

韭菜酸性磷酸酶的分离纯化及酶学性质

孙芳, 任美凤, 胡瑞斌, 唐云明*

(西南大学生命科学学院, 重庆市甘薯工程研究中心, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 取新鲜韭菜, 通过匀浆、缓冲液抽提、硫酸铵分级沉淀、CM-Sepharose离子交换层析、Superdex-200凝胶过滤层析等方法纯化, 获得韭菜中所含的一种电泳纯的酸性磷酸酶(ACP)。经纯化后的酶溶液比活力为645.83U/mg, 纯化倍数达到454.81倍, 回收率为10.50%。酶学性质研究表明: 该酶的分子质量约为58.97kD; 最适反应温度和pH值分别为65℃和5.4; 该酶对对硝基苯磷酸二钠(pNPP)的 K_m 值为 0.896×10^{-3} mol/L; 较高浓度的 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 对该酶的激活作用更强; 抗坏血酸、甲醇、乙醇、氯仿、异丙醇、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 的浓度越大, 对该酶的抑制作用越强。

关键词: 韭菜; 酸性磷酸酶; 分离纯化; 性质

Isolation, Purification and Characterization of Acid Phosphatase from Chinese Chives

SUN Fang, REN Mei-feng, HU Rui-bin, TANG Yun-ming*

(Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing Sweetpotato Engineering Research Center, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Fresh chives were homogenized, extracted with buffer and precipitated by ammonium sulfate. The precipitant was dissolved in HAc-NaAc and then purified by CM-Sepharose ion-exchange chromatography and superdex-200 gel filtration chromatography. A new type of electrophoretically pure acid phosphatase (ACP) from fresh Chinese chives was then obtained. The enzyme activity of the purified ACP reached 645.83 U/mg. The purification factor was 454.81 and the activity recovery was 10.50%. Characterization studies showed that the molecular mass of this enzyme was approximately 58.97 kD and the optimum reaction temperature and pH value were 65 °C and 5.4, respectively. The K_m value for this enzyme was 0.896×10^{-3} mol/L when using nitrophenyl phosphate disodium (pNPP) as the substrate. High concentrations of Mg^{2+} and Mn^{2+} showed stronger activation of the enzyme while the higher concentration of ascorbic acid, methanol, ethanol, chloroform, isopropanol, Cu^{2+} and Ag^+ , the stronger the inhibition of the enzyme.

Key words: Chinese chives; acid phosphatase; isolation and purification; characterization

中图分类号: Q946.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)17-0187-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201317040

酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP, EC3.1.3.2)是一类在酸性条件下水解磷酸单酯键释放出无机磷的巯基酶^[1], 是生物体内参与磷代谢的重要酶类^[2]。它还在物质代谢调节、能量转换以及信号传导等途径中发挥重要的作用^[3]。该酶具有广泛的应用价值, 是酶标免疫测定技术的常用工具酶之一^[4]。也可作为食品、饮料的添加剂^[5]。此外, 它在农产品农药残留检测中具有重要的作用^[4], 它还可以作为检测指示性酶类, 用于检定牛乳及蛋品中微生物的水平^[6], 为食品安全提供有力的保障。因此获得来源广低成本低的ACP具有重要的理论和实践意义。韭菜属于百合科多年生宿根草本植物, 是常年的绿叶蔬菜之一^[7], 具有丰富的营养价值及药用功能。本实验以韭菜为研究材料, 分离纯化了其中的1种ACP, 并对其部分酶学性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

韭菜采自西南大学实验基地。

对硝基苯磷酸二钠(pNPP) 美国Amresco公司; CM-Sepharose、Superdex-200、凝胶过滤层析分子质量标准品、蛋白质SDS-PAGE标准品 美国GE Healthcare公司; 牛血清白蛋白 美国Sigma公司; 丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺 瑞士Fluka公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 韭菜ACP粗酶液的制备

