

文章编号: 0529-6579 (2000) S2-0119-04

# 豇豆多胺氧化酶的底物动力学研究\*

何生根, 黄学林, 傅家瑞

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘 要:** 从豇豆 (*Vigna unguiculata*) 幼叶分离纯化的多胺氧化酶对腐胺 (Put)、尸胺 (Cad)、1, 6-己二胺和 1, 10-癸二胺等二胺类底物有较强的亲和力, 底物的碳链长度越短, 亲和力越强. 该酶对亚精胺 (Spd) 和精胺 (Spm) 的氧化也有一定的催化活性. 另外, 反应介质的 [Spd] / [Put] 和 [Spm] / [Put] 比值以及  $O_2$  浓度对该酶的催化活性有调节作用.

**关键词:** 豇豆 (*Vigna unguiculata*); 多胺氧化酶; 多胺; 底物动力学

**中图分类号:** Q946 **文献标识码:** A

多胺氧化酶 (polyamine oxidase, PAO) 是催化生物体内腐胺 (Put)、尸胺 (Cad)、亚精胺 (Spd) 和精胺 (Spm) 等多胺 (polyamines, PAs) 氧化降解的关键酶. 已有研究表明, 植物 PAO 的生理功能除了调节细胞的 PAs 水平外, 还参与种子萌发、碳氮循环、衰老和胁迫等生理过程<sup>[1]</sup>. 研究植物 PAO 的酶学性质对于深入认识植物多胺的氧化降解代谢和调节机理具有重要意义. 自 Hill<sup>[2]</sup> 最先从豌豆幼苗获得纯化的 PAO, 迄今已分离纯化出 PAO 的植物种类只不过十几种, 且不同植物来源的 PAO 的酶学特性也有差异<sup>[3-6]</sup>. 前文<sup>[7]</sup>我们报道了豇豆幼叶中存在较高的 PAO 活性并已将其分离纯化, 本文着重研究该酶底物动力学方面的有关特性.

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

豇豆 (*Vigna unguiculata*) 品种为“金丰 1 号”, 购于广东省种子公司. 种子经表面消毒和吸胀后播于盛湿润河沙的瓷盘萌发并培育至一芽二叶初展.

### 1.2 豇豆 PAO 的纯化

按文献 [7] 的方法从豇豆幼苗的幼叶分离纯化 PAO.

### 1.3 PAO 活性及 $K_m$ 和 $V_{max}$ 测定

参照文献 [8] 的方法并略作修改. 反应混合物含 2 mL 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0), 0.2 mL 愈创木酚 (25 mmol/L), 0.1 mL 过氧化物酶溶液 (1 mg/mL) 及 0.2 mL 酶液. 混合液于 30 °C 水浴预保温 2 min 后分别加入适量底物启动反应, 用 Beckman DU640

\* 基金项目: 国家教委博士点基金资助项目 (9455808); 广东省自然科学基金资助项目 (970655)

收稿日期: 2000-08-28; 作者简介: 何生根 (1965 ~), 男, 副教授, 现在仲恺农业技术学院 (510225) 工作.

UV 分光光度计测定 470 nm 处光密度值的变化并由该仪器所配备的酶动力学软件计算酶活性及  $K_m$  和  $V_{max}$ . 以  $0.01\Delta A_{470}/\text{min}$  为一个酶活力单位 (u).

#### 1.4 反应介质 $O_2$ 浓度对 PAO 活性的影响

参照文献 [3] 的方法, 用 Clark 氧电极测定过量底物 (2 mmol/L Put) 下 PAO 的耗氧速率变化直至无耗氧为止, 并用饱和的亚硫酸氢钠溶液在同样条件下进行标定, 根据所得的标定曲线和耗氧曲线得出各点的  $O_2$  浓度和对应的耗氧速率 (以此表示 PAO 活性).

#### 1.5 蛋白质含量测定

按文献 [9] 的方法, 以牛血清蛋白作标准.

## 2 结果与讨论

### 2.1 豇豆 PAO 的底物特异性

分别以不同多胺类物质作为底物测定豇豆 PAO 的活性, 并计算其对各底物的  $K_m$  和  $V_{max}$  值 (表 1, 2), 可知该酶的最适底物为 Put, 对 Cad、1,6-己二胺和 1,10-癸二胺等二胺也有较强的亲和力; 另外, 该酶对 Spd 和 Spm 的氧化也有一定的催化作用. 这一结果与豌豆<sup>[4]</sup>、*Euphorbia characias*<sup>[6]</sup>、水稻<sup>[8]</sup>、大豆<sup>[10]</sup> 等植物的 PAO 的底物特异性相似, 但与玉米<sup>[3]</sup>、凤眼莲<sup>[5]</sup>、满江红<sup>[11]</sup> 等植物的 PAO 的底物特异性不同, 后者最适底物则为 Spd 和 Spm. 从豇豆 PAO 的  $K_m$  和  $V_{max}$  与二胺底物碳链长度的关系 (图 1) 来看, 二胺底物的碳链长度明显影响该酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  值, 即二胺底物碳链越长,  $K_m$  值越大,  $V_{max}$  值则越小.

