

大豆磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酯酶研究

Ⅲ、非专一性酸性磷酸酯酶的纯化与特性

董登峰, 杨杰, 江立庚, 陈念平

(广西大学农学院, 广西南宁 530005)

摘要: 从大豆叶片中分离能水解磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的酸性磷酸酯酶, 通过硫酸铵分部(20%~50%饱和度)沉淀、DEAE-纤维素层析、刀豆球蛋白琼脂糖凝胶亲和层析将酶纯化了 422.47 倍, 活性达 78.16 U/mg 蛋白。该酶对 PEP 专一性不强, K_m 为 1.09 mmol/L(PEP), 最适 pH5.8, 在 pH4.8~7.0 范围内及 60℃ 以下较稳定, 水解 PEP 的活性被 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 激活, F^- 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 MoO_4^{2-} 及 3-磷酸甘油酸(3-PGA)、三磷酸腺苷 ATP 等代谢物抑制, 受异柠檬酸等有机酸影响较小。

关键词: 大豆; 非专一性酸性磷酸酯酶; 纯化; 特性

中图分类号: Q556.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)05-0472-05

Study on soybean phosphoenolpyruvate phosphatase(PEPP) Ⅲ. Purification and characterization of nonspecific acid phosphatase

DONG Deng-feng, YANG Jie, JIANG Li-geng, CHEN Nian-ping

(Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: An acid phosphatase hydrolyzing phosphoenolpyruvate(PEP) has been isolated from soybean leaves and purified 422.47-fold, to a final specific activity of 78.16 U/mg proteins, through Ammonium sulfate fraction precipitation(20%~50% saturation), DEAE-cellulose chromatography and Concanavalin A sepharose affinity chromatography. This enzyme shows low specificity for phosphoenolpyruvate(PEP); its K_m is 1.09 mmol/L and optimum pH15.8. It is relatively stable at the pH ranging from 4.8 to 7.0 and at temperature below 60℃. The enzyme activity is activated by Mg^{2+} , Mn^{2+} and inhibited by F^- , Cu^{2+} , Zn^{2+} , PO_4^{3-} , MoO_4^{2-} and some metabolites such as 3-PGA, other than organic acids such as isocitrate.

Key words: soybean; nonspecific acid phosphatase; purification; characterization

植物中广泛存在磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酯酶(PEPP), 其作用被认为是将 PEP 直接水解成丙酮酸释放 P_i , 提供了一条支路绕过消耗 P_i 的丙酮酸激酶(PK)途径, 维持植物缺磷条件下的 EMP-TCA 这一基本代谢的运转(Duff 等, 1994)。不同来源的 PEPP 性质相差较大, Duff 等(1989; 1991)先后从黑

芥悬浮细胞中纯化了两种能水解 PEP 的酸性磷酸酯酶, 其最适 pH 都是 5.6, 但其温度稳定性、亚基结构、底物专一性等相差很大, 亚细胞定位也不同, 因而推测其功能也不一样, Malhotra 等(1990)从萌发的绿豆中纯化 PEPP, 最适 pH 为 8.5, 郭振飞(1994a, b)从水稻叶片中纯化两种水解 PEP 的磷酸

收稿日期: 2004-09-06 修订日期: 2005-02-24

基金项目: 国家自然科学基金(30070453); 广西大学博士启动基金(DD160008)(Supported by the National Natural Science Foundation of China, Grant No. 30070453; Initial Foundation to Ph. D of Guangxi University No. DD160008)。

作者简介: 董登峰(1971-), 男, 湖北京山人, 博士, 副教授, 从事植物逆境生理和酶工程研究。

酯酶,一种最适 pH 为 5.3,专一性差,另一种最适 pH 8.7,专一性较强。我们以大豆叶片为材料纯化 PEPP,过 DEAE-纤维素柱时得到两个活性峰,随后研究证实一个是非专一性的酸性磷酸酯酶(AP),一个是专一性较强的 PEPP。本文报道非专一性的酸性磷酸酯酶的部分特性。

