

## 菜心乙醇酸氧化酶二种催化功能的初步研究(简报)

王炜军 李明启

(华南农业大学生物技术学院, 广州 510642)

### PRELIMINARY STUDY ON TWO TYPES OF CATALYTIC FUNCTION OF GLYCOLLATE OXIDASE IN THE LEAVES OF *BRASSICA PARACHINENSIS*

Wang Weijun Li Mingqi

(College of Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

关键词 菜心; 乙醇酸氧化酶; 催化功能

Key words *Brassica parachinensis*; Glycollate oxidase; Catalytic function

中图分类号 Q946.5

乙醇酸氧化酶(glycollate oxidase, EC 1.1.3.1, GO)是植物光呼吸代谢的关键酶,催化乙醇酸生成乙醛酸,但又有研究者报道其可能还具有进一步氧化乙醛酸生成草酸的能力。Richardson和Tolbert发现甜菜等一些植物的GO均能氧化乙醛酸生成草酸,并且两种催化活性的比值在酶的纯化及纯化酶的放置过程中保持不变,因此他们认为:两氧化活性均由GO来催化,其之所以能够氧化乙醛酸可能是由于乙醛酸的水化物— $\text{CH}_2(\text{OH})_2\text{COOH}$ 与乙醇酸结构类似的缘故<sup>[1]</sup>; Havir报道烟草叶片GO氧化乙醇酸活性与其氧化乙醛酸活性的比值随着酶的纯化而下降,同时还发现抑制剂2-羟基丁炔酸(2-HBA)和氧浓度对二种氧化活性的影响各不相同,因此推测烟草中至少存在两种具氧化乙醇酸和乙醛酸能力的酶<sup>[2]</sup>。上述两种结果存在较大的差异,而GO的上述两种催化功能与植物光呼吸代谢的途径及其生理功能有着直接的联系。本文是这一研究的结果。

#### 1 材料和方法

**材料** 菜心(*Brassica parachinensis*)在网室栽培,取其绿叶作材料。

**试剂** DEAE-纤维素(上海化学采购供应站进口分装), Sephadex G-200、Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech.), 乙醇酸、乙醛酸、硫酸鱼精蛋白(Sigma), 羟基磷灰石(上海伯奥生物技术公司), 黄素单核苷酸 FMN, (Fluka), 三羟甲基氨基甲烷 Tris (Farco), 二氯酚吡啶 DCPIP (The British Drug Houses LTD.), 其它试剂均为分析纯或生化试剂。

**酶两个催化活性的测定** 采用DCPIP还原法<sup>[3,4]</sup>, 反应总体积为2 ml, 反应缓冲液为0.1 mol/L (pH8.0)磷酸钠盐缓冲液, 内含0.1 mmol/L FMN、1 mmol/L EDTA.Na<sub>2</sub>、5 mmol/L 底物(用前已调至中性)、0.2 mmol/L DCPIP, 适量酶液, 反应温度为30℃, 以加入底物来

启动反应, 计取 610 nm 波长下光密度的下降值, 每 15 s 读数一次, 在反应体系中加入适量酶液使得光密度的变化值在每分钟 0.200 以内, 以每分钟在 610 nm 波长下光密度下降 1.0 个单位所需的酶量定义为一个酶活性单位 (U)。分别以乙醇酸和乙醛酸为底物测定各自活性, 求取两者的比值。

**分离纯化过程中酶两活性比的分析** 酶分离纯化参照彭新湘和李明启的方法<sup>[5]</sup>, 但增加了羟基磷灰石柱层析(用 25–400 mmol/L pH8.0 磷酸钠缓冲液进行浓度线性梯度洗脱)。分别取纯化过程中的硫酸铵分部盐析、硫酸鱼精蛋白沉淀、羟基磷灰石柱层析、DEAE-纤维素柱层析、Sephadex G-200 五个纯化步骤的酶样进行两活性比的测定。

**纯化酶在贮存过程中两活性比的分析** 将 Sephadex G-200 胶过滤后的酶液在 25 mmol/L pH8.0 磷酸钠盐缓冲液(内含 0.2 mol/L NaCl 和 1 mmol/L NaN<sub>3</sub>)中, 于 4 °C 下贮存, 分别在 2 d、4 d、9 d、18 d 时取出测定两活性比。