表 1 豇豆 PAO 的底物特异性

| 项目                           | 底物 (1 mol/L) |       |      |      |         |          |
|------------------------------|--------------|-------|------|------|---------|----------|
|                              | Put          | Cad   | Spd  | Spm  | 1,6-己二胺 | 1,10-癸二胺 |
| PAO 活性/(u·mg <sup>-1</sup> ) | 3 240        | 2 760 | 560  | 420  | 2 150   | 1 700    |
| 相对活性/%                       | 100          | 85.2  | 17.3 | 13.0 | 66.4    | 52.5     |

表 2 不同底物对豇豆 PAO 的  $K_m$  和  $V_{max}$  的影响

| 项目                                      | 底物 (1 mol/L) |       |      |      |         |          |
|-----------------------------------------|--------------|-------|------|------|---------|----------|
|                                         | Put          | Cad   | Spd  | Spm  | 1,6-己二胺 | 1,10-癸二胺 |
| $K_m/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$   | 0.07         | 0.12  | 0.46 | 0.53 | 0.17    | 0.22     |
| $V_{max}/(\text{u}\cdot\text{mg}^{-1})$ | 3 640        | 2 870 | 710  | 480  | 2 460   | 2 090    |

### 2.2 反应介质中 $[\text{Spd}]/[\text{Put}]$ 和 $[\text{Spm}]/[\text{Put}]$ 比值对豇豆 PAO 活性的影响

前人研究表明, 种子萌发和植物的形态发生等生理过程与其体内的  $[\text{Spd}]/[\text{Put}]$  或  $[\text{Spm}]/[\text{Put}]$  比值的变化有着十分密切的关系<sup>[12,13]</sup>. 为此, 我们研究了反应介质中不同  $[\text{Spd}]/[\text{Put}]$  或  $[\text{Spm}]/[\text{Put}]$  比值对豇豆 PAO 活性的影响, 并分别以 PAO 活性对  $[\text{Spd}]/[\text{Put}]$  和  $[\text{Spm}]/[\text{Put}]$  的比值作图, 结果见图 2a 和 2b. 无论固定 Put 浓度、改变 Spd 或 Spm, 还是固定 Spd

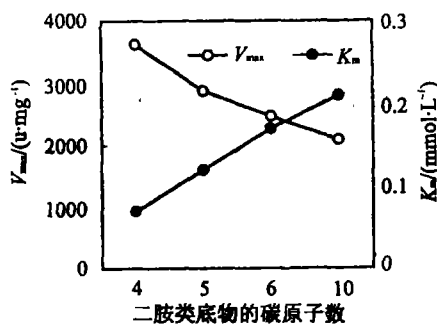


图 1 豇豆 PAO 动力学参数与二胺底物碳链长度的关系

或 Spm 浓度、改变 Put 浓度, 豇豆 PAO 活性都随  $[Spd]/[Put]$  或  $[Spm]/[Put]$  比值的变化而改变, 表明豇豆 PAO 活性受到  $[Spd]/[Put]$  和  $[Spm]/[Put]$  比值的调节. 我们认为这可能是 Spd 和 Spm 与 Put 竞争酶的结合位点的结果. 不过, 植物体内  $[Spd]/[Put]$  或  $[Spm]/[Put]$  比值的变化对一些生理过程的调控作用是否与它们对 PAO 活性的效应有关则需进一步研究.

