

陶 奕. 豆芽磷酸吡哆醛水解酶的部分纯化及性质[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 255–257.

豆芽磷酸吡哆醛水解酶的部分纯化及性质

陶 奕

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要:采用硫酸铵沉淀及 Sephadex G-100 凝胶过滤柱、DEAE-Sephrose 阴离子交换柱、SP SephadexC-25 阳离子交换柱层析等步骤, 对豆芽中磷酸吡哆醛 (PLP) 水解酶进行分离纯化。结果表明: 黄豆芽 PLP 水解酶被纯化了 220.19 倍, 得率为 23.65%。最适温度为 50 ℃, 最适反应 pH 值为 5.5; Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 等对该酶有激活作用, Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 及金属离子螯合剂 EDTA 对该酶有抑制作用, 而 Ca^{2+} 对该酶活性无明显影响。在最适反应条件下, 测得反应底物磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺 (PMP) 的 K_m 分别为 0.27、0.41 mmol/L。

关键词: 豆芽; 磷酸吡哆醛; 酸性磷酸酶; 纯化; 性质

中图分类号: Q563⁺.3; S565.101

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2013)09-0255-03

维生素 B₆ 是一组吡啶化合物的总称, 其吡啶环第四碳位被甲酰基取代后形成吡哆醛 (pyridoxal, PL), PL 的磷酸酯形式为磷酸吡哆醛 (pyridoxal-5'-phosphate, PLP)。PLP 是重要的功能型维生素 B₆, 含有强活泼性的醛基, 能与细胞中多数亲核物质和蛋白质形成复合体, 参与催化氨基酸的各种代谢反应^[1]。PLP 水平的紊乱会影响生物体的正常生理机能。在生物体内, 受磷酸酶的作用, PLP 的浓度维持在一个较低的水平, 当体内 PLP 浓度过高时, 磷酸酶可以将 PLP 水解为 PL, 因此 PLP 水解酶是 PLP 代谢调控的关键性酶^[2]。

Lumeng 等最早对小鼠体内的 PLP 水解酶进行了研究^[3], 之后 Fonda 从人体红细胞中纯化出了 PLP 磷酸酶, 参与人体

中 PLP 的代谢调控^[4]。近年, Tazoe 等对细菌中 PLP 水解酶也进行了研究^[5], 但植物体内有关 PLP 水解代谢酶的研究只在烟草^[6]中有报道, 证实其为酸性磷酸酶, 酸性磷酸酶是一组在酸性条件下水解各种磷酸酯的酶, 因此, 研究开发来源丰富的植物 PLP 水解酶具有重要意义。本试验以取材容易且成本低的黄豆芽为材料, 对其体内 PLP 水解酶进行初步分离纯化和部分酶学性质研究, 以期为 PLP 水解酶的进一步研究和应用提供依据, 同时也为豆芽体内磷酸吡哆醛代谢调控机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

黄豆芽购自合肥市农贸市场。磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺 (PMP)、二硫苏糖醇 (DTT)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、对硝基苯磷酸二钠 (PNPP)、柠檬酸、柠檬酸钠等均购自上海生工

收稿日期: 2013-03-18

作者简介: 陶 奕 (1989—), 女, 江苏靖江人, 硕士研究生, 研究方向为豆芽维生素 B₆ 代谢。E-mail: taoyi890616@126.com。

2.4 不同产地金莲花与人工种植金莲花黄酮含量比较

金莲花属 (*Trollhus* L.) 属于毛茛科金莲花亚科, 全世界约 25 种, 其中我国 16 种^[5], 主要分布于河北、山西、内蒙古、新疆、四川、云南、吉林、陕西、甘肃、青海等省 (区), 山西、河北是传统的金莲花道地产地和栽培地^[6]。从宁夏明德中药饮片有限公司购买河北承德、山西五台山、内蒙古赤峰、吉林长白山产的野生金莲花, 在正交试验所得优化提取工艺条件下进行提取, 其结果见表 4 ($n=3$)。

