

大白菜葡萄糖磷酸变位酶同工酶的 纯化及其分子性质*

崔洪昌 刘敬梅 Samuel S. Sun^{* *}

(北京蔬菜研究中心蔬菜种质改良实验室, 北京 100081)

摘 要 首先对影响葡萄糖磷酸变位酶(PGM)稳定性的因素进行了比较研究, 结果发现, 在所有被检测的因子中, 磷酸根对酶的保护作用最强, 而 Tris-盐酸则效果极差。在磷酸缓冲液中添加二硫苏糖醇、PMSF、葡萄糖和镁离子等可能的保持试剂未能进一步提高酶的稳定性。另外, pH 对 PGM 酶的稳定性有较大影响, 酸性 pH 不利于酶活性的保持, 在 pH8.0 时酶最为稳定。因此, 本实验对 PGM 同工酶的纯化均在 pH8.0 的磷酸缓冲液中进行。依次经过抽提、分步硫酸铵沉淀、Sephadex G75 柱层析以及二乙氨基纤维素柱高效液相色谱(DEAE-HPLC)等分离步骤, 我们纯化了大白菜品种“白阳”黄化种苗中的 3 个葡萄糖磷酸变位酶(PGM)同工酶, 并分别测定了同耐热相关 PGM 同工酶和与其自然电泳迁移率相近的另一同工酶的米氏常数(K_m), 比较了它们对 37℃ 热处理的稳定性。结果表明, 在米氏常数和热稳定性方面它们没有显著差别, 因而推测 PGM 酶本身可能不是影响大白菜耐热性的主要因素。

关键词 葡萄糖磷酸变位酶 同工酶 米氏常数 耐热性 柱层析 大白菜

提高大白菜等作物的抗热性对于其农业生产十分必要^[1]。然而, 直到目前为止, 对于植物抗热的生理和生化机制仍完全不清楚。最近, 郑晓鹰等人发现, 耐热大白菜品种“复阳”和“白阳”的耐热性与葡萄糖磷酸变位酶(Phosphoglucomutase, PGM, E. C. 2. 7. 5. 1)的一个同工酶存在密切相关; 进一步研究结果表明, 大白菜的耐热基因可能与这一葡萄糖磷酸变位酶的基因有紧密联索关系(等发表)。另外, 王永健等人认为, 大白菜的耐热性为寡基因控制的数量性状, 并且存在一个主效耐热基因(未发表)。这些实验结果为研究大白菜耐热机理以及进一步分离和鉴定耐热基因提供了重要理论依据。

葡萄糖磷酸变位酶是糖代谢途径中的一个关键酶^[2], 并普遍存在于从细菌到人的各类生物体内^[2~10]。在高等植物中, PGM 酶一般以两种主要形式存在: 一类在叶绿体和质体内, 为 Plastidic PGM^[2, 4]; 另一类分布在细胞质中, 为 Cytosolic PGM^[4, 7]。但在很多生物体内, PGM 酶都已演化成多个同工酶^[4, 5, 9]。大白菜也具有这种多态性。在自然胶聚丙烯酰胺同工酶电泳上, 其黄化种苗至少有 3 条显著 PGM 同工酶带, 正常苗中则更多^[1], 与耐热性相关的同工酶仅为其中之一。由于不同形式的 PGM 酶之间可能在分子大小、热稳定性、底物特异性等多方面表现出差异^[10], 另外鉴于 PGM 酶在生化代谢中的重要作用, 不能排除与耐热相关的 PGM

1997-05-22 收稿。

* 该项目是北京市重点实验室(研究中心)组建项目。

* * 工作单位: 香港中文大学。

同工酶本身为主要抗热基因的可能性。为阐明这一问题, 必须对各同工酶的生化性质进行比较研究。

以前关于 PGM 酶纯化的报道不少^[3,7], 但都不能将各同工酶分离。作者虽然曾成功地纯化了与耐热相关的 PGM 酶^[1], 进行了微测序, 但是最终制备的酶不能保持酶活性, 而且在纯化过程中, 酶活性也很不稳定, 也不适于本研究。本文即描述了对大白菜中 PGM 酶分离条件的优化和在改善的条件下纯化各同工酶的方法, 并报道了对其生化性质比较研究的结果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为萌发 5~7 d 的大白菜黄化幼苗, 品种为耐热性较强的“白阳”, 萌发条件见参考文献[1]。

