

烟草磷酸吡哆醛水解酶的分离纯化与表征

马娅萍¹, 黄龙全¹, 张剑韵^{2*}

(1. 安徽农业大学 茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学 生命科学学院, 合肥 230036)

摘要: 采用硫酸铵沉淀、DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换、Sephadex G-100 凝胶过滤和 SP Sephadex C-25 阳离子交换柱层析等步骤, 对烟草磷酸吡哆醛水解酶进行了分离纯化。结果表明: 该酶被纯化了 119.6 倍, 得率为 28.49%, 经凝胶过滤和 SDS-PAGE 测得该酶的全分子量为 49.6 kDa, 亚基分子量约为 25 kDa; 该酶最适温度为 50 °C, 最适反应 pH 为 5.5; Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 等对该酶有激活作用, 金属离子螯合剂 EDTA 对酶有抑制作用, 加入 Mg^{2+} 后抑制作用得到解除; 在最适反应条件下, 测得反应底物磷酸吡哆醛 (PLP) 和磷酸吡哆胺 (PMP) 的 K_m 值分别为 0.23 mmol/L 和 0.56 mmol/L。

关键词: 烟草; 磷酸吡哆醛; 水解酶; 纯化; 酶性质

中图分类号: Q945.14 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)05-0710-05

Purification and characterization of pyridoxal-5'-phosphate hydrolase from tobacco

MA Ya-Ping¹, HUANG Long-Quan¹, ZHANG Jian-Yun^{2*}

(1. College of Tea & Food Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Pyridoxal-5'-phosphate hydrolase was purified from tobacco by ammonium sulfate, DEAE-Sephadex Fast Flow ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration, SP Sephadex C-25 ion exchange chromatography. Further investigations of pyridoxal-5'-phosphate hydrolase, reported herein, lead to the conclusion that this enzyme was purified approximately 119.6-fold, the recovery of 28.49% activity, Sephadex G-100 gel filtration and SDS-PAGE showed that the molecular weight of the enzyme was 49.6 kDa, and the molecular weight of subunit was approximately 25 kDa; The enzyme had an optimal temperature and pH at 50°C and 5.5, respectively. It was enhanced by Mg^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} , yet inhibited by chelating agent EDTA, which inhibited effect was relieved after added Mg^{2+} ; under optimal conditions, the K_m values for pyridoxal-5'-phosphate (PLP) and pyridoxamine-5'-phosphate (PMP) were 0.23 mmol/L, 0.56 mmol/L, respectively.

Key words: tobacco; pyridoxal-5'-phosphate; hydrolase; purification; enzymological properties

维生素 B₆ (VB₆) 是一组吡啶化合物的总称, 2-甲基-3-羟基-5-羟甲基吡啶是它们共同的母体, 吡啶环第四碳位被羟甲基、氨基、甲酰基取代后分别形成吡哆醇 (Pyridoxine, PN)、吡哆胺 (Pyridoxamine, PM) 和吡哆醛 (Pyridoxal, PL), 三者相应磷酸酯形

式为磷酸吡哆醇 (Pyridoxine-5'-phosphate, PNP)、磷酸吡哆胺 (Pyridoxamine-5'-phosphate, PMP) 和磷酸吡哆醛 (Pyridoxal-5'-phosphate, PLP)。PLP 作为多种酶的辅酶, 参加催化涉及氨基酸的代谢反应。

酸性磷酸酶是一组在酸性条件下水解各种磷酸

* 收稿日期: 2012-04-07 修回日期: 2012-07-28

基金项目: 安徽省自然科学基金重点项目 (KJ2010A116) [Support by Key Project Natural Science Foundation of Anhui Province (KJ2010A116)]

作者简介: 马娅萍 (1985-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 从事烟草 VB₆ 代谢方面的研究, (E-mail)sdmnp2007@126.com。

