

草鱼酸性磷酸酯酶的性质及金属离子对其活性的影响

杨立红, 肖波, 王晓洁, 侯月利, 王佳, 孙静

(鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 以草鱼肝脏为材料提取一种酸性磷酸酯酶(ACPase, EC.3.1.3.2),进一步用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀分离, Sephadex G-200柱纯化,经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯度鉴定呈现单一酶蛋白带,该酶紫外吸收峰为240 nm和280 nm,等电点为4.8,相对分子质量为100 046.1。该酶水解对硝基苯磷酸二钠(pNPP)的最适pH值为4.4,最适温度为45℃,并有热激活现象,热激活温度为60℃。耐热实验表明,该酶在最适温度下耐热时间为33 min,最适温度下20 min时表现出最大活性。在60℃下耐热时间为25 min,15 min时表现最大活性。酶促反应初速度为0.047 5 $\mu\text{mol}/\text{min}$,最大反应速度为0.153 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。米氏常数 K_m 值为 3.56×10^{-3} mol/L。金属离子对酶活性影响的研究结果表明, K^+ 对酶有激活作用, Li^+ 、 Na^+ 对酶的活性没有明显影响;碱土金属离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对酶有激活作用,其激活程度由大到小依次为: Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ; Mn^{2+} 对酶有激活作用, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 则有抑制作用;重金属离子 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^+ 和 Cd^{2+} 对酶有抑制作用,其中 Hg^{2+} 的抑制效应最强。 Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 的作用机制研究结果表明, Mg^{2+} 对酶具有混合型激活作用, Cu^{2+} 对酶具有竞争性抑制作用。[中国水产科学,2010,17(5):969-976]

关键词: 草鱼; 酸性磷酸酯酶; 金属离子; 活性

中图分类号: Q556; S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-0969-08

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是中国重要淡水经济鱼类。养殖水环境与鱼体的健康息息相关,水环境的污染会导致草鱼生长不良。其原因之一是某些金属离子尤其是重金属离子,对鱼体内的酶产生抑制作用。其中,酸性磷酸酯酶(ACPase)在鱼体生长代谢过程中具有重要作用,其活性与机体免疫功能呈正相关^[1]。水环境中金属离子通过影响磷酸酯酶的活力与构象,进而影响鱼的正常生理活动与物质代谢,使鱼的健康程度下降,容易受到病原体的侵染^[2-4]。虽然关于金属离子对ACPase的影响有过一些研究^[5-6],但对草鱼ACPase的作用未见报道,研究草鱼ACPase的特性和金属离子对其影响可以阐明金属离子对草鱼生长代谢影响的机制,为指导生产实践提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂和仪器

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)成鱼,体质量1 500~2 000 g。对硝基苯磷酸二钠(pNPP)购于Sigma公司,葡聚糖凝胶(SephadexG-200)为Pharmacia公司产品,低分子量标准蛋白(Marker)为中国科学院上海生物化学研究所监制,其他试剂均为国产分析纯。

UT-2000型紫外可见分光光度计由尤尼柯仪器有限公司制造;YC-1型层析实验冷柜由北京博医康技术公司生产;高速冷冻离心机为美国Thermo Scientific公司生产。

1.2 酶的分离纯化及酶活力的测定

参照文献[7]的方法,将草鱼肝脏称重后用pH 5.0的NaAc-HAc缓冲液提取酶蛋白,饱和度

收稿日期: 2009-09-18; 修订日期: 2010-04-07.

基金项目: 山东省烟台市科学技术发展计划项目(2007152); 鲁东大学“校引进人才基金”项目(LY20083307); 鲁东大学学科建设项目(2009).

作者简介: 杨立红(1959-),女,教授,主要从事生物化学及生物活性物质开发应用研究. Tel: 13220936563; E-mail: Yanglihong33@263.net

通讯作者: 肖波(1972-),男,博士,主要从事生化与分子生物学研究. E-mail: xboyt@163.com

40%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 去杂蛋白,再经饱和度60%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析离心后得酶粗制品,粗酶再透析去除盐离子及杂蛋白后经SephadexG-200柱层析进行纯化。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行酶的纯度鉴定,浓缩胶浓度为3%,分离胶浓度为7%。