称取清洗干净并擦干的新鲜韭菜120g, 剪碎, 按1:2(m/V)的比例加入预冷的50mmol/L HAc-NaAc缓冲液

收稿日期: 2012-06-20

基金项目: 重庆市科委重点攻关项目(CSTC, 2011AB1027)

作者简介: 孙芳(1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: scncsfang@163.com

*通信作者: 唐云明(1960—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: tbright@swu.edu.cn

(pH5.0, 含3mmol/L MgCl₂、10mmol/L 巯基乙醇(ME)、2mmol/L EDTA-Na₂)；用组织捣碎机打碎，4℃冰箱抽提2.5h，纱布过滤后滤液在4℃条件下12000r/min离心20min，收集上清液；向其中加入硫酸铵至40%饱和度，4℃静置2.5h后，4℃条件下12000r/min离心30min，收集上清液；再向其中加入硫酸铵至65%饱和度，4℃、盐析3h后，4℃条件下12000r/min离心35min，收集沉淀；沉淀用50mmol/L HAc-NaAc缓冲液(pH5.0)溶解，测定ACP的酶活力和蛋白质含量后透析，除去SO₄²⁻后得粗酶源。

1.2.2 CM-Sepharose离子交换层析

CM-Sepharose离子交换层析柱经50mmol/L HAc-NaAc (pH5.0)缓冲液平衡后，取粗酶液10mL上柱，用0~1mol/L的NaCl溶液(由50mmol/L、pH5.0 HAc-NaAc缓冲液配制而成)进行线性梯度洗脱，流速为0.5mL/min，每管收集5mL；分别测定各管酶活力以及蛋白质含量，收集ACP活性较高的酶液，在4℃条件下用5mmol/L HAc-NaAc缓冲液(pH5.0)透析脱盐，冷冻干燥浓缩后进行凝胶过滤层析。

1.2.3 Superdex-200凝胶过滤层析

取经1.2.2节方法处理后得到的酶液5mL上Superdex-200层析柱，用50mmol/L HAc-NaAc (pH5.0)缓冲液进行洗脱，流速0.3mL/min，每管收集3mL；分别测定各管ACP活性和蛋白质含量；收集活性较高的酶液用超纯水透析，冷冻干燥后，得到粉末状的酶制品，置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.4 韭菜ACP纯度鉴定及分子质量测定

采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对1.2.3节获得的ACP进行纯度鉴定。制备12%分离胶、5%浓缩胶，上样量为12μL。经凝胶过滤层析和SDS-PAGE测定其分子质量^[8]。

1.2.5 蛋白质浓度的测定

采用紫外分光光度法以及考马斯亮蓝染料法(Bradford法)对本实验中的蛋白质含量进行测定^[8]。

1.2.6 ACP活力的测定

参照文献[9]略微改进为：3mL 0.2mol/L HAc-NaAc pH5.0缓冲液(含5mmol/L ME)、1mL 10mmol/L MgSO₄及1mL 5mmol/L pNPP，于37℃水浴5min后，加入100μL酶液，反应10min，加入2.5mL终止剂(0.2mol/L NaOH)终止反应。以双蒸水代替酶液作为对照，在420nm波长处测定光吸光度。根据对硝基苯酚(PNP)标准曲线^[10]计算产物生成量。在此反应条件下，每10min催化底物水解生成1μmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

1.2.7 韭菜ACP性质的测定

1.2.7.1 韭菜ACP的最适反应温度与热稳定性

在不同温度(20~60℃，梯度为10℃；60~80℃，梯度为5℃)条件下测定ACP的酶活力，以酶活力最高值为100%，计算其他条件下的相对酶活力，以研究其最适反应温度。将酶液放置在不同的温度(25~75℃，梯度为10℃)条件下，每间隔一定时间测定ACP的酶活力，以酶