* 通讯作者: 张剑韵, 博士, 教授, 主要从事维生素学研究, (E-mail)jianyun218@yahoo.com.cn。

酯的酶,在生物磷代谢中起着重要作用(Duff等,1994)。Margaret(1992)从人体红细胞中纯化出PLP-磷酸酶,证实其为一种酸性磷酸酶,参与人体中PLP的代谢调控。PLP作为重要的功能型VB₆,在生物体内其含量受到严格调控,磷酸吡哆醛水解酶是其关键性代谢调控酶,这对生物体内生理功能有条不紊的进行非常重要(Gao等,1994)。目前,在哺乳动物(Lawrence等,1975)和细菌(Masaaki等,2005)中对磷酸吡哆醛水解酶均有研究,而植物体内磷酸吡哆醛的水解代谢尚不明确。烟草作为一种模式植物,广泛用于植物生理生化研究。本文以烟草为材料,对磷酸吡哆醛水解酶进行了分离纯化和酶学性质分析,以期对磷酸吡哆醛水解酶的进一步研究和应用提供依据。同时,也为烟草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

烟草鲜叶(实验室栽培,品种为云烟21)。磷酸吡哆醛(PLP)、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、柠檬酸三钠等均购自上海生物工程有限公司(Sangon)。

1.2 烟草磷酸吡哆醛水解酶的分离纯化

称取烟草鲜叶150.0 g,组织捣碎机捣碎,按固液比1:2的比例加入预冷的缓冲液I(50 mmol/L柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液,pH5.5,0.1 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(NH₄)₂SO₄饱和度调到40%,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(NH₄)₂SO₄至60%的饱和度,相同条件离心。目的蛋白存在于饱和度为40%~60%的(NH₄)₂SO₄沉淀中,用10 mL缓冲液II(10 mmol/L柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液,pH5.5,0.5 mmol/L DTT、2 mmol/L MgCl₂、50 μmol/L PMSF)悬浮沉淀。将重悬液上样于DEAE-Sepharose Fast Flow离子交换柱中(柱长300 mm,直径20 mm),用缓冲液II和NaCl(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I透析,每4 h更换1次透析液。将透析后的酶液用聚乙二醇(20000)浓缩,上

样于Sephadex G-100凝胶过滤柱中(柱长500 mm,直径20 mm),用缓冲液II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℃用缓冲液I透析,每4 h更换一次透析液。将透析后的酶液用聚乙二醇(20000)浓缩,上样于SP Sephadex C-25离子交换柱中(柱长600 mm,直径12 mm),用缓冲液II和NaCl(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Margaret(1992)的方法,略作修改。反应体系3 mL,添加0.2 mL酶液,0.2 mmol/L PLP,4 mmol/L MgCl₂,50 mmol/L pH5.5柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液在37℃下反应15 min,391 nm下测定吸光度。酶活力单位(U)定义为每分钟每毫克蛋白消耗PLP的纳摩尔数。

1.4 蛋白质浓度的测定

蛋白质浓度测定采用Bradford(1976)的方法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.5 磷酸吡哆醛水解酶纯度和分子量测定

采用SDS-PAGE和Sephadex G-100凝胶过滤层析测定其分子量(Gabriel,1971)。SDS-PAGE凝胶电泳分离胶浓度为12%,浓缩胶浓度为4%。Sephadex G-100凝胶过滤以牛血清白蛋白(67 kDa)和溶菌酶(14.7 kDa)为标准蛋白。

1.6 磷酸吡哆醛水解酶部分性质的测定

1.6.1 酶的最适温度和最适pH 分别在pH5.5,37℃条件下测定烟草磷酸吡哆醛水解酶在不同温度(20~80℃,间隔10℃)和不同pH值(4.0~7.0,间隔pH0.5)条件下的酶活力。以最适条件下的酶活力作为100%,其余测得酶活力与之相比为相对酶活力。

1.6.2 酶的温度稳定性和pH稳定性 将酶液分别放置于不同温度(20~80℃,间隔10℃)及不同pH值(4.0~7.0,间隔pH0.5)条件下,每隔5 min,测定酶液的酶活力。温度稳定性以37℃下的酶活力为100%,pH稳定性以反应体系中缓冲液pH5.5时测得的酶活力作为100%,其余测得的酶活力用相对酶活力表示。

