

米胚芽谷氨酸脱羧酶的分离纯化及 部分酶学性质的研究

吕莹果,张 晖,马晓博,姚惠源

(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

【摘 要】 【目的】分离纯化米胚芽谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase, GAD),并对其酶学性质进行研究。【方法】通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、DEAE-Sephrose FF离子交换色谱、Superdex 200凝胶过滤色谱和Glu Sephrose CL 4B亲和色谱等分离纯化技术,对米胚芽GAD进行分离纯化。用体积排阻高效液相色谱测定米胚GAD的相对分子质量,SDS-PAGE测定其亚基的相对分子质量。测定米胚GAD的最适温度和pH,通过酶动力学试验测定其动力学常数(K_m)和最大反应速度($V_{\max}$),并测定KCl和 MgSO_4 等化学物质对酶活性的影响。【结果】分离纯化得到了米胚GAD,其纯化倍数为65.7,比活达223.4 U/mg,酶活回收率为10.8%。米胚GAD的相对分子质量为78 ku,亚基相对分子质量为40 ku,说明米胚GAD是由2个相同亚基构成的二聚体。米胚GAD的最适反应温度为40℃,最适反应pH为5.6;米胚GAD的热稳定较差,80℃时酶几乎完全失活;米胚GAD在pH 4.5~8.0较为稳定,能保持88%以上的酶活。米胚GAD对谷氨酸Glu的 K_m 为32.3 mmol/L, $V_{\max}$ 为1.159 mg/min;对磷酸吡哆醛(PLP)的 K_m 为1.7 $\mu\text{mol/L}$, $V_{\max}$ 为1.171 mg/min。 K^+ 和 Ag^{2+} 对米胚GAD的活力有较大抑制, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 和 Li^{2+} 等对活性影响不大,500 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 对米胚GAD有较强的激活作用。【结论】米胚GAD的性质与其他植物GAD存在差异。

【关键词】 米胚芽;谷氨酸脱羧酶;酶学性质分析

【中图分类号】 Q557+.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)08-0190-07

Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ

LV Ying-guo, ZHANG Hui, MA Xiao-bo, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Jiangsu, Wuxi 214122, China)

Abstract: 【Objective】 The study purified and researched the properties of rice germ glutamate decarboxylase(GAD). 【Method】 GAD was purified 65.7-fold from rice germ using a combination of ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephrose FF ion exchange chromatography, Superdex-200 gel filtration chromatography, and Glu-Sephrose CL 4B affinity chromatography. SE-HPLC was used to determine the relative molecular weight (Mr) of GAD, and SDS-PAGE was used to determine the Mr of the subunit of GAD. Then the optimum temperature and pH, K_m of GAD was tested. 【Result】 The purified preparation showed a single peak on SE-HPLC with an approximate molecular mass of 78 ku and a single band on SDS-PAGE with a subunit Mr of 40 ku. This indicated that the GAD from rice germ existed as a dimer of homological subunits. Rice germ GAD had an optimum pH at 5.6, and an optimum temperature at 40℃. Rice germ

* [收稿日期] 2007-09-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(20671044);新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0488)

[作者简介] 吕莹果(1982—),女,河南洛阳人,在读博士,主要从事谷物功能成分研究。E-mail: lydia.lv@yahoo.com.cn

[通讯作者] 张 晖(1966—),女,上海人,教授,博士生导师,主要从事谷物功能成分研究。

GAD inactivated at 80 ℃,but it was stable at pH 4.5—8.0. K_m values for glutamic acid and PLP were determined at 32.3 mmol/L and 1.7 μ mol/L, respectively. Chemicals reagents such as HgCl₂, KI and AgNO₃ decreased the enzyme activity, but 500 μ mol/L of CaCl₂ at the optimum pH could increase the GAD activity greatly. 【Conclusion】 GAD of rice germ has some properties different from GAD of other plants.

Key words: rice germ; glutamate decarboxylase; enzymatic character

γ -氨基丁酸(GABA)是高等动物体内十分重要的抑制性神经递质之一,其在生物体中具有重要的生理功能。谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase, GAD)是用生物技术富集生产 GABA 的关键酶,其广泛分布于各种生物体中。植物 GAD 因具有一个特殊的钙调素(CaM)结合区域,受 Ca²⁺ 浓度的调节,而不同于其他来源的 GAD^[1],这使得植物 GAD 具有更为重要的生物意义。因此,植物来源 GAD 的分离纯化研究受到了广大科研工作者的重视。目前,已有关于马铃薯^[2]、南瓜^[3]、矮牵牛^[4]、蚕豆^[5]、大麦^[6]、小麦^[7]、山黧豆^[8]等几种植物 GAD 分离纯化的报道。稻米 GAD 最早是作为预测种子发芽率的重要指标,近年来的研究则主要集中在利用米胚芽中的 GAD 富集生产 GABA 方面^[9-10]。为进一步改善米胚 GAD 富集生产 GABA 的工艺条件,对米胚 GAD 进行分离纯化,并了解其分子大小、结构和性质是至关重要的,但目前此方面的研究未见报道。

