热带亚热带植物学报　　1994,2(1):51－57
Journal of Tropical and Subtropical Botany

水稻叶片酸性磷酸酯酶活性及其部分特性

郭振飞　徐昌杰　卢少云　王炜军　李明启
（华南农业大学光合作用研究室，广州　510642）

摘　要

从水稻叶片部分纯化了水解磷酸烯醇式丙酮酸的磷酸酯酶，其 K_m（PEP）为 0.1mmol/L，最适 pH 5.3，在偏酸性 pH 条件下（pH4.0～7.2）稳定，对热亦较稳定，酶活性受 Pi 强烈抑制。它对其底物要求不专一，能水解多种含磷酯键的化合物，表明它是一种非专一性的酸性磷酸酯酶。各种含磷酯键的代谢物对酶活性起竞争性抑制作用，且表现出叠加性。Cu^{2+}、Zn^{2+}和 Fe^{2+}抑制酶活性，Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+}、Co^{2+}和 EDTA 无影响。

关键词：水稻叶片；酸性磷酸酯酶；调节

植物中存在水解磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）的磷酸酯酶活性，它常伴随丙酮酸激酶（PK）存在，干扰 PK 的测定，难以将两者分离[1,6,12,17]。最近有人提出，PEP 磷酸酯酶在植物代谢中的重要作用是提供了一条从 PEP 转化为丙酮酸的交替途径[16]。Duff 等在 1989 年首次从黑芥（*Brassica nigra*）细胞纯化了 PEP 磷酸酯酶，其最适 pH 为 5.3[4]。Malhotra 和 Kayastha 从绿豆种子纯化了 PEP 磷酸酯酶，其最适 pH 为 8.5[11]。我们对水稻叶片中能水解 PEP 的磷酸酯酶进行了部分纯化，经底物专一性研究证明为非专一性的酸性磷酸酯酶。本文报告这些结果。

材料与方法

材料　由华南农业大学农学系提供水稻早香占（*Oryza sativa* L. cv. Zao Xiangzhan）种子。将稻种浸种 2d 后播种于瓷盘内，生长至二叶期后以 Hoagland 营养液培养至三叶期。

磷酸酯酶的提取及部分纯化　剪取 30g 水稻叶片，按 Malhotra 和 Kayastha 方法[11]提取粗酶液。加入 0.1mol/L HCl 调至 pH4.5，于 9 000 rpm 离心 20min，上清液调回 pH6.7；加入硫酸铵粉末，取 35%至 50%饱和度的沉淀，以 10mmol/L 咪唑（pH6.7）悬浮后，过 Sephadex G－50 柱（1.5×45cm），收集酶活性峰部分，盛于透析袋内，以 PEG 浓缩后上 DEAE-Sepharose 柱（1.5×45cm）以含 0～0.5mol/L KCl 的咪唑（pH6.7）缓冲液洗脱，收集酶活性峰部分，为测定酶液。

磷酸酯酶活性测定　（1）按 Kachmar 和 Boyer 方法[10]测定丙酮酸的生成量。反应介质含 80mmol/L 的乙酸缓冲液（pH5.3），2mmol/L PEP，10mmol/L $MgSO_4$，加入酶液启动反应，总体积 1ml。以不加 PEP 为对照。于 37℃水浴中反应 10min 后，加入 1ml 的 0.125% 2,4-二硝基苯肼（溶于 2mol/L HCl）中止反应。再加入 1ml 和 2.4mol/L NaOH（含 2mmol/L EDTA），摇匀

1993-09-10　收稿；1993-12-06　修回

后静置，取上清液于 510nm 处比色。以系列浓度丙酮酸钠溶液为标准，测定标准曲线。以 37℃时每 min 催化生成 1μmol/L 丙酮酸的酶量为 1 个活性单位。(2)测定 Pi 的生成量。按与(1)相同方法于 37℃反应 10min 后，参照 Duff 等的方法[4]进行测定，用以研究酶的底物专一性。

蛋白质含量测定 按 Bradford 考马斯亮蓝法[3]测定。

结 果

一、酶的纯化

经过粗提、酸变性、硫酸铵沉淀、Sephadex G-50 柱层析和 DEAE-Sepharose 柱层析等步骤，酶被纯化了 70.7 倍（表 1）。进一步纯化，过 SP-Sephadex G-50 柱，引起了酶的失活。

