

# 硒对华贵栉孔扇贝碱性磷酸酶的酶动力学及理化性质研究

余群<sup>1</sup>, 王重刚<sup>2</sup>, 陈荣<sup>1</sup>, 郁昂<sup>1</sup>, 郑微云<sup>1</sup>

(1. 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门大学环境科学研究中心, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 探讨了微量硒( $\text{Se}^{4+}$ )对华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis* (Reeve))碱性磷酸酶(AKP)的作用。以催化动力学原理研究了不同缓冲系统中微量硒对 AKP 的影响。结果表明,  $\text{Se}^{4+}$  对该酶的作用与酶所处的环境有关。在 0.05 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  (pH 9.0) 缓冲溶液中  $\text{Se}^{4+}$  浓度小于 12.5 mmol/L 时呈现出激活作用;  $\text{Se}^{4+}$  浓度大于 12.5 mmol/L 时呈现出非竞争性的抑制作用, 其抑制常数为  $6.81 \times 10^{-2}$  mol/L。在 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲系统 (pH 9.0) 中, 微量  $\text{Se}^{4+}$  对 AKP 具有强烈竞争性抑制作用, 其抑制常数为  $3.79 \times 10^{-1}$  mol/L。经紫外吸收光谱、荧光发射光谱和圆二色谱的实验表明, 微量  $\text{Se}^{4+}$  与 AKP 作用后, 该酶的构象已发生了变化。研究发现海水环境中若含有微量  $\text{Se}^{4+}$  ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), 可以促进扇贝 AKP 的水解, 利于贝类的生长发育和外壳的形成, 并有益于贝类的繁殖。

**关键词:** 华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis* (Reeve)); 碱性磷酸酶(AKP); 硒; 酶动力学

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)10-0056-06

由于硒元素的独特性质, 人们广泛开展了硒在不同生物种类中的存在形态、功能及其机制研究, 揭示了硒与生命活动密切相关的许多重要信息。例如扇贝硒蛋白使肿瘤生长减缓, 具有一定程度提高抗氧化能力, 减轻放射治疗的副作用的功能<sup>[1]</sup>。硒多糖(硒化卡拉胶)增强栉孔扇贝淋巴中氧化酶活力<sup>[2]</sup>。碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase (EC. 3. 1. 3. 1), 简称 AKP)是一种含锌的水解酶, 是生物体中存在的赖以生长、生存的重要酶类之一, 在生物体内的磷代谢过程中具有重要的生理功能<sup>[3]</sup>。它对扇贝等贝类的生长具有重要的作用。近年来, 碱性磷酸酶作为重金属对环境污染胁迫的生物指示物和生物传感器已逐渐为人们所认识<sup>[4,5]</sup>。而硒与 AKP 酶的关系研究甚少。本文拟对这两者的关系作一些初步研究, 通过硒对扇贝 AKP 的动力学研究以及作用后引起酶构象的变化情况在理论上的探讨, 试图能为扇贝等主要经济贝类在人工养殖环境中提高抗病免疫能力研究提供一些有用的参数和依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)采自福建省漳浦县下安区海珍品养殖场。

对硝基苯磷酸二钠(PNPP)系德国 E. Merck 产品, 作为酶作用的底物; 牛血清白蛋白系上海生物工程技术有限公司产品(电泳纯); 亚硒酸系北京化工厂出品(分析纯), 配制时用 NaOH 调节 pH 值至弱

碱性, 即为  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  溶液; 其他化学试剂均采用国产分析纯。所有溶液均用重蒸水配制。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 扇贝 AKP 的分离提纯

AKP 按文献[6]的方法制备提纯, 酶的纯度鉴定采用快速蛋白液相色谱(FPLC)及聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳(PAGE)检验为单一纯的酶蛋白。比活力为 25.3 U/(mg·min)。

#### 1.2.2 蛋白浓度测定

采用改进的考马斯亮兰 G-250 试剂测定<sup>[7]</sup>; 以牛血清蛋白作标准。

#### 1.2.3 酶活力测定

在 2.0 mL 反应液中含有 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0), 4.0 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 2.0 mmol/L PNPP 和适量的酶蛋白。反应前 37°C 预热 10 min, 加入适量酶液后, 在 37°C 反应 10 min, 以 0.1 mol/L NaOH 2.0 mL 终止反应, 冷却后于 722 型分光光度计中测定光吸收值( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ,  $I = 0.5 \text{ cm}$ ), 参照对硝基苯酚(PNP)标准曲线, 计算酶活力。