液不保温时的酶活力为100%，计算温育不同时间下酶的相对活力，以研究该酶的热稳定性。

1.2.7.2 韭菜ACP的最适pH值与pH值稳定性

在不同pH值(4.2~6.0)条件下测定ACP的酶活力，以酶活力最高值为100%，计算其他pH值条件下的相对酶活力，以研究该酶的最适反应pH值。将纯化后的酶液分别置于不同pH值(3~9)的缓冲溶液中，放置不同的时间，然后测定ACP的酶活力，以酶液最适pH值条件下酶活力作为100%，计算不同pH值条件下酶的相对活力，以研究该酶的pH值稳定性。

1.2.7.3 韭菜ACP米氏常数(K_m)的测定

在pH 5.0、37℃条件下，以不同浓度的pNPP(0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mmol/L)为底物，测定韭菜ACP的酶活力，采用双倒数作图法(Lineweaver-Burk法)作图求出该酶的K_m值。

1.2.7.4 不同化合物对韭菜ACP活性的影响

向含有不同浓度化学试剂EDTA-Na₂、尿素、H₂O₂、抗坏血酸的4mL pH5.0, 0.2mol/L HAc-NaAc缓冲液中，分别加入200μL酶液，于4℃作用30min后，置于37℃水浴5min，然后加入1mL底物，反应10min后终止，测定酶活力。以不加化合物时的酶活力为100%，计算不同条件下的相对酶活力。

1.2.7.5 不同有机溶剂对韭菜ACP活性的影响

向含有不同体积分数有机溶剂甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、氯仿的4mL pH5.0、0.2mol/L HAc-NaAc缓冲液中，分别加入200μL酶液，其余方法同1.2.7.4节。以不加有机溶剂时的酶活力为100%，计算不同条件下的相对酶活力。

1.2.7.6 不同金属离子对韭菜ACP活性的影响

分别配制各种金属离子母液，浓度为10mmol/L，再按一定的量和200μL酶液混合(混合后各金属离子终浓度分别为1、2、3、4、5mmol/L)，在4℃条件下放置30min后，加入4mL pH5.0, 0.2mol/L HAc-NaAc缓冲液，置于37℃水浴5min，然后加入1mL底物，反应10min后终止，测定酶活力。以不加金属离子时的酶活力为100%，计算各金属离子浓度下酶的相对活力。

2 结果与分析

2.1 韭菜ACP的分离纯化

韭菜ACP粗酶液经CM-Sepharose层析后的结果如图1所示，可见有两个活力峰(31~35管以及36~40管)，由于酸性磷酸酶通常存在多种同工酶，因此可以判断韭菜中的酸性磷酸酶存在两种同工酶形式。收集多次36~40管中的酶液，透析冷冻干燥浓缩后，经Superdex-200层析，洗脱图谱如图2所示，酶活性峰主要集中在33~37管之间，其中34管酶活最高。收集活性峰，透析冷冻干燥后，样品经SDS-PAGE显示为单一条带(图3)，说明该酶

