

文章编号: 0529-6579 (1999) 05-0077-05

豇豆幼叶多胺氧化酶的分离纯化^{*}

何生根, 黄学林, 傅家瑞

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 依次经粗提、 φ 为 35%~60% 硫酸铵分步沉淀、 φ 为 70% 丙酮沉淀、DEAE-Cellulose 柱层析、Sephacrose CL-4B 柱层析和羟基磷灰石柱层析等步骤后首次从豇豆幼叶得到电泳均一的、亚基相对分子质量约为 70 000 的多胺氧化酶。纯化倍数为 473.3, 产率为 13.1%。该酶在 0.1 mol/L PBS (pH 7.0~7.5) 中较为稳定, 冷冻 (-15°C) 贮存则可保持 20 d 内不失活。

关键词: 豇豆 (*Vigna unguiculata*); 多胺氧化酶; 纯化

中图分类号: Q 946 **文献标识码:** A

多胺氧化酶 (polyamine oxidase, PAO) 是指催化腐胺、亚精胺和精胺等多胺类物质氧化降解的酶类, 研究并掌握植物 PAO 的分子特性和催化性质对于深入探讨植物多胺的氧化降解代谢和调节的分子机理具有重要意义。自 Hill^[1] 最先从豌豆幼苗获得纯化的 PAO, 迄今已分离纯化出 PAO 的植物种类仍只不过十几种, 且各自的酶学性质也有差异^[2~4]。另外, 有关该酶分子生物学方面的研究近几年才刚刚起步^[5,6], 尚有赖于人们对该酶类分子结构与特性的更多研究和认识。

豇豆 PAO 的研究, 国内外尚未见报告。何生根等^[7] 在研究 PAO 在植物中的分布特性时曾报告在豇豆幼叶中存在较高的 PAO 活性。本文试图对豇豆幼叶的 PAO 进行分离纯化, 旨在为研究该酶的分子结构及酶学性质奠定基础。

1 材料和方法

1.1 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 豇豆幼叶 PAO 粗提液制备

参照文献 [8] 的方法, 生长幼苗的一芽二叶部分, 洗净吸干表面水分后加入 3 倍体积缓冲液 A (0.1 mol/L PBS, $\varphi=1\%$ PVP, pH 7.0), 在高速捣碎机上捣碎 3 次, 每次约 5 s, 四层脱脂纱布过滤。滤液经冷冻离心机 (Beckman) $10\ 000\times g$ 离心 20 min (4°C), 上

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

收稿日期: 1998-10-07 作者简介: 何生根, 男, 1965 年生, 副教授, 现在仲恺农业技术学院工作。

清液即为豇豆 PAO (Cowpea PAO, CPAO) 粗提液。

1.3 CPAO 的分离纯化

1.3.1 硫酸铵沉淀 向酶粗提液加入研细的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末, 至 $\varphi=35\%$ 饱和度。静置 20 min 后, 如前离心, 弃沉淀。上清液再加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末, 至 $\varphi=60\%$ 饱和度, 20 min 后离心, 沉淀溶于适量缓冲液 A, 离心, 收集上清液。

1.3.2 丙酮沉淀 冰浴中向上清液边搅拌边缓缓加入 φ 为 70% 冷丙酮 ($-15\text{ }^\circ\text{C}$), 静置 30 min 后离心, 倾净上清液, 沉淀溶于少量缓冲液 B (0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5), 离心, 收集上清液, 经 Sephadex G-25 柱 ($2\times 30\text{ cm}$) 脱盐, 洗脱液为缓冲液 B, 收集蛋白质部分。

1.3.3 DEAE-Cellulose 柱层析 脱盐的酶液上 DEAE-Cellulose (Whatman Express-Ion Exchanger D) 柱 ($2\times 30\text{ cm}$), 用 500 mL 含 0~0.4 mol/L NaCl 缓冲液 B 线性梯度洗脱 (流速为 $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 每 4 min 收集 1 管), 收集活性峰部分。加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末至 $\varphi=60\%$ 饱和度, 静置一段时间后离心, 沉淀溶于少量缓冲液 C (0.01 mol/L PBS, pH 7.0), 离心, 弃沉淀。

1.3.4 Sepharose Cl-4B 柱层析 上清液上预先用缓冲液 C 平衡的 Sepharose Cl-4B (Pharmacia) 柱 ($2\times 50\text{ cm}$), 用缓冲液 C 洗脱 (流速为 $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 每 5 min 收集 1 管), 收集活性峰部分。