1 材料与方 法

1.1 材料种植

以大豆品种 BX10 为材料,严格挑选大小一致的饱满种子,用 30% 的 H_2O_2 表面消毒 5 min,先后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,播种于干净湿润的细河沙中催芽,待两片子叶展出后移栽到 3 L 的塑料盆中。每盆 20 株,置于网室用 1/5 强度 Hoagland 营养液(含 1 mmol/L KNO_3 ; 1 mmol/L $Ca(NO_3)_2$; 0.4 mmol/L $MgSO_4$; 0.2 mmol/L KH_2PO_4 ; 20 μ mol/L EDTAFe(Ⅲ)Na; 46 μ mol/L H_3BO_3 ; 9 μ mol/L $MnCl_2$; 0.3 μ mol/L $CuSO_4$; 0.3 μ mol/L $ZnSO_4$; 0.0728 μ mol/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)自然培养至第三复叶,整个材料培养过程中每 2 d 换一次营养液,每天 7:30 及 19:00 各调一次 pH 使之保持在 6.0 ± 0.5 ,用气泵间歇供气,调节断电控制器使每小时打气 20 min,调节通气筏使每钵气流大小一致。

1.2 PEPP 酶活性的测定

(1)以 PEP 为底物的活性按 Plaxton 等(1990)方法略作修改:1 mL 反应体系中含有 50 mmol/L MES-KOH 缓冲液(pH6.5),2 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸环己亚胺盐,50 mmol/L KCl,10 mmol/L $MgCl_2$,0.2 mmol/L NADH,1 mmol/L DTT,0.2 mg/mL BSA,2IU 兔肌乳酸脱氢酶及适量酶液,反应温度 30 $^{\circ}C$,由酶液启动反应。仪器自动记录 340 nm 波长处吸光值的变化并计算斜率,扣除 NADH 氧化酶活性(即上述体系中不含磷酸烯醇式丙酮酸环己亚胺盐时的测定值),1U 定义为每分钟消耗 1 μ mol 的 NADH。测定酶的性质时根据具体研究目标做相应的改变。

(2)非 PEP 为底物的活性(仅用于研究酶的底物专一性):按 Duff 等(1991)方法,反应缓冲体系改为 MES-KOH(pH5.8,为本酶最适 pH),1U 定义为每分钟释放 1 μ mol 的 P_i 。

(3)蛋白质含量按 Bradford(1976)的方法测定,

以牛血清蛋白作标准。

1.3 PEPP 的提取和部分纯化

1.3.1 酶的提取 称取大豆叶片 100 g,洗净、沥干,加入 160 mL 预冷的提取液即 25 mmol/L MES-KOH 缓冲液(pH6.5,含 2 mmol/L EDTA,4 mmol/L $MgCl_2$,14 mmol/L 巯基乙醇),迅速匀浆,尼龙布过滤,滤液离心(10 000 g,10 min,4 $^{\circ}C$),上清液即为酶粗提液。

1.3.2 硫酸铵分部 上清液缓慢加入固体 $(NH_4)_2SO_4$ 至 20% 饱和度,离心(10 000 g,10 min,4 $^{\circ}C$),弃沉淀,上清液再缓慢加入固体 $(NH_4)_2SO_4$ 至 50% 饱和度,离心(10 000 g,10 min,4 $^{\circ}C$),弃上清液,沉淀用 25 mmol/L MES-KOH 缓冲液(pH6.5,含 2 mmol/L $MgCl_2$)悬浮,装入透析袋中对相同的缓冲液透析至 Nessler's 试剂检测不到 NH_4^+ 为止,离心(10 000 g,10 min,4 $^{\circ}C$)弃沉淀。

1.3.3 DEAE-纤维素柱层析 上清液过 DEAE-纤维素柱(1.5 cm \times 15 cm)(经用 25 mmol/L MES-KOH 缓冲液(pH6.5,含 2 mmol/L $MgCl_2$)预处理的),先用含 0、0.1 mol/L KCl 的上述缓冲液洗涤至流出液 $A_{280} < 0.05$,然后用 400 mL 含 0.1~0.5 mol/L KCl 的上述缓冲液线性梯度洗脱,流速为 0.75 mL/min,每管收集 5 mL,检测各管蛋白含量和酶活性,得到两个酶活性峰。

1.3.4 刀豆球蛋白琼脂糖亲和柱层析 合并第 15~23 管(即第 1 个峰),上 ConA-Sepharose 亲和柱(0.5 cm \times 5 cm)(经过 5 mmol/L 的 PBS(pH6.5,含 1 mmol/L KCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L $CaCl_2$ 、1 mmol/L $MnCl_2$)平衡过的),先用平衡缓冲液洗涤至流出液 $A_{280} < 0.05$ 后,再用 30 mL 含 50~500 mmol/L 甘露糖的平衡缓冲液梯度洗脱,每管收集 1 mL,检测各管蛋白含量和酶活性,合并活性部分。