已达电泳纯，酶的整个分离纯化结果如表1所示。最终得到的韭菜ACP纯品的纯化倍数为454.81倍，回收率为10.50%，酶比活力达到645.83U/mg。

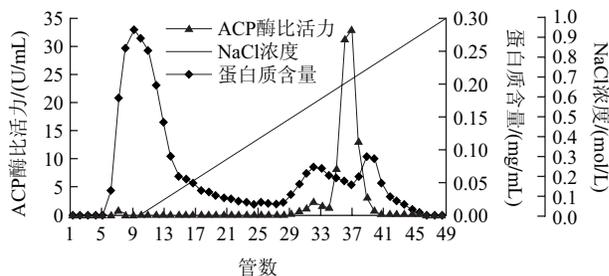


图1 韭菜ACP的CM-Sepharose离子交换层析图谱

Fig.1 CM-Sepharose ion-exchange chromatogram of ACP from Chinese chives

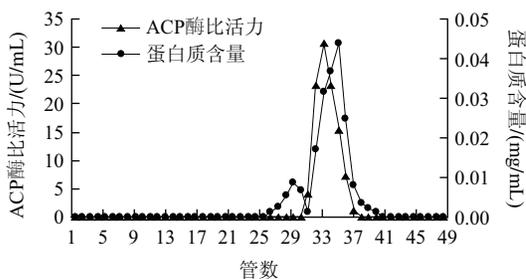


图2 韭菜ACP的Superdex-200凝胶过滤层析图谱

Fig.2 Superdex-200 gel filtration chromatogram of ACP from Chinese chives

表1 韭菜ACP纯化的结果

Table 1 Purification of ACP from Chinese chives

纯化步骤	酶总活力/U	总蛋白/mg	酶比活力(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗提液	4306.92	3031.24	1.42	1.00	100.00
硫酸铵分级沉淀	2655.94	109.82	24.18	17.03	61.67
CM-Sepharose	1507.13	4.19	359.70	253.31	34.99
Superdex-200凝胶柱	452.08	0.70	645.83	454.81	10.50

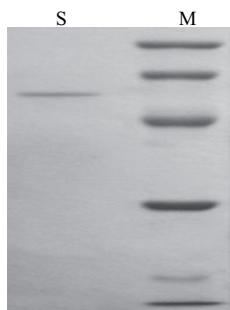


图3 韭菜ACP的SDS-PAGE电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE of purified ACP from Chinese chives

2.2 韭菜ACP分子质量的测定

经Superdex-200凝胶过滤层析测得全酶分子质量约为

59.58kD，经SDS-PAGE测得酶的亚基相对分子质量约为58.97kD，由此基本可以断定韭菜ACP是单亚基酶。

2.3 韭菜ACP的部分酶学特性

2.3.1 韭菜ACP的最适反应温度与热稳定性

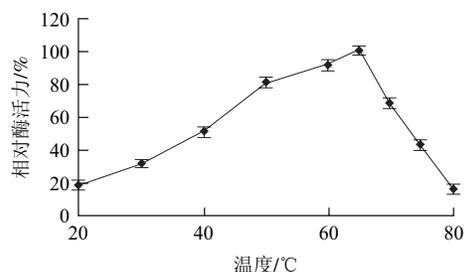


图4 温度对韭菜ACP活力的影响

Fig.4 Effect of temperature on the activity of ACP from Chinese chives

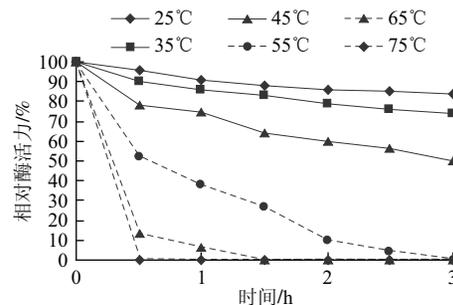


图5 韭菜ACP的热稳定性

Fig.5 Thermal stability of ACP from Chinese chives

由图4可知，该酶的最适反应温度为65°C。酶的热稳定性实验结果如图5所示，在25~35°C温度范围内，该酶比较稳定；在45~75°C温度范围内，随着温度升高，酶活性明显降低，其中65°C保温1.5h以及75°C保温0.5h后，酶活力几乎完全丧失。

2.3.2 韭菜ACP的最适pH值和pH值稳定性

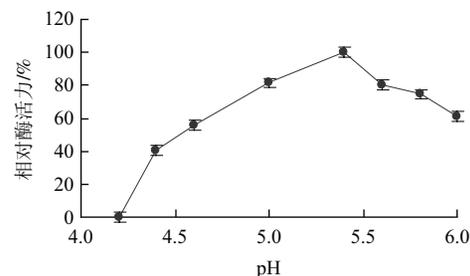


图6 pH值对韭菜ACP活性的影响

Fig.6 Effect of pH on the activity of ACP from Chinese chives

由图6可知，韭菜ACP的最适pH值为5.4，这与ACP的最适pH值一般小于6的特点相符。由图7可知，韭菜ACP的pH值耐受范围较广，在pH5~8的条件下，稳定性较好，酶活性变化趋势比较缓慢，放置10h后，相对酶活力还高达60%以上；当pH值小于4或者大于等于9时，酶蛋白分子结构发生变化，酶活性下降很快。