#### 1.2.4 紫外吸收光谱、荧光吸收光谱和圆二色光谱的测试

AKP 的紫外吸收光谱于 HP 8453 型紫外-可见

收稿日期: 2006-10-19; 修回日期: 2006-12-05

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(D0310003)

作者简介: 余群(1955-), 女, 福建建宁人, 副教授, 电话: 0592-2184896, E-mail: yuq55.xmu@163.com

分光光度计自动扫描记录; 荧光发射光谱以 Varian Cary-Eclipse 型荧光光谱仪自动扫描记录; 圆二色谱 (CD 谱) 采用 JASCO-J500C 型圆二色谱仪测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\text{SeO}_3^{2-}$ 对扇贝 AKP 活力的影响

选用含有相同质量浓度的扇贝 AKP (2.4 mg/L) 底物 PNPP (2.0 mmol/L) 和激活剂  $\text{MgCl}_2$  (4.0 mmol/L) 的不同缓冲液的测活系统, 分别测定不同浓度的  $\text{SeO}_3^{2-}$  对酶活力的影响, 结果如图 1。

实验结果表明,  $\text{SeO}_3^{2-}$  对扇贝 AKP 的作用与该酶所处的缓冲液的测活系统有关。在  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液中, 当  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度小于 12.5 mmol/L 时, 具有较高的激活作用, 尤以 6.0 mmol/L 浓度效应最强, 相对活力达到 140%; 而  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度大于 12.5 mmol/L 时,  $\text{SeO}_3^{2-}$  表现为对扇贝 AKP 的抑制作用, 并在 25 mmol/L 左右, 抑制作用趋于饱和, 如图 1 中 a 所示。在 Tris-HCl 缓冲液中  $\text{SeO}_3^{2-}$  对扇贝 AKP 酶活力始终表现为抑制作用, 如图 1 中 b 所示。

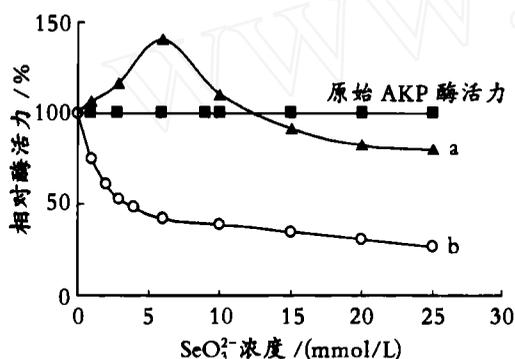


图 1 不同缓冲系统中  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度对扇贝 AKP 酶活力的影响

Fig. 1 The effect of  $\text{SeO}_3^{2-}$  on the AKPase activities from

*Chlamys nobilis* in different buffer systems

(a) 0.05 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ , pH9.0 缓冲液

(b) 0.05 mol/L Tris-HCl, pH9.0 缓冲液

(a) 0.05 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  buffer system (pH9.0)

(b) 0.05 mol/L Tris-HCl buffer system (pH9.0)

### 2.2 $\text{SeO}_3^{2-}$ 对 AKP 的抑制类型

进一步研究硒对扇贝 AKP 活力的抑制作用机理: 在 0.05 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  系统 (pH9.0) 含有 4.0 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  的缓冲溶液中, 测定不同酶量对反应速度的影响。结果如图 2A, 得到一组通过零点的 V-E 直线, 从图中明显看出随着抑制剂浓度升高, 斜率下降, 表明  $\text{SeO}_3^{2-}$  对扇贝 AKP 的抑制作用是可逆的。比较图 2A 中 a, b, c 得知,  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度小于 12.5 mmol/L 时对扇贝 AKP 的激活作用是可

逆的。图 2B 的实验条件与图 2A 相同, 差别仅在于缓冲系统的改变, 即为在 Tris-HCl 系统 (pH 9.0)。图 2B 中呈现的抑制现象与图 2A 中 a, d, e, f 这一组直线相似。这表明在该缓冲系统中,  $\text{SeO}_3^{2-}$  对扇贝 AKP 酶活力的抑制作用也是可逆的。