酶活力测定反应体系总体积为5 mL:3 mL 0.2 mol/L HAc-NaAc pH 5.0缓冲液,1 mL 10 mmol/L MgSO_4 及1 mL 5 mmol/L的底物对硝基苯磷酸二钠(pNPP)。在37℃下,预热5 min,加100 μL 酶液,反应10 min,然后用2.5 mL 0.2 mol/L NaOH溶液终止反应,以蒸馏水代替酶液作对照,在420 nm下测光吸收值。根据邻硝基苯酚标准曲线计算产物生成量^[8]。酶活力单位的定义为:在37℃条件下,以对硝基苯磷酸二钠(pNPP)为底物,1 L酶液1 min水解底物后生成产物的微摩尔数。以1 mg蛋白1 min水解pNPP的微摩尔数计算比活力。采用紫外吸收法^[9]测定蛋白浓度,以牛血清白蛋白为对照。

1.3 草鱼酸性磷酸酯酶的理化性质测定

1.3.1 酶分子量的测定 纯化的酶采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测定其相对分子量。计算出6种低分子量标准蛋白质的迁移率,以其分子量的对数对其迁移率作图,根据待测样品的迁移率,依标准曲线的回归方程计算出待测酶蛋白的相对分子质量。

1.3.2 酶的最适pH值、最适温度的测定 在1.2.1酶活性测定体系中,改变体系的pH值,以光吸收值对pH值作图,最大酶活力所对应的pH为酶促反应的最适pH值。改变体系的温度,以吸收值对温度作图,最大酶活力所对应的温度为酶促反应的最适温度。

1.3.3 酶促反应初速度、米氏常数的测定 在1.2.1酶活力测定体系中,在2 min、4 min、6 min、8 min、10 min、12 min、15 min和20 min时分别测定反应速度,以产物浓度对反应时间作图,其斜率为酶促反应的初速度。在上述活力测定体系中,改变底物pNPP的浓度,分别测定浓度为5mmol/L、10mmol/L、15mmol/L、20mmol/L、25 mmol/L时的反应速度,按照结果分别求出 $1/v$ 和 $1/[S]$,并按照Lineweaver Burk法作图求出该酶的米氏常数(K_m)值和最大反应速度(V_{\max})。直线在

X轴的截距即为 K_m ,直线在Y轴的截距为 V_{\max} 。

1.3.4 酶促反应等电点的测定 分别取不同pH的该酶缓冲液5 mL,加入200 μL 酶液,于280 nm处测吸光值,吸光值最大的溶解度最小,此时缓冲液的pH即为该酶的等电点。

1.3.5 酶紫外光吸收光谱的测定 取适量酶液,于200~400 nm处测吸光值,绘出紫外吸收图谱。

1.4 金属离子对草鱼酸性磷酸酯酶活力影响的测定

1.4.1 正1价碱金属离子对酶活力的影响 在3 mL 0.2 mol/L pH 5.0的NaAc-HAc缓冲液、1 mL 5 mmol/L的pNPP溶液的4 mL反应体系中,再分别加入0.4 mol/L的正1价碱金属离子 Li^+ ,使金属离子终浓度分别为1 mmol/L、2 mmol/L、3 mmol/L、4 mmol/L、5 mmol/L、6 mmol/L、7 mmol/L,同时以不加碱金属离子的测活体系为对照,于37℃恒温水浴中预热5 min,加入100 μL 酶液,孵育10 min,加入2.5 mL 0.2 mol/L的NaOH溶液终止反应,分别测定420 nm波长处的吸光值,绘出 Li^+ 对酶活力影响的趋势曲线。采用同样方法分别测定 Na^+ 和 K^+ 对酶活力的影响,并绘出影响趋势曲线。

1.4.2 碱土金属离子对酶活力的影响 碱土金属离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对草鱼酸性磷酸酯酶活力的影响测定方法同1.4.1。

1.4.3 过渡金属离子对酶活力的影响 在1.4.1的4 mL反应体系中,再分别加入0.02 mol/L的过渡金属离子 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Cu^{2+} ,使各金属离子终浓度分别为0 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$ 、350 $\mu\text{mol/L}$,按1.4.1的方法分别测定 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶活力的影响并绘出影响趋势曲线。

1.4.4 重金属离子对酶活力的影响 在1.4.1的4 mL反应体系中,再分别加入0.04 mol/L的重金属离子 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^+ 和 Cd^{2+} ,使金属离子终浓度分别为0 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 、600 $\mu\text{mol/L}$,按1.4.1的方法分别测定 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^+ 和 Cd^{2+} 对酶活力的影响,并绘出影响趋势曲线。

1.4.5 Mg²⁺、Cu²⁺对酶活力影响的动力学测定 配制浓度梯度分别为5 mmol/L、10 mmol/L、15 mmol/L、20 mmol/L的pNPP的缓冲体系,每一浓度体系分别加入不同浓度的金属离子溶液,混匀,按1.4.1的方法分别测定Mg²⁺、Cu²⁺对酶活力的影响,并绘出酶反应动力学曲线。

