林业科学研究 2008,21(2):154～160
Forest Research

文章编号:1001-1498(2008)02-0154-07

柠条幼苗苯丙氨酸解氨酶的纯化

邱 枫[1,2], 许 雷[2], 高洪文[1]

(1.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,北京 100094; 2.中国农业科学院研究生院,北京 100081)

摘要:用离子交换层析和分子筛层析分离纯化了真叶期柠条根、速生期柠条叶、茎中的苯丙氨酸解氨酶(PAL),并测定了 PAL全酶的分子量。用 SDS-PAGE鉴定了全酶的组成,测定了各亚基的分子量。结果表明:柠条叶中存在 306KD和 222KD两种 PAL,前者是由 82KD和 74KD亚基组成的异聚体,后者是由 74KD亚基组成的同聚体;而柠条根和茎中仅存在 74KD亚基组成的 222KD全酶。该研究为 pal基因的克隆及应用奠定了基础。

关键词:柠条;苯丙氨酸解氨酶;分离纯化

中图分类号:S793.3 **文献标识码**:A

Purification of Phenylalanine Ammonia-lyase in *Caragana korshinskii* Juvenile

QIU Feng[1,2], *XU Lei*[2], *GAO Hong-wen*[1]

(1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;
2. Graduate School, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4.3.1.5) of root in leaf stage, leaf and branch in rapid growth stage of *Caragana korshinskii*, was purified by ion exchange chromatography and gel filtration chromatography. The subunits of PAL by SDS-PAGE were analyzed. The results showed that when purified by ion exchange chromatography and gel filtration chromatography, there were two kinds of PAL, one MW was 306KD and the other was 222KD, from leaf and one PAL which MW was 222 KD from stem and root. By SDS-PAGE, it could conclude that the PAL, MW 306KD, was composed of two polypeptides which MW might be 82KD and two polypeptides which MW might 74 KD, and the 222KD-MW PAL was composed of four homology subunits, which MW was 74KD.

Key words: *Caragana korshinskii*; phenylalanine ammonia-lyase; purify

柠条(*Caragana korshinskii* Kom.)具有较强的适应性和抗逆性,是纤维素、蛋白质等含量较高的多年生灌木。在我国"三北"等环境恶劣、沙化严重地区柠条是重要的饲用植物和造纸材料。但柠条中木质素含量较一般饲草高,导致饲用时,营养价值降低;造纸时成本增加,污染严重。因此降低柠条的木质素含量意义重大。

苯丙氨酸解氨酶(PAL, EC 4.3.1.5)1961年被首次报道[1],除动物外,该酶广泛存在于绿色植物、真菌、细菌、藻类中。PAL催化苯丙烷类代谢途径的第一步反应,即 L-苯丙氨酸非氧化脱氨生成反式肉桂酸,该酶是类黄酮、木质素生物合成等次生代谢过程中的重要调控酶。柠条中尚无任何 PAL纯化方面的研究报道。作者以柠条幼苗为材料,采用离子交换层析和分子筛层析技术对 PAL进行了纯化;用电泳技术对纯化的 PAL进行了亚基组成和分子量

收稿日期: 2006-04-25, 修回日期:2007-06-28
基金项目:国家"863"现代农业主题"抗旱耐盐碱生态环境建设用林灌木柠条、沙棘等新品种选育"(2002AA241091)
作者简介:邱枫(1976—),女,辽宁沈阳人,博士。研究方向:生物化学与分子生物学. E-mail: syqiufeng@163.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

大小研究。

1　材料与方法

1.1　材料

植物材料:采自山西五寨的当年生柠条种子。

试剂: DEAE 52购自 Whatman公司; Sephadex G200(颗粒直径 40～120 μm)等购自 Ameresco公司;兰葡聚糖,标准分子量蛋白质,电泳试剂,考马斯亮兰 G250等购自 Sigma公司;其余试剂均为国产分析纯以上试剂。

1.2　材料培养

选取饱满无虫蛀的种子, 0.1%氯化汞消毒 10 min,无菌水冲洗 3次,无菌水浸泡 24 h,定植于无菌细沙中。培养液浇透。23 ℃/17 ℃(光/暗)(60%湿度, 10 000 lx光强(高压汞灯), 16 h/8 h(光/暗)培养。2 d用营养液浇透 1次。培养用营养液见文献[2]。