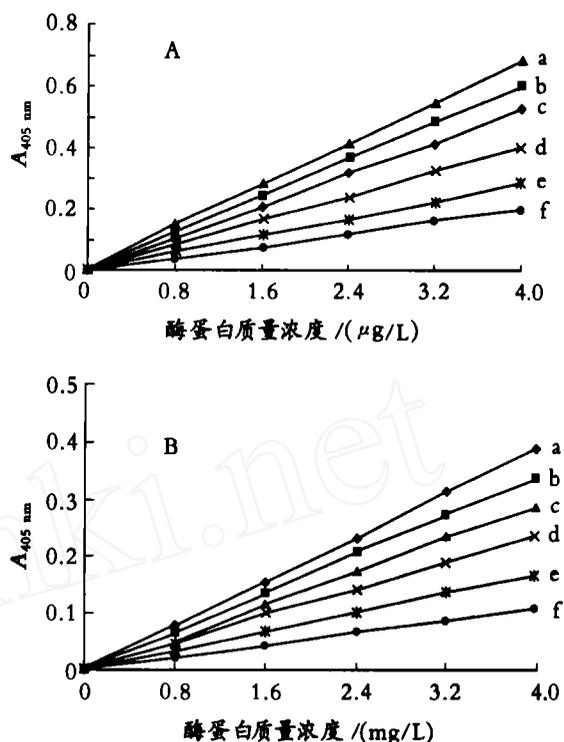


图 2  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度变化时反应速度与 AKP 酶浓度的关系

Fig. 2 The relationship between the reacting velocity and the volume of AKPase when the concentration of  $\text{SeO}_3^{2-}$  is varying

A.  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲系统 (pH9.0); B. Tris-HCl 缓冲系统 (pH9.0)

A.  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  buffer system (pH9.0); B. Tris-HCl buffer system (pH9.0)

$\text{SeO}_3^{2-}$ : a. 0; b. 5.0 mmol/L; c. 10 mmol/L; d. 15 mmol/L; e. 20 mmol/L; f. 25 mmol/L

### 2.3 $\text{SeO}_3^{2-}$ 作用于 AKP 的抑制动力学和抑制常数 $K_i$

选择  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度分别为 0, 15, 20, 25 mmol/L 4 个组在  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲系统 (pH 为 9.0) 中测定其酶活力, 用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图。结果表明  $\text{SeO}_3^{2-}$  对扇贝 AKP 的抑制作用为非竞争性抑制。再以  $1/V$  对  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度作图, 求出抑制常数为  $6.81 \times 10^{-2}$  mol/L。50 mmol/L Tris-HCl 缓冲系统 (pH9.0) 中测定 AKP 活力, 结果以 Lineweaver-Burk 法作图表明该系统  $\text{SeO}_3^{2-}$  对 AKP 酶的抑制作用为竞争性抑制。再以  $K_m$  对  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度作图, 求出其抑制常数为  $3.79 \times 10^{-3}$  mol/L。

### 2.4 不同 $\text{SeO}_3^{2-}$ 浓度作用于扇贝 AKP 后的紫外吸收光谱、荧光发射光谱和圆二色谱

于 pH 值均为 9.0 的不同缓冲系统 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  和 Tris-HCl) 中进行了无底物存在条件下  $\text{SeO}_3^{2-}$  作用于 AKP 酶的紫外吸收光谱、荧光发射光谱和圆二色谱的实验。

结果表明,在 0.05 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲体系中,不同浓度  $\text{SeO}_3^{2-}$  作用于酶的催化反应液时,除了在灵敏度高的荧光发射光谱激发波长 280.3 nm 时,扇贝 AKP 酶在其内源性荧光发射波长 (326.2 nm) 处出现随着  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度增大逐渐降低之外,其他波谱均体现不出变化。这种现象产生仍符合在该缓冲体系中  $\text{SeO}_3^{2-}$  对 AKP 的抑制动力学规律,即具有非竞争性的抑制作用<sup>[8]</sup>。根据实验现象推测, $\text{SeO}_3^{2-}$  仅能与 AKP 活性部位以外的某些功能基团可逆地结合,而这些功能基团不是维持酶分子催化活性的三维构象所必需的。所以灵敏度稍低的紫外吸收光谱、圆二光谱以及激发波长在 295 nm 下激发的荧光发射光谱均显示不出明显变化。而在 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲体系中, $\text{SeO}_3^{2-}$  对 AKP 具有竞争性抑制作用。其特点是  $\text{SeO}_3^{2-}$  抑制剂能与游离的酶结合,即它与正常底物竞争在酶的活性部位与酶结合。因而在无底物存在条件下进行 3 种波谱的扫描结果发现均呈现明显的变化。