1.6.3 化学试剂对烟草磷酸吡哆醛水解酶酶活性的影响 测定不同化学试剂(二价阳离子,金属离子螯合剂等)对烟草磷酸吡哆醛水解酶酶的促进或抑制作用(Djary等,2010)。分别添加1 mmol/L、4

mmol/L 的化学试剂于反应体系中,在 37 °C, pH5.5 缓冲液中反应 15 min,测定酶活力。等量酶液与不加金属离子的该缓冲液混合作为对照组。

1.6.4 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 & Lahti(1981)的方法。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、植酸钠、PLP、PMP、PNP)作为底物时的酶活力,并予以比较。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 °C, pH5.5)下反应,采用 Lineweaver (1934)的双倒数法确定其 K_m 值。

表 1 烟草磷酸吡哆醛水解酶的分离纯化

Table 1 Purification of pyridoxal-5'-phosphate hydrolase from the tobacco

处理 Purification	总活力 (U) Total activity	总蛋白 (mg) Total protein	比活力 (U/mg) Specific activity	纯化倍数 Purification times	得率 (%) Yield
粗酶液 Crude enzyme	3896.96	420	9.28	1.0	100
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation	3703.80	63.6	58.24	6.28	95.04
DEAE Sepharose F. F.	2332.91	8.4	277.73	29.93	59.87
Sephadex G-100	1410.72	1.7	829.84	89.44	36.20
SP Sephadex C-25	1110.09	1.0	1110.09	119.64	28.49

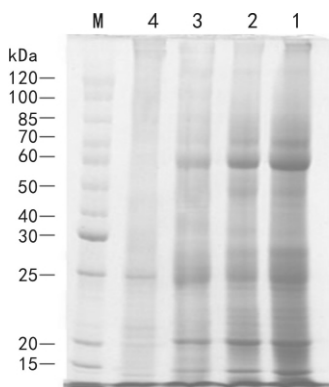


图 1 磷酸吡哆醛水解酶纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of pyridoxal-5'-phosphate hydrolase purification

M. 蛋白 Marker protein; 1. 粗酶液样品 Crude enzyme; 2. DEAE Sepharose F. F.; 3. Sephadex G-100; 4. SP Sephadex C-25.

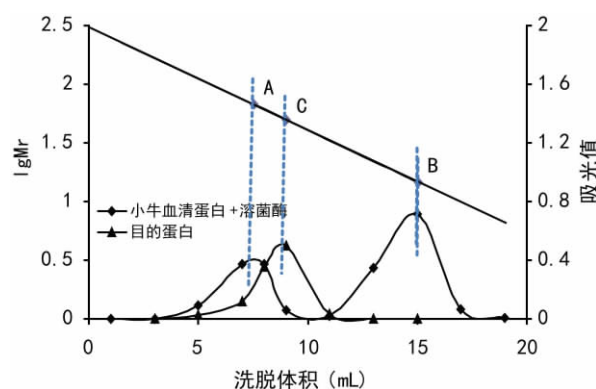


图 2 磷酸吡哆醛水解酶的凝胶层析分离图

Fig. 2 Chromatography of pyridoxal-5'-phosphate hydrolase

A. 牛血清白蛋白 67 kDa; B. 溶菌酶 14.7 kDa; C. 目的蛋白。
A. Bovine albumin 67 kDa; B. Lysozyme 14.7 kDa; C. Target protein.

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

烟草磷酸吡哆醛水解酶采用硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换、Sephadex G-100 凝胶过滤和 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参数见表 1。

2.2 分子量测定

SDS-PAGE 表示纯化的酶蛋白为单一区带,亚基分子量约为 25 kDa(图 1);经 Sephadex G-100 凝胶过滤测得酶分子量为 49.6 kDa(图 2)。结果显示