表 1 水稻叶片磷酸酯酶的纯化

Table 1 Purification of phosphatase from rice leaves

步骤 Fraction	总蛋白 Total protein (mg)	总活性 Total activity (U)	比活性 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification (fold)	回收 Recovery (%)
粗酶液 Crude extract	284.76	39.12	0.137	1	100
pH 4.5	74.30	38.06	0.512	3.7	97.3
硫酸铵沉淀 $(NH_4)_2SO_4$ precipitation	2.23	3.98	1.78	13.0	10.2
Sephadex G-50	0.73	2.09	2.86	20.8	5.4
DEAE-Sepharose	0.13	1.26	9.69	70.7	3.2

二、底物 K_m 值

酶对 PEP 表现为米氏动力学特征，以双倒数作图法测定出它的 K_m (PEP) 为 0.1mmol/L（图 1）。

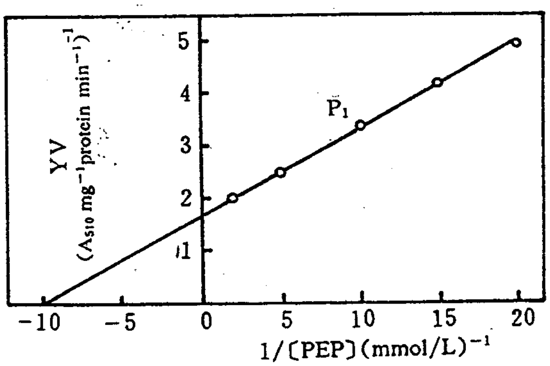

图 1 水稻叶片磷酸酯酶活性对 PEP 浓度的双倒数图

Fig. 1 Double reciprocal plot of the phosphatase from rice leaves against PEP concentrations

