

荞麦与大豆叶片乙醇酸氧化酶的纯化和性质比较研究

刘拥海, 俞乐

(肇庆学院生物系, 广东肇庆 526061)

摘要: 分别从荞麦与大豆叶片中部分纯化了乙醇酸氧化酶(GO, EC1. 1. 3. 1), 并研究其部分性质。结果显示荞麦与大豆叶片中GO的催化特性有明显差异: 大豆叶片中GO对乙醇酸 K_m 值为0.31 mmol/L, 对乙醛酸 K_m 值为1.98 mmol/L。外源草酸对GO氧化乙醇酸活性影响很小, 但对其氧化乙醛酸活性抑制明显, 5 mmol/L草酸可抑制44%。而荞麦叶片中GO性质有所不同: GO对乙醇酸 K_m 为0.46 mmol/L, 对乙醛酸 K_m 为0.85 mmol/L。草酸对荞麦GO氧化乙醇酸活性影响也很小, 对其氧化乙醛酸活性的抑制作用明显小于大豆, 5 mmol/L草酸只抑制24%。上述研究结果表明, 荞麦GO对乙醛酸的亲和力明显强于大豆, 并且草酸对其GO氧化乙醛酸活性影响较小。因此相对于大豆而言, GO可能在荞麦叶片草酸合成中起重要作用。

关键词: 乙醇酸氧化酶; 荞麦; 大豆

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)02-0184-04

Studies on purification and characters of glycolate oxidase between buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and soybean (*Glycine max*) leaves

LIU Yong-hai, YU Le

(Department of Biology, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

Abstract: In this study, glycolate oxidase (GO) was partially purified from both buckwheat and soybean leaves and then compared in terms of the catalytic property. It turned out that differences existed between the two kinds of GO. For soybean GO the K_m for glycolate and glyoxylate was 0.31 mmol/L, 1.98 mmol/L, respectively. The oxidation of glycolate was only slightly inhibited but the oxidation of glyoxylate was inhibited by 44% in presence of 5 mmol/L oxalate. It can be inferred that once oxalate is accumulating to a certain level, its synthesis is suppressed by itself so that oxalate in soybean leaves can not accumulate to a certain high level. For buckwheat GO, the K_m for glycolate and glyoxylate was 0.46 mmol/L, 0.85 mmol/L, respectively, indicating the affinity for glyoxylate is obviously higher than soybean GO. The oxidation of glycolate was also slightly inhibited and the oxidation of glyoxylate was inhibited only 24% in presence of 5 mmol/L oxalate. So comparatively, because of the GO difference, buckwheat leaves may have a higher rate of synthesizing oxalate and also be allowed to accumulate a higher level of oxalate.

Key words: glycolate oxidase; buckwheat; soybean

收稿日期: 2003-05-26 修订日期: 2003-08-13

作者简介: 刘拥海(1972-), 男, 湖南邵东人, 博士, 副教授, 从事植物生理学和细胞生物学教学与科研工作。

草酸广泛存在于植物界中,许多植物中的草酸可达组织干重的 6%~10%(Zindler-Frank, 1976; 彭新湘等, 1992)。前人的研究表明叶片是合成草酸的主要场所(Libert 和 Franceschi, 1987)。乙醇酸氧化酶(GO, EC1. 1. 3. 1)可能是植物叶片草酸合成的重要酶,这是因为 GO 不但可催化乙醇酸生成乙醛酸,也能进一步氧化乙醛酸形成草酸(Kenton 和 Mann, 1952; Richardson 和 Tolbert, 1961)。但奇怪的是不同植物叶片中草酸含量可相差数倍至几十倍不等(Libert 和 Franceschi, 1987; 李宝盛等, 2000)。荞麦与大豆中叶片均存在较高的 GO 活性,但二者叶片中草酸含量差异巨大(刘拥海, 2002),这可能意味着不同植物叶片中 GO 的酶学性质可能有差异。因此本文从荞麦与大豆叶片中部分纯化了 GO, 并比较研究了两种材料中 GO 的部分酶学性质。这可能对于解释 GO 在不同植物叶片中草酸合成中的作用有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆(*Glycine max* L., 品种为化州),由华南农业大学农学院提供;荞麦(*Fagopyrum esculentum* M., 品种为美国荞),由山西省太原市农业科学院提供。