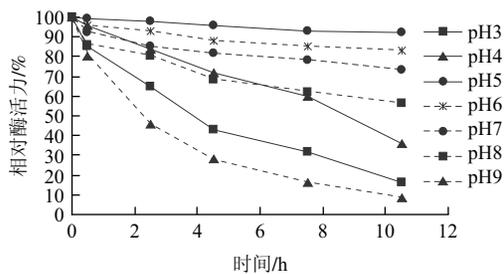


图7 韭菜ACP的pH值稳定性
Fig.7 pH Stability of ACP from Chinese chives

2.3.3 韭菜ACP的米氏常数

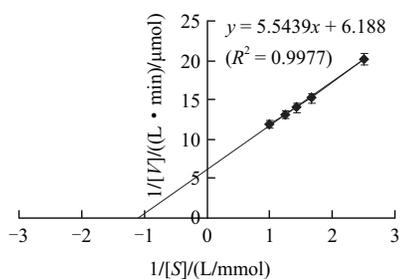


图8 双倒数法测韭菜ACP的米氏常数
Fig.8 Determination of K_m of ACP from Chinese chives by Lineweaver-Burk plot

由图8可知, 韭菜ACP对pNPP的 K_m 值为 $0.896 \times 10^3 \text{ mol/L}$ 。

2.3.4 不同化合物对韭菜ACP活性的影响

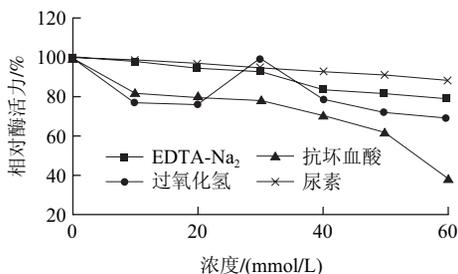


图9 不同化合物对韭菜ACP活性的影响
Fig.9 Effect of various compounds on the activity of ACP from Chinese chives

由图9可知, 随着化合物浓度的增大, 所加的几种化合物对韭菜ACP的活性都表现出了抑制作用, 其中, 抗坏血酸对该酶的抑制作用非常明显, 尿素和EDTA- Na_2 对该酶影响不强烈。过氧化氢对酶活的影响是先下降, 当浓度为20~30mmol/L时, 酶活又回升, 当浓度高于30mmol/L时, 酶活又逐渐下降, 即低浓度与过高浓度时, 酶活性都会受到抑制。

2.3.5 不同有机溶剂对韭菜ACP活性的影响

由图10可知, 在甲醇、乙醇、异丙醇、氯仿4种有机溶剂作用下, 该酶活性均受到了很强的抑制。随着有机溶剂体积分数的增大, 这种抑制作用就更强, 当体积分

数达到60%时, 几乎抑制了该酶70%的酶活。而正丁醇对酶活性几乎没有影响。

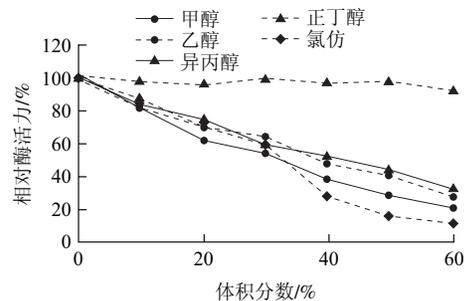


图10 不同有机溶剂对韭菜ACP活力的影响
Fig.10 Effect of various organic solvents on the activity of ACP from Chinese chives