1.3　实验材料选用

定植 40 d左右的真叶期苗取根部。

定植 80 d左右的速生期苗(真叶期后生长 40 d),分取茎、叶部。

1.4　PAL粗酶提取

采用改进的 Hahlbrock K, Ragg H.[3]和 Koike M, Nanbu K[4]方法:相关材料 20 g蒸馏水冲洗干净,吸水纸吸干,剪碎,加 200 mL 0.1 mol·L^{-1}硼酸-硼砂缓冲液(pH值 8.8,内含 1 mmol·L^{-1} EDTA, 5 mmol·L^{-1}巯基乙醇, 1 g·L^{-1} PVP, 1 g·L^{-1}甘油),预冷后用植物组织捣碎机快速匀浆, 12 000 r·min^{-1}冷冻离心 20 min,取上清液。

1.5　PAL酶蛋白纯化

1.5.1　盐析　上清液冰浴中加硫酸铵至 30%饱和度, 15 000 r·min^{-1}冷冻离心 10 min,取上清液,冰浴中加硫酸铵至 60%饱和度, 15 000 r·min^{-1}冷冻离心 10 min,取沉淀,加 10 mL 0.01 mol·L^{-1} Tris-HCl(pH值 8.8)复溶,装入透析袋, 4 ℃冰箱过夜,对 0.01 mol·L^{-1} Tris-HCl(pH值 8.8)透析, 2 h换 1次溶液,透析至溶液中纳氏试剂滴定无铵根离子残留。PEG6000反透析浓缩至 2 mL左右。

1.5.2　离子交换层析纯化　PAL　DEAE 52常规处理,装柱, 0.01 mol·L^{-1} Tris-HCl(pH值 8.8)平衡,浓缩透析液上样。100 mL NaCl+100 mL 0.01 mol·L^{-1} Tris-HCl(pH值 8.8)梯度洗脱(盐离子浓度从 0～1 mol·L^{-1})。部分收集器收集洗脱液,每 4 mL一管。分别测定蛋白量和 PAL酶活。

1.5.3　分子筛凝胶层析纯化　PAL　Sephadex G200浸泡 48 h后,脱气,装柱。0.01 mol·L^{-1} Tris-HCl(pH值 8.8)平衡。合并收集 1.5.2中的相邻活性峰, PEG6000反透析浓缩至 2 mL左右,上样。180 mL 0.01 mol·L^{-1} Tris-HCl(pH值 8.8)洗脱,部分收集器收集洗脱液,每 2 mL一管。分别测定蛋白量和 PAL酶活。

1.5.4　PAL全酶分子量测定　1.6 ×80层析柱,装 Sephadex G-200约 75 cm高,柱体积(Vt)约为 150 mL。将兰葡聚糖、碳酸酐酶(MW 29 KD)、牛血白蛋白(MW 66 KD)、醇脱氢酶(150 KD)、β淀粉酶(200 KD)、马脾脱铁铁蛋白(443 KD)等分子混合上样,以蓝色检测兰葡聚糖的洗脱,测定外水体积(Vo);OD280检测其它蛋白的洗脱,测定各自的洗脱体积(Ve)。按照公式 $K_{av} = (Ve-Vo)/(Vt-Vo)$,求得 5种标准分子量蛋白的 K_{av},根据 K_{av}与蛋白质分子量对数呈线性相关,求出蛋白质分子量与相应 K_{av}曲线图的回归方程,根据样品的 K_{av},从标准曲线的回归方程求出样品分子量。

1.6　PAL活性测定

反应缓冲液: 0.1 mol·L^{-1}硼酸缓冲液 pH值 8.8。

底物: 0.2 mol·L^{-1}L苯丙氨酸。

反应: 1 mL粗酶液+1 mL反应缓冲液+0.1 mL底物(以加同浓度的 D苯丙氨酸为空白对照), 30 ℃保温 30 min, 290 nm比色,以每小时每 mL酶液在 290 nm处吸收变化 0.01为 1酶单位。

1.7　蛋白质含量测定

采用 Bradford法[5]进行。

1.8　PAL酶蛋白的电泳

采用改进的 Laemmmli U K[6]方法进行。浓缩胶 3%;分离胶 8%。兔肌球蛋白(205 KD)、β半乳糖苷酶(116 KD)、6-磷酸果糖激酶(84 KD)、牛血白蛋白(66 KD)、鸡卵清蛋白(45 KD)、大豆胰蛋白酶抑制剂(20 KD)等分子比混匀,用样品缓冲液配制成 2 mg·mL^{-1},作为标准分子量蛋白。

