

几种有机酸和氨基酸对乙醇酸 氧化酶活性的影响

徐凤彩 谭锦华 李明启
(光合作用研究室)

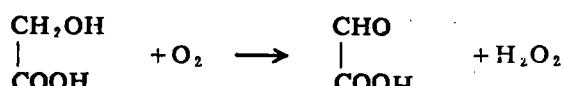
提 要

本文研究苹果酸、甘油酸、丝氨酸、谷氨酸对菜心 (*Brassica parachinensis* Bailey) 叶片乙醇酸氧化酶活性的影响。结果表明, 苹果酸、丝氨酸和谷氨酸均对乙醇酸氧化酶起竞争性抑制作用, 其中以苹果酸和丝氨酸的抑制作用较强而谷氨酸的抑制作用较弱; 测定菜心乙醇酸氧化酶对乙醇酸的 K_m 值为 0.36m mol/L , 丝氨酸、苹果酸、谷氨酸对乙醇酸氧化酶的 K_i 值分别为 $5.5, 7.0, 13.5 \text{m mol/L}$, 甘油酸对乙醇酸氧化酶活性没有明显的影响, 讨论了上述几种有机酸和氨基酸在乙醇酸途径代谢调节中的作用。

关键词 苹果酸; 甘油酸; 丝氨酸; 谷氨酸; 乙醇酸氧化酶

引 言

乙醇酸氧化酶 (EC 1.1.3.1) 是植物光呼吸乙醇酸代谢途径中的一个主要的酶, 在植物体内它能催化乙醇酸氧化生成乙醛酸和过氧化氢:



此酶在1949年最初报告存在于植物中^[2], 以后Zelitch和ochoa从菠菜叶中提纯, 并证明是一种黄素蛋白^[11]。此后在植物中不断发现其普遍存在, 并证明它是分布在过氧化酶体内^[9]。

在过氧化酶体内同时存在谷氨酸和苹果酸, 由线粒体转移来的丝氨酸, 以及由丝氨酸经过转氨反应形成羟基丙酮酸后还原形成的甘油酸等^[9]。这些化合物都是乙醇酸途径中间产物, 其中有的在结构上与乙醇酸相似, 可能影响乙醇酸氧化酶活性。如果它们对乙醇酸氧化酶活性的影响存在的话, 则这种作用在乙醇酸途径的代谢调节中具有重要意义。

关于代谢物调节乙醇酸氧化酶活性的研究较少, 已知它可被草酸抑制^{[5][8]}。最近

1987年9月2日收稿

也有报道谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸和丝氨酸对此酶起竞争性抑制作用^[6]本文报道丝氨酸、苹果酸、谷氨酸、甘油酸对乙醇酸氧化酶活性的影响。

材料和方法

(一) 材料: 菜心

(二) 乙醇酸氧化酶的制备和纯化, 按照Kerr和Groves^[4]的方法和步骤进行。

1. 匀浆: 称取新鲜菜心, 先用自来水, 后用无离子水洗净吸干, 加入80ml 0.1 mol/L Na₂HPO₄ (pH8.0) 的缓冲液, 匀浆1分钟, 四层沙布过滤, 并离心 (0-4°C, 10500×g, 15分钟, 下同)。

2. pH5.3沉淀: 1的上清液加10%醋酸, 小心调pH至5.3、搅拌10分钟, 离心除去沉淀。

3. 硫酸铵分部: 2的上清液加入硫酸铵至25%饱和度, 离心弃去沉淀, 其上清液再加硫酸铵至43%饱和度, 离心收集沉淀。沉淀用10ml 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.3) 溶解。

4. 硫酸鱼精蛋白沉淀: 于3的溶解液中缓急加入2ml 2%硫酸鱼精蛋白(现配现用), 并搅拌, 离心弃去沉淀。鱼精蛋白可与核酸形成复合物沉淀, 以除去核酸, 否则、酶与核酸形成复合物而降低产量。

5. Sephadex G25-DEAE纤维层析: Sephadex G25柱(2.5×13cm、细粉末, Sigma)用5m mol/L Tris-HCl pH8.3缓冲液平衡, 将4的上清液立即加入层析柱, 收入出现的蛋白质带立即泵入DEAE-纤维素层析柱(DEAE-23 SERVA 2×8cm), 流速48ml/h。用同上述缓冲液平衡。洗脱, 洗脱液以考马氏亮兰法不断监测, 当出现蛋白质时, 即为乙醇酸氧化酶部分, 收集此部分。DEAE-纤维素吸附大部分杂质蛋白质。乙醇酸氧化酶不被吸附。收集的酶液加入等体积的饱和硫酸铵溶液(pH8.3)。至此, 纯酶液放入冰箱过夜。次日取出离心, 沉淀用2ml 50mmol/L Tris-HCl (pH8.3)溶解。