2.3.6 不同金属离子对韭菜ACP活性的影响

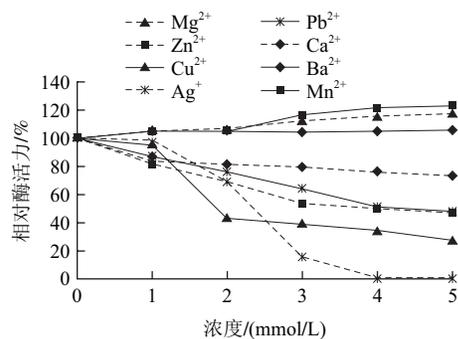


图11 不同金属离子对韭菜ACP活力的影响
Fig.11 Effect of various metal ions on the activity of ACP from Chinese chives

由图11可知, 不同金属离子以及同一金属离子的不同浓度对韭菜ACP活性的影响存在着很大的差异。随着离子浓度的增大, Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活性有明显的激活作用, 说明这两种离子有可能促进了韭菜ACP空间构象的改变, 从而提高了酶的催化效率; Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 对该酶有较强的抑制作用, 其中 Cu^{2+} 、 Ag^+ 对该酶的抑制作用更强, 当 Ag^+ 浓度达到4mmol/L时, 酶活性完全丧失。而 Ba^{2+} 对酶活性没有影响。

3 讨论

本实验以韭菜为提取材料, 通过一系列纯化步骤获得了电泳纯的酸性磷酸酶。与从其他材料中分离纯化得到ACP的实验相比有如下优点: 首先, 材料来源广, 一年四季均可取材, 价格低廉; 其次, 纯化步骤更为简便化、提纯倍数高、酶比活力高。本实验所得的ACP回收率较低, 一方面是因为ACP同工酶较多^[9], 经过一系列纯化步骤去除了部分同工酶, 只收集了其中一种活力较高

的ACP; 另一方面是因为离子交换层析后透析冷冻干燥浓缩, 损失了一部分酶活性的缘故。

该酶最适反应温度为65℃, 高于一般来源的ACP, 在该温度下, 酶的构象发生了改变, 使酶活性中心更适合与底物结合, 从而酶活性得到升高^[11], 但在此温度下酶的稳定性不高, 随着保温时间的延长, 酶活力迅速下降, 说明这种构象是不稳定的。该酶pH值耐受范围较广, 在pH5~8的环境中稳定性较好, 最适pH5.4, 与麦芽(pH5.4)^[12]、菜豆(pH5.6)^[13]、洋葱(pH5.7)^[14]来源的ACP近似, 但与刺参(pH4.4)^[11]以及背角无齿蚌(pH4.8)^[15]来源的ACP不同, 表明不同材料来源的ACP对pH的适应性存在着较大的差异。

该酶的分子质量约为58.97kD, 这与斑玉蕈^[16]来源的ACP(65kD)相近, 但与海参^[17]来源的ACP(147.9kD)以及蚯蚓^[18]来源的ACP(113kD)不同, 反映出ACP作为一种诱导酶, 其分子结构的物种特异性^[9]。该酶 K_m 值为 $0.896 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 与草鱼^[19]来源的ACP(K_m 值为 $0.232 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$)相比差异较大, 与背角无齿蚌^[15]来源的ACP(K_m 值为 $0.73 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$)相近, 表明不同材料中ACP对底物的亲和能力不同。

Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 对韭菜ACP有较强的抑制作用, 这可能是因为金属离子直接作用于该酶的活性部位, 从而使酶活性受到了部分抑制^[9]; 其中4mmol/L的 Ag^+ 即可使该酶活性完全丧失, 这与斑玉蕈^[16]和刺参^[11]中 Pb^{2+} 及 Ag^+ 对ACP的抑制作用强烈的特性相似; 而在黑绿豆^[20]中 Cu^{2+} 对酶有激活作用, 在草鱼^[19]中 Ca^{2+} 对酶有激活作用, 在淡水鱼肌肉^[21]和背角无齿蚌^[15]中, Zn^{2+} 对酶都有激活作用; Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对韭菜ACP酶活性有明显的激活作用, 这与草鱼^[19]以及仿刺参^[22]中ACP研究结果相符, 但与洋葱^[14]以及黑绿豆^[20]中 Mg^{2+} 对ACP活性有强烈的抑制作用的研究结果相反; 以上对比说明ACP的来源不同, 同种金属离子对不同来源的酶活性会表现出不同的效应。