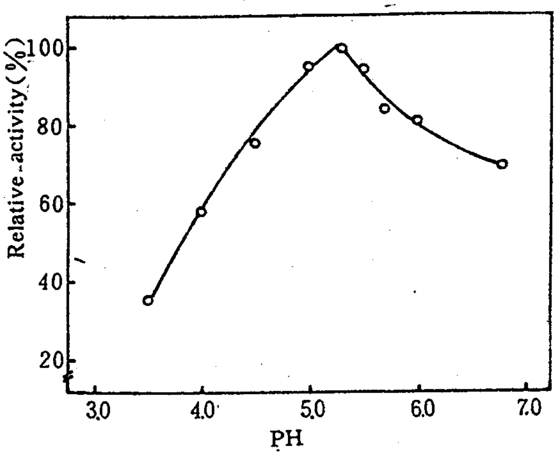

图 2 pH 对水稻叶片磷酸酯酶活性的影响

Fig. 2 Effect of pH on the activity of phosphatase from rice leaves

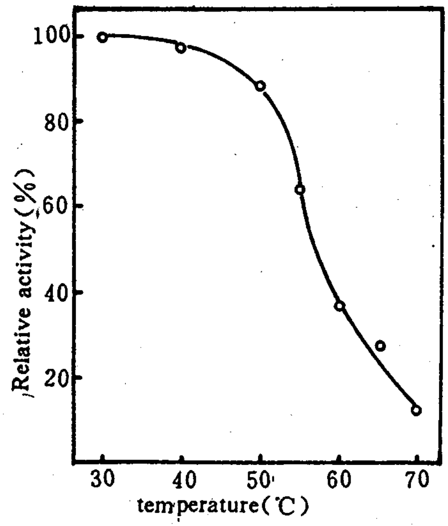

图3　温度对水稻叶片磷酸酯酶活性的影响

Fig. 3　Effect of temperature on the activity of phosphatase from rice leaves

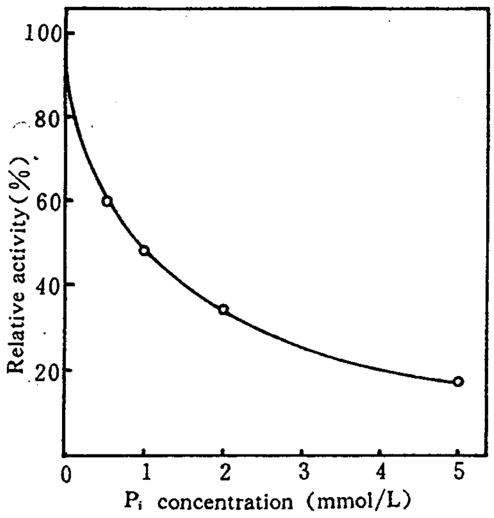

图4　Pi对水稻叶片磷酸酯酶活性的影响

Fig. 4　Effect of Pi on the activity of phosphatase from rice leaves

三、pH对酶活性和酶稳定性的影响

于不同pH的乙酸缓冲液介质中测定酶活性，结果表明，在pH4.0～6.5范围内，酶活性保持在最大活性的60%以上，最适pH为5.3（图2）。

将酶液于系列pH的缓冲液中置4℃4h后，吸取酶液于37℃测定活性。结果表明，酶在pH4.0～7.2范围内较稳定，维持最大活性的95%以上。

四、热稳定性

将酶液于不同温度水浴中保温5min后，迅速冷却至4℃，吸取酶液于37℃测定活性。在50℃以下时，酶较稳定，大于50℃引起酶急剧失活（图3）。

五、Pi对酶活性影响

在K_m浓度PEP条件下，测定了不同浓度Pi对酶活性的影响。结果表明，Pi强烈抑制酶活性，1.0mmol/L Pi抑制活性52%，5.0mmol/L Pi抑制达80%（图4）。

六、底物专一性

以各种磷酸酯代谢物为底物测定酶活性，结果表明，该酶对底物专一性较小，能水解多种含磷酯键的化合物，其中以对PEP、磷酸乙醇酸、3-磷酸甘油酸和焦磷酸（PPi）的水解能力较强（表2）。而黑芥PEP磷酸酯酶对PEP的专一性常数比其它底物的高6倍[4]，绿豆种子PEP磷酸酯酶对PEP的水解能力也明显高于对其它磷酸酯的水解[11]。水稻叶片的磷酸酯酶对其它几种磷酸酯代谢物的专一性差异不大，与黑芥非专一性的酸性磷酸酯酶相似[5]，说明该酶是一种非专一性的酸性磷酸酯酶。

表 2 水稻叶片磷酸酯酶的底物专一性

Table 2 Substrate specificity of the phosphatase from rice leaves

底物 Substrate*	相对活性 Relative activity (%)
磷酸烯醇式丙酮酸 PEP	100
磷酸乙醇酸 P-glycolate	100
3-磷酸甘油酸 3-PGA	90
焦磷酸 PPi	92
ATP	68
ADP	68
果糖-6-磷酸 F-6-P	42
果糖-1，6-二磷酸 F-1，6-P_2	32
葡萄糖-6-磷酸 G-6-P	51
AMP	25

* 所有底物浓度均为 2mmol/L

All concentrations were 2 mmol/L

七、代谢物对酶活性的影响

在 PEP 浓度为 0.1mmol/L 时，测定了各种代谢物对酶活性影响。一些具有抑制作用的代谢物列于表 3。以双倒数作图法测定了一些代谢物的抑制机制和以 Dixon 作图法测定了它们的抑制常数（表 3），它们均表现为竞争性抑制，抑制常数比黑芥 PEP 磷酸酯酶的大[4]。此外，5mmol/L 的柠檬酸、异柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、NH_4^+、Ala、Asp、Asn、Cys、Glu、Gln、Phe、Thr、Lys 和 Ser 对水稻叶片酸性磷酸酯酶活性无影响。

表 3 各种代谢物对水稻叶片酸性磷酸酯酶活性的影响

Table 3 Effects of various metabolites on the activity of acid phosphatase from rice leaves

代谢物 Metabolites (mmol/L)	相对活性 Relative activity (%)	抑制常数 Ki (mmol/L)	抑制类型 Pattern of inhibition
对照 Control	100		
焦磷酸 PPi (2)	11	0.11	C*
ATP (2)	34	0.38	C
磷酸 Pi (2)	35	0.14	C
ADP (2)	36	0.39	C
果糖 1，6-二磷酸 F-1，6-P_2 (2)	39	0.38	C
3-磷酸甘油酸 3-PGA (2)	49	0.30	C
磷酸乙醇酸 P-glycolate (2)	52		
果糖-2，6-二磷酸 F-2，6-P_2 (2)	56		
α-酮戊二酸 (5) α-Ketoglutarate	66		
葡萄糖-6-磷酸 G-6-P (2)	71		
果糖-6-磷酸 F-6-P (2)	72		
AMP (2)	76		
草酸 Oxalate (5)	83		