1.2 酶的提取和纯化

称取种苗 40g, 按参考文献[1]的方法制备酶粗提液和 35%~75% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀。最后将沉淀溶于 15 mL 提取液中。提取液的组成为: 20 mmol, pH 8.0 的磷酸钠缓冲液, 其中加入 0.5% 的 PVP-40, 1% (w/v) 蔗糖以及各为 1 mmol 的 DTT、EDTA 和 PMSF。

取上述酶溶液 2 mL, 上样于一根已由 buffer A (pH 8.0, 20 mmol 的磷酸钠缓冲液, 各 1 mmol EDTA、DTT 和 PMSF) 平衡, 长 30 cm, 内径 1.5 cm 的 Sephadex G75 (Pharmacia) 开口柱, 然后进行等梯度洗脱。洗脱液由一台蠕动泵 (LKB2232 Micropropex S Pump) 输送, 流速为 0.8 mL/min, 并用一自动溜分收集器 (Waters Co.) 收集馏分, 管/min。色谱分离的整个过程都在 4℃ 条件下进行。按 3.1 方法检测各部分的酶活力。合并活力最强的部分, 10 000 rpm 离心 10 min 去除颗粒, 再用离子交换高效液相色谱 (HPLC) 进一步分离和纯化。

高效液相色谱仪由两台 510 泵、一台 712 自动进样器、490UV/VIS 检测器和一自动溜分收集器组成 (均为 Waters 公司生产), 系统控制以及数据收集和处理都通过 Maxima 820 进行。离子交换色谱柱为 DEAE-5PW HPLC 玻璃柱 (TSK-Gel, Japan), 8.0 mm × 75 mm。色谱条件为: 每次上样 150 μL , 50 min 线性梯度洗脱, 初始洗脱液为 buffer A (参看上文), 最终洗脱液为 buffer A 中加 0.5 mol NaCl, 流速 0.6 mL/min, 以管/min 收集溜分。同时在 210 nm (1 AuF) 和 280 nm (0.2 AuF) 进行监测, 并检测酶活性。

1.3 影响 PGM 酶稳定性因素的比较研究

分别称取种苗 2 g, 并按 2.1 法用 5 mL 的不同缓冲液 (表 1) 进行提取。每种酶粗提液分装后, 分别放置在 -40℃, 4℃ 和室温, 比较当天, 1 d 和 2 d 后的酶活性。

1.4 米氏常数 K_m 的测定和同工酶的耐热性实验

按 1.5 法分别配制葡萄糖-1-磷酸 (G-1-P) 浓度为 2 mmol 和 0 mmol 的 PGM 酶检测液 [0 溶液] (其他成分及浓度均同)。取相同体积的两种溶液, 混合均匀, 使 G-1-P 的浓度稀释至 1 mmol。然后取此混合液与相同体积的 0 溶液混合, 使 G-1-P 的浓度变为 0.5 mmol。如此操作, 配制一系列 G-1-P 浓度梯度的酶检测液。分别取经高效液相色谱分离后的各 PGM 同工酶溶液, 在 25℃ 依次用上述不同 G-1-P 浓度的酶检测液测定 340 nm 处的吸光值的变化速率 (Au/min), 并按还原型辅酶 (NADPH) 在 pH 7.5 的摩尔消光系数 $\epsilon_{399\text{nm}} = 6200$ 将 ΔA_{340} 换算为

NADPH 摩尔浓度增加的速度 V (Mole/min)。最后据 Lineweaver-Burk 法作图($1/V$ 对 $1/[S]$), 求算米氏常数。

PGM 同工酶的耐热性比较实验按如下进行: 将同工酶溶液在 37 分别热处理 1 min, 2 min, 4 min, 8 min 和 15 min, 然后迅速使其恢复室温。测定其酶活力, 并比较酶失活的速度。