表 4 不同产地金莲花黄酮含量比较

金莲花产地	黄酮含量 (%)
河北承德	12.027
山西五台山	12.253
内蒙古赤峰	11.472
吉林长白山	4.573
宁夏隆德	11.916

3 结论

利用直观分析法, 在微波辐射下提取金莲花黄酮, 其影响因素依次为 $D > C > E > B > A$, 即微波辐射时间 > 溶剂浓度 >

浸泡时间 > 料液比 > 微波辐射功率, 最佳提取工艺条件是 $A_3B_3C_2D_2E_4$, 微波辐射功率 500 W, 液物料比 1 g : 20 mL, 溶剂浓度 60%, 微波辐射时间 30 min, 浸泡时间 80 min。与河北、山西、内蒙古、长白山产的野生金莲花中黄酮含量相比, 宁夏隆德西北中药材有限公司人工种植的金莲花中黄酮含量较高, 完全能满足药用需要。不过影响金莲花中黄酮含量的因素比较多, 除人工种植与野生的区别之外, 可能还与产地、生长年份、采摘时间、生长环境 (土壤养分) 等因素有关。

参考文献:

- [1] 赵学敏. 本草纲目拾遗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 256.
- [2] 苏志伟, 田 鹤, 马英丽, 等. 金莲花中总黄酮提取工艺的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 850–851.
- [3] 苏连杰. 金莲花药效物质基础及质量评价研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2005.
- [4] 张进祥, 段吉平. 紫外分光光度法测定金莲花中总黄酮的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10): 36–37.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 70–88.
- [6] 白宇明. 中药材金莲花 [J]. 中草药, 1994, 25(6): 291.

生物工程公司。

1.2 黄豆芽磷酸吡哆醛水解酶的分离纯化

称取黄豆芽 50 g,组织捣碎机捣碎,按固液比 1 g : 2 mL 加入预冷的 50 mmol/L 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液 I (pH 值 5.5,含 0.1 mmol/L PMSF、1 mmol/L DTT、50% 甘油),4 ℃、8 000 r/min 离心 20 min,上清液即为粗酶液。将粗酶液的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度调到 50%,4 ℃ 下搅拌 1 h,相同温度下 8 000 r/min 离心 20 min,上清液继续加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和和度 60%,相同条件下离心。目的蛋白存在于饱和度为 40% ~ 60% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀中,沉淀用缓冲液 I 悬浮。将重悬液上样于 Sephadex G - 100 凝胶过滤柱(柱长 500 mm,直径 20 mm)中,用 10 mmol/L 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液 II (pH 值 5.5,含 50 $\mu\text{mol/L}$ PMSF、0.5 mmol/L DTT、2 mmol/L MgCl_2) 进行洗脱,洗脱速度为 0.35 mL/min,收集具有酶活性的洗脱液,放入透析袋中,于 4 ℃ 下用缓冲液 II 透析,每 4 h 更换 1 次透析液。将透析后的酶液置于超滤管中,4 ℃、4 400 r/min 浓缩,上样于 DEAE - Sepharose 阴离子交换柱(柱长 300 mm,直径 20 mm)中,用缓冲液 II 和 NaCl 溶液(0 ~ 0.6 mol/L)进行连续梯度洗脱,洗脱速度为 2.0 mL/min,收集具有酶活性的洗脱液,放入透析袋中,于 4 ℃ 用缓冲液 II 透析,每 4 h 更换 1 次透析液。将透析后的酶液至于超滤管中,4 ℃、4 400 r/min 浓缩,上样于 SP Sephadex C - 25 阳离子交换柱(柱长 600 mm,直径 12 mm)中,用缓冲液 II 和 NaCl 溶液(0 ~ 0.6 mol/L)进行连续梯度洗脱,洗脱速度为 0.5 mL/min,最后收集具有酶活性的洗脱液。