2 结果与分析

2.1 酶的纯化

经过粗提、硫酸铵沉淀、过 DEAE-纤维素柱层析柱时得到两个蛋白质峰和两个 PEPP 活性峰,第一个活性峰略提前于第一个蛋白峰,第二个活性峰为专一性磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酯酶(另文待发),活性峰尖与第二个蛋白峰尖基本重叠(图 1)。

合并第一个活性峰(第15~23号管)进行刀豆球蛋白琼脂糖亲和柱层析,酶被纯化了422.47倍,达78.16 U/mg protein(表1)。该酶能被ConA亲和和吸附,表明该酶为糖蛋白。PEPP和PK不易分离,

Podesta等(1991)证实Malhotra和Kayastha从绿豆中纯化的PEPP和PK是同一蛋白质,我们在反应体系(pH7.2)中加入2 mmol/L ADP,没有检测出PK活性,证明所纯化的酶不是PK。对该酶进行400~600 nm波长的扫描,该酶在550 nm附近没有吸收峰,表明该酶也不是紫色酸性磷酸酯酶(LeBansky等,1992)。

2.2 酶的生化特性

2.2.1 最适pH及pH稳定性 在不同pH的缓冲液(pH4~5.4用HAc-NaAc缓冲系,pH5.5~6.7用MES缓冲系,pH6.8~8.2用HEPES缓冲系)中测定酶的活性,结果表明该酶pH活性宽,最适pH为5.8。将酶置于不同pH缓冲液中5 h(4℃)后,在最适pH5.8的缓冲液中测定酶活性,与放置前的活性比较,结果表明该酶在pH6.0~7.4范围内较稳定(图2)。

2.2.2 热稳定性 将酶置于0.5 mL离心管不同温度干浴10 min后,迅速插入冰中冷却,测定酶活性,

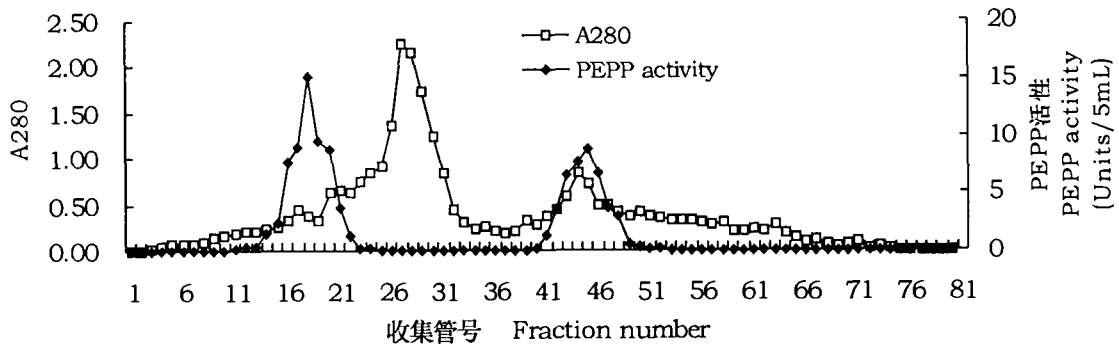


图1 大豆叶片非专一性酸性磷酸酯酶过DEAE-纤维素柱层析洗脱

Fig. 1 Elution profile of soybean leaves nonspecific AP on DEAE-cellulose chromatography

表1 大豆叶片非专一性酸性磷酸酯酶的纯化

Table 1 Purification of nonspecific acid phosphatase from soybean leaves

纯化步骤 Steps	总蛋白质 Total protein (mg)	总活性 Total activity (Units)	比活性 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification (fold)	回收率 Yield (%)
粗提液 Crude extract	2329.48	430.95	0.18	1.00	100.00
硫酸铵分部(20%~50%饱和度) Ammonium sulfate fraction(20%~50% saturation)	554.09	290.12	0.52	2.83	67.32
DEAE-纤维素柱层析 DEAE-cellulose chromatography	13.56	47.74	3.52	19.03	11.08
刀豆球蛋白琼脂糖凝胶柱层析 ConA sepharose chromatography	0.12	9.31	78.16	422.47	2.16