图 3 为  $\text{SeO}_3^{2-}$  与扇贝 AKP 酶作用后的紫外吸收光谱图。纯扇贝 AKP 酶在 190~320 nm 波长范围内出现两个吸收峰。第一个吸收峰在 219 nm 附近,峰值较大,是由于酶蛋白中肽基团的吸收而产生的<sup>[9]</sup>。此峰值随着  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度的增大而明显降低,

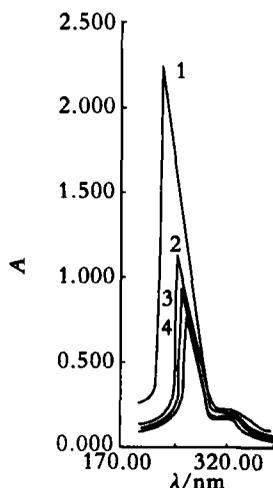


图 3  $\text{SeO}_3^{2-}$  对扇贝 AKP 酶影响的紫外吸收光谱  
酶蛋白质量浓度为 25.3 g/L

Fig. 3 UV absorption of AKPase from *Chlamys nobilis* treated by the varying concentration of  $\text{SeO}_3^{2-}$   
1, 2, 3, 4 分别表示  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度为 0, 20, 30, 35 mmol/L

且有不同程度的红移。表明扇贝 AKP 内的肽键由无规则卷曲变成  $\alpha$ -螺旋的构象变化。第二个吸收峰在 278 nm 处,此峰是蛋白质的特征吸收峰,它主要来自蛋白质分子中酪氨酸 (Tyr) 残基,而色氨酸 (Trp) 残基也有部分贡献<sup>[9]</sup>。图 3 显示的第二峰随  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度的增加亦略有下降,表明扇贝 AKP 构象已发生了变化。

图 4 为  $\text{SeO}_3^{2-}$  作用于扇贝 AKP 酶的荧光发射光谱图。当激发波长为 280.3 nm 时,纯 AKP 酶中的内源荧光发射波长为 326.2 nm。由此波长引起的荧光发射现象既有 Trp 残基的贡献,也有解离的 Tyr 残基的贡献,但主要反映的是酶蛋白的 Trp 残基的荧光;图 4b 是以 295 nm 波长激发,即以 Trp 的激发波长<sup>[10]</sup>激发,在 329.9 nm 处也观察到了荧光发射的现象,但其强度较低,该峰变化可更好地反映酶蛋白中 Trp 残基所处环境的变化。加入  $\text{SeO}_3^{2-}$  后,326.2 nm 和 329.2 nm 处的荧光发射强度均随着  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度的提高而逐渐降低,其中  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度在 5.0~15.0 nmol/L 之间荧光强度下降稍大,并略有蓝移;其余相邻浓度之间变化较为缓慢,当  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度达到 45 nmol/L 时还未使荧光完全淬灭,峰位也没有移动。该现象表明扇贝 AKP 在  $\text{SeO}_3^{2-}$  作用后构象已改变,特别是在 5~15 nmol/L 之间变化较大。荧光强度的下降是由于处于更加非极性微区的 Trp 和 Tyr 残基共同作用的结果<sup>[11]</sup>。这种变化使得酶的高级结构松散,肽链伸展,内呈于疏水环境的 Trp 和 Tyr 残基逐渐暴露到亲水表面,和极性的溶剂分子碰撞,引起能量损失,致使荧光强度下降,发射峰发生位移。