1.3 磷酸吡哆醛水解酶酶活性的测定

酶活性测定参考 Fonda 的方法^[4],略作修改。反应体系 3 mL,添加 0.2 mmol/L PLP、4 mmol/L MgCl_2 、50 mmol/L pH 值 5.5 的柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液在 37 ℃ 下反应 15 min,391 nm 下测定吸光度。酶活性单位(U)定义为 1 min 内 1 mg 蛋白消耗 PLP 的纳摩尔数。

1.4 磷酸吡哆醛水解酶部分性质的测定

1.4.1 酶的最适温度和最适 pH 值 分别在 pH 值 5.5、37 ℃ 条件下测定 PLP 水解酶在不同温度(20 ~ 80 ℃,间隔 10 ℃)和不同 pH 值(4.0 ~ 7.0,间隔 pH 值 0.5)条件下的酶活性。以最适条件下的酶活性为 100%,其余测得酶活性与之相比为相对酶活性。

1.4.2 酶的温度稳定性和 pH 值稳定性 将酶液分别置于不同温度(20 ~ 80 ℃,间隔 10 ℃)及不同 pH 值(4.0 ~ 7.0,间隔 pH 值 0.5)条件下,每隔 5 min 测定酶液的活性。温度稳定性以 37 ℃ 下的酶活性为 100%,pH 值稳定性及反应体系中缓冲液 pH 值 5.5 时测得的酶活性为 100%,其余测得的酶活性用相对酶活性表示。

1.4.3 金属离子对酶活性的影响 测定不同金属离子浓度对黄豆芽磷酸吡哆醛水解酶的促进或抑制作用。分别添加 1 ~ 5 mmol/L(其中 Hg^{2+} 与 Cu^{2+} 浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L)的金属离子和 1、4 mmol/L 的化学试剂于反应体系中,在 37 ℃、pH 值 5.5 的缓冲液中反应 15 min,测定酶活性。以等量酶液与不加金属离子的该缓冲液混合作为对照组。

1.4.4 底物特异性及酶反应动力学参数 底物特异性及酶

反应动力学参数的测定采用 Heinonen 等的方法^[7]。底物特异性:测定不同化学试剂(PNPP、磷酸苯基二钠、ATP、FMN、焦磷酸钠、PLP、PMP、PNP)作为底物时的酶活性,并予比较。酶反应动力学参数 K_m 测定:配制不同浓度的底物(PLP 和 PMP)溶液,分别与酶液在酶活测定条件(37 ℃、pH 值 5.5)下反应,采用 Lineweaver 的双倒数法^[8]确定其 K_m 。

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

黄豆芽磷酸吡哆醛水解酶采用硫酸铵沉淀及 Sephadex G - 100 凝胶过滤柱、DEAE - Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱、SP Sephadex C - 25 阳离子交换柱层析分离纯化后,所得到的纯化倍数和得率等相关系数见表 1。

表 1 豆芽磷酸吡哆醛水解酶的分离纯化

处理	总活性 (U)	总蛋白含 量(mg)	比活性 (U/mg)	纯化 倍数	得率 (%)
粗酶液	64 949.13	4 335.80	14.97	1.00	100.00
硫酸铵沉淀	62 970.18	236.55	266.20	17.77	96.95
Sephadex G - 100	38 132.94	69.52	548.51	36.61	60.55
DEAE - Sepharose	13 385.01	6.744	1 984.72	132.49	35.10
SP Sephadex C - 25	3 166.48	0.96	3 298.42	220.19	23.65

2.2 酶的部分性质研究

2.2.1 酶促反应的最适温度和温度稳定性 反应缓冲液 pH 值 5.5,在 20 ~ 80 ℃ 下测定酶活性,该酶的最适温度为 50 ℃ (图 1)。酶液在 20 ~ 50 ℃ 温度范围内稳定性较好,保温 1 h,残留活性仍在原来的 90% 以上。60 ℃ 保温 1 h 后剩余活性为原来的 74.56%,但在高于环境温度 60 ℃ 时,酶迅速失活,70、80 ℃ 保温 1 h 后残留活力仅为原来的 15.49%、1.82%。

