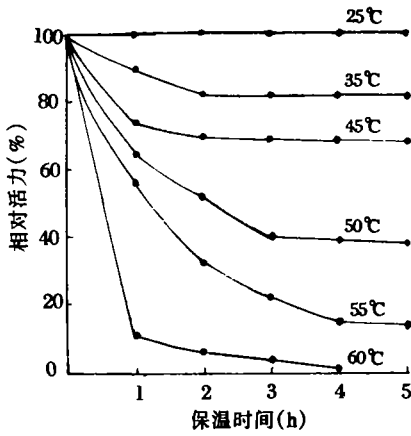


图7 AKP的热稳定曲线

Fig.7 Stability of AKP in different preincubation temperature

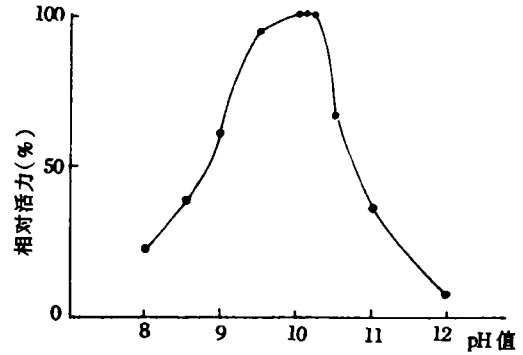


图8 AKP最适反应 pH 曲线

Fig.8 The effect of pH on activity

2.2.4 pH对酶反应速度的影响

在不同 pH 值 8.0~12.0 条件(其它条件同酶活性测定)下测定酶活力,作 pH-酶活力曲线(图 8),结果表明,该酶在 pH 值 10.0~10.2 时活性最强。将酶液在不同 pH 值 6~12 缓冲液中于 25℃ 放置 1 h,然后按酶活性测定相同条件进行酶活性测定。结果表明泥鳅 AKP 在 pH 值 7.5~11.0 范围内稳定。

参 考 文 献

- 上海市医学化验所.1979.临床生化检验.上海科技出版社.354~356.
- 王重庆等.1994.高级生物化学实验教程.北京大学出版社.54~63.
- 李良铸等.1991.生化制药学.北京:中国医药科技出版社.175.
- 吴少伯.1979.植物组织中的蛋白质及同功酶——聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳.植物生理学通讯,(1):30~33.
- 陈定福.1994.南方鲇碱性磷酸酶的分离纯化及其部分性质的研究.生物化学杂志,10(4):420~426.
- 陈定福,唐云明.1995.长吻鲈碱性磷酸酶的分子量及氨基酸组成.水产学报,19(1):78~82.
- 张树政等.1987.酶学研究技术.北京:科学出版社.130~158.
- 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):64~71.
- Layne E.1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Colewick S P, Kaplow N P, ed. Methods in Enzymology. Vol. III. New York: Academic Press. 447~454.
- Lowry D H. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, 193:267~275.