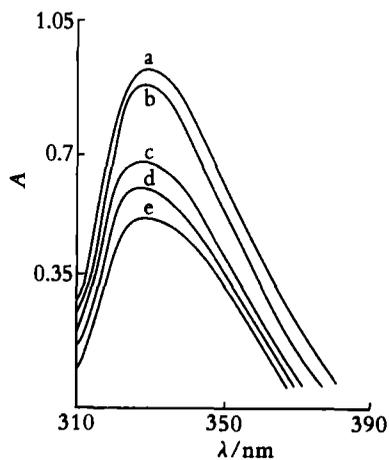


图 4  $\text{SeO}_3^{2-}$  对扇贝 AKP 酶影响的荧光发射光谱

Fig. 4 Fluorescence emission spectra of AKPase from *Chlamys nobilis* treated by  $\text{SeO}_3^{2-}$   
酶蛋白终质量浓度为 25.8 mg/L; a, b, c, d, e 分别表示  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度为 0, 5, 15, 30, 45 nmol/L。激发波长  $E_x$  为 296 nm

图 5 为  $\text{SeO}_3^{2-}$  作用于扇贝 AKP 在圆二光谱 (CD 谱) 的谱图。圆二光谱是左右圆偏振光的吸收光谱, 它的差异反映了酶分子空间结构的差异。从 CD 谱明显看出, 纯扇贝 AKP 无明显的吸收峰, 这与 AKP 为  $\text{Zn}^{2+}$  辅基酶有关, 因为其中  $\text{Zn}^{2+}$  具有闭层电子结构 ( $3d^{10}$ ), 故没有明显的光磁性质变化<sup>[12]</sup>。当  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度加到  $90 \mu\text{mol/L}$  后, AKP 酶在  $260 \sim 300 \text{ nm}$  处出现较明显的正 Cotton 效应峰。它们主要由蛋白质中芳香侧链所致。其中, 第 1、2、3 峰是苯丙氨酸 (Phe) 残基的 CD 特征吸收峰, 峰 5 是 Trp 残基的特征吸收峰, 峰 4、6 分别为 Trp 的 La' 和 Lb' 特征吸收带。观察  $250 \sim 300 \text{ nm}$  处 CD 谱的变化, 可直接反映扇贝 AKP 芳香侧链基团性质的改变, 由此说明经  $\text{SeO}_3^{2-}$  作用后, 扇贝 AKP 构象已发生变化, 与紫外光谱和荧光光谱所得的结论一致。因此, 3 种波谱的扫描 (图 3, 4, 5) 均表明扇贝 AKP 酶的构象已发生了变化。

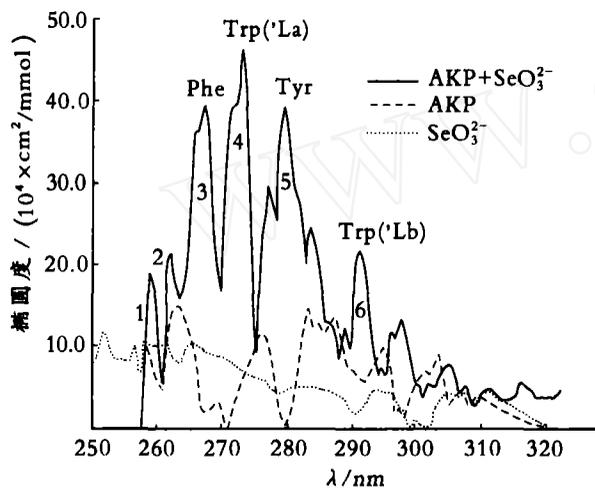


图 5 扇贝 AKP 酶的圆二色谱图  
Fig. 5 Circular dichroism spectra of AKPase from *Chlamys nobilis* treated by  $\text{SeO}_3^{2-}$   
酶蛋白质量浓度为  $0.848 \text{ g/L}$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$  浓度为  $90 \mu\text{mol/L}$

### 3 讨论

关于重金属对海洋动物碱性磷酸酶 (AKPase) 的影响已有许多报道<sup>[4, 13~17]</sup>。Mazorra 等<sup>[4]</sup>研究了海水中  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  对蛤不同器官和组织酸性和碱性磷酸酶的动力学性质, 表明这两种酶均呈现很好的米氏动力学模式。其中 Hg 是 AKPase 最强的抑制剂, 表现为混合型的抑制, 指示 Hg 对体内蛋白有高度的亲和力, 破坏了酶的活性中心。颜思旭等<sup>[15]</sup>探讨了多种金属离子对文昌鱼体内 AKPase 的酶动力学影响发现,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  对酶活力没有影响,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  为激活作用,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  为