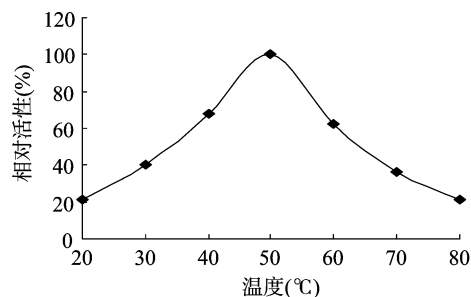


图 1 温度对酶活性的影响

2.2.2 酶促反应的最适 pH 值和 pH 稳定性 37 ℃ 条件下,在 pH 值 4.0 ~ 7.0 的反应缓冲液体系中测定酶活性,该酶的最适 pH 值为 5.5,且在 pH 值 4.5 ~ 6.0 范围内酶活性较大(图 2)。pH 值在 4.5、6.0 下保持 30 min,酶活性仅下降了 8.34%、12.05%,而在 pH 值 4.0、7.0 条件下,酶活性下降较大,分别下降了 40.23%、50.53%。

2.2.3 金属离子对酶活性的影响 二价阳离子和金属螯合剂对酶活性具有不同程度的促进和抑制作用。其中 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶有催化作用,且随着浓度升高,催化作用增强; Ca^{2+} 对酶活性基本无影响;而 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 对酶活性有强烈的抑制作用;EDTA 对酶活性也有抑制作用,随着浓度升高,抑制作用增强,但加入 Mg^{2+} 后抑制作用得到解除(图 3)。

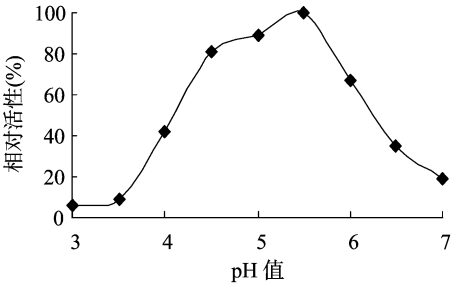


图2 pH 值对酶活性的影响

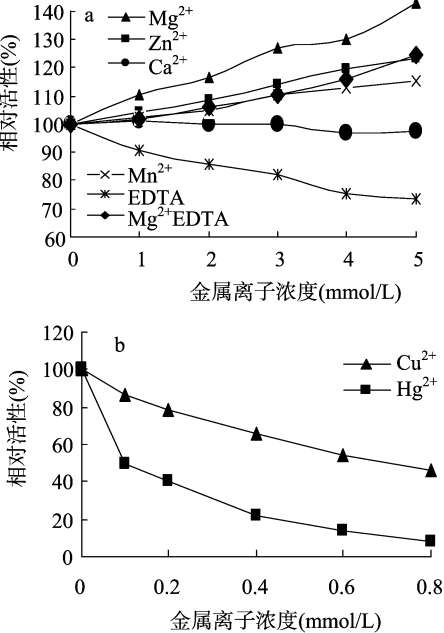


图3 金属离子对 PLP 水解酶活性的影响

2.2.4 底物特异性及酶反应动力学参数的测定 (1)底物特异性。由表 2 可见,以 PNPP、磷酸苯基二钠、ATP、焦磷酸钠、PLP 作为底物时,PLP 水解酶表现出较强的活性;而以 FMN、植酸钠、PMP 作为底物时,该酶具有较小的催化活性。(2)酶反应动力学参数 K_m 的测定。在 37℃、pH 值 5.5 条件下,采用 Lineweave - Burk 作图法,以 PLP、PMP 为反应底物,测得其 K_m 分别为 0.27、0.41 mmol/L。