* Competitive 竞争性

我们还测定了一些代谢物对酶活性影响的相互作用，发现它们的抑制作用具有叠加性，两

种代谢物共同对酶的抑制作用大于它们的单独作用（表4）。

八、一些金属离子的影响

在测定介质中不含 Mg^{2+}、PEP 浓度 0.1mmol/L 条件下，测定了几种二价金属离子和 EDTA 对磷酸酯酶活性的影响，5mmol/L 的 Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+}、Co^{2+}和 EDTA 对酶活性无影响，Cu^{2+}、Zn^{2+}和 Fe^{2+}分别抑制酶活性 49%、36%和 16%。这与 Mg^{2+}、Ca^{2+}、Co^{2+}和 Mn^{2+}激活黑芥 PEP 磷酸酯酶活性的结果[4]不同。

表4　代谢物对水稻叶片酸性磷酸酯酶的叠加效应

Table 4　Additive effects of various metabolites on the activity of acid phosphatase from rice leaves

代谢物 Metabolites	抑　制 Inhibition（%）
焦磷酸 PPi（0.05）	11.9
果糖-6磷酸 F-6-P（0.5）	8.2
ADP（0.2）	18.0
AMP（1.0）	18.8
磷　酸 Pi（0.1）	18.5
+焦磷酸 PPi（0.05）	30.7
+3-磷酸甘油酸 3-PGA（0.2）	30.1
+果糖-6-磷酸 F-6-P（0.5）	29.4
+葡萄糖-6-磷酸 G-6-P（0.5）	20.8
+ATP（0.1）	24.1
+ADP（0.2）	27.4
+AMP（1.0）	29.3
3-磷酸甘油酸 3-PGA（0.2）	12.5
+焦磷酸 PPi（0.05）	23.0
+果糖-6-磷酸 F-6-P（0.5）	19.6
+葡萄糖-6-磷酸 G-6-P（0.5）	18.0
+ATP（0.1）	25.6
+ADP（0.2）	25.1
ATP（0.1）	17.2
+焦磷酸 PPi（0.05）	25.7
+ADP（0.2）	34.6
+AMP（1.0）	32.5

讨　论

Duff 等分别从黑芥悬浮细胞分离出两种磷酸酯酶（A 和 B），并分别进行了提纯。磷酸酯酶 A 为非专一性的酸性磷酸酯酶，磷酸酯酶 B 为对 PEP 较专一的 PEP 磷酸酯酶[4,5]。它们都有水解 PEP 的活性，而且亲和力相同（$K_m = 0.05$mmol/L），都受 Mg^{2+}激活，等电点和最适 pH 也相同，但它们对底物的专一性表现出差异：磷酸酯酶 B 对 PEP 的专一性常数（V_{max}/K_m）比对其它底物的高 6 倍以上，不能水解 PPi（0.5mmol/L）；磷酸酯酶 A 则对 PPi 具有较高的亲和力和专一性常数[4,5]。

本试验从水稻叶片部分提纯了具有水解 PEP 活性的磷酸酯酶，其 K_m(PEP)为0.1mmol/L，最适 pH 5.3，对热较稳定，受 Pi 强烈抑制，它对底物要求不专一。这些结果与黑芥细胞的非专一性酸性磷酸酯酶的性质相似[5]。Huang 等[9]以电泳法证明水稻叶片存在 2 种酸性磷酸酯

酶，其最适 pH 5.0 受 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$、NaF、$CuSO_4$ 和 KH_2PO_4 强烈抑制，不受 $CaCl_2$、KCl、Na_2-EDTA 和 $MnSO_4$ 影响。烟草叶片的酸性磷酸酯酶也具类似性质[15]。本文也观察到 Mn^{2+}、Ca^{2+} 和 EDTA 对酶活性无影响，Cu^{2+}、Pi 强烈抑制酶活性，与酸性磷酸酯酶性质相似[9,15]。结果表明，本试验提取的磷酸酯酶不是对 PEP 专一性的 PEP 磷酸酯酶，而是非专一性的酸性磷酸酯酶。