抑制作用。其中  $\text{Cu}^{2+}$  为非竞争性抑制作用, 而  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  可使失活的酶复活。这与 Lan 等<sup>[16]</sup>研究重金属对红海鲷 AKPase 综合影响的结果基本一致。Regoli 等<sup>[17]</sup>则认为意大利海域铜、锌、砷、铁、锰、铅和硒对贻贝 AKPase 活性诱导不明显, 似乎在慢性污染环境中生物体内存在着某些适应和补偿机制。该酶的抑制可能代表了对金属反映的初始阶段。这些研究都显示 AKPase 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。 $\text{Zn}^{2+}$  是酶的辅基, 是酶活性所必需的。 $\text{Mg}^{2+}$  在酶催化反应中起激活的作用<sup>[15]</sup>。由于碱性磷酸酶对金属盐类的敏感性, 在生态毒理学中作为很好的生物标志物被推荐<sup>[18]</sup>。

根据世界 15 个海湾海水中硒含量分析, 得出海洋中总硒浓度为  $0.3 \sim 2.34 \text{ nmol/L}$ <sup>[19]</sup>。厦门地区养殖海域海水的总硒浓度为  $0.48 \sim 0.96 \text{ nmol/L}$ , Se (IV) 浓度为  $0.13 \sim 0.4 \text{ nmol/L}$ <sup>[20]</sup>。在水生生态环境中, 硒具有特殊的生物效应, 它既有毒性而又是生命的必需微量元素。其生物功能很大程度上取决于它的剂量浓度。它的生物富集曲线非常陡, 从无毒到完全致毒效应仅差 2 个数量级<sup>[21]</sup>。由于生物链的生物富集, 使得硒在鱼类和野生动物体内迅速达到致毒水平<sup>[22]</sup>。海洋中无机硒的存在形式主要有硒酸盐 ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) 和亚硒酸盐 ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), 其中以亚硒酸盐更易被生物所利用<sup>[21]</sup>。硒的来源主要来自于采矿、石油化学工业、工业生产废料的排放, 尤其是火力发电厂通过烟囱发射排放以及废渣的倾倒等<sup>[23]</sup>。由于硒的特殊性, 在研究上存在着很大的差异。在研究硒污染的潜在毒性方面, Lemly<sup>[24]</sup>研究了火力发电厂附近 Belevs 湖中硒对鱼类的毒性影响证实, 硒通过成鱼摄食进入体内富集, 诱导蛋白合成错误, 其幼体孵化后, 在生长过程产生亚致死性的变形。Lohner 等<sup>[23]</sup>研究了倾倒火电厂灰渣的河中重金属暴露对蓝鳃太阳鱼体内包括 AKPase 在内的几种酶的影响发现, 与对照站点比较, 鱼体内 AKPase 活性与 As, Ni, Cu, Cr 呈正相关, 与 Se 水平呈负相关。Se 抑制了鱼体内 AKPase 活性, 当倾废停止后, AKPase 活性恢复。然而, 在研究重金属对红海鲷 AKPase 综合影响的结果时发现,  $\text{Se}^{4+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  混合暴露时, 硒能降低过量铜对 AKPase 活性的抑制作用, 表明  $\text{Se}^{4+}$  与  $\text{Cu}^{2+}$  之间呈现拮抗作用<sup>[16]</sup>。其他的研究也表明, 硒能拮抗汞、甲基汞、镉、铅等多种物质的毒性<sup>[25]</sup>。

评价金属离子在碱性磷酸酶的结构与功能中所起的作用中, 动力学与酶学的研究可以从不同的角度提供信息。最通用的方法是观察加入金属螯合物对酶活性是否表现抑制, 以了解金属离子是否是活

性中心。是否在改变酶活性的同时,也改变活性部位的金属离子的波谱行为等物理性质。

金属酶失活的研究也是阐明金属离子在酶结构和功能中所起作用的一条重要途径<sup>[6]</sup>。AKP 中有两类功能不同的金属离子。其中只有一类金属离子直接涉及酶的活性。另一类金属离子虽然确定能与酶蛋白结合,但在功能上没有明显的直接作用。