烟草磷酸吡哆醛水解酶由两个相同的亚基组成。

2.3 磷酸吡哆醛水解酶的部分性质研究

2.3.1 酶促反应的最适温度和温度稳定性 反应缓冲液 pH5.5,在 20~80 °C 下测定酶活力,该酶的最适温度为 50 °C(图 3)。酶液在 20 °C、30 °C 和 40 °C 保温 30 min 后,残留活力分别为 98.37%、98.50% 和 99.33%,保温 1 h,残留活力分别为 93.47%、95.13% 和 96.98%;在 50 °C 保温 30 min 后,残留活力为 59.84%,1 h 后残留酶活力为 47.93%;在 60 °C、70 °C 和 80 °C 保温 30 min 后,残留活力分别为 52.66%、21.43% 和 18.18%,1 h 后,活力分别为初始活力的 47.83%、13.27% 和 0.09%。

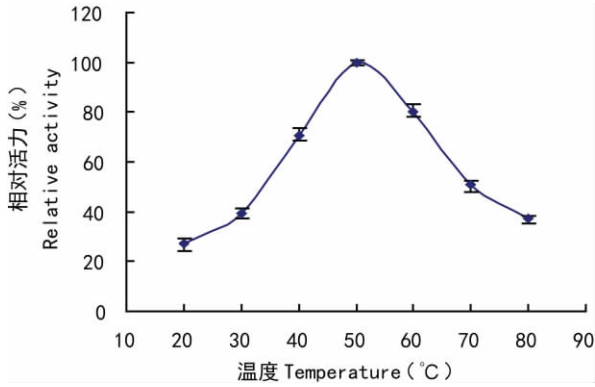


图3 温度对酶活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the catalytic activity of pyridoxal-5'-phosphate hydrolase from the tobacco

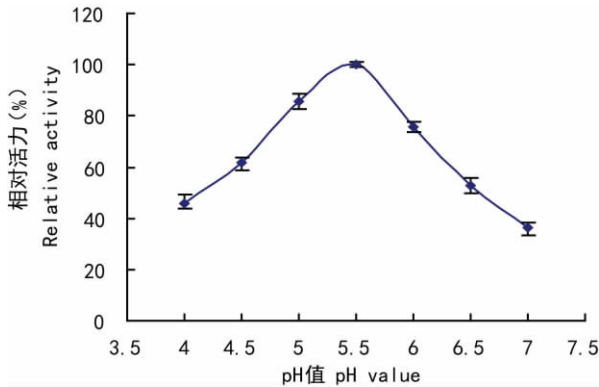


图4 pH 值对酶活性的影响

Fig. 4 Effects of pH on the catalytic activity of pyridoxal-5'-phosphate hydrolase from the tobacco

2.3.2 酶促反应的最适 pH 和 pH 稳定性 37 °C 条件下,在 pH4.0~7.0 反应缓冲液体系中测定酶活力,该酶的最适 pH 为 5.5,且在 pH 5.0~6.0 范围内酶活力较大(图 4)。pH 值 5.0 和 6.0 范围内酶活力较为稳定,30 min 后酶活力仅分别下降了 8.68%和 9.98%,而在 pH 值 4.0 和 7.0 条件下,酶活力下降较大,分别下降了 16.96%和 17.83%。

2.3.3 化学试剂对酶活性的影响 (1)金属离子对酶活性的影响:二价阳离子和金属离子螯合剂对酶活性具有不同程度的促进和抑制作用(表 2)。其中 4 mmol/L 的 Mg^{2+} 催化作用最强,其次是 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 。EDTA 对磷酸吡哆醛水解酶活性具有抑制性,加入 Mg^{2+} 后抑制作用得到解除。(2)化合物对酶活性的影响:反应产物(磷酸三钠和 PL)对酶活性具有很强的抑制性,ATP 和 pNPP 也具有较强烈的竞争性抑制作用(表 4)。且对

于大部分化合物(钼酸钠和碘乙酸钠除外)来说,高浓度(4 mmol/L)比低浓度(1 mmol/L)具有更明显的抑制作用。

表 2 二价阳离子和金属离子螯合剂对酶活性的影响
Table 2 Effects of some cations and chelating agent on the activity of the purified acid phosphatases from the tobacco