2　结果与分析

取柠条真叶期根、速生期茎和叶,进行了粗提、盐析、DEAE-52离子交换层析、SephadexG200凝胶层析纯化和 PAGE分析鉴定。

2.1　柠条 PAL的离子交换层析

30%～60%盐析的柠条速生期叶片的 PAL,用

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

DEAE-52离子交换柱层析进行分离纯化,结果如图 1所示:

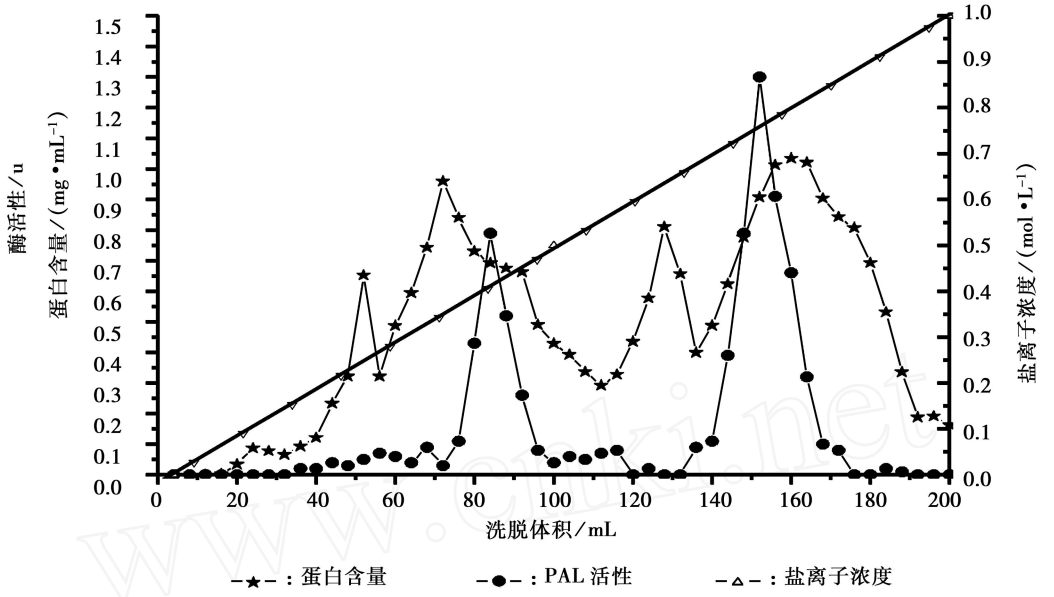

图 1 柠条叶片 PAL的离子交换柱层析图

从图 1可见:经 30%～60%硫酸铵盐析初步纯化的柠条叶片 PAL,经离子交换层析分离,可以得到 2个活性峰。洗脱这 2个 PAL组分的盐离子浓度分别约为 0.4 mol·L^{-1}和 0.75 mol·L^{-1}。这表明在速生期柠条叶片中可能存在理化性质不同的 PAL同工酶。PAL是木质素合成等多条植物次生代谢途径的关键酶、调控酶,其同工酶的存在可使速生期植物叶片中多种代谢实现分途径调控。

30%～60%盐析的柠条速生期茎的 PAL,用 DEAE-52离子交换柱层析进行分离纯化,结果如图 2所示:

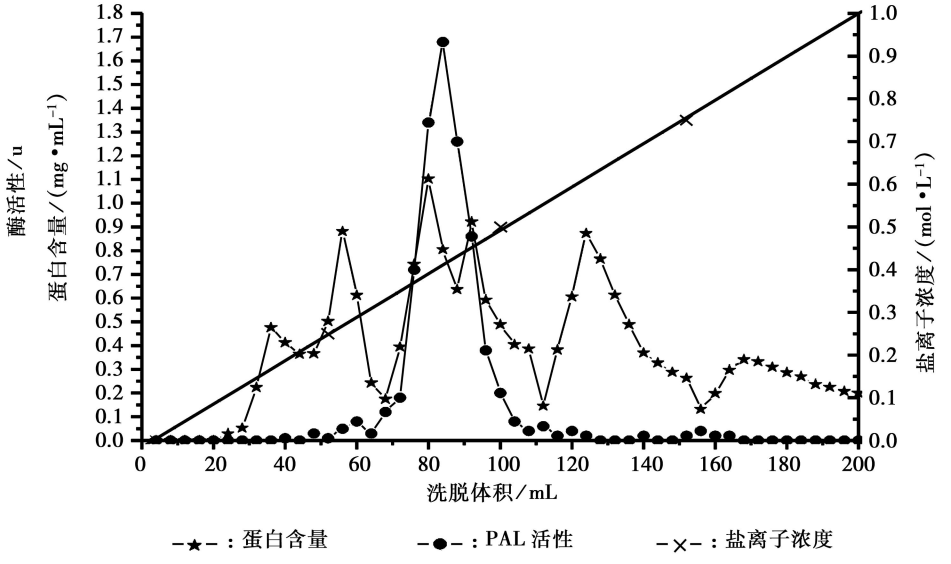

图 2 柠条茎 PAL的 DEAE-52离子交换柱层析图

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

从图 2中可见:经 30%～60%硫酸铵盐析初步纯化的柠条茎 PAL,经离子交换层析分离,仅有 1个活性峰,洗脱该活性组分的盐离子浓度约为 0.4 mol·L^{-1}。这表明速生期柠条茎中可能无 PAL同工酶。

30%～60%盐析的柠条真叶期根的 PAL,用 DEAE-52离子交换柱层析进行分离纯化,结果如图 3所示:

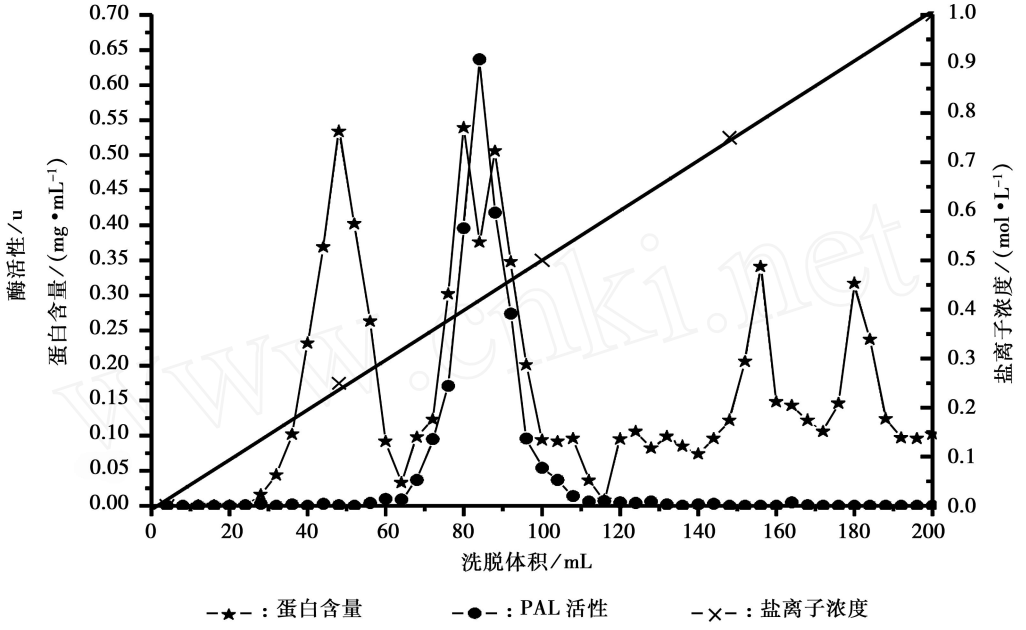

图 3　柠条根 PAL的 DEAE-52离子交换柱层析图

从图 3中可见:经 30%～60%硫酸铵盐析初步纯化的柠条根 PAL,经离子交换层析分离,也仅有 1个活性峰,洗脱该 PAL组分的盐离子浓度约为 0.4 mol·L^{-1}。这表明真叶期柠条根中无 PAL同工酶。

2.2　柠条 PAL的分子筛层析及全酶分子量

2.2.1　蛋白质分子量标准曲线制作　碳酸酐酶、牛血白蛋白、醇脱氢酶、β淀粉酶、马脾脱铁铁蛋白混合物经 Sephadex G-200层析分离后,各自的 K_{av}分别为:0.44、0.32、0.24、0.2、0.12。求出蛋白质分子量对数与 K_{av}值的回归方程为:$\mathrm{Log}MW = 3.00187 - 3.67513K_{av}$