关于硒对海洋生物体内 AKPase 酶动力学性质的研究仍未见报道,尤其是在相同 pH 介质、不同缓冲体系下硒对栉孔扇贝 AKPase 酶动力学性质的比较研究。

本实验通过比较了两个相同 pH 介质、不同缓冲系统金属硒离子对 AKP 的作用。并在无底物存在下进行紫外吸收光谱、荧光发射光谱和圆二色谱的波谱研究。上述结果表明,SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 对扇贝 AKP 的活性影响与酶所处的环境介质具有密切关系。在 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲系统中,当 SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 浓度小于 12.5 mmol/L 时表现出对 AKP 的激活作用;当大于 12.5 mmol/L 时则表现出抑制作用。由于 Se<sup>4+</sup> 所占据的不是活性部位而是结构部位,因此 SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 对酶活性的影响较为温和。3 种谱图的分析也显示出与酶抑制动力学相同的结果。因为海水中的 pH 值一般偏于弱碱性,其中含有弱酸的离子是以 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 离子为主而形成的,所以在该环境体系中海水若含有微量 Se<sup>4+</sup> (SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>),将可以促进扇贝 AKP 的水解,将有利于调节体内钙和磷的代谢,促进贝类的生长发育和外壳的形成,同时也有益于贝类的繁殖<sup>[14]</sup>。即使有高浓度 Se<sup>4+</sup> (SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) 存在,因为其抑制作用是属于非竞争性抑制作用,所以能使扇贝等贝类能够耐受海水中高浓度 Se<sup>4+</sup> (SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)。

在 Tris-HCl 缓冲系统中,Se<sup>4+</sup> (SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) 对扇贝 AKP 的作用是竞争性抑制作用。谱图结果可以表明,在该系统中该酶的构象均已发生变化。说明在该有机物存在的环境介质中 SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 与 AKP 的结合部位是酶的活性功能基团。有机物介质破坏了酶的活性中心的结合位点,使得硒对酶蛋白的亲合力增强,从而破坏了原有的 AKPase 酶的构象。因此该环境体系将不利于扇贝的繁殖与生长。在此环境中高浓度的 Se<sup>4+</sup> 将可能造成扇贝等贝类生物的中毒甚至死亡。上述实验结果还提示,在有机物污染的水体中,金属硒对养殖贝类的协同毒性作用不容忽视。在某些特殊情况下,如海湾、河口和工业废水排出污染的海区中,海水环境条件改变了,即使存在对生物生长有益的微量硒,也将不利于扇贝等贝类的生长。

## 参考文献:

- [1] 李翎,王海清,毛文君. 肿瘤放射治疗中扇贝硒蛋白的作用 [J]. 海洋科学,1999,2: 63-65.
- [2] 孙虎山,李光友. 免疫多糖对栉孔扇贝血淋巴中氧化酶活力的影响 [J]. 高技术通讯,2001, 5: 10-12.
- [3] 陈清西,张喆. 锯缘青蟹碱性磷酸酶分离纯化及部分理化性质研究 [J]. 海洋与湖沼,1998,29(4): 362-367.
- [4] Mazorra M T, Rubio J A, Blasco J. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2002, 131: 241-249.
- [5] Claude D, Tran-Minh C. Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety, Environmental Research, Section B*, 2002, 51: 206-209.
- [6] 张洪渊,刘克武,石安静,等. 背角无齿蚌碱性磷酸酶的分离、纯化及其动力学研究 [J]. 水生生物学报,1996, 20(1): 57-62.
- [7] 郭敏亮,姜涌明. 考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响 [J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(6): 558-561.
- [8] 邹国林. 酶学 [M]. 武汉: 武汉大学出版社,1997.
- [9] 阎隆飞,孙之荣. 蛋白质分子结构 [M]. 北京: 清华大学出版社,1998.
- [10] 赵陈光,刘兰英,丘爱东,等. 人纤维蛋白溶酶原中色氨酸残基的化学修饰 [J]. 高等学校化学学报,1997, 18(5): 744-747.
- [11] 耿芳宋,刘洪明,王秀丽,等. 汞对人类胎盘碱性磷酸酶活力与荧光光谱的影响 [J]. 青岛医学院学报,1999, 35(1): 16-18.
- [12] 杨频,高飞. 生物无机化学原理 [M]. 北京: 科学出版社,1997.
- [13] Blasco J, Puppo J, Sarasquete C. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum* [J]. *Mar Biol*, 1993, 115: 113-118.
- [14] Zhang Rong-qing, Chen Qing-xi. Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) in alkaline phosphatase by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000, 32: 865-872.
- [15] 颜思旭,陈清西. 金属离子对文昌鱼碱性磷酸酶的影响 [J]. 厦门大学学报自然科学版,1986,25(6): 692-698.
- [16] Lan W G, Wong M K, Chen N, et al. Effect of combined copper, zinc, chromium and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major* [J]. *Aquaculture*, 1995, 131: 219-230.
- [17] Regoli F, Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and