1.2 材料培养

荞麦种子用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min,用自来水与蒸馏水冲洗干净,浸种 24 h,将其点播于盛有蛭石的瓦钵中,待子叶长出后移栽,用 1/5 强度 Hoagland 营养液(pH6.0)培养。大豆种子用 30% 的双氧水消毒 5 min,用自来水与蒸馏水冲洗干净,再用饱和硫酸钙溶液浸泡 30 min,点播于盛有蛭石的瓦钵中,待子叶长出后移栽,用 1/5 强度 Hoagland 营养液(pH6.0)培养。

1.3 乙醇酸氧化酶纯化及活性测定

参照刘拥海(2002)的方法。将 25 g 左右的叶片洗净,沥干,在 40 mL 25 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH8.0)中快速研磨成匀浆液,尼龙布过滤,滤液于 5 000 g 低温(4 °C,下同)离心 10 min。上清液用 10% HAC 将 pH 调至 5.3,静置 10 min,5 000 g 低温离心 10 min,取上清液先慢慢加入固体硫酸铵使其饱和度为 20%,静置 10 min,5 000 g 低温离心 10 min,再取上清液慢慢加入固体硫酸铵使其饱和度

为 55%,静置 30 min,再 5 000 g 低温离心 10 min,沉淀溶于 5 mL 5 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入适量硫酸鱼精蛋白(2 mg/mL)搅拌溶解,静置 30 min,5 000 g 离心 10 min,取上清液在预先用 5 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH8.0)平衡过的 Sephadex G-50 中进行脱盐,收集含蛋白较高(用考马斯亮蓝 G-250 检测)的几管(呈淡黄色),加入适量 FMN 以稳定酶活性。取上述步骤的酶液上 DEAE-纤维素柱(2×10 cm)(预先用磷酸钠缓冲液平衡),用 5~100 mmol/L pH8.0 磷酸钠缓冲液浓度梯度洗脱,分部收集后检测每管的酶活性及在 280 nm 波长处的吸光值,合并酶活性较高的几管溶液作测定分析用。酶活性单位(U)定义为 1 min 产生 1 nmol H₂O₂ 需要的酶量。

1.4 蛋白质含量测定

参照 Bradford(1976)的方法,以牛血清蛋白做标准曲线。

2 结果与分析

2.1 GO 的部分纯化

通过硫酸铵分部盐析、硫酸鱼精蛋白沉淀和 DEAE-纤维素层析等步骤,分别从荞麦与大豆叶片中部分纯化了 GO。结果显示纯化后荞麦 GO 比活性达 619.27 U/mg 蛋白,纯化了 26.32 倍;大豆 GO 比活性达 466.46 U/mg 蛋白,纯化了 14.70 倍(表 1)。在纯化过程中可以发现,经 G-50 脱盐后的酶液经过 DEAE-纤维素柱,荞麦 GO 出现 1 个酶活性峰和 2 个蛋白峰,活性峰与第一个蛋白峰基本重叠,而大豆 GO 出现 1 个酶活性峰和 1 个蛋白峰,活性峰略提前于蛋白峰(图 1、2)。

2.2 GO 对底物乙醇酸、乙醛酸的 Km 值

取纯化的荞麦与大豆 GO,分别测定其对底物乙醇酸、乙醛酸的 Km 值及草酸对两种底物的抑制常数,结果(表 2)表明,荞麦和大豆 GO 对底物乙醇酸的 Km 值差异不大(0.46 mmol/L vs. 0.31 mmol/L),但对乙醛酸的 Km 值,荞麦 GO 显著小于大豆(0.85 mmol/L vs. 1.98 mmol/L),这表明荞麦 GO 对底物乙醇酸的亲和力与大豆较接近,而对乙醛酸的亲和力显著强于大豆。

2.3 外源草酸对 GO 活性的影响

本文研究结果显示:草酸对荞麦和大豆中 GO 氧化乙醇酸活性的抑制作用较小,分别为 5.4%、

以达到较高水平; 相对于大豆而言, 荞麦叶片中可允许积累较高含量的草酸, 因为积累的草酸对其自身进一步合成影响不大(刘拥海, 2002)。

Watanabe 等(1995)报告的结果与本文有所不

同: 叶片草酸含量差异较大的菠菜与菜心 GO, 二者对底物乙醛酸、乙醇酸的 K_m 值均没有明显差异。但 Richardson 和 Tolbert(1961)曾报告甜菜叶片中 GO 氧化乙醛酸的 K_m 值相对较大, 对底物乙醛酸