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化及纯度鉴定结果

从草鱼肝脏中提取酸性磷酸酯酶,经硫酸铵分级沉淀再经Sephadex G-200柱纯化,酶分离纯化的结果见表1和图1、图2。

由表1和图1可以看出,经匀浆、盐析和凝胶过滤使酶的纯化倍数为5.92倍。经Sephadex G-200第1次柱层析分离得到4个酶吸收峰,分别标记为组分I、II、III和IV。组分I在这4组分量最高,因此对其进行第2次层析。组分I经第2次Sephadex G-200柱层析分离后经聚丙烯酰胺凝胶电泳得到1个单一酶谱带(图2)。将组分I于-20℃保存用于分子量及其性质测定。

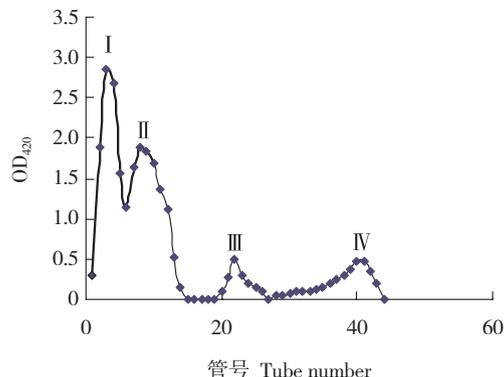


图1 SephadexG-200洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of ACP on sphadex G-200 column

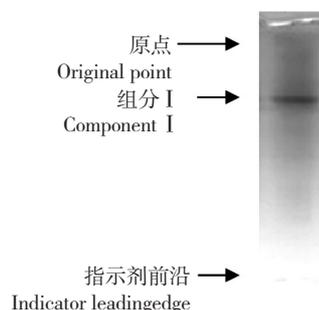


图2 组分I的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
Fig.2 Polyacrylamide gel electrophoresis of the component I of ACP from *Ctenopharyngodon idellus*

表1 草鱼酸性磷酸酯酶的分离纯化结果
Tab.1 The purification result of ACP from *Ctenopharyngodon idellus*

步骤 Step	总体积/mL Total volum	总蛋白/mg Total protein	总活力/ μ mol Total activity	比活力/ μ mol/min·mg Specific activity	提纯倍数 Purification multiple	回收率/% Recovery rate
匀浆离心上清液 Supernatant centrifuged from homogenate	23	1635.88	1595.23	0.98	1.00	100
60% (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀溶解液 Solution of 60% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	4.8	261.4	313.35	1.20	1.22	19.6
G-200 柱层析 G-200 column chromatography	3.8	6.914	40.32	5.80	5.92	2.5

2.2 酶理化性质测定结果

2.2.1 分子量 组分I经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果及低分子量标准蛋白曲线见图3和图4。

由图3可知,组分I的相对迁移率为0.211,由低分子量蛋白质标准曲线(图4)可知,组分I的相对分子质量为100 046.1。

2.2.2 酶的最适pH、最适温度及耐热性 由图5可

以看出,草鱼酸性磷酸酯酶的最适pH在4.4附近,随pH值升高酶活力逐渐下降。酶的最适温度为45℃(图6)。当温度上升到60℃时,酶的活性再次升高,由此推测草鱼酸性磷酸酯酶可能有热激活现象。由图7、图8可以看出,该酶在最适温度45℃下其活性可保持33 min,20 min时表现最大活性。60℃下酶活性耐受时间为25 min,在15 min时表现出最大活性。

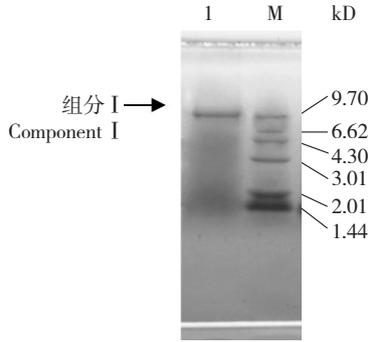


图3 草鱼酸性磷酸酯酶组分 I 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
Fig. 3 SDS polyacrylamide gel electrophoresis of the component I of ACP