1.5 PGM 酶的检测(分光光度计法)

此法是根据 PGM 酶的催化原理, 并参考前人类似的方法发展来的。具体操作方法见参考文献[1]。

2 结果与分析

2.1 不同缓冲液组成对 PGM 酶稳定性的影响

很多关于 PGM 酶分离和纯化的报道都认为, 在溶液中加入一定量巯基保护试剂对于保持 PGM 酶的活性十分重要^[7,9]。在纯化大白菜与耐热相关的 PGM 同工酶的实验中, 我们也发现二硫苏糖醇(DTT)可以显著提高酶的稳定性^[1]。鉴于 DTT(巯基还原剂)对 PGM 酶的保护作用, 以及降低 pH 可以降低溶液的氧化还原势的原理, 曾推测在酸性 pH 纯化大白菜 PGM 酶可能会改善纯化效率。实际上, 的确也有在酸性 pH 成功纯化 PGM 酶的报道^[5]。但我们的实验结果表明, 低 pH 对大白菜的 PGM 酶的活性不但没有保护作用, 反而有不利影响。从表 1 可以看出, 大白菜 PGM 酶在低 pH 下活性很不稳定, 而且在所测试的 pH 范围内, 酸性越强, 酶粗提液的初始酶活力越低, 失活速度也越快。当缓冲液的 pH 为 5.8 时, 初始酶活力仅为 0.0286 Au/min; 室温放置 24 h 后已基本测不到酶活性, 即使在低温(4)下活性也只有 0.0012 Au/min; pH 8.0 时, 初始酶活性最高(0.2194 Au/min), 酶稳定性也最大。在室温放置 1 d 后其酶活力仍高达初始酶活力的 83.9%, 2 d 后为 63.5%。因此, 对大白菜 PGM 酶的提取和纯化应该在 pH 8.0 进行。

磷酸缓冲液和 Tris-Cl 是纯化和研究 PGM 酶最常使用的缓冲液^[3,5-9]。但我们发现大白菜 PGM 酶在 Tris-Cl 中很易丧失活性^[1]。所以本实验中着重对两种溶液进行了比较。结果发现: 用 Tris-Cl 提取的酶溶液, 不但其初始活性明显较低, 酶活丧失速度也快。20 放置 24 h 后酶活性仅有 2.15%, 2 d 后则已完全没有活性。相比之下, 所有含 PO_4^{3-} 的酶粗提液, 其酶活性均很稳定, 即使在室温下放置 24 h 后, 其活力还都在 65% 以上; pH 7.6 时, 保持酶活的比例更高, 2 d 后仍有 55% 以上的活性。值得注意的是, 虽然低温(-40 和-4)以及加入一定量 DTT 能够显著提高 PGM 酶在 Tris-Cl 中的稳定性, 而对于磷酸缓冲液, 这些措施则几乎没有任何效果。另外, 在磷酸缓冲液中加入 PMSF(丝氨酸蛋白酶抑制剂)、Glc(底物类似物)和 Mg^{2+} (辅酶离子)等可能的 PGM 酶保护剂也均未能进一步显著提高 PGM 酶的稳定性。这些结果表明, PO_4^{3-} 对于保持大白菜 PGM 酶的活性具有最重要作用, 而 Tris-Cl 对酶的保护则差得多。

根据上述结果, 我们认为, 对于大白菜 PGM 酶的提取和纯化, pH 8.0 的磷酸缓冲液(加入 PVP-40、EDTA 和蔗糖等基本成分)是最适宜的条件, 而 Tris-Cl 则应该避免使用。在磷酸缓冲液中添加 Mg^{2+} 、DTT、PMSF 和 Glc 是可以选择的。为最大程度的保护 PGM 酶的活性, 本实验对于 PGM 酶的提取和纯化, 均在上述基本磷酸缓冲液加入了各 1 mmol 的 DTT、EDTA 和 PMSF。

