菠菜甜菜碱醛脱氢酶的抑制因子*

梁 峥 赵 原 李浴春 邹喻苹 骆爱玲 黄巨富

(中国科学院植物研究所，北京 100044)

关键词 甜菜碱醛脱氢酶、抑制因子、菠菜

在以前的报道[1]中，部分纯化了菠菜叶片的甜菜碱醛脱氢酶 (betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)。在测定用 60% 硫酸铵盐析的酶样活性时，观察到酶活性与酶蛋白的加入量不成正比关系，而是随着酶蛋白量增加，以毫克酶蛋白为基础，酶活性明显下降。这暗示，在酶制剂中可能存在抑制因子。本文报道我们的实验结果。

一、材料和方法

1. 实验材料 实验用的菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 采自本所实验农场或购自当地市场。去中脉后贮藏在 −80℃ 冰箱备用。

2. 甜菜碱醛脱氢酶的分离 50g 去脉的叶片，加入 100ml 研磨介质，在冰浴条件下用研钵研磨成糊状，经一层孔径 40×40 μm 的 Netex 尼龙布过滤，滤液于 10000×g 离心 20min，上清液保持在冰浴中边搅动边加入固体硫酸铵，达到 50% 饱和度 (W/V, 29.1g/100ml)，静置 30min，于 10000×g 离心 20min，上清液按上法加入硫酸铵，达到 60% 饱和度(W/V, 7g/100ml)，静置 30min 后，悬浮物在 10000×g 离心 20min，弃去上清液，沉淀用 1ml 悬浮介质悬浮，为甜菜碱醛脱氢酶 (BADH, EC1.2.1.8) 酶样。研磨介质的组成是 Tris-HCl (pH8.0) 100mmol/L，蔗糖 0.4mol/L，聚乙烯吡咯烷酮 1%，二硫苏糖醇 2mmol/L，EDTA-Na_2 1mmol/L，悬浮介质的组成是Tris-HCl(pH8.0) 10mmol/L，巯基乙醇 10mmol/L，甘油 10%。

3. 甜菜碱醛脱氢酶抑制因子的分离 将 60% 硫酸铵盐析的酶样沉淀物在 Sephadex-G25 柱上 (1.6 × 7.0cm，LKB) 展开，柱预先用平衡液(同悬浮介质)平衡，并用同样平衡液洗脱，流速约 0.5ml/min，分管收集，每管 1ml。测定每管 BADH 活性和蛋白量。

4. 甜菜碱醛脱氢酶活性测定 测定在 30℃ 下进行。在 1ml 反应介质中，含 Tris-HCl (pH8.5)100mmol/L，二硫苏糖醇 2mmol/L，NAD 2mmol/L，甜菜碱醛(Sigma) 0.5mmol/L 和酶。反应由加入甜菜碱醛启动。根据 340nm 光密度增加计算酶的活性。

5. 蛋白质含量测定 按 Bradford[2] 方法，以牛血清白蛋白作为标准。

二、结果和讨论

当用 60% 硫酸铵盐析沉淀的酶样进行 BADH 活性测定时，其活性与酶蛋白加入量不成正比关系(表 1)，而是随着酶蛋白加入量的增加，酶活性明显降低。这暗示，在 60% 硫酸铵

本文 1990 年 4 月22日收到。1990 年 8 月10日收到修改稿。

* 国家自然科学基金和国家科技攻关资助项目。

盐析沉淀的 BADH 制剂中，可能有抑制因子存在。该抑制因子与甜菜碱醛脱氢酶为 60% 硫酸铵共沉。

表 1　BADH 活性与酶蛋白量关系

酶蛋白 (μg)	BADH 活性 (nmol/min)	理论值活性 (nmol/min)	比活性 (nmol/min · mg 蛋白质)	相对活性 (%)
86.5	1.13	1.13	13.1	100
173.0	1.74	2.26	10.1	77.1
432.5	2.84	5.65	6.6	50.4
865.0	3.17	11.3	3.7	28.2