2.2.2　柠条 PAL的分子筛层析　分别合并经 DEAE52纯化,有 PAL活性的样品液,反透析浓缩。将 4个样品(即 0.4 mol·L^{-1}盐洗脱叶 PAL样品、0.75 mol·L^{-1}盐洗脱叶 PAL样品、0.4 mol·L^{-1}盐洗脱茎 PAL样品和 0.4 mol·L^{-1}盐洗脱根 PAL样品)进行 Sephadex G-200纯化,结果分别如图 4—7所示:

从图 4中可见:0.4 mol·L^{-1}盐离子洗脱柠条叶 PAL经分子筛层析纯化后得到单一洗脱峰,其 K_{av}约为 0.18,由回归方程得分子量约为 222KD。

从图 5中可见:0.75 mol·L^{-1}盐离子洗脱柠条叶 PAL经分子筛层析纯化后得到单一洗脱峰,其 K_{av}约为 0.14,由回归方程得分子量约为 306KD。

从图 6中可见:速生期柠条茎 PAL经分子筛层析纯化后得到单一洗脱峰,其 K_{av}约为 0.18,由回归方程得分子量约为 222KD。

从图 7中可见:真叶期柠条根 PAL经分子筛层析纯化后得到单一洗脱峰,其 K_{av}约为 0.18,由回归方程得分子量约为 222KD。

2.3　纯化 PAL的 SDS-PAGE鉴定及 PAL亚基分子量测定

分子筛层析纯化后的各 PAL样品,进行 SDS-PAGE,电泳结果如图 8所示。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