本研究采用(NH₄)₂SO₄ 分级沉淀、离子交换色谱、凝胶过滤色谱和亲和层析等技术,对米胚芽 GAD 进行分离、纯化和鉴定,并研究了米胚 GAD 的部分酶学性质,以期为进一步研究米胚 GAD 的分子生物学性质及米胚 GAD 富集生产 GABA 的工艺条件奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

米胚芽由上海粮食储运公司提供,4 ℃ 储存。DEAE-Sephrose FF、Superdex 200、溴化氰活化的 Sephrose CL 4B,均购于瑞典 Pharmacia 公司;磷酸吡哆醛(PLP)、苯甲基磺酰氟(PMSF),均购于 Amresco 公司;SDS-PAGE 和 SE-HPLC 用标准蛋白质,购于上海西巴斯生物技术开发有限公司。

1.2 米胚 GAD 的提取和分离纯化

米胚 GAD 的分离纯化步骤见图 1。

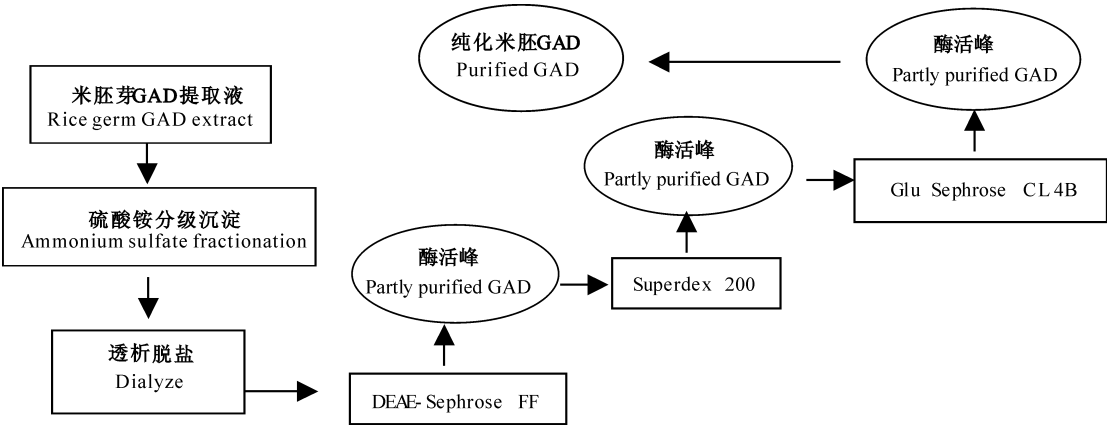


图 1 米胚 GAD 的分离纯化流程
Fig.1 Flow chart of GAD purification

取米胚芽 200 g,加入提取液 800 mL (50 mmol/L 磷酸钾缓冲液,pH5.6,2 mmol/L 巯基乙醇,2 mmol/L EDTA,1 mmol/L PLP,1 mmol/L PMSF 和体积分数 10% 甘油),用高速分散器打成匀浆,4 层纱布过滤,9000 g、4 ℃ 离心 25 min,上清液即为米胚 GAD 提取液。用饱和度为 30%~50% 的(NH₄)₂SO₄ 对提取液进行分步盐析,透析脱盐后

依次进行 DEAE-Sephrose FF,Superdex 200 和 Glu Sephrose CL 4B 分离纯化。DEAE-Sephrose FF 条件为:色谱柱为 Φ 1.6 cm×50 cm;起始缓冲液为 50 mmol/L、pH5.6 的磷酸钾缓冲液,内含 1 mmol/L PLP 和 1 mmol/L PMSF;梯度洗脱液为 400 mL 含 0~1.4 mol/L NaCl 的起始缓冲液;流速为 10 mL/h,每 24 min 收集 1 管,每管 4 mL。Superdex

200 分离条件为:色谱柱为 $\Phi 1.0\text{ cm}\times 100\text{ cm}$;平衡和洗脱缓冲液为 50 mmol/L 、 $\text{pH}5.6$ 磷酸钾缓冲液,内含 1 mmol/L PLP 和 1 mmol/L PMSF;流速为 12 mL/h ,每隔 10 min 收集 1 管,每管 2 mL 。Glu Sephrose CL 4B 分离条件为:色谱柱 $\Phi 1.0\text{ cm}\times 30\text{ cm}$;起始缓冲液为 50 mmol/L 、 $\text{pH}5.6$ 的磷酸钾缓冲液,内含 1 mmol/L PLP 和 1 mmol/L PMSF,梯度洗脱液为 100 mL 含 $0\sim 0.5\text{ mol/L}$ NaCl 的起始缓冲液;流速为 10 mL/h ,每 12 min 收集 1 管,每管 2 mL 。纯化后的酶液用 50 mmol/L 、 $\text{pH}5.6$ 磷酸钾缓冲液透析脱盐后,冷冻干燥保存待用。