试剂 Reagent	浓度 Concentration (mmol/L)	相对活性 Relative activity (%)
Control	0	100±1.0
Cu^{2+}	1	110.5±1.8
	4	121.6±2.8
Zn^{2+}	1	138.9±2.4
	4	150.6±1.5
Mn^{2+}	1	156.8±3.0
	4	159.7±3.8
Ca^{2+}	1	173.7±2.2
	4	169.4±3.5
Mg^{2+}	1	211.6±2.2
	4	238.4±2.3
EDTA	1	81.0±3.0
	4	66.3±2.0
EDTA + Mg^{2+} **	1	189.5±2.8
	4	172.5±3.0

** 表示实验组添加的 EDTA 和 Mg^{2+} 为同一标注浓度。

** The experimental group added EDTA and Mg^{2+} for the same annotation concentration.

表 3 不同化合物对酶活性的抑制作用

Table 3 Inhibition of different compound on the activity of the purified acid phosphatases from the tobacco

化合物 Compound	浓度 Concentration (mmol/L)	相对活性 Relative activity (%)
Control	0	100±1.0
氯化钾	1	54.3±1.7
	4	14.0±1.0
钼酸钠	1	3.0±0.3
	4	4.9±0.5
碘乙酸钠	1	76.8±1.0
	4	88.7±0.8
咪唑	1	90.1±1.3
	4	86.9±1.3
磷酸三钠	1	18.8±1.0
	4	15.5±1.3
PL	1	19.1±0.8
	4	11.5±1.0
ATP	1	28.7±0.7
	4	24.4±1.0
pNPP	1	1.7±1.0
	4	1.5±0.8

2.3.4 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 4 可见,pNPP、磷酸苯基二钠、

ATP、焦磷酸钠和 PLP 作为底物时,磷酸吡哆醛水解酶表现出较强的酶活性,而 FMN、植酸钠和 PMP 作为底物时,该酶具有相对较小的催化活性。(2)烟草磷酸吡哆醛水解酶的酶反应动力学参数 K_m 测定:在 $37\text{ }^\circ\text{C}$, pH5.5 条件下,采用 Lineveaver-Burk 作图法,以 PLP 和 PMP 为反应底物,测得其 K_m 值分别为 0.23 mmol/L (图 5)和 0.56 mmol/L (图 6)。

表 4 烟草磷酸吡哆醛水解酶的底物特异性
Table 4 Substrate specificity of purified acid phosphatases from the tobacco

底物 Substrates	相对活性 Relative activity (%)
pNPP	100 ± 1.0
磷酸苯基二钠	88.6 ± 0.7
ATP	93.9 ± 1.3
FMN	39.2 ± 2.0
焦磷酸钠	98.5 ± 1.7
植酸钠	2.9 ± 1.0
PLP	61.3 ± 1.3
PMP	29.6 ± 1.7

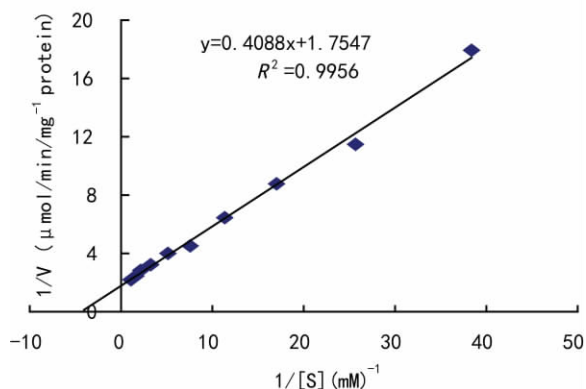


图 5 以 PLP 为底物时的 K_m 值

Fig. 5 K_m value of PLP as the substrate

3 结论与讨论

本文采用硫酸铵沉淀、离子交换柱、凝胶过滤柱层析等分离纯化技术对烟草磷酸吡哆醛水解酶进行了纯化,纯化出的酶为双亚基结构,亚基分子量约为 25 kDa 。该酶最适温度为 $50\text{ }^\circ\text{C}$,与高亚朋等(2011)和陆珊(2006)的研究报道相似。植物酸性磷酸酶的最适 pH 一般低于 6.0(Carmen, 1998; Mariusz 等, 1997)。本实验测得烟草磷酸吡哆醛水解酶的最适 pH 为 5.5。