表 1 经不同提取液提取后 PGM 酶的活性及随时间变化

样 品	提取当天 PGM 酶活力	提取 1 d 后 PGM 的酶活力及其占			提取 1 d 后 PGM 的酶活力及其	
		初始活力的比例			占初始活力的比例	
		-40	4	20	-40	20
1) PB, no DTT	0. 2171	0. 159 73. 5%	0. 1779 81. 9%	0. 1644 75. 7%	0. 1629 75. 0%	0. 1342 61. 8%
2) PB, 2 mmol DTT	0. 2017		0. 1625 80. 6%	0. 1637 81. 2%		0. 1110 55. 0%
3) PB, 1 mmol PM SF	0. 2116		0. 1783 84. 3%	0. 1731 81. 8%		0. 1222 57. 8%
4) PB, 5 mmol Glc	0. 2078		0. 1766 85. 0%	0. 1651 79. 5%		0. 1234 59. 4%
5) PB, 5 mmol M g ²⁺	0. 2101		0. 1864 88. 7%	0. 1917 56. 7%		0. 1321 62. 9%
6) PB, pH 5. 8	0. 0286		0. 0012 42. 0%	0 0%		—
7) PB, pH 6. 8	0. 2083		0. 1577 75. 7%	0. 1346 64. 6%		—
8) PB, pH 8. 0	0. 2194		0. 1830 83. 4%	0. 1840 83. 9%		0. 1394 63. 5%
9) Tris-盐酸 pH 7. 6	0. 1910	0. 0741 38. 8%	0. 0501 26. 2%	0. 0041 21. 5%	0. 0816 42. 7%	0 0%

注: 1. PB: 20 mmol 磷酸钠缓冲液+ 1 mmol EDTA+ 0. 5% PVP-40+ 2% 蔗糖+ 1 mmol DTT; Tris-Cl: 20 mmol+ 1mmol EDTA+ 0. 5% PVP-40+ 2% 蔗糖+ 1 mmol DTT; DTT: 二硫苏糖醇; PMSF: 苯甲基磺酰氟; Glc: 葡萄糖; G-1-P: 葡萄糖-1-磷酸; M g²⁺: MgCl₂。

2. PGM 活力单位为 ΔAu/ min。

2. 2 PFM 同工酶的分离和纯化

根据我们以前的实验结果^[1], 与耐热相关的 PGM 同工酶主要存在于 65% ~ 75% 沉淀中, 而当溶液中 (NH₄)₂SO₄ 浓度为 35% ~ 75% 时, 所有 PGM 同工酶都被沉淀。35% ~ 75% 沉淀部分经 Sephadex G75 柱层析分离后, 只在第 41 ~ 48 管时检测到一个 PGM 酶活性峰(最大活性出现在第 45 管)。分子筛柱层析虽然不能够将各同工酶分开, 却可以除去干扰 PGM 进一步纯化的绝大部分杂蛋白, 因为在经 HPLC 进一步分离后, 各酶活性峰处的紫外吸收值极低, 而经 Sephadex G75 柱层析前的样品, 却都有较强的吸收。

酶活性最大部分经 DEAE 纤维素离子交换高效液相色谱(HPLC) 后, 分别在 9min、12min 和 19min 检测到三个活性峰(peak I, peak 和 peak), 其相对酶活力强度(以最大酶活峰为 100% 计) 分别为 100%、37. 3% 和 76. 3%。酶色谱峰的数目与酶粗提液经电泳后所显示的同工酶条带数相同^[1]。另外, 我们还分别制备了 35% ~ 65% 和 65% ~ 75% 两部分硫酸铵沉淀, 并用上述方法进行了分离。前者只在 peak 处呈现一主要色谱峰, 后者则包含 peak 和 peak 两个同工酶。这表明 DEAE-HPLC 柱能够将电荷差别很小的同工酶完全分开。根据 PGM 同工酶在离子交换柱上被洗脱出来的顺序及其与同工酶电泳中迁移率的对应关系, peak 应该为与耐热相关的 PGM 酶^[1]。

2.3 PGM 同工酶分子性质的研究

表 2 37 热处理不同时间后 peak 和 peak 酶活力的变化

色谱峰	37 温育不同时间后的 PGM 的酶活力及其占初始活力的比例					
	0 min	1 min	2 min	4 min	8 min	15 min
第 1 色谱峰	0.054	0.035	0.033	0.027	0.022	0.019
		64.8%	61.1%	50%	40.7%	35.2
第 2 色谱峰	0.031	0.020	0.013	0.010	0.011	0.008
		64.5%	41.9%	32.3%	35.5%	25.8%