本试验分离纯化米胚 GAD 的过程中所用的缓冲液中都添加了 1 mmol/L PLP 和 1 mmol/L PMSF,以减少 GAD 分离纯化过程中酶活性的损失。其中 PLP 是 GAD 的辅基,无 PLP 的存在, GAD 酶活很低;PMSF 可防止粗酶液中蛋白酶对 GAD 的分解。

1.3 米胚 GAD 酶活的测定

取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 酶液,加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 底物溶液(10 mg/mL Glu, $\text{pH}5.6$), $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h , $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min , $8\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,取上清液, HPLC 法测定 GABA 含量^[11]。以每 30 min 生成 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 的 GABA 作为 1 个酶活力单位。

1.4 酶液中蛋白质含量的测定

采用 Bradford 法^[12]测定,以牛血清蛋白为标准。

1.5 GAD 亲和层析介质的制备^[13]

L-谷氨酸铜盐的制备:称取 0.5 g 的 L-Glu,溶于 50 mL 蒸馏水中,缓慢加入适量的固体碱式碳酸铜, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 5 h 后,用滤纸热过滤,滤液冷却备用。

Glu 的 C-1 羧基偶联:将 5 g 溴化氰活化的 Sephrose CL 4B 加入 50 mL 上述 L-谷氨酸铜盐溶液中,调 pH 为 6.0 ,室温反应 24 h ,蒸馏水洗几次后抽干、装柱($1.0\text{ cm}\times 30\text{ cm}$),用 3 倍柱床体积的 0.1 mol/L EDTA- Na_2 洗脱,以除去 Cu^{2+} ,用原子吸收法测定洗脱下的 Cu^{2+} 量,计算偶联上的 Glu 量为 $1.7\text{ }\mu\text{mol/mL}$ 。

1.6 米胚 GAD 相对分子质量的测定

采用体积排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)测定粗酶液的相对分子质量分布和纯化的 GAD 酶蛋白的相对分子质量 Mr,以标准蛋白为参照。SE-HPLC 工作条件:色谱柱为:串联的 KW802.5 和 KW803;检测器为紫外检测仪;积分仪为日立-7500;检测波长为 280 nm ;流动相为 50 mmol/L 磷酸盐

缓冲液, $\text{pH}7.0$,含 0.3 mol/L NaCl;进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$;流速为 0.5 mL/min 。

根据已知分子质量标准蛋白质在 SE-HPLC 色谱柱上的保留时间 t_R ,作 $t_R\text{-lgMr}$ 图,然后根据米胚 GAD 的保留时间计算其相对分子质量。

1.7 米胚 GAD 亚基相对分子质量的测定

参考文献[14]采用 SDS-PAGE 电泳方法测定米胚 GAD 亚基的相对分子质量,分离胶质量浓度为 150 g/L ,板胶厚度为 0.75 mm ,进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$ (酶液蛋白质含量为 1 mg/mL 左右)。根据已知相对分子质量的标准蛋白质在 SDS-PAGE 中的相对迁移率 R_f ,作 $R_f\text{-lgMr}$ 图,由米胚 GAD 的相对迁移率计算其相对分子质量。

1.8 米胚 GAD 部分酶学性质的测定

1.8.1 米胚 GAD 的最适温度及热稳定性 在不同温度下测定 GAD 的酶活性,以酶活最高者为 100% ,计算其他温度下酶液的相对酶活。将酶液(蛋白质含量约为 0.2 mg/mL)在不同温度下保温 1 h 后,迅速冷却至室温,测定酶活力,并以未保温的酶液在相应温度下的酶活为 100% ,计算保温 1 h 后酶液的相对酶活。

1.8.2 米胚 GAD 的最适 pH 及 pH 稳定性 用浓度为 0.1 mol/L 的醋酸($\text{pH}2.0\sim 5.5$)、磷酸($\text{pH}5.5\sim 7.0$)、Tris-HCl($\text{pH}7.0\sim 9.0$)缓冲溶液配制不同 pH 的底物和稀释酶液(蛋白质含量约为 0.2 mg/mL),测定酶活力,以酶活最高者为 100% ,计算 GAD 在其他 pH 下酶液的相对酶活。此外,将酶液用上述不同 pH 缓冲液稀释,在室温下放置 1 h 后,测定其酶活力,以未放置的酶液在相应 pH 下的酶活为 100% ,计算放置 1 h 后酶液的相对酶活。