结果表明该酶较耐热,在60℃以下温度较稳定,至60℃仍保持有76%的活性(图3)。

2.2.3 米氏常数(K_m)及最大反应速度(V_{max}) 测定0.05~2 mmol/L浓度梯度的PEP底物反应速度,以浓度的倒数对速度的倒数作图,该酶的 K_m 为1.09 mmol/L, V_{max} 为188.68 U/mg protein,专一性常数为173.1(图4)。

2.2.4 酶的底物专一性 以含有磷酸酯键不同的底物(0.05~2 mmol/L)代替PEP反应,测定 P_i 的释放作为酶的活性,以浓度的倒数对速度的倒数作图,

计算该酶的对不同底物的 K_m 和 V_{max} 。该酶合成底物pNPP催化活性最高,对ATP亲和力最强,对PEP专一性不及pNPP和3-PGA强(表2)。

2.2.5 离子及代谢物对酶活性的影响 在含1 mmol/L PEP(K_m 浓度底物)的HEPES-KOH缓冲液(pH5.8)中分别加入不同的离子,测定纯化酶的活性,结果表明 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 激活AP活性, Fe^{2+} 、 F^- 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 MoO_4^{2-} 抑制PEPP活性,其中 MoO_4^{2-} 抑制作用最强,仅加入0.5 mmol/L就完全失活,而 F^- 抑制作用弱,加入50 mmol/L仍有

50%活性,可见在测定丙酮酸激酶(PK)活性时加入 MoO_4^{2-} 来消除 PEPP 的干扰要比 F 有效(表 3)。

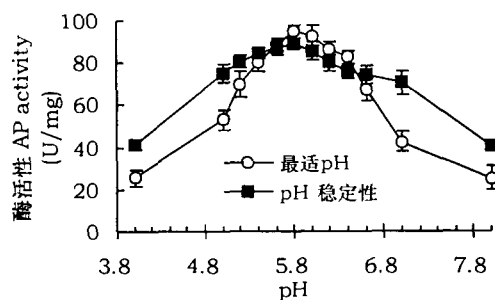


图 2 pH 对大豆叶片 AP 活性及稳定性的影响
Fig. 2 Effect of pH on the activity and stability of AP from soybean leaves

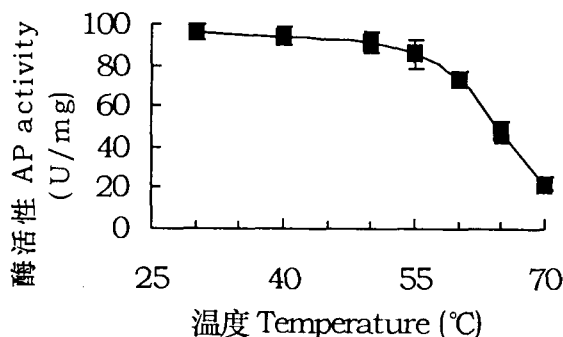


图 3 温度对大豆叶片 AP 稳定性的影响
Fig. 3 Effect of temperature on the stability of AP from soybean leaves

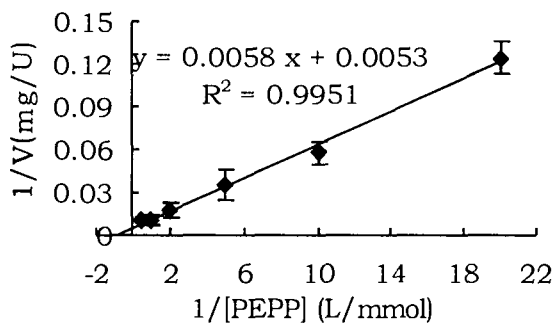


图 4 大豆叶片酸性磷酸酯酶的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 4 Lineweaver-Burk plot for AP purified from soybean leaves

本实验用以研究专一性的代谢物都抑制该酶对 PEPP 的催化活性,抑制效果都在 50%以上,其中 2 mmol/L 的 3-PGA 完全抑制。几种有机酸则对 PEPP 抑制效果较小,这与我们前期的结果一致:缺磷和铝毒诱导大豆大量分泌苹果酸、草酸和柠檬酸,但体内内源有机酸含量较维持较高的稳定水平而

PEPP 活性增加近 5 倍(Dong 等,2004)。

表 2 大豆叶片酸性磷酸酯酶的底物专一性
Table 2 Substrate specificity of purified acid phosphatase from soybean leaves