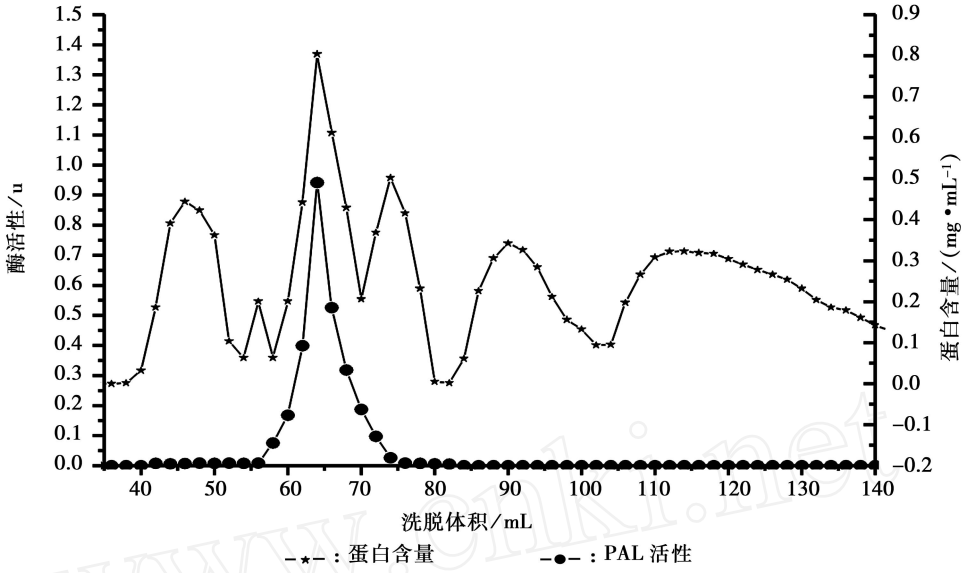

图 4 0.4 mol·L⁻¹盐离子洗脱、柠条叶 PAL的分子筛层析图

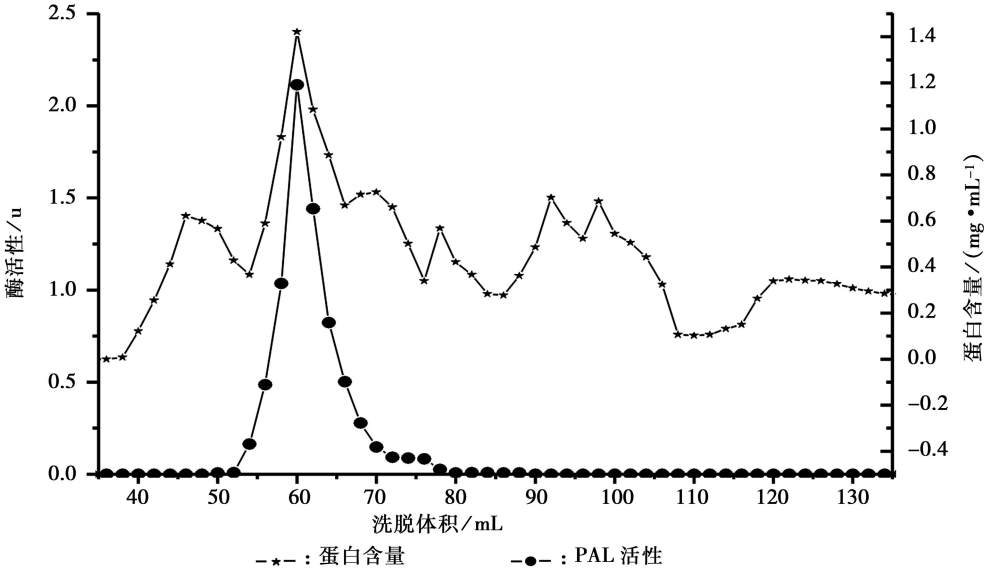

图 5 0.75 mol·L⁻¹盐离子洗脱、柠条叶 PAL的分子筛层析图

根据图 8中标准分子量蛋白的 Rf(分别约为 0.21、0.36、0.46、0.53、0.64、0.84),及相应的分子量,求出 Rf - 分子量对数标准曲线的回归方程: $y = 2.608\ 47 - 1.546\ 13x$

从图 8中可见 PAL样品经 SephadexG200纯化后基本能达到电泳纯。

柠条叶片中分子量为 306KD的 PAL经电泳后出现 2个浓度基本相等的组分,其 Rf分别为 0.45和 0.48(图 8,泳道 1),回归方程得分子量为 82KD和 74KD。