1.3.5 羟基磷灰石柱层析 将上步酶液上预先用缓冲液 C 平衡的羟基磷灰石 (Bio-Rad) 柱 ($2\times 15\text{ cm}$), 先用约 1 个柱体积的缓冲液 C 洗至接近基线, 然后用缓冲液 D (0.15 mol/L PBS, pH 7.0) 洗脱 (流速为 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 每 5 min 收集 1 管), 收集活性主峰部分。

1.4 PAO 活性测定

参照文献 [7] 的方法并略作修改。反应混合物含 2 mL PBS (0.1 mol/L, pH 7.0), 2.0 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 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴预保温 2 min 后分别加入 0.1 mL 腐胺 (20 mmol/L) 启动反应, 用 Beckman DU640 分光光度计连续测定波长为 470 nm 处吸光度的变化并由机内的 “Enzyme Kinetics” 软件求算酶活性。以每分钟 $0.01\Delta A_{470}$ 为一个酶活力单位 (U)。

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。

1.6 酶纯度鉴定

参照文献 [10] 的方法略作修改。将纯化的酶液透析、浓缩至约 1 mg/L 后, 取样按 $V(\text{样品}):V(\text{缓冲液})=1:1$ [50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), $\varphi=2.3\%$ SDS (Serva), $\varphi=10\%$ 甘油, $\varphi=5\%\beta\text{-ME}$, $\varphi=0.1\%$ 溴酚蓝] 混匀, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 2~3 min 促进 SDS 与多肽的结合, 冷至室温后 $10\,000\times g$ 离心 5 min, 取上清液上样。每泳道上样量为 5~10 μL 。 $V(\text{丙烯酰胺}):V(\text{甲叉双烯酰胺})$ (Merck) = 29:1, φ (浓缩胶) = 4%, φ (分离胶) = 10%。电泳条件: 30 mA 恒流, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 电泳约 2 h。电泳结束后凝胶用 $\varphi=45\%$ 甲醇, $\varphi=10\%$ 冰乙酸, $\varphi=0.25\%$ 考马斯兰 R250 (Fluka) 染色 2 h, $\varphi=30\%$ 甲醇和 $\varphi=10\%$ 冰乙酸溶液脱色。

1.7 酶的贮存

- 1.7.1 酶的低温贮存及其介质 取0.2 mL 纯 CPAO 加到 0.8 mL 的不同离子强度和 pH 的 PBS 中, 4 ℃下放置 24 h 后测定酶活性, 并以贮存开始时的酶活性为 100%。
- 1.7.2 酶的冷冻贮存 将纯化的 CPAO 酶液分装并贮于-15 ℃下, 于不同时间测定其活性。

2 结果与讨论

2.1 CPAO 的分离纯化

经过酶的粗提、硫酸铵沉淀、冷丙酮沉淀、DEAE-Cellulose 柱层析 (图 1a)、Sephacrose CI-4B 柱层析 (图 1b) 和羟基磷灰石柱层析 (图 1c) 等步骤, 得到了纯化的 CPAO 样品。纯化的 CPAO 经 SDS-PAGE, 只出现 1 条蛋白染色带 (图 1d), 达到了电泳纯。表明我们成功地从豇豆幼叶得到了单一的 PAO。根据酶与标准蛋白质的迁移率, 得知该酶的亚基相对