6. 琼脂糖凝胶层析: 将上述溶液加于1.5×35cm的4%琼脂糖凝胶(珠状、中国东海制药厂)层析柱。用50mmol/L Tris-HCl pH8.3缓冲液平衡。收集酶部分, 备用。

(三) 酶的活性测定: 根据Servaides等^[7]的方法用盐酸苯肼法测定10分钟内生成乙醛酸的毫克分子数。反应液含:

A. 稀解酶液0.2ml, B. Tris-HCl缓冲液(50mmol/L pH8.3)1.4ml, C. 过氧化氢酶(25单位)0.2ml, D. 50mmol/L乙酸醇0.2ml。

表1 纯化过程总结(50g材料)

步骤	体积(ml)	总活性*	蛋白总量(mg)	比活性**	产量(%)	纯化度
A	118	631	3947	0.16	100	1.0
B	98	611	1548	0.395	96.8	2.5
C	10	425	488	0.87	67.4	5.4
D	12	375	368	1.02	59.4	6.4
E	75.8	315	28	11.25	50.0	70.3
F	—	—	—	27	—	169

* 酶的活性单位为乙醛酸mmol×10⁻¹分钟。

** 酶的比活性单位为mmol乙醛酸mg⁻¹蛋白质10⁻¹分钟。

先将A、B、C、混合, 与D分别放30℃水浴中, 待温度平衡后, 吸取D加入、开始反应。10分钟后以0.2ml 2mol/L HCl中止反应。取出、离心, 吸取上清液1ml, 用0.1ml 1.82 mol/L NaOH中和, 再加0.2ml 0.33%盐酸苯肼(溶于0.15mol/L HCl中)。10分钟后, 放入冰浴中, 加1ml 12mol/L HCl, 0.2ml 1.65%铁氰化钾, 混合后, 放置20分钟, 在550nm波长下比色。

蛋白质测定用考马氏亮蓝法^[1]。

丝氨酸、甘油酸、苹果酸、谷氨酸每种用四个浓度(0, 2.5, 5, 10mmol/L), 在五个不同乙醇酸浓度(底物)下, 分别测定其乙醛酸生成量。

试验结果

(一) 甘油酸对乙醇酸氧化酶活性的影响

由表2可见, 不同浓度的甘油酸对乙醇酸氧化酶活性没有明显的影响, 尽管它在结构上与乙醇酸相似, 亦具有 α -羟基。

(二) 丝氨酸对乙醇酸氧化酶活性的影响

丝氨酸对乙醇酸氧化酶活性有明显的抑制作用。在相同底物(乙醇酸)浓度下, 这种抑制作用随丝氨酸浓度的增加而加大; 但是在不同底物浓度下, 抑制作用随浓度底的增加而下降。以不同底物浓度对反应速度、用Lineweaver-Burk法作图(图1), 测得乙醇酸氧化酶的 K_m 值为0.36 mmol/L。同时从图1可见随着丝氨酸浓度的加大, V_m 值不变而 K_m 值变大, 这说明丝氨酸对乙醇酸氧化酶活性的抑制作用属于竞争性抑制作用, 并求得丝氨酸对乙醇酸氧化酶的 K_i 值为5.5mmol/L。

(三) 苹果酸对乙醇酸氧化酶活性的影响

苹果酸对乙醇酸氧化酶活性也有明显的抑制作用, 而且也属于竞争性抑制(图2)。因为这种抑制作用, 可因底物浓度的提高而下降, 而且表现出 K_m 值增加, 而 V_m 不变, 其 K_i 值为7.0 mmol/L。

表2 甘油酸对乙醇酸氧化酶活性的影响

处理	甘油酸浓度 (mmol/L)	乙醇酸浓度 (mmol/L)	乙醇酸氧化酶活性 ($10^{-2}\mu\text{mol乙醛酸克重鲜}/10\text{分钟}$)
1	0	5	21.10
2	2.5	5	20.80
3	5.0	5	21.33
4	7.5	5	21.67
5	10.0	5	20.80