柠条叶片中分子量为 222KD的 PAL经电泳后仅有 1个组分,其 Rf为 0.48(图 8,泳道 2),回归方程得分子量为 74KD。

柠条茎和根中分子量为 222KD的 PAL经电泳后同样仅有 1个组分,其 Rf为 0.48(图 8,泳道 3、4),回归方程得分子量为 74KD。

3 讨论与结论

柠条是我国“三北”及一些土壤贫瘠、沙化严重地区重要的饲用和纸浆植物,尽管国内外对其生化

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

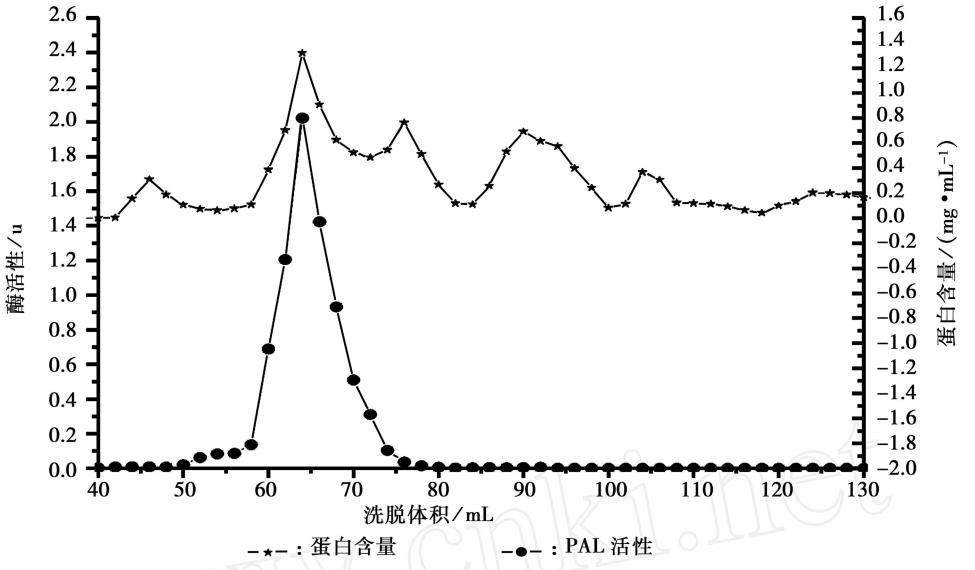

图 6　柠条茎 PAL的分子筛层析图

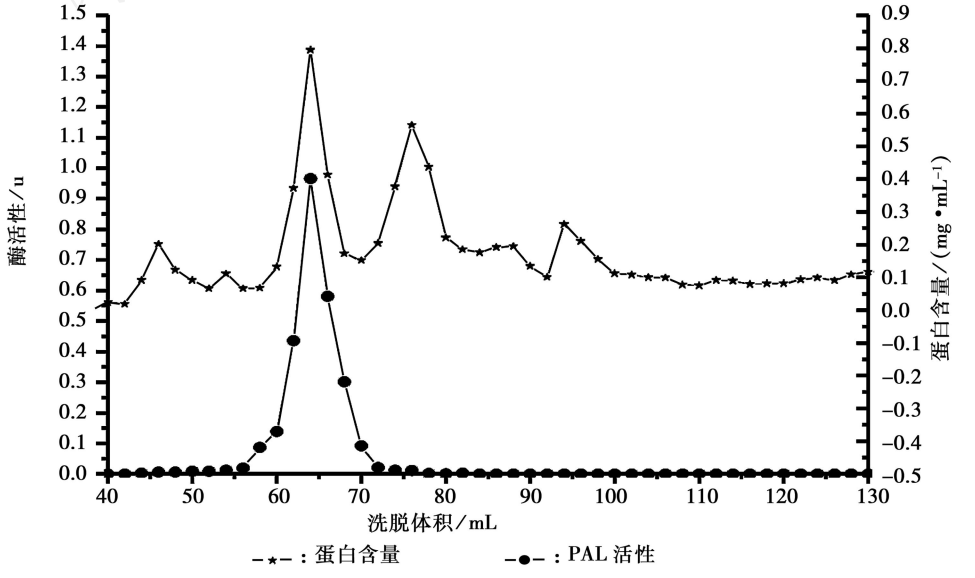

图 7　柠条根 PAL的分子筛层析图

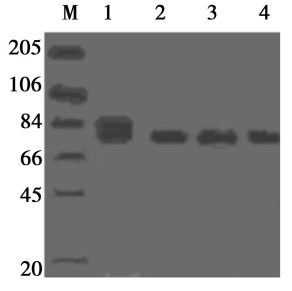

图 8　柱纯化柠条 PAL的 SDS-PAGE (M:标准分子量;
1:叶中 306KD PAL样品;2:叶中 222KD PAL样品;
3:茎中 222KD PAL样品; 4:根中 222KD PAL样品)

代谢及相关酶的研究基本处于空白阶段,但对其生物学特性研究还比较详细。方天纵[7]通过聚类法分析把苗期柠条分为萌芽期、子叶期、速生期和硬化期,本论文根据该阶段划分标准,选取不同发育时期的柠条进行不同器官的 PAL纯化研究。

国内在 PAL纯化方面的研究报道较少,江柯等[8]进行了红酵母苯丙氨酸解氨酶的分离纯化,刘卫红等[9]进行了银杏 (*Ginkgo biloba* L.)叶苯丙氨酸解氨酶的分离纯化,这 2篇论文均通过 SDS-PAGE分别证明在酵母和银杏中 PAL全酶是 79.4KD单一亚基的多聚体,但没有提出全酶的分子量。

国外在这方面的研究较多,但结论不尽相同。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Bolwell GP[10]从菜豆 (*Phaseolus vulgaris* Linn.)中纯化出的 PAL亚基为 77KD,1986年该项目组又用实验证实菜豆中 PAL77KD的亚基易部分降解为 70KD、53KD和 46KD,因此在纯化 PAL时菜豆中易得到该 3个亚基成分[1],1991年从同样材料中他们又提纯到了 PAL的 83KD成分[12]。他们认为在菜豆中至少有 2种以上的 PAL存在。77KD亚基组成的 PAL表达量易受外界环境影响,对应于植物体苯丙烷类代谢的快反应,该亚基在体内易被降解,而 88KD亚基组成的 PAL是由看家基因编码,不受环境影响,不易降解,催化苯丙烷类代谢中的慢反应。A da Cunha[13]以菜豆为材料研究 PAL时,认为菜豆内有由 4个 83(+/-4)KD亚基组成的 320+/(-9KD)和 330(+/-4KD)两种 PAL全酶。但 Whetten R.W和 Sedevoff R.R[14]从火炬松 (*Pinus taeda* Linn.)中提纯到 PAL全酶为 280KD,亚基为 74KD,并认为该植物中 PAL没有同工酶。Lim H W等[15] 1997年在进行芥蓝 (*Brassica juncea* var. *integrifolia* (West) O. E. Schulz) PAL纯化后提出该植物 PAL由 4个 40KD亚基组成的共聚体。尽管大多数研究认为 PAL全酶均由 4个相同亚基构成,但 K K Kalghatgi和 P V Subba Rao[16]的研究却表明从立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* Kühn中提纯到的 330KD PAL全酶是由 2个 70KD(α亚基)和 2个 90KD(β亚基)组成的。