1.8.3 米胚 GAD 动力学常数的测定 将酶液(蛋白质含量约为 0.2 mg/mL)与底物(10 g/L Glu, $\text{pH}5.6$)在最适温度和最适 pH 下分别反应 $2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 25, 30$ 和 60 min ,测定酶反应速度保持初速度的时间范围。将酶与不同浓度 Glu 或 PLP 在最适温度和最适 pH 下以初速度进行反应,测定反应产物中 GABA 的含量,以单位时间的 GABA 产量为酶反应的初速度,用 Lineweaver Burk 双倒数作图,经线性拟合得到回归直线,求解米胚 GAD 对 Glu 和 PLP 的反应动力学常数(K_m)和最大反应速率(V_{max})。

1.8.4 金属离子及其他化学物质对米胚 GAD 活性的影响 配制 2 mmol/L 的 KCl、KI、 MgSO_4 、 MnSO_4 、 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 AgNO_3 、LiSO、 CaCl_2 、EDTA

和 40 mmol/L 的 SDS 溶液,分别与等体积酶液(蛋白质含量约为 0.2 mg/mL)混合,于 30 ℃ 保温 30 min,然后测定酶的剩余活力,以不加化学物质的酶活力为 100%,计算添加化学物质后酶液的相对酶活。

2 结果与分析

2.1 米胚 GAD 的分离纯化

2.1.1 DEAE-Sephrose FF 分离 由图 2 可知,在梯

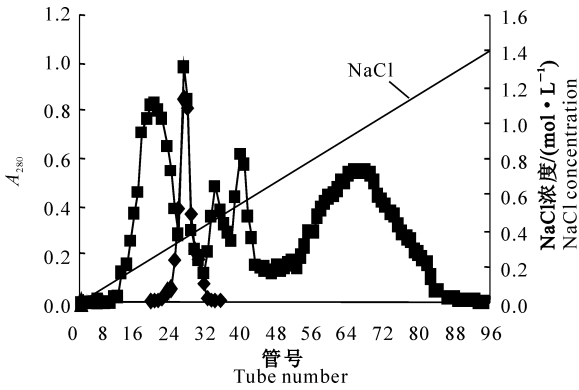


图 2 米胚 GAD 在 DEAE-Sephrose FF 上的分离结果
—■—. 洗脱液;—◆—. GAD 活力
Fig. 2 DEAE-Sephrose FF chromatography of GAD
—■—. Eluant buffer;—◆—. Activity of GAD

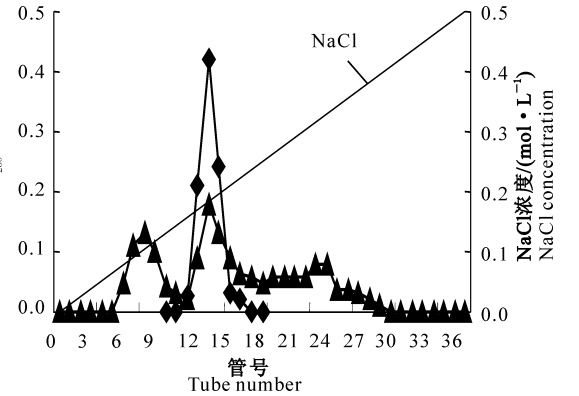


图 4 米胚 GAD 在 Glu Sephrose CL 4B 上的分离结果
—▲—. 洗脱液;—◆—. GAD 活力
Fig. 4 Glu Sephrose CL 4B Chromatography of crude GAD
—▲—. Eluant buffer;—◆—. Activity of GAD

2.1.3 Glu Sephrose CL 4B 分离 由图 4 可见,米胚 GAD 经离子交换色谱和凝胶色谱分离后,在 Glu Sephrose CL 4B 上仍然能分离 2 个蛋白峰,在 NaCl 浓度达到 0.12 mol/L 时,GAD 开始被洗脱下来,即第 2 个 A_{280} 峰(洗脱液为 26~30 mL)有酶活性。收集处理酶活峰部位酶液,进行 SDS-PAGE 电泳,结果(图 5)表明,GAD 为单一区带,说明米胚 GAD 可利用 DEAE-Sephrose FF 离子交换色谱、Superdex 200 凝胶过滤色谱和 Glu Sephrose CL 4B 亲和层析

度洗脱过程中,收集到的第 20~30 管洗脱液具有 GAD 活力,表明第 2 个洗脱液峰有酶活性,酶活峰只有一个,且与洗脱液的 A_{280} 峰吻合,分离效果较好。
2.1.2 superdex 200 分离 收集酶液透析除盐,再经过凝胶色谱 superdex 200 分离,洗脱曲线见图 3。由图 3 可知,米胚 GAD 酶活峰出现在第 2 个紫外吸收峰的位置,在洗脱体积为 50~60 mL 时被洗脱下来。