- laboratory conditions; implications for the use of biomarkers [J]. *Aquatic Toxicology*, 1995, 31: 143-164.
- [18] Bogè G, Leydet M, Houvet D. The effects of hexavalent chromium on the activity of alkaline phosphatase in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 1992, 23: 247-260.
- [19] 夏卫平, 张海生, 谭见安, 等. 东南极海硒的形态与分布 [J]. *环境科学学报*, 1996, 16(1): 30-36.
- [20] 胡明辉, 刘道礼, 杨逸萍. 海洋中硒的双箱模式及地球化学特性 [J]. *厦门大学学报自然科学版*, 1988, 27(1): 93-97.
- [21] 彭安, 王子健, Whanger P D, 等. 硒的环境生物无机化学 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1995.
- [22] Lemly A D. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59: 44-56.
- [23] Lohner T W, Reash R J, Williams M. Assessment of Tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium-laden coal Ash effluents, 2. Tissue biochemistry evaluation [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 50: 217-224.
- [24] Lemly A D. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002b, 57: 39-49.
- [25] 徐芳, 邱德仁, 杨梵原, 等. 硒的化学与生物形态分析综述 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2002, 22(2): 331-340.

## The kinetics and physical & chemical characteristics of alkaline phosphatase from the scallope *Chlamys nobilis* (Reeve) effected by trace Selenium

YU Qun<sup>1</sup>, WANG Chong-gang<sup>2</sup>, CHEN Rong<sup>1</sup>, YU Ang<sup>1</sup>, ZHENG Wei-yun<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Research Center for Environmental Science of Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Oct. ,19,2006

**Key words:** *Chlamys nobilis*; alkaline phosphatase; selenium; enzymatic kinetics

**Abstract:** The effects of trace selenium on alkaline phosphatase (AKP) from *Chlamys nobilis* (Reeve) were estimated. The behaviors of AKPase in different buffer systems were studied by using the principle of enzymatic catalytic kinetics. The results have indicated that the role of Se<sup>4+</sup> on the AKPase is related to the buffer systems that AKPase existed in.

The activation of AKPase was found in 0.05 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> (pH=9.0) system when Se<sup>4+</sup> concentration is below to 12.5 mmol/L. And the inhibition of AKPase as noncompetitive inhibition was found when Se<sup>4+</sup> concentration is over 12.5 mmol/L. The inhibition constant is 4.9 × 10<sup>-2</sup> mol/L. While the strongly competitive role of AKPase was in 0.05 mmol/L Tris-HCl buffer system where the trace selenium existed. The inhibition constant is 3.9 × 10<sup>-3</sup> mol/L.

The effects of trace selenium (SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) on the changes in molecular conformation of AKPase from *C. nobilis* (Reeve) have been observed, detected by UV-absorption spectra, fluorescence emission spectra and circular dichroism spectra.

The results showed that trace selenium which exists in the normal breeding seawater may promote AKPase hydrolysis of scallope, make for the growth of seashell and its crust forming. Therefore, trace selenium in seawater should avail to the propagating of seashell. While pollution of the breeding environment, such as variations of the alkalinity and the presence of harmful metal ions and organic solvents, the pollution affects exists the enzyme activity and its conformation which affects the growth and survival of the animal.

(本文编辑: 张培新)