经硫酸铵分级沉淀,DEAE 52离子交换层析及 Sephadex G200分子筛层析分离,从柠条中提纯到了 2种 PAL,分子量分别约为 222KD和 306KD,前一种 PAL在柠条根、茎、叶中均存在;后一种 PAL仅存在于柠条叶中。该结果与 Bolwell GP和 A da Cunha在菜豆中的结论基本相同。

分子筛层析时,PAL中二硫键完整,因此测定的分子量为全酶分子量,而 SDS-PAGE中因加入了巯基乙醇,PAL中二硫键被打断,测定的分子量为 PAL组成亚基的分子量。比较分子筛层析和 SDS-PAGE分子量测定结果可以发现:柠条叶、茎及根中 222KD的 PAL全酶由 4个约 74KD的相同亚基构成;而叶中 306KD PAL全酶是由 2个 74KD亚基和 2个 82KD亚基组成的异多聚体。该结果与前人在植物材料中的研究结果有差异,而与微生物来源的 PAL全酶组成相同。这可能是由于柠条为野生种遗传背景较为复杂有关。

本研究结果表明柠条中 PAL存在同工酶,柠条 PAL全酶既有由相同亚基构成的,也有由不同亚基构成的,这些结论为进一步进行木质素生物合成的分子调控操作打下了基础。

参考文献:

[1] Koukol J, Conn E E. The metablism of aromatic compounds in high plants: Purification and propertics of the L-phenvlalanine deaminase of Herdeum vulagare[J]. Biol Chem, 1961(236): 2692 - 2698

[2] 牛西午,丁玉川,许 强,等.营养液不同磷浓度对柠条苗期植株生长发育的影响[J].西北植物学报, 2003, 23(4): 622 - 627

[3] Hahlbrock K, Ragg H. Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1975, 166: 41 - 46

[4] Koike M. Nanbu K. Phenylalanine ammonia-lyase activity in alfalfa suspension cultures treated with conidia and elicitors of Verticillium albo-atrum[J]. Biologia Plantarum, 1997(5): 349 - 353

[5] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analyt Biochem, 1976, 72: 248 - 254

[6] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature 1970, 227: 680 - 685

[7] 方天纵,安守芹,赵怀青.应用有序聚类法对柠条苗高生长期的划分[J].内蒙古林学院学报(自然科学版), 1996, 18(1): 22 - 26

[8] 江 柯,卢 涛,赵德利,等. 红酵母苯丙氨酸解氨酶的分离纯化及性质研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, 141(14): 865 - 868

[9] 刘卫红,王 燕,杜何为,等.银杏叶苯丙氨酸解氨酶分离纯化条件的研究[J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(3): 196 - 198

[10] Bolwell G P, Bell J N, Cramer C L, *et al*. L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris* characterisation and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cell suspension cultures [J]. European Journal of Biochemistry, 1985, 149: 411 - 419

[11] Bolwell G P, Cramer C L, Lamb C J, *et al*. L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: partial degradation of enzyme subunits *in vitro* and *in vivo*[J]. Biochim Biophys Acta, 1986, 881: 210 - 217

[12] Bolwell G P, Rodgers M W. L-phenylalanine ammonia-lyase from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) characterization and differential expression of antigenic multiple Mr forms[J]. Biochem J, 1991, 279: 231 - 236

[13] A da Cunha. Purification characterization and induction of L-phenylalanine ammonia- lyase in *Phaseolus vulgaris*[J]. European Journal of Biochemistry, 1988, 178: 243 - 248

[14] Whetten R W, Sedevoff R R. Phenylalanine ammonia- lyase from loblolly pine [J]. Plant Physiology, 1992, 98(1): 380 - 386

[15] Lim H W, Park S S, Lim C J. Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from leaf mustard [J]. Molcell, 1997, 31; 7(6): 715 - 720

[16] K K Kalghatgi, P V Subba. Microbial L-phenylalanine ammonia-lyase. Purification, subunit structure and kinetic properties of the enzyme from *Rhizoctonia solani*[J]. Biochem J, 1975, 149: 65 - 75

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net