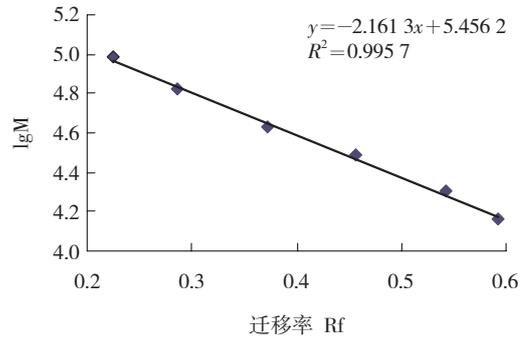


图4 低分子量蛋白标准曲线
Fig. 4 Low molecular weight protein's standard curve

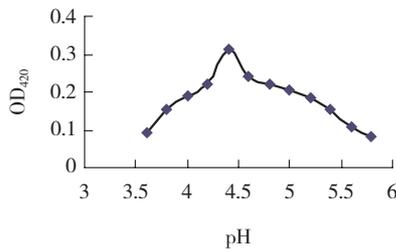


图5 pH 值对草鱼酸性磷酸酯酶活力的影响
Fig. 5 Effect of pH value on activity of ACP

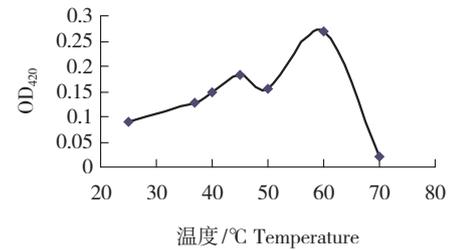


图6 温度对草鱼酸性磷酸酯酶活力的影响
Fig. 6 Effect of temperature on activity of ACP

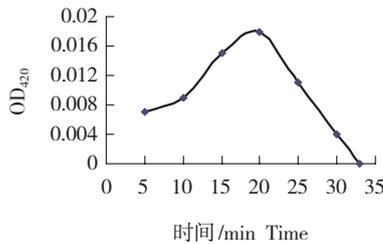


图7 45 °C 时草鱼酸性磷酸酯酶的耐热时间
Fig. 7 Duration time of ACP activity at 45 °C

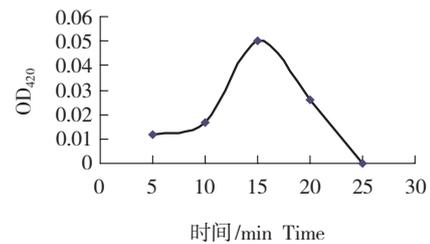


图8 60 °C 时草鱼酸性磷酸酯酶的耐热时间
Fig. 8 Duration time of ACP activity at 60 °C

2.2.3 酶促反应初速度、米氏常数的测定 由酶促反应初速度测定结果(图9)及米氏常数的测定结果(图10)可见,草鱼酸性磷酸酯酶酶促反应初速度(v_0)为 $0.0475 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$,米氏常数 $K_m=3.56 \times 10^{-3} \text{mol/L}$,最大反应速度 $V_{\text{max}}=0.153 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。
2.2.4 酶的等电点 草鱼酸性磷酸酯酶等电点测定结果(图11)可以看出,草鱼酸性磷酸酯酶的等电点在4.8附近。
2.2.5 酶的紫外光吸收光谱 由草鱼酸性磷酸酯酶紫外光吸收光谱的测定结果(图12)可以看出,草鱼酸性磷酸酯酶的紫外吸收峰在240 nm和280 nm处,

具有一般酶蛋白的紫外吸收特征。

2.3 金属离子对草鱼酸性磷酸酯酶活力的影响测定结果

2.3.1 正1价金属离子对酶活力的影响 正1价金属离子 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 等对酶活力的影响结果见图13。 K^+ 对草鱼酸性磷酸酯酶的活性有激活作用,而 Li^+ 、 Na^+ 对酶的活性没有明显影响。

2.3.2 碱土金属离子对酶活力的影响 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 等碱土金属离子对酶活力的影响见图14。

由图14可见,3种碱土金属离子对该酶均有激活作用,以 Ba^{2+} 的激活作用最为显著。激活程度由

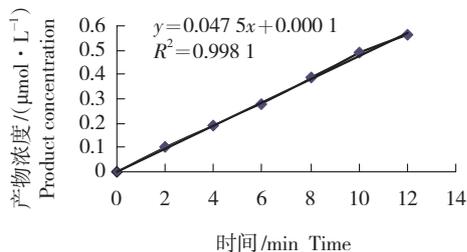


图9 草鱼酸性磷酸酯酶促反应初速度的测定
Fig. 9 Initial velocity of ACP for hydrolysis of pNPP

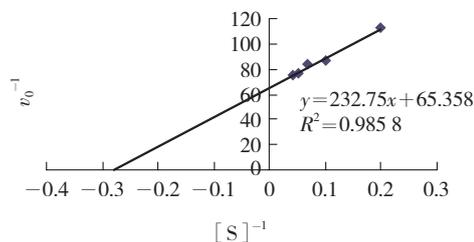


图10 草鱼酸性磷酸酯酶促反应米氏常数的测定
 v_0 单位 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, $[\text{S}]$ 单位为 $\mu\text{mol}/\text{mL}$.
Fig. 10 K_m of ACP for hydrolysis of pNPP
The unit of v_0 is $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ and the unit of $[\text{S}]$ is $\mu\text{mol}/\text{mL}$.