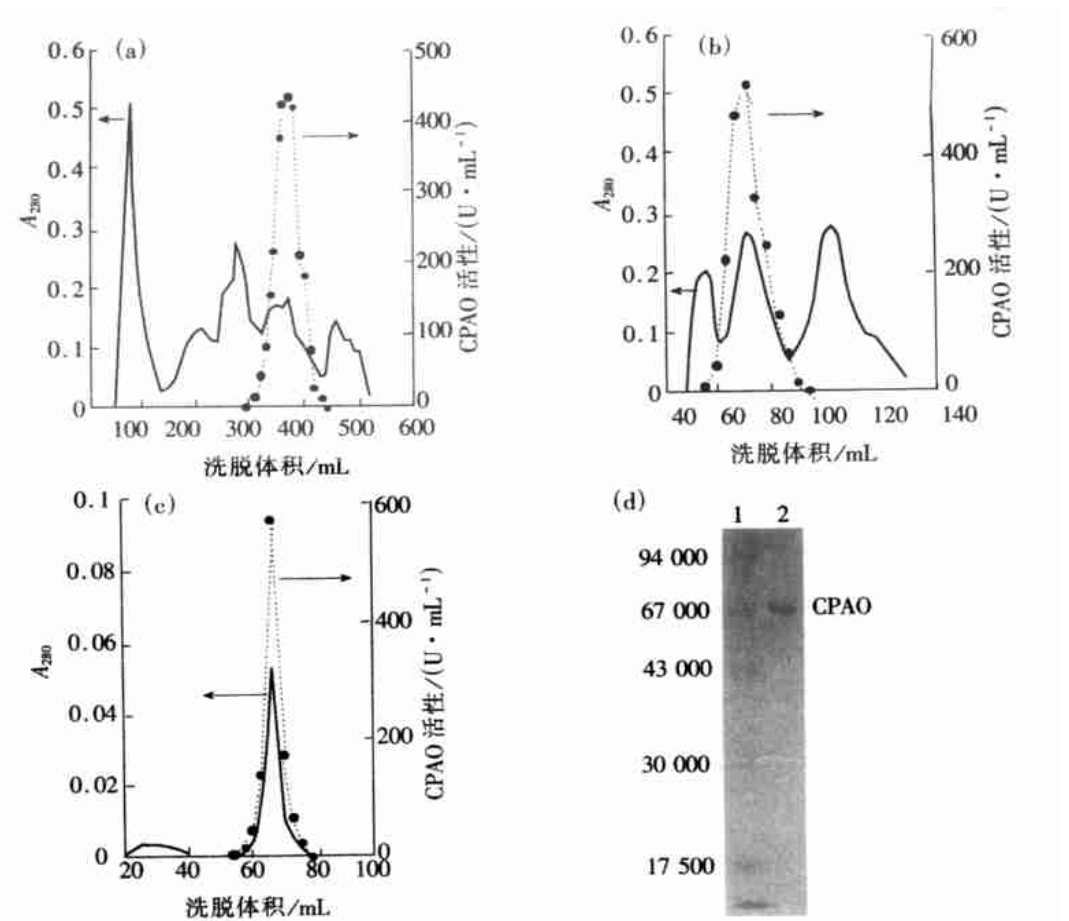


图1 CPAO 的 DEAE-Cellulose (a), Sepharose CI-4B (b) 和
羟基磷灰石 (c) 柱层析, 纯化 CPAO 的 SDS-PAGE (d)

Fig. 1 DEAE-Cellulose (a), Sepharose CI-4B (b) and hydroxylapatite (c)
column elution pattern of CPAO, SDS-PAGE of the purified CPAO (d)

(d): 1 Marker; 2 CPAO

分子质量为 70 000. CPAO 提纯的典型过程总结于表 1.

表 1 豇豆 PAO 的纯化步骤和参数

Tah 1 Purification procedure and parameter of CPAO

纯化步骤	总活性/U	总蛋白/mg	比活性/ (U·mg ⁻¹)	纯化倍数	产率/%
粗提液	31 915	3 473.7	9.2	1	100
φ= 35%~60% 硫酸铵沉淀	21 739	717.0	30.3	3.3	68.1
φ= 70% 丙酮沉淀	12 632	63.7	198.3	21.6	39.6
DEAE-Cellulose 柱层析	8 682	4.94	1 757.5	191.0	27.2
Sepharose Cl-4B 柱层析	6 293	1.57	4 008.3	435.7	19.7
羟基磷灰石柱层析	4 180	0.96	4 354.2	473.3	13.1

前人曾用直接制备丙酮粉末的方法初步提纯玉米^[11] 和风眼莲^[12] 的 PAO, 我们经反复摸索后发现, 采用 φ 为 70% 冷丙酮沉淀经硫酸铵沉淀处理的酶液效果更好, 可除去大量的杂蛋白和残留的色素物质, 酶也被充分浓缩, 且酶的比活性和产率都较高. 一些研究者用阴离子交换柱层析来纯化植物的 PAO^[8 12 13], 我们采用 DEAE-Cellulose (expression ex-changer D) 柱层析并结合 NaCl 线性梯度洗脱也获得了较好的效果, 经此一步 CPAO 比活性提高约 8.8 倍. 纯化过程中, Sepharose Cl-4B 柱层析和羟基磷灰石柱层析两步虽对酶比活提高不多, 且使酶活力损失过半, 但对获得电泳均一的酶蛋白是必不可少的.

