

菠菜乙醇酸氧化酶同工酶 GO I 的纯化和特性

徐杰¹, 吴燕燕²

(1. 华南师范大学生物技术研究所, 广东 广州 510631; 2. 华南师范大学激光生命研究所, 广东 广州 510631)

摘要: 从菠菜绿叶中获得 SDS-PAGE 为 $40\,000 \pm 2\,000 M_r$ 单带的乙醇酸氧化酶同工酶 GO I。其 GO 比活为 $8.4 U \min^{-1} mg^{-1}$ protein, 经 ND-PAGE 后显示 M_r 为 470 000。用 IEF 测得其等电位为 7.4。用氧电极法证实该 GO I 能同时催化乙醇酸和乙醛酸的氧化。制备 GO I 的抗体并对菠菜绿叶粗蛋白作免疫双扩散, 有免疫沉淀线; 经蛋白 A-Sepharose CL-4B 柱吸附法和抗原亲和吸附法, 得到单特异性 GO I 抗体。用该 GO I 抗体对菠菜绿叶粗蛋白作 SDS-PAGE Western blot 后只有 $40\,000 \pm 2\,000$ 一条染色带; 作 4%–20% ND-PAGE Western blot 后有多条染色带, M_r 分别大约为 470 000、280 000 和 80 000, 表明菠菜绿叶中的 GO I 有多个聚合态。

关键词: 乙醇酸氧化酶同工酶; 菠菜; 催化特性; 等电点; 分子量; 聚合态

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2001)01-0014-05

PURIFICATION AND PROPERTIES OF GLYCOLATE OXIDASE ISOZYME GO I FROM SPINACH LEAVES

XU Jie¹, WU Yan-yan²

(1. *Biotechnology Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;*

2. *Laboratory of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)*

Abstract: By using ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-25, DEAE-Cellulose, and Sepharose-6B chromatographies, glycolate oxidase isozyme GO I was purified from spinach green leaves which showed only one band with molecular weight (M_r) of $40\,000 \pm 2\,000$ in SDS-PAGE. The specific activity of purified GO I was $8.4 U \min^{-1} mg^{-1}$ protein. GO I showed its M_r of 470 000 in 4%–20% ND-PAGE and could catalyze both oxidations of glycolate and glyoxylate simultaneously. The isoelectric point (PI) of GO I was about pH 7.4. There was a immunity precipitate line determined by immunity double-diffusion reaction between the antibody raised against GO I and crude protein from spinach green leaves. The specific GO I antibody was purified by protein A-Sepharose CL-4B column and specific antigen affinity elution. Only the $40\,000 \pm 2\,000$ band could immunity cross-react with GO I antibody, and different GO I polymers of 470 000, 280 000, and 80 000 were found when crude protein were conducted to SDS-PAGE Western blot or ND-PAGE

收稿日期: 2000-05-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(39800009); 广东省自然科学基金项目(970308)

Western blot using this specific GO I antibody.

Key words: Glycolate oxidase isozyme; Spinach; Catalyzed property; Isoelectric point; Molecular weight; Polymeric form

从理论上讲, 抑制乙醇酸氧化酶(EC.1.1.3.15, 简称GO)的活性能提高植物特别是C₃植物如水稻的净光合速率, 从而提高其产量。对GO的研究具有重要的理论意义和实际应用价值。以往认为GO是一个由单种亚基和FMN组成的寡聚酶^[1-4], 测出的GO的分子量(M_r)在70 000-700 000不等, 有人据此推测GO在不同生理状态下有不同的聚合态^[1,5]。但以上观点难于解释GO为何具多种相差较大的等电点(PI): 如黄瓜GO的PI≈8.4^[1]; 豌豆GO的PI≥9.6^[2]; 褐藻GO的PI≈9.6^[3]; 南瓜GO的PI≈7.1^[4]; 大麦GO的PI≈7.7^[5]; 菜心GO的PI则有7.0、8.5、8.8等^[6]。目前对GO是否能同时催化乙醇酸和乙醛酸的氧化也有争议, 早期Richardson和Tolbert, 以及Tolbert和Burris均认为GO是双功能酶, 但当时缺乏SDS-PAGE的证据^[7,8]; 近期Havir在GO纯化过程中, 不断测定酶液催化乙醇酸和乙醛酸的氧化的活化能, 并计算其比值, 发现不同纯化程度的酶液有不同的比值, 据此推测催化乙醇酸和乙醛酸的氧化可能是由不同的酶来完成, 即乙醇酸氧化酶只催化乙醇酸的氧化, 而乙醛酸的氧化是由独立的乙醛酸氧化酶来催化^[9]。可见, 以往均是在未确定GO纯度的前提下, 研究GO是否为双功能酶。我们首次证实, 菠菜绿叶有GO I、GO II和GO III三种同工酶; 它们并存于植物体内, 其中GO I经SDS-PAGE后为40 000±2 000单带^[10-12]。因此, 前人认为的只含单种亚基和FMN组成的GO就是GO I, 即前人有关GO是否为一双功能酶的争议, 以及GO在不同生理状态下有不同的聚合态的推测均只是针对GO I而言。GO I是否真的具有以上特性? 我们根据GO I在pH 8.3缓冲系统的非变性凝胶电泳(Nondenaturing PAGE, ND-PAGE)中是向正极泳动, 由此判断其PI小于pH8.3, 但没有测定具体的PI数值^[11]。本文从菠菜中获得GO I, 对以上问题作进一步的研究。