底物 Sbstrate	最大反应速度 Vmax (U/mg)	米氏常数 Km (mmol/L)	专一性常数 Specificity constant (Vmax/Km)
对硝基苯磷酸 pNPP	327.56	0.85	385.36
3-磷酸甘油酸 3-PGA	143.66	0.78	184.18
磷酸烯醇式丙酮酸 PEP	188.68	1.09	173.10
三磷酸腺苷 ATP	85.24	0.57	149.54
二磷酸腺苷 ADP	98.25	0.93	105.65
焦磷酸 Ppi	74.26	1.02	72.80
6-磷酸葡萄糖 G-6-P	25.64	1.21	21.19
植酸 Phytate	23.12	1.56	14.82
6-磷酸果糖 F-6-P	14.22	2.05	6.94

表 3 离子和代谢物对大豆叶片酸性磷酸酯酶活性的影响
Table 3 Effects of ions and metabolites on the activity of AP purified soybean leaves

离子和代谢物 Ions and metabolites	浓度 Concen- tration (mmol/L)	酶活性 AP activity (U/mg)	相对活性 Relativity activity (%)
离子 对照 Control	—	76.38±7.54	—
Ions MgCl ₂	5	94.33±6.11	123.50
MnCl ₂	5	107.64±5.84	140.93
FeSO ₄	5	57.35±3.06	75.09
KF	50	38.25±3.25	50.08
CuSO ₄	5	51.27±5.56	67.12
KH ₂ PO ₄	2	13.37±1.72	17.50
ZnSO ₄	5	44.83±3.87	58.69
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0.5	0±0	0
代谢物 对照 Control	—	93.82±6.22	—
Metabo- 三磷酸甘油酸 3-PGA	2	0±0	0
lites 三磷酸腺苷 ATP	2	62.78±7.06	66.92
二磷酸腺苷 ADP	2	57.56±4.68	61.35
焦磷酸 PPI	2	78.45±4.38	83.62
6-磷酸葡萄糖 G-6-P	2	76.22±9.15	81.24
植酸 Phytate	5	84.33±5.79	89.88
6-磷酸果糖 F-6-P	2	69.54±6.40	74.12
草酸 Oxalate	5	82.68±3.96	88.13
柠檬酸 Citrate	5	88.33±5.28	94.15
苹果酸 Malate	10	86.54±5.72	92.24
异柠檬酸 Isocitrate	5	90.82±4.97	96.80

3 讨论与小结

根据最适 pH 将磷酸酯酶分为酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶,植物碱性磷酸酯酶(如 6-磷酸蔗糖磷酸酯酶,1,6-二磷酸果糖磷酸酯酶)常具有绝对专一性,而酸性磷酸酯酶专一性不强(Duff 等,1994)。从黑芥悬浮细胞中纯化得到的两种分解 PEP 的磷

酸酯酶,最适 pH 都为 5.6,属于酸性磷酸酯酶,都受 Pi 强烈抑制,其中一种对 PEP 的亲系数大,有较强的专一性,定位于液胞中,作用可能是再利用体细胞内的磷,另一种对 PEP 不专一,定位于细胞壁,作用可能是分泌到胞外后分解利用有机磷脂(Duff 等,1989;1991)。从绿豆(Malhotra 等,1990)和水稻(郭振飞等,1994a)中纯化的 PEPP 性质相似,属于碱性磷酸酯酶,最适 pH 分别为 8.5 和 8.7,不受 Pi 影响,本文首次从大豆叶片分离纯化出水解 PEP 的酸性磷酸酯酶,其最适 pH 5.8,有较宽的 pH 催化范围和热稳定性,被 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 所激活,受 MoO_4^{2-} 、 F^- 及较低浓度 PO_4^{3-} 所抑制,以及水解对硝基苯磷酸(pNPP)和 3-磷酸甘油酸(3-PGA)表现出较高的催化速度和专一性,能被刀豆球蛋白亲和吸附等,这些特性都与黑芥分泌型酸性磷酸酯酶相似,但与之也有很大差异: F^- 和 PO_4^{3-} 也不能完全抑制大豆 AP 的活性,此外其对 PEP、pNPP、3-PGA 的 K_m 值都比黑芥 AP 高出 15~20 倍(Duff 等,1989)。