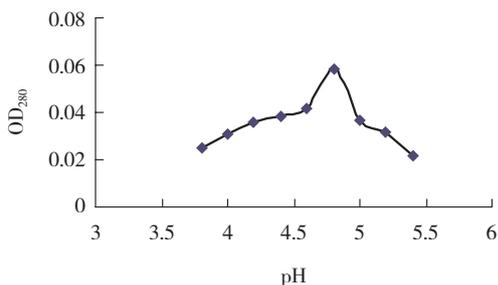


图11 草鱼磷酸酯酶等电点的测定
Fig. 11 Isoelectric point determination of ACP from *Ctenopharyngodon idellus*

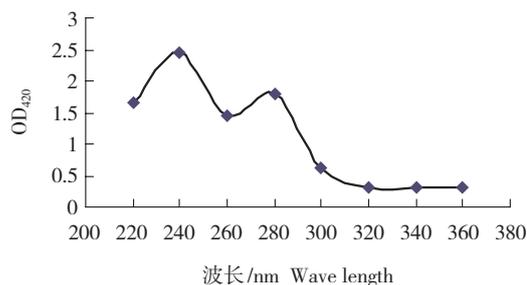


图12 草鱼酸性磷酸酯酶的紫外吸收光谱图
Fig. 12 UV absorption spectrum of ACP from *Ctenopharyngodon idellus*

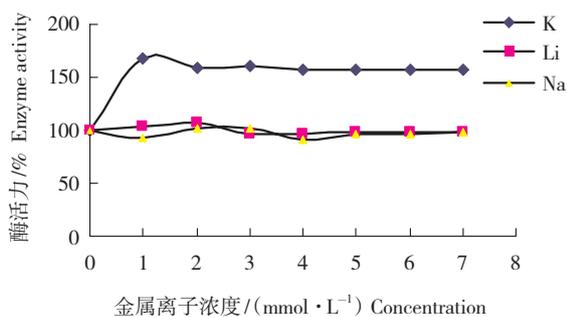


图13 碱金属离子对草鱼酸性磷酸酯酶活力的影响
Fig. 13 Effects of monovalent metal ions on the activity of ACP from *Ctenopharyngodon idellus*

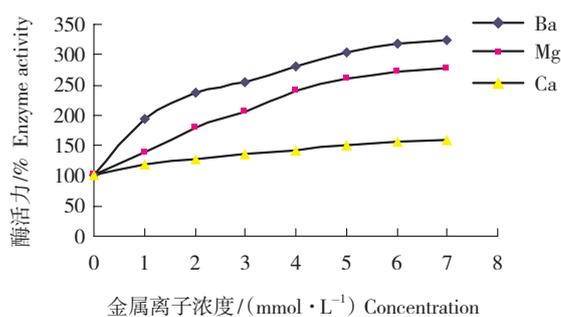


图14 碱土金属离子对草鱼酸性磷酸酯酶活力的影响
Fig. 14 Effects of positive bivalent alkaline earth metal ions on the activity of ACP from *Ctenopharyngodon idellus*

大到小依次为 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ,当这些金属离子浓度增大到一定程度时,对酶的作用趋于稳定。

2.3.3 过渡金属离子对酶活力的影响 过渡金属离子 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等对酶活力的影响测定结果(图15)可以看出, Mn^{2+} 对该酶有激活作用,而 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 对该酶有抑制作用。抑制程度由大到小依次为 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} ,当这些金属离子浓度增大到一定程度时,对酶的作用趋于稳定。

2.3.4 重金属离子对酶活力的影响 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 等重金属离子对酶活力的影响测定结果见图16。

由图16可见, Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对该酶有抑制作用。抑制程度由大到小依次为 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 。其中 Hg^{2+} 对该酶的抑制作用最强,300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的离子浓度即可使酶的活力抑制率达85.5%。