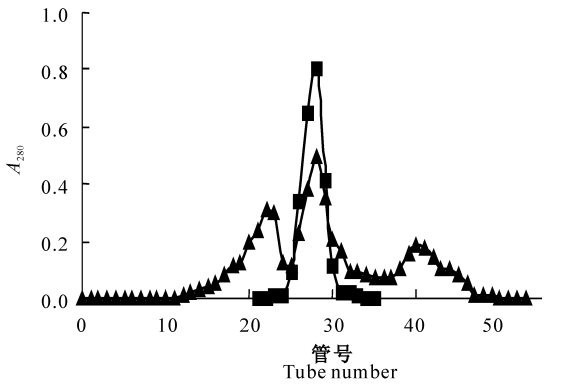


图 3 米胚 GAD 在 Superdex 200 上的分离结果
—▲—. 洗脱液;—■—. GAD 活力
Fig. 3 Superdex 200 Chromatography of GAD
—▲—. Eluant buffer;—■—. Activity of GAD

进行纯化。

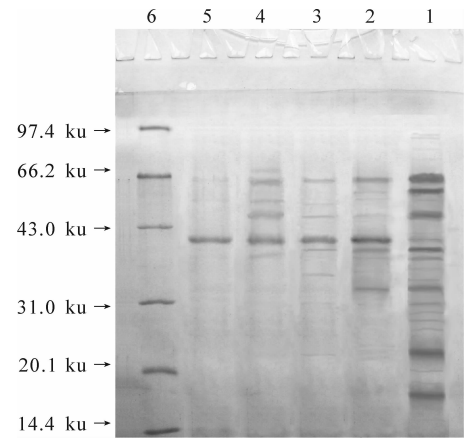


图 5 不同纯化阶段米胚 GAD 的 SDS-PAGE 电泳
1. 米胚 GAD 粗酶液;2. 经 DEAE-Sephrose FF 分离的酶液;3. 经 DEAE-Sephrose FF 和 Superdex 200 2 次分离的酶液;4. 粗酶液经 Glu Sephrose CL 4B 1 次分离的酶液;5. 经 DEAE-Sephrose FF、Superdex 200 和 Glu Sephrose CL 4B 3 次纯化的酶液;6. 标准蛋白质
Fig. 5 SDS-PAGE of GAD collection during different purification stages
1. Crud GAD; 2. DEAE-Sephrose FF fraction; 3. DEAE-Sephrose FF and Superdex 200 fraction; 4. Glu Sephrose CL 4B fraction; 5. DEAE-Sephrose FF, Superdex 200 and Glu Sephrose CL 4B fraction; 6. Molecular standards

分别测定米胚 GAD 提取液、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、DEAE-Sephrose FF 离子交换色谱、Superdex 200 凝胶过滤色谱和 Glu Sephrose CL 4B 亲和色谱分离纯化过程中,各步所收集酶液的酶活力、蛋白质

含量,结果见表 1。由表 1 可见,纯化后的米胚 GAD 酶的比活力达到了 223.4 U/mg,纯化倍数为 65.7,酶活回收率为 10.8%。

表 1 米胚 GAD 分离纯化过程中各步酶液的纯化情况

Table 1 Purification of GAD from rice germ

纯化步骤 Purification step	总蛋白/mg Total protein	总活力/U Total activity	比活/(U·mg ⁻¹) Specific activity	提纯倍数 Purification fold	酶活回收率/% Recovery
米胚 GAD 提取液 Crud GAD	715.5	2432.7	3.4	1.0	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀 Precipitation	177.0	2053.2	11.6	3.4	84.4
DEAE-Sephrose FF 离子交换色谱 Fraction	45.7	1294.2	28.3	8.3	53.2
Superdex 200 凝胶过滤色谱 Fraction	7.6	995.0	130.6	38.4	40.9
Glu Sephrose CL 4B 亲和层析 Fraction	1.2	262.7	223.4	65.7	10.8

2.2 米胚 GAD 的相对分子质量

结果表明,米胚 GAD 的相对分子质量为 78 ku,较大麦 GAD(260 ku)^[6]、小麦 GAD(310 ku)^[7]、山魮豆 GAD(140 ku)^[8]等的相对分子质量小,与马铃薯块茎 GAD(90 ku)^[2]较为接近。说明植物中 GAD 的相对分子质量差异较大。

2.3 米胚 GAD 亚基相对分子质量的测定

图 5 为纯化各阶段酶液的 SDS-PAGE 图,利用纯化米胚 GAD 在 SDS-PAGE 中的 R_f 值,可计算得到米胚 GAD 亚基的相对分子质量为 40 ku,米胚 GAD 相对分子质量为 78 ku,由此可推断,米胚 GAD 蛋白分子是由 2 个相同亚基组成的二聚体,与马铃薯块茎 GAD(天然相对分子质量 90 ku,亚基相对分子质量 43 ku)相似^[2],但与其他动植物的 GAD