表 2 黄豆芽 PLP 水解酶的底物特异性

底物	相对活性 (%)
PNPP	100.00
磷酸苯基二钠	82.45
ATP	90.52
FMN	41.12
焦磷酸钠	96.94
植酸钠	13.03
PLP	74.83
PMP	29.73

3 结论与讨论

本研究采用硫酸铵沉淀及凝胶过滤柱、离子交换柱层析等

分离纯化技术,对黄豆芽 PLP 水解酶进行纯化,纯化了 220.19 倍。本试验测得该酶的最适 pH 值为 5.5,这与烟草中 PLP 水解酶的最适 pH 值相似,证明该酶是酸性磷酸酶。本试验测得黄豆芽 PLP 水解酶的最适温度为 50℃,且在 20~50℃ 温度范围内活性较稳定。

本研究结果还表明, Ca^{2+} 对水解 PLP 的磷酸酶活性基本无影响。 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 对该酶的活性有明显的抑制作用,这与杨立红等对酸性磷酸酶的研究结果^[9] 相似。 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 对该酶的激活作用相对较小。 Mg^{2+} 对该酶有明显的激活作用,这与 Duff 等分离出来的酸性磷酸酶的结果^[10-11] 相符。EDTA 对该酶有抑制作用,但加入 Mg^{2+} 后抑制作用得以解除,可能是因为 Mg^{2+} 与 EDTA 形成络合物。

此外,黄豆芽 PLP 水解酶可以水解 ATP、磷酸苯基二钠等多种底物。采用 Lineweave - Burk 作图法,以 PLP、PMP 为反应底物,测得该酶的 K_m 分别为 0.27、0.41 mmol/L,表明黄豆芽 PLP 水解酶更容易催化 PLP 的水解。

参考文献:

[1]Wagner S, Bernhardt A, Leuendorf J E, et al. Analysis of the arabi-dopsis rsr4 - 1/pdx1 - 3 mutant reveals the critical function of the PDX1 protein family in metabolism, development, and vitamin B₆ bio-synthesis[J]. The Plant Cell, 2006, 18(7): 1722 - 1735.

[2]Gao G J, Fonda M L. Kinetic analysis and chemical modification of vitamin B₆ phosphatase from human erythrocytes[J]. Journal of Bio-logical Chemistry, 1994, 269(10): 7163 - 7168.

[3]Lumeng L, Li T K. Characterization of the pyridoxal - 5' - phosphate and pyridoxamine - 5' - phosphate hydrolase activity in rat liver[J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(20): 8126 - 8131.

[4]Fonda M L. Purification and characterization of vitamin B₆ - phos-phate phosphatase from human erythrocytes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(22): 15978 - 15983.

[5]Tazoe M, Ichikawa K, Hoshino T. Purification and characterization of pyridoxine 5' - phosphate phosphatase from *Sinorhizobium meliloti* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2005, 69(12): 2277 - 2284.

[6]马娅萍, 黄龙全, 张剑韵. 烟草磷酸吡哆醛水解酶的分离纯化与表征[J]. 广西植物, 2012, 32(5): 710 - 714, 609.

[7]Heinonen J K, Lahti R J. A new and convenient colorimetric determi-nation of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase [J]. Analytical Biochemistry, 1981, 113(2): 313 - 317.

[8]Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation con-stant[J]. J Am Chem Soc, 1934, 56(3): 658 - 666.

[9]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): 440 - 443.

[10]Duff S M, Lefebvre D D, Plaxton W C. Purification, characterization, and subcellular localization of an acid phosphatase from black mus-tard cell - suspension cultures; comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1991, 286(1): 226 - 232.

[11]Duff S M, Lefebvre D D, Plaxton W C. Purification and characteriza-tion of a phosphoenolpyruvate phosphatase from brassica nigra suspension cells[J]. Plant Physiology, 1989, 90(2): 734 - 741.