研究结果还表明, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对烟草磷酸吡哆

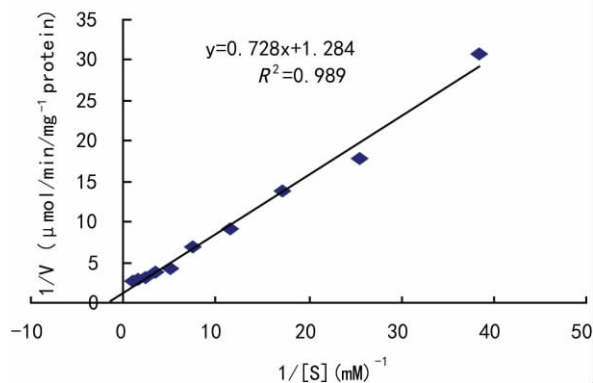


图 6 以 PMP 为底物时的 K_m 值

Fig. 6 K_m value of PMP as the substrate

醛水解酶的激活作用较弱,而 Mg^{2+} 对酶的激活作用最强。 Mg^{2+} 可能与 PLP 中的磷酸基团结合形成 $\text{Mg} \cdot \text{PLP}$ 复合物,再参与酶的催化反应。金属离子螯合剂 EDTA 对烟草磷酸吡哆醛水解酶有抑制作用,加入 Mg^{2+} 后,EDTA 的抑制作用解除,这可能是 Mg^{2+} 与 EDTA 之间存在竞争或拮抗作用。

另外,烟草磷酸吡哆醛水解酶可以水解多种底物(pNPP、磷酸苯基二钠和 ATP 等)。以 PLP 和 PMP 作为底物,酶的 K_m 值分别为 0.23 mmol/L 和 0.56 mmol/L 。结果表明烟草磷酸吡哆醛水解酶更容易催化 PLP 的水解。

参考文献:

- 陆珊. 2006. 麦芽酸性磷酸酶的部分性质研究[D]. 成都:四川大学
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biol Chem*, **72**:248-254
- Carmen VF. 1998. *Plant Physiol Biochem*, **36**(7):487-494
- Djary MK, Jean TG, Betty MF, et al. 2010. Biochemical characterization of two non-specific acid phosphatases from Cucurbitaceae (*Lagenaria siceraria*) edible seeds exhibiting phytasic activity [J]. *J Anal & Plant Sci*, **7**(3):860-875
- Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism[J]. *Physiol Plant*, **90**:791-800
- Gabriel O. 1971. Locating enzymes on gels[J]. *Methods in Enzymology*, **22**:578-604
- Gao GJ, Margaret LF. 1994. Kinetic analysis and chemical modification of vitamin B₆ phosphatase from human erythrocytes[J]. *J Biol Chem*, **10**:7 163-7 168
- Gao YP(高亚朋), Su M(苏茉), Liang JR(梁建荣), et al. 2011. Study on purification and characterization of acid phosphatase from mung bean(绿豆酸性磷酸酶的分离纯化和部分性质研究)[J]. *J Chin Cereals Oils Assn*(中国粮油学报), **26**(5):92-96
- Heinonen JK, Lahti RJ. 1981. A new and convenient colorimetric (下转第 609 页 Continue on page 609)

白色或淡黄色,近辐状,花冠筒极短,花冠裂片卵状长圆形或长圆状披针形,长约 3 mm,宽约 1 mm,顶端略钝;副花冠双轮,着生于合蕊冠上,外轮成环状或杯状,膜质,具 5 棱,顶端截平或短 5 裂,内轮为 5 裂片,远比外轮为长,裂片扁平,长圆状,基部被外轮的副花冠所包围;花药顶端的膜片直立;花粉块下垂,基部弯;柱头短圆锥状,平头。蓇葖披针状圆柱形,长约 15 cm,直径约 1 cm,外果皮薄而平滑;种子阔卵形,扁平,长约 3 mm,宽约 2 mm,顶端的白色绢质种毛长约 2 cm。花期 2~11 月,果期冬季至翌年春季。