差别较大。

2.4 米胚 GAD 的酶学性质

2.4.1 温度对米胚 GAD 活性的影响 由图 6 可知,米胚 GAD 的最适反应温度约为 40 ℃,与山魮豆^[8]的 GAD 最适反应温度(40 ℃)基本一致,而与南瓜^[3]的 GAD 最适反应温度(60 ℃)不同,说明不同植物的 GAD 最适温度差别较大。

将米胚 GAD 酶液分别置于 40,50,60,70,80 和 90 ℃的水浴中保温 1 h,测定残余酶活。结果(图 7)表明,米胚 GAD 的热稳定性较差,50 ℃时酶活只能维持 80%,55 ℃时已失活 1/2,60 ℃时酶活仅剩 13%,80 ℃时几乎完全失活。与小麦 GAD^[7]相比,米胚 GAD 的热稳定性较差。

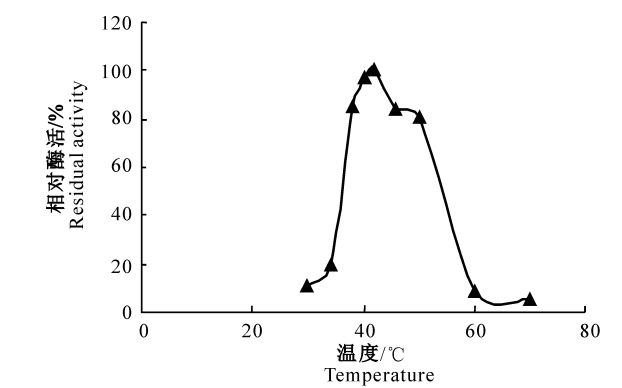


图 6 温度对米胚 GAD 活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on GAD activity

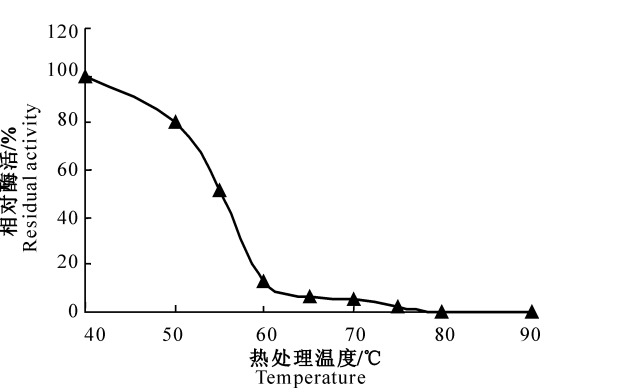


图 7 温度对米胚 GAD 稳定性的影响

Fig. 7 Temperature stability of GAD

2.4.2 pH 值对米胚 GAD 活性的影响 由图 8 可以看出,米胚 GAD 的最适 pH 为 5.6,与一些植物 GAD 的最适 pH 相近(如山魮豆 GAD 的最适 pH 为 5.4^[8],小麦为 5.8^[7],南瓜为 5.8^[3]),而与微生物

和动物^[15-16]的差别较大。由图 9 可见,米胚 GAD 在较宽的 pH 范围内(pH4.5~8.0)表现较为稳定,均能保持 88%以上的酶活;pH 在 4.5 以下或 8.5 以上时,酶活迅速下降。

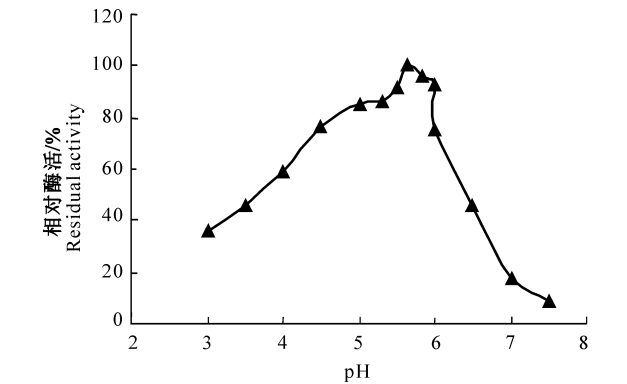


图 8 pH 值对米胚 GAD 活性的影响
Fig. 8 Effect of pH on GAD activity

2.4.3 米胚 GAD 的动力学常数 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法来测定米胚 GAD 的 K_m 和 V_{max} ,结果显示米胚 GAD 对 PLP 的 K_m 为 $1.7\text{ }\mu\text{mol/L}$, V_{max} 为 1.171 mg/min ;对 Glu 的 K_m 值为 32.3 mmol/L , V_{max} 为 1.159 mg/min 。

米胚 GAD 对 PLP 的 K_m 值与马铃薯 GAD 对 PLP 的 $K_m^{[2]}$ ($2.0\text{ }\mu\text{mol/L}$) 较为接近,但与鼠脑 GAD 对 PLP 的 $K_m^{[17]}$ ($0.05\text{ }\mu\text{mol/L}$) 和人 GAD 对