注: PGM 活力单位为 Au/min

通过双倒数作图法(图 1),测定 peak 和 peak 以 G-1-P 为底物的米氏常数分别为 $4.91 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 和 $7.29 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。在酶本身的耐热性上,两个同工酶在最初时酶活力的下降速度是相同的,只是后来表现出一定差别(表 2)。这种差异可能与 peak 的初活力较小而较易失活有关。

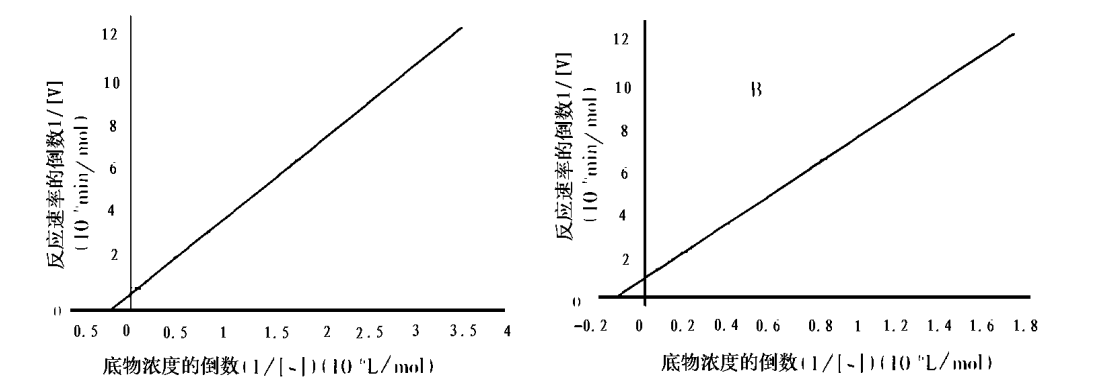


图 1 双倒数法测定葡萄糖磷酸变位酶(PGM)的米氏常数(K_m)
(具体方法见正文。经 DEAE-HPLC 分离后的酶色谱峰 peak 的 K_m = $4.921 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ (图 1A), peak (与耐热相关的同工酶)的 K_m = $7.29 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ (图 1B)。二者没有显著差别。[V]: 反应产物,即还原型辅酶 (NADPH) 生成的速率, mol/L; [S]: 酶检溶液中底物(G-1-P)的初始浓度, mol/L。)

3 讨论

3.1 关于 PO₄³⁻ 对 PGM 酶保护作用可能机制的探讨

大白菜的 PGM 酶是很不稳定的,这在多种植物中都已报道^[6,7,9]。虽然在提取缓冲液中加入一定量 DTT 可以显著改善酶的稳定性,但对于同工酶的分离及进一步研究其性质,酶的稳定性仍不够。本实验通过对磷酸缓冲液和 Tris-Cl 及其他可能的 PGM 酶保护剂的比较,发现 PO₄³⁻ 对酶的稳定性有很强的保护作用,而 Tris-Cl 则很差。推测 PO₄³⁻ 对 PGM 酶的保护可能是通过抑制酶活性,从而减少了酶活性中心被失活因子的作用的结果。PGM 酶是一种磷酸基转移酶^[8]。其催化作用是首先自身磷酸化,然后将磷酸基团转移到底物进行的。在磷酸缓冲液中,大量 PO₄³⁻ 的存在势必会对磷酸基的转移产生影响。已有实验结果表明,在磷酸缓冲液中测

定 PGM 酶活力的灵敏度比在很多其他缓冲液(包括 Tris-Cl 内)中都低得多^[7]。其酶活性受到抑制的同时也减少了有害因素对酶活性中心的伤害,从而对酶产生保护。而在 Tris-Cl 中,由于没有 PO_4^{3-} 的干扰,酶活性不受抑制,因而所测定的酶活力也较高,自然也易失活。

不过,影响酶稳定性的因素可能是多方面的。如果只有 PO_4^{3-} 对 PGM 酶有保护作用,那么在所有其他缓冲液中测定酶活力的灵敏度应该是一样的。但实际上这些缓冲液之间也表现出一定差别^[7]。因此, PO_4^{3-} 可能只是影响 PGM 酶稳定性的主要因素之一。