关于植物酸性磷酸酯酶，已有较多研究，它在 Pi 的产生和转运中起重要作用。环境胁迫如 Pi 亏缺、水分和盐胁迫等引起酸性磷酸酯酶活性升高许多倍[2,7,8,13,14]。本文报道各种代谢物对水稻叶片 酸性磷酸酯酶的抑制作用具有叠加性，这表明在正常条件下，酶活性在体内可能受到强烈抑制，只有在环境发生变化时，如 Pi 亏缺或各种胁迫，才表现较高活性，有利于代谢途径的正常运转。

参 考 文 献

1 Baysdorfer C, Bassham J A. Spinach pyruvate kinase isoforms. Plant Physiol, 1984; 74: 374—379

2 Bhargava R, Sachar R C. Induction of acid phosphatases in cotton seedlings: enzyme purification, sub—unit structure and kinetic properties. Phytochemistry, 1987; 26: 1293—1297

3 Bradford M A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein—dye binding. Anal Biochem, 1976; 72: 248—254

4 Duff S M G, Lefebvre D D, Plaxton W C. Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. Plant physiol, 1989; 90: 734—741

5 Duff S M G, Lefebvre D D, Plaxton W C. Purification, characterization of an acid phosphatase from black mustard cell—suspension cultures: Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase. Arch Biochem Biophys, 1991; 286: 226—232

6 Duggleby R G, Dennis D T. Pyruvate kinase, a possible regulatory enzyme in higher plants. Plant Physiol, 1973; 52: 312—317

7 Goldstein A H, Danon A, Baertlein D A, Mcdaniel R C. Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. Plant Physiol, 1988; 87: 716—720

8 Hayakawa T, Igaue I, kobayashi K. Acid phosphatase activity and phytase activity of germinatng rice seeds. Bulletin of the Faculty of Agriculture, 1988; 40: 35—46 (Crop Physiol Abst, 1989; 15: 1892)

9 Huang Y F, Ching C C, Chen Y R. Studies on acid phophatase in rice tissues. Taiwania, 1991; 36: 108—116 (Crop Physiol Abst, 1992; 18: 3132)

10 Kachmar J F, Boyer P D. Kinetic analysis of enzyme reactions. J Biol Chem, 1953; 200: 669—682

11 Malhotra O P, Kayastha A M. Isolation and characterization of phosphoenolpyruvate phosphatase from germinating mung bean (*Vigna radiata*). Plant Physiol, 1990; 93: 194—200

12 McCollum R E, Hageman R H, Tyner E H. Occurrence of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate phosphatase in seeds of higher plants. Soil Sci, 1960; 89: 49—51

13 Pan S. Characterization of multiple acid phosphatases from salt stressed spinach leaves. Aust J Plnt Physiol. 1987; 14: 117—124

14 Rossi A, Palma M S, Leone F A, Brigliadar M A. Properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds. Phytochemistry, 1981; 20: 1923—1926

15 Shaw J G. Acid phosphatase from tobacco leaves. Arch Biopchem Biophys, 1966; 117: 1—9

16 Sung S S, Xu D, Galloway C M, Black C C. A reassessment of glycolysis and gluconeogenesis in higher plants. Physiol Plant, 1988; 72: 650—654

17 Tomlinson J D, Turner J F. Pyruvate kinase of higher plants. Biochim Biophys Acta, 1973; 329: 128—139

ACID PHOSPHATASE ACTIVITY AND PARTIAL PROPERTIES IN RICE LEAVES

Guo Zhenfei Xu Changjie Lu Shaoyun Wang Weijun Li Mingqi

(*Laboratory of Photosynthesis Research, Department of Agricultural Biology, South China Agricultural University*, Guangzhou 510642)

Abstract

A phosphatase was partially purified from rice leaves by the steps of acidification (to pH 4. 5), ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-50 chromatography and DEAE-Sepharose chromatography. Its K_m (PEP) was 0. 1 mmol/L with an optimum pH 5. 3, and was heat-stable and lossed few activity in the range of pH 4. 0—7. 2. Its activity was potently inhibited by Pi. The enzyme was not specific for its substrate, and could hydrolyze a wide variety of phosphate esters. The results indicated that the enzyme was a non-specific acid phosphatase. Various phosphate ester metabolites exhibited additive inhibition effect on it and was competitive with respect to PEP. The enzyme activity was also inhibited by Cu^{2+}, Zn^{2+}, and Fe^{2+}, and unaffected by Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, and EDTA.

Key words: Rice leaves; Acid phosphatase; Regulation