1 材料与方法

材料 菠菜(*Spinacia oleracea* L.)购自市场。大容量低速离心机(3 000×g, 4×500 ml)为上海医用分析仪器厂产品。氧电极仪为上海植物生理研究所产品。Sephadex G-25、Sephacrose-6B、4%-20% ND-PAGE所用标准蛋白、蛋白A-Sepharose CL-4B均为Pharmacia产品。DEAE-cellulose-52为Whatman公司产品。硝酸纤维素薄膜(NC膜)为Amersham公司产品。乙醛酸、电泳用试剂、FMN均为Sigma产品。SDS-PAGE所用标准蛋白和IEF所用载体两性电解质(pH3.5-10)均为上海丽珠生物技术有限公司产品。乙醇酸为上海试剂二厂产品, 其它试剂均为国产分析纯产品。

GO I的纯化 除采用大容量低速离心机, 以及大幅提高柱层析的流速外, Sephadex G-25和DEAE-cellulose-52柱层析的流速均为5 ml min⁻¹, Sepharose-6B柱层析的流速为1 ml min⁻¹。其余按徐杰和李明启的方法^[12]获得GO I, GO比活用比色法测定^[12]。

蛋白浓度测定 按Bradford的方法, 以BSA为标准^[13]。

电泳分析 SDS-PAGE按Laemmli的方法^[14], 4%-20% ND-PAGE按张龙翔等^[15]的方法。

GO I 催化乙醇酸和乙醛酸的氧化 按徐杰^[16]的氧电极法测定, 测定 GO I 催化乙醇酸氧化产生乙醛酸时, 先后加入浓度为 0.346 mg ml⁻¹, 溶解在 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.3) 中的 GO I 100 μ l 和 100 mmol/L 底物乙醇酸 16 μ l; 测定 GO I 催化乙醛酸氧化产生草酸时, 则先后加入浓度为 0.346 mg ml⁻¹, 溶解在 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH8.0) 中的 GO I 100 μ l 和 100 mmol/L 底物乙醛酸 16 μ l.

GO I 的 pI 测定 按文献[11], GO I 在圆盘电泳槽中作 IEF, 电泳后按 0.5 cm 的间隔将凝胶切开多段, 按次序各放入一试管并加 1 ml pH7.0 双蒸水, 在 37 $^{\circ}$ C 摇床中放置过夜, 分别测定各试管中溶液的 pH.

GO I 抗体的制备 GO I 按每管 1 mg 分装在 5 支试管中, 并在 -16 $^{\circ}$ C 和 40% 硫酸铵中放置备用。第 1 天取其中一支试管中的蛋白在 4 $^{\circ}$ C 下, 经 12 000 \times g 离心 30 min 后取沉淀, 用水溶解后在 4 $^{\circ}$ C 下对生理盐水透析过夜, 再经耳缘静脉注射至兔子中。第 7 天取另一支试管中的蛋白同上离心和透析, 加 5 ml 完全佐剂充分混匀后, 在脊椎两侧作皮下多点注射。第 14 天同第 7 天作皮下多点和后腿肌肉注射。第 21 天重复第 7 天的工作。第 28 天重复第 1 天的工作。第 32 天从兔子心脏取血, 并在 37 $^{\circ}$ C 静置 2 h, 在 4 $^{\circ}$ C 下经 4 000 \times g 离心 10 min 后取抗血清。

GO I 抗体对菠菜粗蛋白的免疫双扩散 按徐杰等^[17]的方法。

GO I 抗体的纯化 按 Goudswaard^[18]的方法, GO I 抗体首先经蛋白 A-Sepharose CL-4B 柱吸附, 非特异性地获得无色的 IgG; 再按 Olmsted^[19]的方法, GO I 作 SDS-PAGE 后转移至 NC 膜上, 经丽春红染色后剪下只含 40 000 \pm 2 000 蛋白带的膜条, 以此亲和纯化以上无色 IgG 中的单特异性 GO I 抗体。