表 3 草酸对 GO 活性的影响(U/mg 蛋白)
Table 3 Effect of oxalate on GO activity (U/mg protein)

底物 Substrate	荞麦 Buckwheat			大豆 Soybean		
	对照 Control	+草酸 +Oxalate (5 mmol/L)	相对抑制 Relative inhibition(%)	对照 Control	+草酸 +Oxalate (5 mmol/L)	相对抑制 Relative inhibition(%)
氧化乙醇酸活性 Oxidased glycolate activity	596.33	564.22	-5.4	361.89	346.66	-4.2
氧化乙醛酸活性 Oxidased glyoxylate activity	133.03	100.92	-24	68.56	38.09	-44

亲和力较小, 并且其 GO 氧化乙醛酸活性对草酸非常敏感, 这与本文报告的大豆叶片 GO 相似。而 Millerd 等(1963)的研究结果显示酢酱草科的植物叶片 GO 氧化乙醛酸的 K_m 相对较小, 并且其草酸对其氧化乙醛酸活性抑制较小, 类似于本文报告的荞麦叶片 GO 的性质。本文首次通过比较荞麦与大豆叶片 GO 性质差异, 并将其同这两种植物叶片草酸含量积累差异联系起来。

参考文献:

- 刘拥海. 2002. 植物草酸代谢调控机理的研究[D]. 华南农业大学, 23-26.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**: 248-254.
- Clagett CO, Tolbert NE. 1949. Oxidation of α -hydroxyacids by enzyme from plants[J]. *J Biol Chem*, **178**: 977-987.
- Kenton RH, Mann PJG. 1952. Hydrogen peroxide formation in oxidations catalyzed by plant α -hydroxyacid oxidase[J]. *Biochem J*, **52**: 130-134.
- Li BS(李宝盛), Peng XX(彭新湘), Li MQ(李明启). 2000. Relationship between oxalate accumulation and photorespiratory glycolate metabolism in plants(植物草酸积累与光呼吸乙醇酸代谢的关系)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **26**(2): 148-152.
- Libert B, Franceschi VR. 1987. Oxalate in crops plants[J]. *J Agri Food Chem*, **35**: 926-938.
- Millerd A, Morton RK, Wells JRE. 1963. Enzymic synthesis of oxalic acid in *Oxalis pes-caprae*[J]. *Biochem J*, **88**: 281-287.
- Pandey OP, Sanwal GG. 1982. Purification and properties of glycolate oxidase from *Nopalea dejecta*, a CAM plant[J]. *Plant Physiol Biochem*, **9**: 80-87.
- Peng FY(彭飞燕), Chen SS(陈升枢), Li MQ(李明启). 1991. Comparative studies on photorespiration and the activities of photorespiration enzymes in C_3 , C_4 and CAM plants(C_3 , C_4 和 CAM 植物的光呼吸和有关酶活性的比较研究)[J]. *J South China Agr Univ*(华南农业大学学报), **12**(4): 5-13.
- Peng XX(彭新湘), Li MQ(李明启). 1992. Oxalate and its metabolism(植物中的草酸及其代谢)[J]. *Plant Physiol Commu*(植物生理学通讯), **28**(2): 93-96.
- Rehfeld DW, Randall DD. 1970. Enzymes of the glycolate pathway in plant without CO_2 -photorespiration[J]. *Can J Bot*, **48**: 1 219-1 226.
- Richardson KE, Tolbert NE. 1961. Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase[J]. *J Bol Chem*, **235**: 1 280-1 284.
- Tolbert NE, Cohan MS, Burris RH, et al. 1968. Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism[J]. *J Biol Chem*, **243**: 5 179-5 184.
- Watanabe Y, Fujii N, Terayama H, et al. 1995. Comparison of enzyme activity in oxalate synthesis between *Spina-cia oleracea* L. and *Brassica campestris* L. [J]. *Soil Sci Plant Nutr*, **41**(1): 89-94.
- Zindler-Frank E. 1976. Oxalate biosynthesis in relation to photosynthetic pathway and plant productivity; a survey [J]. *Z Pflanzphysiol*, **80**(1): 1-13.