不同来源的ACP在酶学性质上存在着较大的差异, 主要是因为不同物种的不同组织中, 生物体为了适应环境, 满足不同生长代谢的需求, 会产生以多种同工酶的形式存在的ACP, 这是生物体不断进化、基因不断变化并选择性表达的结果^[16]。

参考文献:

- [1] MACDONALD K. The hydrolysis of phenyl phosphate by mouse-liver acid phosphatase[J]. *Biochemical Journal*, 1961, 80(1): 154-161.
- [2] 张国庆, 王有志, 王守现, 等. 树状多节袍酸性磷酸酶的分离纯化与性质研究[J]. *菌物学报*, 2011, 30(5): 753-759.
- [3] 陆珊. 麦芽酸性磷酸酶的部分性质研究[D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [4] 郝志明, 吴燕燕, 李来好. 罗非鱼内脏中酶的筛选[J]. *南方水产*, 2006, 2(2): 38-42.
- [5] 吴应文. 大麦芽中酸性磷酸酯酶的分离[J]. *甘肃科学学报*, 1991, 3(4): 69-71.
- [6] 吴信法. 酶和食品品质的指示[J]. *肉品卫生*, 1994(11): 30-31.
- [7] 邓玉, 敬海明, 成丽丽, 等. 韭菜过氧化氢酶的分离纯化及其部分酶学特性[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 217-221.
- [8] 李健武, 余瑞元. *生物化学试验原理和方法*[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 171-176.
- [9] 高亚鹏, 苏莱, 梁建荣, 等. 绿豆酸性磷酸酶的分离纯化和部分性质研究[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(5): 92-96.
- [10] 王秀奇, 秦淑媛, 高天慧, 等. *基础生物化学实验*[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 185-189.
- [11] 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): 441-442.
- [12] 杨彩兰, 陈巍, 苟春宝, 等. 一种麦芽酸性磷酸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*, 2011, 48(1): 207-212.
- [13] NOEL A, TEJERA G, OLIVERA M, et al. Partial purification and characterization of a non-specific acid phosphatase in leaves and root nodules of *Phaseolus vulgaris*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42: 585-591.
- [14] GUO Jie, THOMAS C. Purification and Characterization of an acid phosphatase from the bulb of *Allium cepa* L. var. sweet Spanish[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1997, 151: 520-527.
- [15] 魏炜, 张洪渊, 石安静. 背角无齿蚌酸性磷酸酶的分离、纯化及部分性质研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 1999, 36(3): 570-572.
- [16] 杨立红, 高兴喜, 缪静, 等. 斑玉蕈酸性磷酸酯酶的酶学性质研究[J]. *菌物学报*, 2011, 30(5): 744-752.
- [17] ZHU Beiwei, YU Jianwei, ZHANG Zongshen, et al. Purification and partial characterization of an acid phosphatase from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44: 875-879.
- [18] STUBBERUD H E, HONSI T G, STENERSEN J. Purification and partial characterisation of tentatively classified acid phosphatase from the earthworm *Eisenia veneta*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2000, 126: 487-494.
- [19] 杨立红, 肖波, 王晓洁, 等. 草鱼酸性磷酸酯酶的性质及金属离子对其活性的影响[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(5): 970-976.
- [20] ASADUZZAMAN A K M, RAHMAN H M, YEASMIN T. Purification and characterization of acid phosphatase from a germinating black gram (*Vigna mungo* L.) seedling[J]. *Arch Biol Sci, Belgrade*, 2011, 63(3): 747-756.
- [21] 王彩霞, 刘茹, 刘友明, 等. 淡水鱼肌肉中酸性磷酸酶的酶学特性[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(4): 518-521.
- [22] 于建伟, 李冬梅, 李吉龙, 等. 仿刺参酸性磷酸酶的提取及粗酶性质研究[J]. *水产科学*, 2009, 28(1): 6-7.