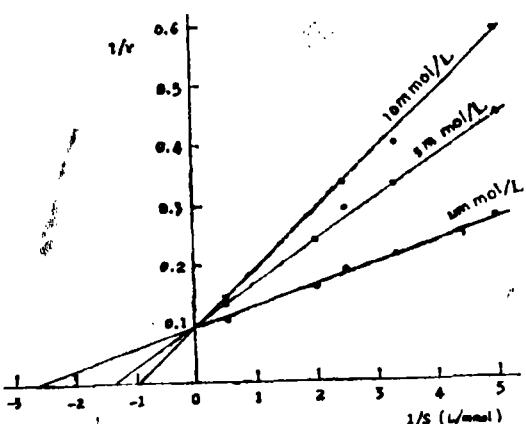


图1 丝氨酸对乙醇酸氧化酶抑制作用的双倒数作图

(四) 谷氨酸对乙醇酸氧化

酶活性的影响

谷氨酸对乙醇酸氧化酶活性也有竞争性抑制作用(图3)、其 K_i 值为 13.5 m mol/L 。

综上所述、除甘油酸对乙醇酸氧化酶活性没有明显影响外，丝氨酸、苹果酸、谷氨酸都对乙醇酸氧化酶有明显的抑制作用，而且由实验所得数据来看，这种抑制作用均属于竞争性可逆抑制。

讨 论

对乙醇酸氧化酶代谢调节的研究。可使我们更深入了解植物光呼吸代谢调节的机理，从而为人工控制光呼吸，提高光合生产率提供理论依据。

(一) 乙醇酸途径碳、氮代谢的协调、在过氧化物酶体内谷氨酸来自叶绿，丝氨酸来自线粒体，而甘氨酸是由谷氨酸和丝氨酸通过转氨酶的作用由乙醛酸形成。以后甘氨酸转移至线粒体内并发生氧化脱氨，生成丝氨酸和氮

等，氮又经同化形成谷氨酸^[3]。我们实验及Pandey和Sanwal的报告均观察到谷氨酸、丝氨酸及甘氨酸对乙醇酸氧化酶有抑制作用。当细胞内这些氨基酸过多累积时，乙醇酸氧化酶活性降低， C_2 循环减慢，这些氨基酸的生成也就减少；而当这几种氨基酸下降时，乙醇酸氧化酶活性加强， C_2 循环加速进行(图4)。从而使乙醇酸途径的碳、氮代谢得以协调进行。至于植物是否依靠 C_2 循环以生成所需甘氨酸、丝氨酸供叶绿素和蛋白质的生物合成之用，目前仍有不同意见，但不管怎样，当细胞内这些氨基酸的利用增加而含量减少时，将有利 C_2 循环的进行。实际情况是否如此，将有待实验进一步证明。

(二) 苹果酸的调节作用 在过氧化物酶体内含有NAD—苹果酸脱氢酶，能将羟基丙酮酸还原为甘油酸^[4]，苹果酸由细胞质通过苹果酸—天冬氨酸穿梭而来^[5]，细胞质的