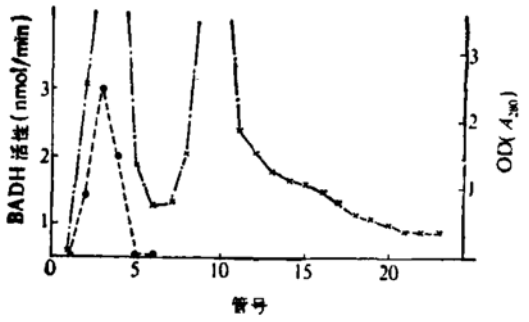


图 1　甜菜碱醛脱氢酶的分部收集
●…●BADH;　×…×OD

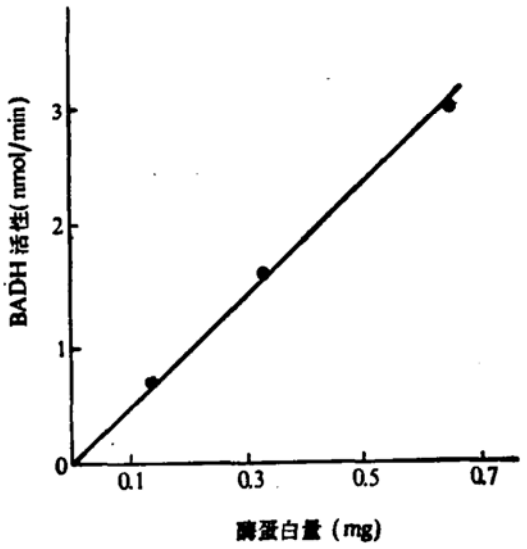


图 2　BADH 活性与蛋白量的关系

将 60% 硫酸铵盐析沉淀的甜菜碱醛脱氢酶样，通过 Sephadex G-25 柱，进行分部收集，测定各收集管的酶活性和蛋白质含量，结果如图 1 所示。由图 1 可以看到，蛋白质含量有两个峰。甜菜碱醛脱氢酶活性集中在第一个峰，在第二个峰和其他收集管没有甜菜碱醛脱氢酶的活性，而甜菜碱醛脱氢酶抑制因子则存在于第二个峰部分中（见表 2）。

当 60% 硫酸铵盐析沉淀的 BADH 通过 Sephadex G-25 柱后，利用具有 BADH 活性高峰的分部（第 3 管），再测定 BADH 活性，结果如图 2 所示，BADH 活性与酶蛋白加入量成正相关，表明过柱前有抑制因子与 BADH 共存，过柱后，BADH 与其抑制因子已被分开。

如果在测过柱后酶样的 BADH 活性时，将图 1 中第二个蛋白峰的样品（第 9 管）回加到测定反应中，BADH 的活性受到抑制（表 2），表明 BADH 的抑制因子存在于此分部中。这种抑制作用看来不是由于收集液中硫酸铵引起，因为加入第二个蛋白峰以后的收集液（如第 14 管）不影响 BADH 活性。

由于抑制 BADH 活性的组分出现在 Sephadex G-25 柱的第二个峰，估计它可能是一种小分子化合物。

高等植物中存在甜菜碱醛脱氢酶未见有报道。甜菜碱醛脱氢酶是摧化甜菜碱生物合成的最后一个酶。环境胁迫诱导甜菜碱积累和 BADH 活性提高[3,4]。许多证据表明[3,5,6]，在高等植

表 2　BADH 抑制因子对 BADH 活性的影响

酶蛋白 (μg)	抑制因子 (μl)	BADH 活性 (nmol/min · mg 蛋白质)	相对活性 (%)
325	0	4.96	100
325	第 9 管，25μl	4.37	88.1
325	第 9 管，50μl	3.87	78.0
325	第 14 管，25μl	5.16	104

物中，甜菜碱积累是细胞通过渗透调节机制对环境胁迫的适应。菠菜中存在 BADH 抑制因子的事实表明，BADH 抑制因子与 BADH 可能共同参与调节和控制甜菜碱的合成。对 BADH 抑制因子的进一步纯化及其性质的研究，将能更好地认识高等植物的渗调机制。由于甜菜碱合成途径比较简单[7]，在高等植物中，甜菜碱合成酶基因是人们试图分离的胁迫抗性基因中较为理想的基因[3,5,6]。因此，与甜菜碱合成积累有关的 BADH 抑制因子的研究，将会促进这一领域的研究进一步发展。

参　考　文　献

[1] 梁峥等，植物学报（待发表）。

[2] Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, **72**(1976), 248—254.

[3] Le Rudulier, D. et al., *Science*, **224**(1984), 1064—1068.

[4] Pan, S. M., *Taiwania* (Taipei), **28**(1983), 128—137.

[5] Hanson, A.D. et al., *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress* (Ed. Key, J.L.), Alan R. Liss, Inc., New York, 1985, 71—92.

[6] Higgins, C.F. et al., *TIBS*. **12**(1987), 339—344.

[7] Weretilnyk, E.A. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **271**(1989), 56—63.