2.3.5 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活力影响的动力学测定结

果 由图 17 可见, Mg^{2+} 对酶的激活作用使酶促反应的 V_{max} 增大, 而米氏常数 K_m 值减小, 其效应为混合型

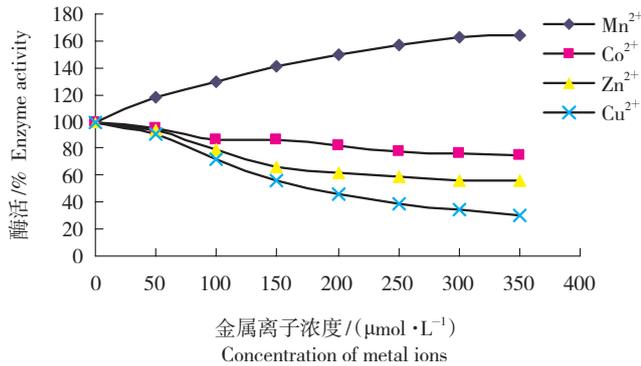


图 15 过渡金属离子对草鱼酸性磷酸酯酶活力的影响
Fig. 15 Effects of transition metal ions on the activity of ACP from *Ctenopharyngodon idellus*

激活作用。由图 18 可见, Cu^{2+} 只影响酶的 K_m 值, 使其增大, 不影响 V_{max} , 其抑制类型为竞争性抑制。

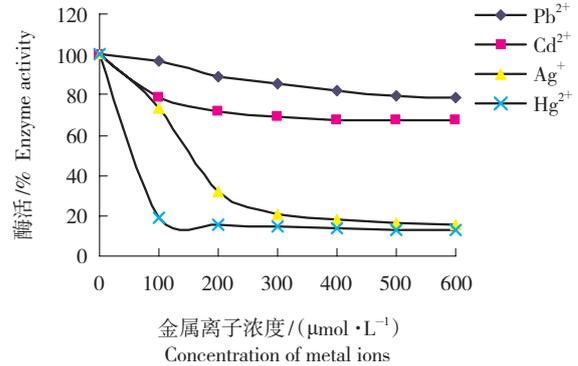


图 16 重金属离子对草鱼酸性磷酸酯酶活力的影响
Fig. 16 Effects of heavy metal ions on the activity of ACP from *Ctenopharyngodon idellus*

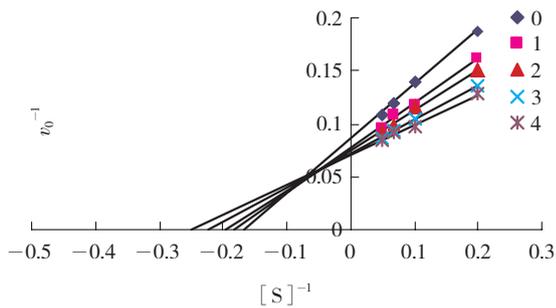


图 17 Mg^{2+} 对草鱼酸性磷酸酯酶的激活作用
 v_0 单位为 $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$, $[S]$ 单位为 $\mu\text{mol}/\text{mL}$.
Fig. 17 The activation effects of Mg^{2+} on the ACP from *Ctenopharyngodon idellus*
The unit of v_0 is $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ and the unit of $[S]$ is $\mu\text{mol}/\text{mL}$.

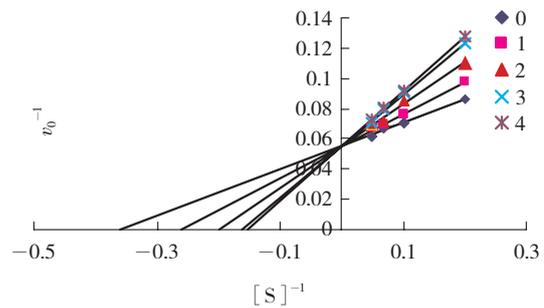


图 18 Cu^{2+} 对草鱼酸性磷酸酯酶的激活作用
 v_0 单位为 $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$, $[S]$ 单位为 $\mu\text{mol}/\text{mL}$.
Fig. 18 The inhibition effects of Cu^{2+} on the ACP from *Ctenopharyngodon idellus*
The unit of v_0 is $\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ and the unit of $[S]$ is $\mu\text{mol}/\text{mL}$.