广西(Guangxi):北海市,合浦县,沙田镇,英罗港,海边沙地,路边灌木丛,罕见,海拔 1 m,2011 年 1 月 13 日,黄俞淞、林春蕊等 H110101(IBM);同地,2011 年 5 月 14 日,黄俞淞、林春蕊等 Y0354(IBM)。

分布:海南;印度、缅甸、尼泊尔、泰国和越南亦有分布。为广西首次记录。

野外调查发现,近年来广西海岸带生物资源与环境受人类活动影响严重,尤其是围垦养殖使红树林大面积锐减(范航清,2000),一些海岸带生物衰退甚至面临灭绝威胁。本次调查发现的肉珊瑚只分布于合浦县沙田镇英罗港海边沙地灌木丛中,缠绕在打铁树 *Myrsine linearis* (Lour.) Poir. 和变叶裸实 *Gymnosporia diversifolia* Maxim. 植株上,其它伴生植物主要有无根藤 *Cassytha filiformis* L.、牛眼睛 *Capparis zeylanica* L.、青皮刺 *C. sepiaria* L.、露兜树 *Pandanus tectorius* Soland.、仙人掌 *Opun-*

tia stricta (Haw.) Haw. var. *dillenii* (Ker Gawl.) L. D. Benson、光叶柿 *Diospyros diversilimba* Merr. et Chun、鹊肾树 *Streblus asper* Lour.、毛马齿苋 *Portulaca pilosa* L.、白鼓钉 *Polycarpea corymbosa* (L.) Lam. 等。值得关注的是,这次发现的肉珊瑚其个体数量稀少,且生长在路边,周边地区正在实施工程建设,随时可能因此而被铲掉、消失。

肉珊瑚是绿色、无叶、肉质的藤本植物,形态独特,其花序聚伞状,花朵晶莹漂亮,且花期长,具有较高的观赏价值。此外,肉珊瑚全株可供药用,具有收敛、止咳、催乳等功效(吴征镒,1990;Gan,2005)。建议开展肉珊瑚的迁地保存或园艺、药用栽培利用,重视与加强海岸带生物多样性保护研究。

参考文献:

- 范航清. 2000. 红树林海岸环保卫士[M]. 广西:科学技术出版社:142-163
- 范航清. 2010. 滨海药用植物[M]. 湖北:科学技术出版社:279-281
- 广东农林学院. 1977. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,63:307-309
- 广东省植物研究所. 1974. 海南植物志[M]. 北京:科学出版社,3:259
- 吴征镒. 1990. 新华本草纲要[M]. 上海:科学技术出版社,3:272
- Gan LS, Yang SP, Fan CQ, et al. 2005. Lignans and their degraded derivatives from *Sarcostemma acidum* [J]. *J Nat Prod*, 68:221-225
- Li PT, Michael GG, Stevens WD. 1995. Asclepiadacea[M]//Wu ZY, Raven PH, Hong DY(eds). Flora of China. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 16:202

(上接第 714 页 Continue from page 714)

- determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphate[J]. *Anal Biol Chem*, 113:313-317
- Lawrence L, Ting KL. 1975. Characterization of the pyridoxal-5'-phosphate and pyridoxamine-5'-phosphate hydrolase activity in rat liver[J]. *J Biol Chem*, 250:8 126-8 131
- Lineweaver HB. 1934. The determination of enzyme dissociation constants[J]. *Am Chem*, 56:658-666
- Margaret LF. 1992. Purification and characterization of vitamin

- B₆-phosphate phosphatase from human erythrocytes[J]. *J Biol Chem*, 22:15 978-15 983
- Mariusz O. 1997. Purification and characterization of acid phosphatase from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds[J]. *Plant Physiol*, 105:1 301
- Masaaki T, Keiko I, Tatsuo H. 2005. Purification and characterization of pyridoxine-5'-phosphate from *Sinorhizobium meliloti* [J]. *Biosci Biol Chem*, 69(12):2 277-2 284