3.2 PGM 同工酶与大白菜耐热性

米氏常数是反映酶催化性质的特征参数,它表示酶在所测定条件下与反应底物结合的亲合度。酶的不同形式(同工酶)由于结构和性质方面的变化,其米氏常数(K_m)数值大小会有所不同,而且性质差别越大,其 K_m 相差也越大。如果 PGM 同工酶本身为控制大白菜耐热的主要因素,那么与耐热相关的 PGM 同工酶应该和其他同工酶表现出较大差别。从 peak 和 peak 两个同工酶来看,虽然它们的米氏常数有一定差别,但这种差异是很微小的,不足以说明与耐热相关的同工酶和其他同工酶对植株耐热性的影响的本质差别。另外,对两个同工酶的耐热性的直接比较的结果也否定了这种可能性。况且,与耐热相关的同工酶(peak)的耐热性似乎比另一同工酶 peak 还差。综上所述,PGM 酶本身很可能并不是控制大白菜耐热性的主要因素。

参 考 文 献

- 1 崔洪昌等. 大白菜与耐热相关的葡萄糖磷酸变位酶同工酶的分离和纯化. 华北农学报, 1998, 13(4): 86 ~ 92
- 2 Caspar T, *et al.* Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana*(L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol*, 1985, 79: 11 ~ 17
- 3 Barman T E. Phosphoglucomutase. In: *Enzyme Handbook Vol 1*, 1969. 455 ~ 456
- 4 Gottlieb L D. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science*, 1982, 216: 373 ~ 380
- 5 Joshi J G, *et al.* Phosphoglucomutase. V. Multiple forms of phosphoglucomutase. *Biochemistry*, 1967, 57: 1482 ~ 1489
- 6 Kahl G, Stegemann H. Enzyme degradation in higher plants: phosphoglucomutase. *FEBS Letters*, 1973. 32(2): 325 ~ 329
- 7 Muhlbad H, Schnarrenberger C. Properties and intracellular distribution of two phosphoglucomutases from spinach leaves. *Planta*, 1978, 141: 65 ~ 70
- 8 Salvucci M E, *et al.* Identification of the 64 kilodalton chloroplast stromal phosphoprotein as phosphoglucomutase. *Plant Physiology*, 1990, 93: 105 ~ 109
- 9 Sangwan R S, Singh R. Multiple forms of phosphoglucomutase from immature wheat endosperm. *Physiol Biochem*, 1987, 25(6): 745 ~ 751
- 10 Whitehouse D B, *et al.* Phosphoglucomutase. I. Complete human and rabbit mRNA sequence and direct mapping of this highly polymorphic marker on human chromosome 1. *Proc Natl Acad Sci*, 1989. 411 ~ 415

Purification of Phosphoglucomutase Isozymes from Chinese Cabbage and Studies on Their Molecular Properties

Cui Hongchang Liu Jingmei Samuel S. Sun

(Vegetable Germplasm Improvement Laboratory, Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081)

Abstract A variety of factors were comparatively studied with regard to their effects on the stability of phosphoglucomutase (PGM) in Chinese cabbage. It was clearly shown that PO_4^{3-} was most effective in maintaining the enzyme activity, while Tris-Cl was most ineffective. Inclusion of such possible enzyme protectants as DTT, PMSF, glucose and Mg in phosphate extraction buffer did not improve PGM stability any further. It was also shown that PGM enzyme was much affected by pH change, with low pH harmful and pH8.0 optimal. For these reasons, pH8.0 phosphate buffer was used throughout the process of PGM purification. The three PGM isozymes were successfully separated from the etiolated seedlings of Chinese cabbage "Baiyang", by a series of methods from extraction, stepwise ammonium sulphate precipitation, Sephadex G75 chromatography and finally DEAE-cellulose HPLC. The Michaelis constants (K_m) of these two isozymes (one is the heat-tolerance related PGM) were then determined, and their heat stability was evaluated directly by incubation at 37 °C. No essential differences were found between them, indicating that the observed heat-tolerance of Chinese cabbage cannot be attributed to any individual PGM isozyme.

Key words: Phosphoglucomutase; Isozyme; Michaelis constants; Heat-tolerance; Chromatography; Chinese cabbage