**蛋白含量的测定** 采用考马斯亮蓝 G-250 染料结合法<sup>[6]</sup>, 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

## 2 结果和讨论

### 2.1 纯化的菜心叶片乙醇酸氧化酶的两催化活性

从图 1a, b 可知, 不管以乙醇酸为底物还是以乙醛酸为底物, 纯化的菜心叶片乙醇酸氧化酶均能还原测定反应液中的二氯酚吡酚, 使其在 610 nm 波长处的光密度下降, 这表明纯化的菜心叶片乙醇酸氧化酶不仅能氧化乙醇酸, 而且还能氧化乙醛酸, 而对后者的氧化能力相对较弱, 这支持了 Richardson 和 Tolbert 的结果<sup>[1]</sup>。另外如图 1a, b 所示: 当反应液中不外加 FMN 时, 两类催化活性均明显丧失, 说明纯化的菜心叶片 GO 的氧化乙醛酸活性与氧化乙醇酸活性一样, 均以黄素单核苷酸 (FMN) 为辅因子。

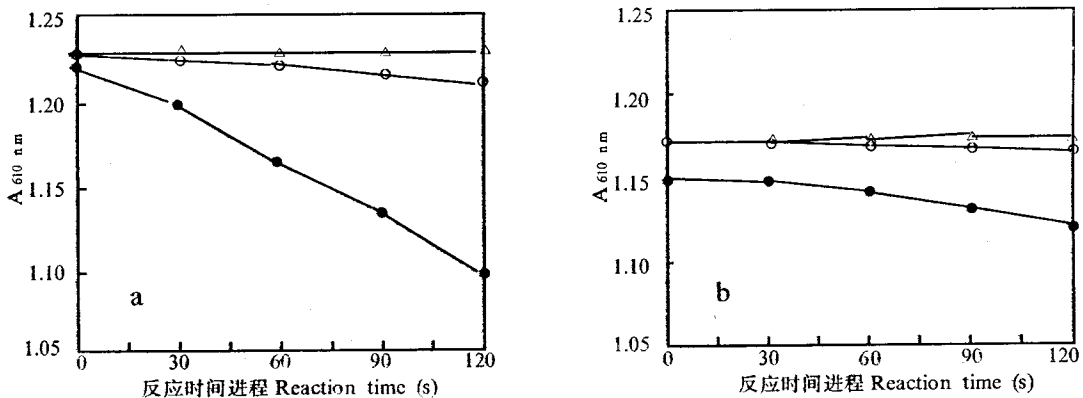


图 1 菜心叶片纯化 GO 的两种催化活性

Fig. 1 Two types of catalytic activity of glycollate oxidase (GO) in the leaves of *Brassica parachinensis*

a: 氧化乙醇酸的活性 The activity of glycollate oxidation; b: 氧化乙醛酸的活性 The activity of glyoxylyate oxidation  
 FMN: 0.1 mmol/L; —●— +FMN; —○— -FMN; —△— 先将酶液于 100 °C 灭活 10 min, GO was treated at 100 °C for 10 min before activity assay

### 2.2 分离纯化过程中菜心乙醇酸氧化酶两种催化活性比值的变化

分别取酶纯化过程中硫酸铵分部、硫酸鱼精蛋白沉淀、羟基磷灰石柱层析、DEAE-纤维素

柱层析、Sephadex G-200 胶过滤五个纯化步骤中的酶液进行两活性比的分析, 结果表明: 随着酶纯度的提高, 其氧化乙醇酸活性与氧化乙醛酸活性的比值呈逐渐升高的趋势(表 1), 这既不同于 Havir 在烟草叶片 GO 上所观察到的结果<sup>[2]</sup>, 又有别于 Richardson 和 Tolbert 的报道<sup>[1]</sup>。

表 1 纯化过程中菜心 GO 氧化乙醇酸活性与氧化乙醛酸活性比值的变化

Table 1 Changes in ratio of glycollate and glyoxylate oxidation for GO in the leaves of *Brassica parachinensis* during purification

纯化步骤 Purification fraction	氧化乙醇酸活性 Activity of glycollate oxidation (U mg <sup>-1</sup> protein)	氧化乙醛酸活性 Activity of glyoxylate oxidation (U mg <sup>-1</sup> protein)	活性比(氧化乙醇酸活性/ 氧化乙醛酸活性) Ratio (glycollate/ glyoxylate oxidation)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 分部盐析 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction	1.25	0.264	4.73
硫酸鱼精蛋白沉淀 Protamine precipitation	1.13	0.237	4.77
羟基磷灰石柱层析 Chromatography of hydroxylapatite	4.15	0.829	5.01
DEAE-纤维素柱层析 Chromatography of DEAE-cellulose	42.0	7.13	5.89
Sephadex G-200 胶过滤 Sephadex G-200 filtration	43.3	6.15	7.04