单特异性 GO I 抗体对菠菜粗蛋白的 SDS-PAGE Western blot 和 4% - 20% ND-PAGE Western blot 按 Blake 等^[20]的方法, 粗蛋白和标准蛋白同时上样, 电泳后用刀片将凝胶切开两半, 含粗蛋白的凝胶用于蛋白印迹, 而含标准蛋白的凝胶则用考马斯亮蓝染色。

2 结果与分析

菠菜粗蛋白经 pH 5.3 酸沉淀、(NH₄)₂SO₄ 分部沉淀、Sephadex G-25、DEAE-cellulose 和 Sepharose-6B 柱层析分离, 得到乙醇酸氧化酶同工酶 GO I (表 1)。

表 1 菠菜乙醇酸氧化酶同工酶 GO I 的提取过程中各参数的变化
Table 1 Data for preparing GO I isozymes from spinach green leaves

步骤 Step	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (U)	总体积 Volume (ml)	比活 Specific activity (U min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	产率 Yield (%)	纯化倍数 Purification fold
粗提液 Crude extract	860	74.8	850	0.087	100	1
pH 5.3 沉淀 pH 5.3 precipitation	629	61.0	700	0.097	73.1	1.12
硫酸铵分部沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	150	49.7	40	0.33	17.5	3.79
Sephadex G-25	60.2	40.9	46	0.68	7.0	7.82
DEAE-纤维素 DEAE-cellulose	2.2	33.4	8	15.2	0.25	174.7
Sepharose-6B	1.0	8.4	10	8.4	0.11	96.5

GO I 经 SDS-PAGE 后呈 M_r 为 $40\,000 \pm 2\,000$ 的单带(图 1A); 经 ND-PAGE 后 M_r 约为 $470\,000$ (图 1C)。用 IEF 测得其 $pI \approx 7.4$ 。本实验采用大容量低速离心机和大幅提高柱层析的流速, 可在 16 h 内获得 GO I, 而以往的方法则至少要 36 h^[12]。

氧电极法分析表明, GO I 能同时催化乙醇酸和乙醛酸的氧化(图 2)。测得 GO I 催化乙醇酸氧化为乙醛酸的活性为 $0.707 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$; 而 GO I 催化乙醛酸氧化产生草酸的活性为 $0.353 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 。首次证明菠菜 GO I 是一双功能酶。我们曾从菜心中获得 SDS-PAGE 为 $42\,000 \pm 2\,000$ 单带的 GO, 也证实该 GO 是一双功能酶^[16]。

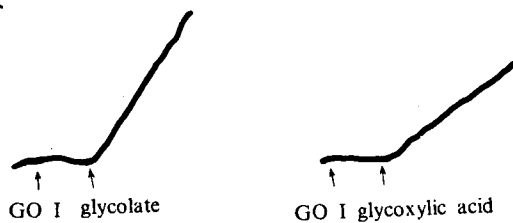


图 2 氧电极法分析菠菜 GO I 催化乙醇酸和乙醛酸的氧化
Fig. 2 Oxidations of glyoxylic acid and glycolate catalyzed by GO I assayed by oxygen electrode method

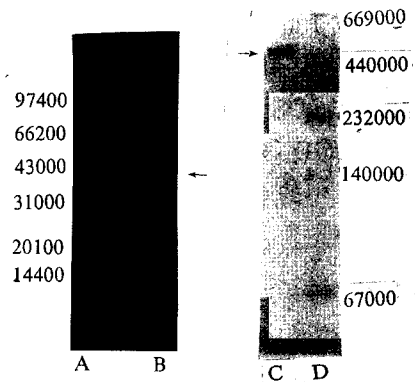


图 1 菠菜乙醇酸氧化酶同工酶 GO I 的 SDS-PAGE (A, B) 和 4%–20% ND-PAGE (C, D)

Fig. 1 SDS-PAGE (A, B) and 4%–20% ND-PAGE (C, D) of GO I isoforms from spinach green leaves
A: GO I (4 μg); B: Protein markers;
C: GO I (3 μg); D: Protein markers.