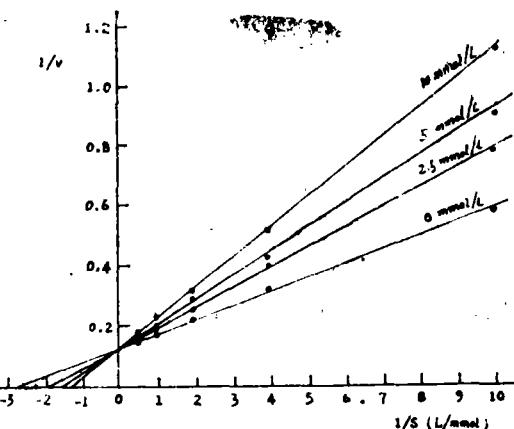


图2 苹果酸对乙醇酸氧化酶抑制作用的双倒数作用图

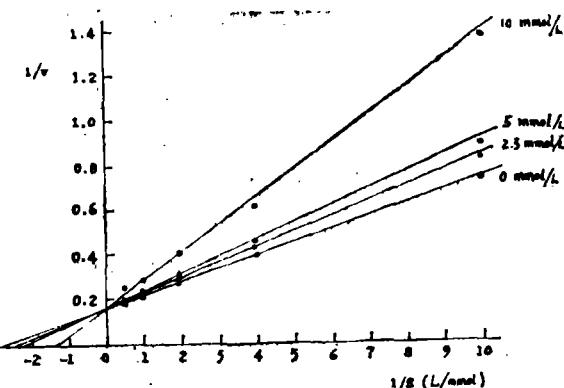


图3 谷氨酸对乙醇酸氧化酶抑制作用的双倒数作用图

苹果酸又可由线粒体通过苹果酸—草酰乙酸穿梭而来^[10]。我们的实验发现苹果酸对乙醇酸氧化酶有竞争性抑制作用。即当乙醇酸氧化酶迅速进行时,生成甘氨酸较多;在线粒体内由甘氨酸氧化生成的NADH,将草酰乙酸还原生成的苹果酸亦较多;较多的苹果酸穿梭入过氧化物酶体内,将有利于C₂循环向前进行。但苹果酸对乙醇酸氧化酶有抑制作用,由苹果酸氧化生成的草酰乙酸^[8]及进一步转氨生成的天冬氨酸对乙醇酸氧化酶亦有抑制作用^[8],这便可以防止C₂循环过速运行。

(三) 在过氧化物酶体内也含有甘油酸,它亦具有 α -羟基,和乙醇相似,但我们实验,未发现甘油酸对乙醇酸氧化酶有抑制作用。这可能是由于甘油酸的—CH₂OH基团碍阻它与酶的活性部位结合。

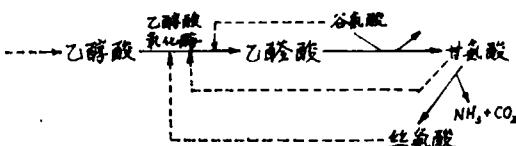


图4 谷氨酸、甘氨酸、丝氨酸对乙醇酸途径的调节作用,虚线箭头示抑制作用

引用文献

- [1] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.*, 27: 248-254
- [2] Clagett, C. O. et al. (1949) Oxidation of α -hydroxy acids by enzymes from plants. *J. Biol. Chem.*, 178: 977-987
- [3] Keys, A. J. et al. (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature*, 275: 741-743
- [4] Kerr, M. W., Groves, D. (1975) Purification and properties of glycolate oxidase from *Pisum sativum* leaves. *Phytochem.*, 14 (2), 359-362
- [5] Nishimura, M. et al. (1983) Purification and characterization of glycolate oxidase from pumpkin cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.*, 222: 397-402
- [6] Pandey, O. P., Sanwal, G. G. (1982) Purification and properties of glycolate oxidase from *Nopalea erecta*, a CAM plant. *Plant Physiol. Biochem.* 9 (2), 80-87
- [7] Servaite, J. C. et al. (1978) Glycolate synthesis in a C₃, C₄ and intermediate photosynthetic plant type. *Plant Cell Physiol.* 19 (8), 1399-1405
- [8] Tomlbert, N. E. et al. (1949) Products of the oxidation of glycolic acid and 1-lactic acid by enzymes from tobacco leaves. *J. Biol. Chem.*, 181: 905-914
- [9] Tolbert, N. E. (1971) Microbodies—peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 22: 45-74
- [10] Woo, K. C., Osmond, C. B. (1976) Glycine decarboxylation in mitochondria isolated from spinach leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, 3: 771-785
- [11] Zelitch, I., Ochoa, S. (1953) Oxidation and reduction of glycolic and glyoxylic acids in plants. I. glycolic acid oxidase. *J. Biol. Chem.*, 201: 707-718

EFFECTS OF SOME ORGANIC AND AMINO ACIDS ON THE ACTIVITY
OF GLYCOLATE OXIDASE FROM LEAVES OF
Brassica parachinensis Bailey

Xu Fengcai Tan Jinhua Li Mingqi

(Laboratory of Photosynthesis Research)

ABSTRACT

In this communication we report the effects of malic and glyceric acids, serine, and glutamic acid on the activity of glycolate oxidase from the leaves of *Brassica parachinensis* Bailey. It was found that malic acid, serine, and glutamic acid inhibited competitively the activity of glycolate oxidase; the K_i values for serine, malic acid, and glutamic acid were 5.5, 7.0, and 13.5 $\mu\text{mol/L}$ respectively, while the K_m (glycolate) of glycolate oxidase was 0.36 $\mu\text{mol/L}$ determined by the Lineweaver-Burk plots. Glyceric acid showed no marked effect on the activity of this enzyme. The significance of the regulation of glycolate oxidase by these acids in the photorespiratory glycolate pathway is discussed.

key words: malate; glycerate; serine; glutamate; glycolate oxidase