### 2.3 纯化的菜心叶片 GO 在贮存过程中两种催化活性的变化

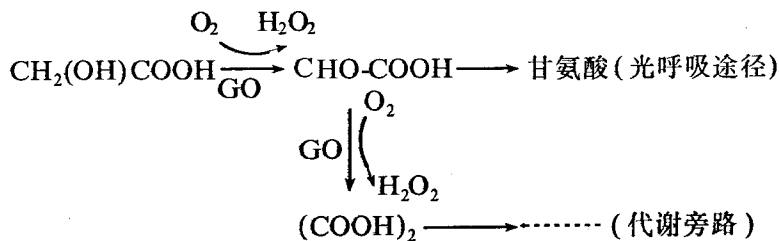
从表 2 可见, 最后经 Sephadex G-200 纯化的酶在低温贮存过程中, 活性逐渐下降, 两种氧化活性比也呈现逐渐升高的趋势, 这与 Richardson 和 Tolbert 报道甜菜等植物的纯化 GO 的两活性比在贮存过程中保持不变的结果<sup>[1]</sup>不同。

表 2 4℃ 贮存过程中纯化的菜心叶片 GO 两种催化活性比的变化

Table 2 Changes in ratio of glycollate and glyoxylate oxidation for purified GO in the leaves of *Brassica parachinensis* during storage at 4℃

活性比 Activity ratio	贮存时间 Storage time (d)				
	0	2	4	9	18
氧化乙醇酸活性 Activity of glycollate oxidation (U mg <sup>-1</sup> protein)	41.5	36.1	36.5	31.1	23.4
氧化乙醛酸活性 Activity of glyoxylate oxidation (U mg <sup>-1</sup> protein)	5.49	3.95	4.05	2.06	1.42
活性比(氧化乙醇酸活性/氧化乙醛酸活性) Ratio (glycollate/glyoxylate oxidation)	7.56	9.14	9.01	15.1	16.5

上述实验结果表明: 菜心叶片乙醇酸氧化酶不仅可氧化乙醇酸, 而且还能氧化乙醛酸生成草酸, 是一个双功能酶, 因此我们推测光呼吸代谢在乙醛酸处可能产生了一个旁路:



而 GO 正位于代谢的分支点上。同时我们的结果还显示: 菜心叶片 GO 的两种催化活性比在酶的纯化及纯化酶的贮存过程中均呈逐渐升高的变化趋势, 而这种活性间比值的可变性也许暗示着: 植物能够通过调节自身 GO 的两个催化活性的相对值, 从而控制代谢物质流在两条途径间的分配。已知草酸在植物体中普遍存在, 近年来的研究表明草酸及其代谢与一些重要的生理现象和功能密切相关, 如植物的抗病虫害<sup>[8,9]</sup>、耐低磷<sup>[10]</sup>及抗重金属离子的毒害<sup>[11]</sup>等。因此对于 GO 的两种催化活性及其调节机理尚需进行更深入的研究。

### 参考文献

- 1 Richardson K E, Tolbert N E. Oxidase of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase. *J Biol Chem*, 1961, 236:1280-1284
- 2 Havir E A. Evidence for presence in tobacco leaves of multiple enzymes for the oxidation of glycolate and glyoxylate. *Plant Physiol*, 1983, 71:874-878
- 3 Zelitch I. Glycolic acid oxidase and glyoxylic acid reductase. *Methods in Enzymol*, 1955, 1:528-532
- 4 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985, 195-197
- 5 彭新湘, 李明启. 乙醇酸氧化酶的纯化结晶和酪氨酸残基修饰对酶活性的影响. *植物生理学*, 1986, 2(12): 262
- 6 Bradford M M. 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
- 7 Kuczmak M, Tolbert N E. Glycolic acid oxidase formation in greening leaves. *Plant Physiol*, 1962, 37:729-734
- 8 Yoshihara T, Sogawa K, Villareal R. Comparison of oxalic acid concentration in rice varieties resistant and susceptible to the brown planthopper. *Int Rice Res Newsl*, 1979, 4(5):10-11
- 9 Zhou F, Zhang Z, Gregersen P L et al. Molecular characterization of oxalate oxidase involved in response of barley to powdery mildew fungus. *Plant Physiol*, 1998, 117:33-41
- 10 严小龙, 张福锁著. 植物营养遗传学. 北京: 中国农业出版社, 1997, 113-116
- 11 Ma J F, Zheng S J, Hiradate S. Detoxifying aluminum with buck wheat. *Nature*, 1997, 390:569-570