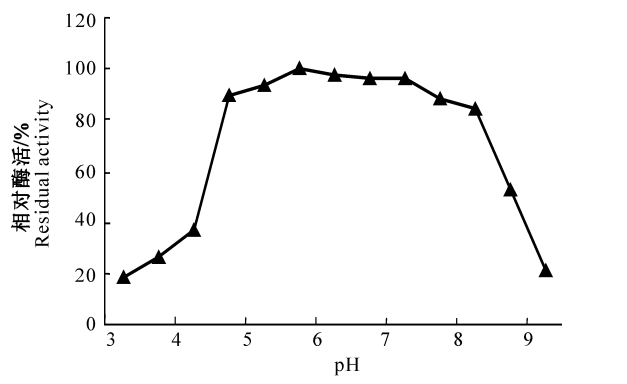


图 9 pH 值对米胚 GAD 稳定性的影响
Fig. 9 pH stability of GAD

PLP 的 $K_m^{[18]}$ ($0.13\text{ }\mu\text{mol/L}$) 差异较大。
2.4.4 金属离子和其他化学物质对米胚 GAD 活性的影响 从表 2 可以看出,金属离子 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 和 Li^{2+} 对米胚 GAD 的活性未产生显著的影响, 2 mmol/L 的 EDTA 对米胚 GAD 的活性影响也不大; KCl 对米胚 GAD 的活性稍有抑制, KI 和 Ag^{2+} 对米胚 GAD 的活性有较大抑制作用; SDS 对于米胚 GAD 的活性有较强的抑制作用。

表 2 金属离子和其他化学物质对米胚 GAD 活性的影响
Table 2 Effect of chemical reagents on GAD activity

金属离子或化学物质 Metal ion and Chemical reagent	浓度/(mmol · L ⁻¹) Concentration	相对酶活/% Relative activity	金属离子或化学物质 Metal ion and Chemical reagent	浓度/(mmol · L ⁻¹) Concentration	相对酶活/% Relative activity
K ⁺ (KCl)	2	84.7	Ag ⁺ (AgNO ₃)	2	68.6
K ⁺ (KI)	2	55.1	Li ⁺ (LiSO ₄)	2	96.6
Mg ²⁺ (MgSO ₄)	2	99.2	Ca ²⁺ (CaCl ₂)	2	97.8
Mn ²⁺ (MnSO ₄)	2	97.4	EDTA	2	90.74
Al ³⁺ (Al ₂ (SO ₄) ₃)	2	95.7	SDS	40	61.73

有研究表明, GAD 活性受 Ca^{2+} 的调节^[19], 因此本研究测定了 Ca^{2+} 对米胚 GAD 的活性的影响。

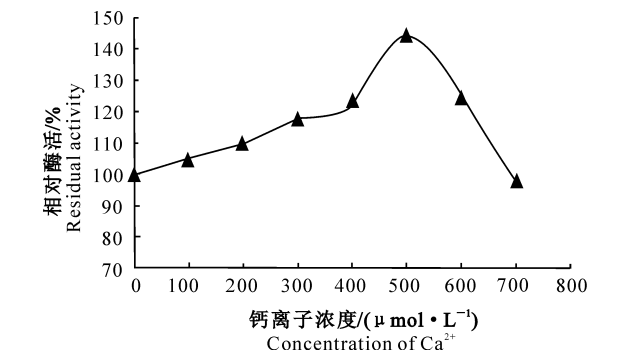


图 10 Ca^{2+} 对米胚 GAD 活性的影响
Fig. 10 Effect of Ca^{2+} on GAD activity

由图 10 可以看出, 当 Ca^{2+} 浓度在 $600\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以下时, 其对 GAD 的活性有较强的激活作用; 当 Ca^{2+} 浓度为 $500\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时, 其对米胚 GAD 活性的

激活作用最强, 相对酶活达到 145% 。说明, Ca^{2+} 对米胚 GAD 的活性有较强的激活作用, 推测米胚 GAD 可能是一种钙调素结合蛋白 (CaM-binding protein, CaMBP), 而且钙依赖的 CaMBP。

3 结 论

1) 通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、DEAE-Sephrose FF 离子交换色谱、Superdex 200 凝胶过滤色谱和 Glu Sephrose CL 4B 亲和色谱等分离纯化技术, 从米胚芽中分离得到 GAD, 经 SDS-PAGE 鉴定为单一组分, 说明米胚 GAD 得到了有效的纯化。米胚 GAD 的纯化倍数为 65.7 , 酶活力达 223.4 U/mg , 酶活回收率为 10.8% 。