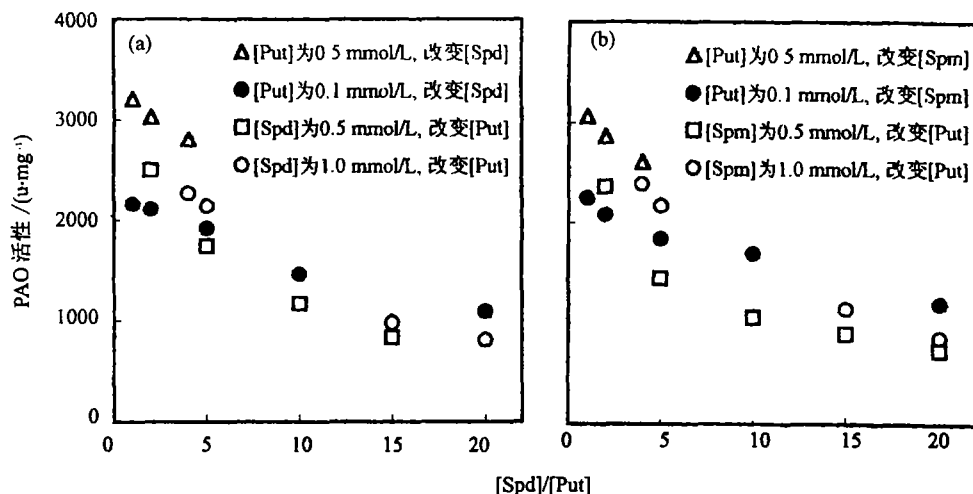


图2 反应介质中  $[Spd]/[Put]$  (a) 和  $[Spm]/[Put]$  (b) 比值对豇豆 PAO 活性的影响

### 2.3 $O_2$ 浓度对豇豆 PAO 活性的影响

$O_2$  也是植物 PAO 的底物之一<sup>[1,10]</sup>, 用氧电极测得该酶耗氧速率与  $O_2$  浓度之间的关系 (图3) 表明, 当  $O_2$  浓度低于  $20 \mu\text{mol/L}$  时豇豆 PAO 无活性, 当  $O_2$  浓度在  $25 \sim 80 \mu\text{mol/L}$  之间该酶活性随  $O_2$  增加而增加, 之后则达到饱和. 说明除非在严重的氧胁迫条件下, 否则  $O_2$  难以成为豇豆 PAO 催化活性的限制因子.

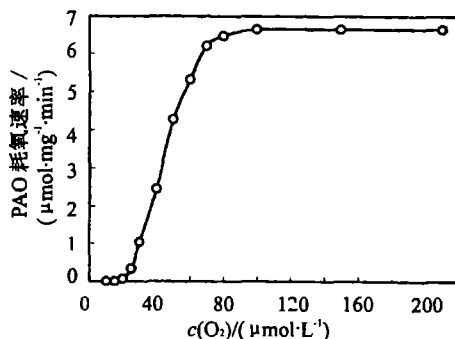


图3 反应介质中  $O_2$  浓度对豇豆 PAO 活性的影响

### 参考文献:

- [1] 何生根, 黄学林, 傅家瑞. 植物的多胺氧化酶. 植物生理学通讯, 1998, 34 (3): 214 ~ 219.
- [2] HILL J M. Diamine oxidase (pea seedlings). Methods Enzymol, 1972, 17B: 730 ~ 735.
- [3] SUZUKI Y, YANAGISAWA H. Purification and properties of maize polyamine oxidase: A flavoprotein. Plant Cell Physiol, 1980, 21: 1085 ~ 1094.
- [4] PADIGIA A, CONONI A, FLORIS G. Characterization of amine oxidase from *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus* and *Cicer*. Phytochem, 1991, 30: 3895 ~ 3897.
- [5] YANAGISAWA H, KATO A, HOSHIAI S, et al. Polyamine oxidase from water hyacinth: purification and properties. Plant Physiol, 1987, 85: 906 ~ 909.

- [6] PADIGLIA A, MEDDA R, LORRAI A, et al. Characterization of *Euphorbia characias* latex amine oxidase. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1363 ~ 1371.
- [7] 何生根, 黄学林, 傅家瑞. 豇豆幼叶多胺氧化酶的分离纯化. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1999, 38 (5): 77 ~ 81.
- [8] CHAUDURI M M, GHOST B. Purification and characterization of diamine oxidase from rice embryos. *Phytochem*, 1984, 23: 241 ~ 243.
- [9] 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.
- [10] DI PAOLO M L, VIANELLO F, STEVANATA, et al. Kinetic characterization of soybean seedling amine oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 323: 329 ~ 334.
- [11] 何生根, 黄学林, 傅家瑞. 部分植物的多胺氧化酶活性. *植物生理学通讯*, 1997, 33 (6): 432 ~ 433.
- [12] SMITH T A. Polyamines. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1985, 36: 117 ~ 143.
- [13] MATILLA A J. Polyamines and germination. *Seed Sci Res*, 1996, 6: 81 ~ 93.

## Substrate Kinetics of Polyamine Oxidase from *Vigna unguiculata*

HE Sheng-gen<sup>\*</sup>, HUANG Xue-lin, FU Jia-rui

**Abstract:** Polyamine oxidase purified from *Vigna unguiculata* primary leaves could catalyze oxidation of polyamines such as putrescine (Put), cadaverine (Cad), spermidine (Spd) and spermine (Spm), but its effective substrates were diamines. It appeared that the enzyme was more specific for short chain diamines than for longer chain ones. The enzyme activity was regulated by [Spd] / [Put] or [Spm] / [Put] ratio in the reaction medium. It had no activity if the oxygen concentration in the reaction medium was below 20  $\mu\text{mol/L}$ , but the activity increased rapidly when oxygen concentration increasing from 25 to 80  $\mu\text{mol/L}$ , then kept constant.

**Keywords:** diamine oxidase; polyamine oxidase; substrate kinetics; *Vigna unguiculata*

---

<sup>\*</sup> School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China