图 3 GO I 抗体对菠菜绿叶粗蛋白的免疫双扩散
Fig. 3 Immunity double diffusion between the antibody raised against GO I and crude protein from spinach green leaves

A, B: Crude protein (80 μg); C: Antibody (25 μl)

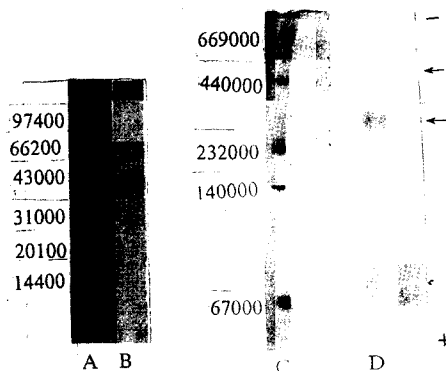


图 4 单特异性 GO I 抗体对菠菜绿叶粗蛋白的免疫印迹

Fig. 4 Crude protein from spinach green leaves were adjusted to SDS-PAGE (A, B) or 4%–20% ND-PAGE (C, D) in a pH 8.3 buffer system from anode to cathode followed by Western blot using the specific GO I antibody
A: Protein makers; B: Crude protein (50 μg); C: Protein markers; D: Crude protein (50 μg)

制备 GO I 的抗体并对菠菜绿叶粗蛋白作免疫双扩散, 有免疫沉淀线(图 3)。经蛋白 A-Sepharose CL-4B 柱吸附和抗原亲和吸附, 得到单特异性 GO I 抗体。用该 GO I 抗体对菠菜绿叶粗蛋白作 SDS-PAGE Western blot 后只有 $40\,000 \pm 2\,000$ 一条染色带(图 4B); 作 4%—20% ND-PAGE Western blot 后有三条染色带, M_r 分别大约为 470 000、280 000 和 80 000, 表明菠菜绿叶中的 GO I 有多个聚合态(图 4D)。可见, GO I 是一双功能酶; pI 为 7.4; 在体内有不同的聚合态。

参考文献:

- [1] Behrends W, Raush U, Loffler H G, et al. Purification of glycolate oxidase from greening cucumber cotyledons [J]. *Planta*, 1982, 156:566—571.
- [2] Kerr M V, Groves D. Purification and properties of glycolate oxidase from *Pisum sativum* leaves [J]. *Phytochem*, 1975, 14:359—362.
- [3] Iwamoto K, Suzuki K, Ikawa T. Purification and characterization of glycolate oxidase from the brown alga *Spatoglossum* (Phaeophyta) [J]. *J Phycol*, 1996, 32(5):790—798.
- [4] Roth-Bejerano N, Lips S H. Binding of glycolate oxidase to peroxisomal membranes as effected by light [J]. *Photochem Photobiol*, 1978, 27:171—175.
- [5] Hall N P, Reggiani R, Lea P J. Molecular weights of glycolate oxidase from C_3 and C_4 plants determined during early stages of purification [J]. *Phytochem*, 1985, 24:1645—1648.
- [6] 王炜军, 李明启. 菜心叶片中乙醇酸氧化酶的多种组分 [J]. *植物生理学报*, 1998, 24(4):413—416.
- [7] Richardson K E, Tolbert N E. Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase [J]. *J Biol Chem*, 1961, 236:1280—1283.
- [8] Tolbert N E, Burris R H. Light activation of plant enzymes which oxidizes glycolic acid [J]. *J Biol Chem*, 1950, 186:791—804.
- [9] Havar E A. Evidence for presence in tobacco leaves of multiple enzymes for the oxidation of glycolate and glycoxylyate [J]. *Plant Physiol*, 1983, 71:874—878.
- [10] 徐杰, 吴燕燕. 菠菜中不同等电点的乙醇酸氧化酶全酶分子量的测定 [J]. *植物生理学通讯*, 1998, 34(1):49—51.
- [11] 徐杰. 菠菜中的乙醇酸氧化酶是一个同工酶 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, 14(6):800—804.
- [12] 徐杰, 李明启. 乙醇酸氧化酶纯化方法的改进 [J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32(4):280—282.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 172:248—254.
- [14] Laemmli Y K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4 [J]. *Nature*, 1970, 227:680—685.
- [15] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1982, 119—123.
- [16] 徐杰. 菜心乙醇酸氧化酶的纯化和催化特性分析 [J]. *植物学通报*, 1998, 15(4):75—77.
- [17] 徐杰, 李明启, 施教耐. 光和底物对乙醇酸氧化酶基因表达的诱导 [J]. *植物生理学报*, 1996, 22(3):315—319.
- [18] Goudswaard J, Van der Donk J A, Noordzij A, et al. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins [J]. *Scand J Immunol*, 1978, 8:21—24.
- [19] Olmsted J B. Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples [J]. *J Biol Chem*, 1981, 256:11955—11957.
- [20] Blake M S, Johnston K H, Russell-Jones G T, et al. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blot [J]. *Anal Biochem*, 1987, 136:175—179.