2) 米胚 GAD 的相对分子质量为 78 ku , 亚基相对分子质量为 40 ku , 说明米胚 GAD 是由 2 个相同亚基构成的二聚体。

3)米胚 GAD 的最适反应温度为 40 ℃,最适反应 pH 为 5.6。米胚 GAD 的热稳定性较差,80 ℃ 时酶基本完全失活。但米胚 GAD 在较宽的 pH 范围内(pH4.5~8.0)较为稳定,能保持 88% 以上的酶活。米胚 GAD 对 Glu 的 K_m 为 32.3 mmol/L, V_{max} 为 1.159 mg/min;对 PLP 的 K_m 为 1.7 μ mol/L, V_{max} 为 1.171 mg/min。

4)金属离子 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 和 Li^{2+} 对米胚 GAD 的活力没有显著影响;2 mmol/L EDTA 对米胚 GAD 的活力影响也不大;KCl 对米胚 GAD 的活力稍有抑制,KI 和 Ag^{2+} 对米胚 GAD 的活力有较大的抑制;SDS 对米胚 GAD 活力的抑制作用最大; Ca^{2+} 浓度为 500 μ mol/L 时,对米胚 GAD 的激活作用最强,相对酶活达到 145%。

[参考文献]

[1] Baum G, Lev-Yadun S, Fridmann Y, et al. Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants [J]. EMBO J, 1996, 15: 2988-2996.

[2] Statyan V, Nair P V. Purification and characterization of L-glutamate decarboxylase from solanum tuberosum [J]. Eur J Biochem, 1985, 150: 53-60.

[3] Matsumoto, Yamaura, Funatsu. Physical properties of glutamate decarboxylase from squash [J]. Agric Biol Chem, 1996, 54: 3001-3003.

[4] Baum G, Chen Y, Arazi T, et al. A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 19610-19617.

[5] Johnson B, Singh K. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea [J]. Phytochemistry, 1997, 46(1): 39-44.

[6] Inatomi K, Slaughter J C. Glutamate decarboxylase from barley embryo and roots: General properties and the occurrence of three enzymic forms [J]. Biochem J, 1975, 147: 479-484.

[7] 范军, 李纯, 朱苏文, 等. 小麦谷氨酸脱羧酶的纯化及部分性质研究 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(3): 641-644.

Fan J, Li C, Zhu S W, et al. Purification and some properties of Glutamate Decarboxylase from wheat seedling [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 14(3): 641-644. (in Chinese)

[8] 穆小民, 沈黎明, 吴显荣. 林山生山豆豉谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分性质的研究 [J]. 生物化学杂志, 1997, 13(2): 181-185.

Mu X M, Shen L M, Wu X R. Studies on the purification and properties of glutamic acid Decarboxylase from Flat Pea [J]. Journal of Biochemistry, 1997, 13(2): 181-185. (in Chinese)

[9] Saikusa T. Accumulation of gamma aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking [J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(12): 2291-2292.

[10] Sadami O, Staoshi A. Enzymatic production of γ -aminobutyric acid using rice (*Oryza sativa*) germ [J]. Food Sci Technol Res, 2000, 6(3): 208-211.

[11] 张晖, 吴胜芳, 姚惠源. OPA 柱前自动衍生-紫外检测米胚芽中的 γ -氨基丁酸的 HPLC 法研究 [J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(10): 50-52.

Zhang H, Wu S F, Yao H Y. Determination of γ -Aminobutyric acid in rice germ by HPLC with automatic pre-column derivation and UV detection [J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(10): 50-52. (in Chinese)

[12] Bradford M A. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-251.

[13] 范军, 李培金, 李纯, 等. 谷氨酸脱羧酶亲和层析制备 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(1): 30-32.

Fan J, Li P J, Li C, et al. Affinity chromatography materials for glutamate decarboxylase [J]. The Journal of Northwest Agricultural University: Natural Science Edition, 2001, 29(1): 30-32. (in Chinese)

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

[15] Strausbach P H, Fisher E H. Chemical and physical properties of Escherichia coli glutamate decarboxylase [J]. Biochemistry, 1970, 9: 226-233.

[16] Moody A J, Hejnas K R, Marshall M O, et al. Isolation by anion-exchange of immunologically and enzymatically active human islet glutamic acid decarboxylase 65 overexpressed in Sf9 insect cells [J]. Diabetologia, 1995, 38: 14-23.

[17] Wu J Y, Mackay I R, Chen Q Y, et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase from mouse brain [J]. J Biol Chem, 1973, 248(9): 3029.

[18] Nathan B, Bao J, Hsu C C, et al. A membrane of brain L-glutamate decarboxylase: identification, isolation and its relation to insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 242-246.

[19] Ling V, Snedden W A, Shelp B J, et al. Analysis of a soluble calmodulin binding protein from fava bean roots: Identification of glutamate decarboxylase as a calmodulin activated enzyme [J]. Plant Cell, 1994, 6: 1135-1143.