2.2 CPAO 贮存的稳定性

4 ℃ 低温下, 贮存介质的离子强度和 pH 对 CPAO 活性都有影响 (图 2). CPAO 贮于 0.01 和 0.1 mol/L 的 PBS 中都以中性或弱碱性 (pH 7.0~7.5) 环境较为稳定. 不过, 在本试验的各 pH 值, CPAO 的稳定性又是以贮于较高离子强度的 0.1 mol/L PBS 中为高. 另外, 在冷冻贮存条件下该酶可保持 20 d 内不失活. Vianello 等^[14] 研究表明, 纯化的大豆 PAO 也是在低离子强度下的稳定性不如较高离子强度, 但该酶较稳定的 pH 范围为 5.0~7.0, 当其在 pH 4.0 或 pH 8.0

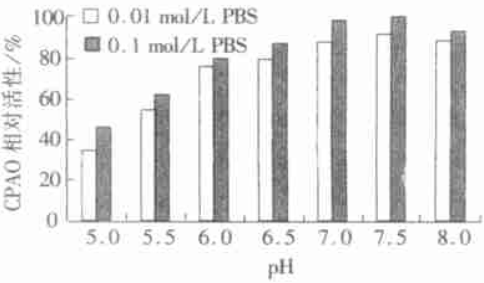


图 2 贮存介质的 PBS 浓度和 pH 对 CPAO 活性的影响

Fig 2 Effects of PBS concentration and pH of the storage medium on the CPAO activity

的介质中 4 ℃ 下存放 24 h 后完全失活; 若将该酶置于液氮 (− 80 ℃) 中贮存 2 个月内可保持其活性不失. Yanagisawa 等^[12] 的研究则显示, 纯化的风眼莲 PAO 在低离子强度下的稳定性反而高些. 如此看来, 植物 PAO 贮存的稳定性与其来源和贮存条件有较大的关系.

参考文献:

[1] HILL J.M. Diamine oxidase (pea seedlings) [J]. Methods Enzymol (B), 1972, 17: 730~735.
[2] SMITH T.A. Polyamines [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1985, 36: 117~143.
[3] MEDDA R, PADIAGLIA A, FLORIS G. Plant copper amine oxidases [J]. Phytochem, 1995, 39: 1~9.
[4] 何生根, 黄学林, 傅家瑞. 植物的多胺氧化酶 [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34 (3): 214~219.

- [5] ROSSI A, PETRUZZELLI R, FINAZZI-AGRO A. cDNA-derived amino acid sequence of lentil seedling amine oxidase [J]. FEBS Lett, 1992, 301: 253~257.
- [6] TIPPING A J, McPHERSON M J. Cloning and molecular analysis of the pea seedling copper amine oxidase [J]. J Bio Chem, 1995, 28: 16939~16946.
- [7] 何生根, 黄学林, 傅家瑞. 部分植物中的多胺氧化酶活性 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 33 (6): 432~433.
- [8] CHAUDHURI M M, GHOST B. Purification and characterization of diamine oxidase from rice embryos [J]. 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 [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248~254.
- [10] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680~685.
- [11] SUZUKI Y, YANAGISAWA H. Purification and properties of maize polyamine oxidase: A flavoprotein [J]. Plant & Cell Physiol, 1980, 21: 1085~1094.
- [12] YANAGISAWA H, KATO A, HOSHIAI S, et al. Polyamine oxidase from water hyacinth: purification and properties [J]. Plant Physiol, 1987, 85: 906~909.
- [13] SUZUKI Y. Purification and characterization of diamine oxidase from *Triticum aestivum* shoots [J]. Phytochem, 1996, 42: 291~293.
- [14] VIANELLO F, Di PALOLM L, STEVANATO R. Purification and characterization of amine oxidase from soybean seedling [J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 307: 35~39.

Purification of Polyamine Oxidase from Cowpea (*Vigna unguiculata*) Primary Leaves

HE Sheng-gen, HUANG Xue-lin^{*}, FU Jia-nui

Abstract: Polyamine oxidase was purified by the criterion of SDS-PAGE from the primary leaves of the cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings by the successive steps of the crude extraction, ammonium sulfate precipitation, acetone precipitation, and chromatography on DEAE-Cellulose, Sepharose CL-4B and hydroxylapatite column. The enzyme was purified 473.3-fold and its yield was 13.1%. The molecular weight of its subunit was about 70 000 estimated by SDS-PAGE. The purified enzyme was relatively stable in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0~7.5) at 4 °C and retained its full activity for 20 d-storage at -15 °C.

Keywords: cowpea (*Vigna unguiculata*); polyamine oxidase; purification

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China