3 讨论

实验结果表明, 草鱼肝脏酸性磷酸酯酶的最适 pH 为 4.4, 这与其他水生动物酸性磷酸酯酶的最适 pH 值差异很小, 例如, 刺参 (*Stichopus japonicus*) 酸性磷酸酯酶的最适 pH 为 4.4^[7], 背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 酸性磷酸酯酶的最适 pH 为 4.8^[10], 长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*) 及文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 酸性磷酸酯酶的最适 pH 均为 4.5^[11-12]。本研究测得草鱼酸性磷酸酯酶的等电点为 4.8, 而长毛对虾酸性磷酸酯酶的等电点为 4.7^[11], 刺参酸性磷酸酯酶的等电点为 4.2^[7], 文昌鱼酸性磷酸酯酶的等电

点为 4.05^[12]。本研究测得草鱼酸性磷酸酯酶的 K_m 值为 $3.56 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 背角无齿蚌酸性磷酸酯酶的 K_m 值为 $0.73 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ^[10], 长毛对虾酸性磷酸酯酶的 K_m 值为 $0.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ^[11], 刺参酸性磷酸酯酶的 K_m 值为 $0.816 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ^[7], 文昌鱼酸性磷酸酯酶的 K_m 值为 $2.08 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ^[12]。本研究测得草鱼酸性磷酸酯酶的最适温度为 45°C , 而背角无齿蚌酸性磷酸酯酶的最适温度为 50°C ^[10], 长毛对虾的最适温度为 40°C ^[11], 刺参酸性磷酸酯酶的最适温度为 45°C ^[7]。在测定最适温度时发现该酶有热激活现象, 这与杨立红等^[7]对刺参酸性磷酸酯酶的研究结果相同; 与

之不同的是,刺参酸性磷酸酯酶的激活温度为70℃,草鱼酸性磷酸酯酶的热激活温度为60℃,并在60℃下耐热时间为25 min,在15 min时表现出最大活性。由此可见,酸性磷酸酯酶的热激活不是偶然现象,其激活机理有待于进一步研究。上述结果表明,不同物种的酸性磷酸酯酶的酶学特征有所差异,其原因可能是由于在不同物种及不同组织器官中酸性磷酸酯酶存在多种型的同工酶。

本研究表明,不同金属离子对草鱼酸性磷酸酯酶活性有不同的影响。 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对酶有激活作用,与张勇侠等^[13]的研究结果一致。对 Mg^{2+} 作用机制研究表明, Mg^{2+} 对酶的激活机制为混合型激活作用,表明 Mg^{2+} 结合到酶活性中心以外的部位,增大了酶与底物的亲和力(K_m 减小),同时也增加了酶的催化速率(V_{max} 增大),并且随激活剂浓度增大激活程度亦增大。 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 及重金属离子 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^+ 和 Cd^{2+} 对酶均有抑制作用。对 Cu^{2+} 的作用机制研究表明, Cu^{2+} 对酶具有竞争性抑制作用,通过和底物与酶分子同一部位竞争性结合,降低了酶对底物的亲和力(K_m 增大),从而使酶促反应速度降低,并随抑制剂浓度的增大抑制程度亦增大。金属离子对酶活力的影响是通过形成酶-金属离子-底物三元复合物(即E-M-S)以影响酶蛋白的构象,或作为酶活性中心成分、传递氢或电子及作为酶与底物的“桥梁”,或者是中和阴离子降低反应中的静电斥力,从而影响酶的催化活力。在许多研究中 Zn^{2+} 对酸性磷酸酯酶均有抑制作用^[7,13-14,15],这与本研究结果一致,但也有研究表明, Zn^{2+} 对酸性磷酸酯酶有激活作用^[10,16],何海琪等^[16]研究表明, Zn^{2+} 对肌肉中最适pH为2.6和6.0的2组酸性磷酸酯酶均有抑制作用,对最适pH为4.3的酶组分有激活作用;对胰脏中最适pH为6.5的酸性磷酸酯酶的组分有抑制作用。而对最适pH为3.4的组分有激活作用。最适pH是区别同工酶的重要特征之一, Zn^{2+} 对酸性磷酸酯酶活性表现的这种相反影响,说明不同类型的酸性磷酸酯酶同工酶对 Zn^{2+} 的反应是不同的。重金属离子作为不可逆抑制剂,多与酶蛋白分

子中的巯基或羟基共价结合,从而影响了酶的活性中心及酶蛋白的构象,使酶活性降低或丧失。金属离子通过影响草鱼酸性磷酸酯酶的活力,从而对草鱼的生长产生影响。作为草鱼免疫相关的酶类,其活性越高,机体免疫功能越强。由此提示,对酸性磷酸酯酶有激活作用的金属离子,在养殖环境中可适当合理补给,对有抑制作用的金属离子要严格控制,尤其是重金属离子。

参考文献:

- [1] 刘青,赵恒寿.鱼类常用免疫指标及其检测技术[J].渔业现代化,2007,34(3):28-30.
- [2] 陈素丽,陈清西,林达挺,等.长毛对虾酸性磷酸酯酶功能基团的研究[J].台湾海峡,1997,16(1):80-84.
- [3] 陈素丽,陈清西,杨佩真,等.长毛对虾酸性磷酸酯酶功能基团的研究[J].台湾海峡,1997,16(2):201-204.
- [4] 陈素丽,薛雄志,雷鸣,等.几种金属离子对文昌鱼酸性磷酸酯酶的影响[J].厦门大学学报:自然科学版,1994,33(增刊):24-27.
- [5] Janska H, Kubicz A, Bem M, et al. Catfish liver acid phosphatase differently glycosylated enzyme molecules with altered kinetic properties[J]. Comp Biochem Physiol, 1986, 85(4)B: 753-758.
- [6] Panara F, Pasqualini S, Antonielli M. Multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and some characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme[J]. Biochem Biophys Acta, 1990, 1073: 73-80.
- [7] 杨立红,孙振兴,王晓洁,等.刺参酸性磷酸酯酶的分离纯化及部分性质研究[J].食品科学,2008,29(10),441-443.
- [8] 王秀奇,秦淑媛,高天慧,等.基础生物化学实验[M].第2版.北京:高等教育出版社,1997:184-187.
- [9] 丛峰松.生物化学实验[M].上海:上海上海交通大学出版社,2005:111-113;182-184.
- [10] 魏炜,张洪渊,石安静.背角无齿蚌酸性磷酸酯酶的分离、纯化及部分性质研究[J].四川大学学报:自然科学版,1999,36(3):569-572.
- [11] 陈素丽,陈清西,胡天惠,等.长毛对虾酸性磷酸酯酶的纯化与性质[J].厦门大学学报:自然科学版,1997,36(1):122-125.
- [12] 陈素丽,龚少静,曾伟章.文昌鱼酸性磷酸酯酶的分离提纯

- 及其性质的初步研究[J].厦门大学学报:自然科学版, 1985,24(1):84-90.
- [13] 张勇侠,黄新河,刘鑫,等.部分金属离子及EDTA对瘦肉型猪(PIC344)精液酸性磷酸酶活性与荧光光谱的影响[J].畜牧兽医学报,2005,36(7):686-689.
- [14] 陈素丽,薛雄志,力政军,等.几种金属离子对文昌鱼酸性磷酸酶的影响[J].厦门大学学报:自然科学版, 1994,33(增刊):24-27.
- [15] 陈素丽,陈清西,岳文杰,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):96-99.
- [16] 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.

Characterization of acid phosphatase from *Ctenopharyngodon idellus* and effects of metal ions on the enzyme activity

YANG Lihong, XIAO Bo, WANG Xiaojie, HOU Yueli, WANG Jia, SUN Jing

(School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: An acid phosphatase (ACPase, E.C.3.1.3.2) was extracted from liver of *Ctenopharyngodon idellus*. Then it was precipitated by ammonium sulfate and purified on sephadex G-200, and a single band of ACPase appeared in the SDS-PAGE gel. The maximal UV absorbance of the enzyme was under 240 nm and 280 nm, and the isoelectric point was 4.8. When the acid phosphatase was used to hydrolyze pNPP, the optimal pH was 4.4, and the optimal temperature was 45 °C. Furthermore, hydrolyzation of the enzyme could be activated by heating, and the temperature of heat activation was 60 °C. Thermo-stability experiment showed that activity of the enzyme could last for 33 min at optimal temperature, and the maximal activity was revealed at 20 min. The activity of the enzyme could last for 25 min at 60 °C, and the maximal activity was revealed at 15 min. The initial velocity of the enzymatic reaction was 0.047 5 μmol/min and the maximal velocity was 0.153 μmol/min. The Michaelis constant (K_m) was 3.56×10^{-3} mol/L. Effects of metal ions on the enzyme activity indicated that the enzyme could be activated by K^+ obviously, but could not be affected by Li^+ or by Na^+ . The positive bivalent alkaline earth metal ions of Mg^{2+} , Ca^{2+} and Ba^{2+} could activate the enzyme, and the activation ability was as follows: $Ba^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$. The transition metal ions Mn^{2+} could activate the enzyme. However, Zn^{2+} , Cu^{2+} and Co^{2+} inhibited the enzyme. The heavy metal ions Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ and Cd^{2+} also inhibited the enzyme, respectively, and the inhibitory effect of Hg^{2+} was the strongest. The mechanism of Mg^{2+} or Cu^{2+} affecting the enzyme indicated that Mg^{2+} could make mixed activation on enzyme, but Cu^{2+} displayed competitive inhibition on the enzyme. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 969-976]

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; acid phosphatase; characterization; metal ions; activity

Corresponding author: XIAO Bo. E-mail: xboyt@163.com