大豆 AP 对 PEP 的亲合力低,其 K_m 值(1.09 mmol/L)远大于黑芥,也高于细胞内 PEP 浓度(Malhotra 等,1990)和 PK 对 PEP 的 K_m 值(郭振飞等,1994a),可见大豆 AP 可能要分泌到细胞外起作用,即使在细胞体内其活性也要受到细胞内 PEP 浓度的调控,不能像黑芥 PEPP 那样与 PK 竞争 PEP 而独立起作用,只有在 PK 主路受阻、细胞内 PEP 积累并且 Pi 浓度降低到对 AP 抑制作用较小后才激发,与此推测相符的是缺磷培养的长春花(*Catharanthus roseus*)悬浮细胞内 PK 的两个共底物 ADP 和磷含量分别比对照低 8 倍和 200 倍,而此时磷含量(0.03 mmol/L)对 AP 的抑制作用也相对较小(Ukaji 等,1987)。

酸性磷酸酯酶主要定位于液胞中(Duff 等,1994),但胞质溶浆(Chen 等,1988)和叶绿体(Mulligan 等,1980)等细胞器中也存在,其最适酸性 pH 并不排斥其在非酸性的环境中起作用。由于大豆 AP 专一性不强,并且对 3-PGA 亲合力及专一性常数比 PEPP 还高,本实验所纯化的酶是否为 3-PGA 磷酸酯酶,抑或并非单一蛋白? 该酶的性质与 Randall 等(1971)从甘蔗叶中纯化的性质不同,经非变性 PAGE 凝胶电泳也证实为单一的蛋白带(资料未列出),进一步的免疫检测以及组织分布、亚细胞定位、专一性、酶蛋白的分子特性、活性中心及精细调控等研究在进行中。

参考文献:

- 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 Biochem*, **72**: 248-254.
- Chen C, Chen SC. 1988. Evidence of acid phosphatase in cytoplasm as a distinct entity[J]. *Arch Biochem Biophys*, **262**: 427-438.
- Dong DF, Peng XX, Yan XL. 2004. Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminum toxicity in two contrasting soybean genotypes[J]. *Physiol Plant*, **122**(2): 190-199.
- Duff SMG, Sarst G, Plaxton WC. 1994. The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism[J]. *Physiol Plant*, **90**: 791-800.
- Duff SMG, Lefebvre DD, Plaxton WC. 1989. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells[J]. *Plant Physiol*, **90**: 734-741.
- Duff SMG, Lefebvre DD, Plaxton WC. 1991. Purification, characterization, and subcellular localization of an acid phosphatase from black mustard cell-suspension cultures: comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase [J]. *Arch Biochem Biophys*, **286**: 226-232.
- Guo ZF(郭振飞), Xu CJ(徐昌杰), Lu SY(卢少云). 1994a. Phosphoenolpyruvate phosphatase activity and partial properties in rice leaves. (水稻叶片磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酯酶活性及其部分特性)[J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, **36**(9): 703-708.
- Guo ZF(郭振飞), Xu CJ(徐昌杰), Lu SY(卢少云). 1994b. Acid phosphatase activity and partial properties in rice leaves. (水稻叶片酸性磷酸酯酶活性及其部分特性)[J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, **2**(1): 51-57.
- LeBansky BR, McKnight TD, Lawrence LR. 1992. Purification and characterization of a secreted purple phosphatase from soybean suspension cultures[J]. *Plant Physiol*, **99**: 391-395.
- Malhotra OP, Kayastha AM. 1990. Isolation and characterization of phosphoenolpyruvate phosphatase from germinating mungbeans(*Vigna radiata*)[J]. *Plant Physiol*, **93**: 194-200.
- Mulligan RM, Tolbert NE. 1980. Properties of a membrane bound phosphatase from the thylakoids of spinach chloroplasts[J]. *Plant Physiol*, **66**: 1169-1173.
- Plaxton WC. 1990. Glycolysis[A]. In: Lea PJ(ed). *Methods in Plant Biochemistry*[M]. London: Academic Press, **3**: 145-173.
- Podesta FE, Plaxton WC. 1991. Association of phosphoenolpyruvate phosphatase activity with the cytosolic pyruvate kinase of germinating mung beans[J]. *Plant Physiol*, **97**: 1329-1333.
- Randall DD, Tolbert NE. 1971. 3-Phosphoglycerate phosphatase in plants. I. Isolation and characterization from sugar cane leaves[J]. *J Biol Chem*, **246**: 5510-5517.
- Ukaji T, Ashihara H. 1987. Effect of inorganic phosphate on synthesis of 5-phosphoribosyl-pyrophosphate in cultured plant cell[J]. *Int J Biochem*, **19**: 1127-1131.