

谷氨酸脱羧酶亲和层析介质制备

范 军, 李培金, 李 纯, 稽跃琴, 陆翠珍

(安徽农业大学 生物技术研究中心, 安徽 合肥 230036)

[摘 要] 将 Sepharose 4B 用环氧氯丙烷活化, 接丁二胺臂, 再用环氧氯丙烷活化, 与谷氨酸的 N-2 氨基偶联。在 N,N'-二环己碳化二亚胺催化下, 以接臂的胶与谷氨酸的 C-5 和 C-1 羧基基团偶联。结果表明, 谷氨酸 N-2 氨基偶联和 C-1 羧基偶联的亲介质对小麦谷氨酸脱羧酶有部分亲和作用, 洗脱下的酶活低, 而谷氨酸 C-5 羧基基团偶联的层析介质对小麦谷氨酸脱羧酶有完全亲和作用, 洗脱的酶活高。谷氨酸能从亲和材料上洗脱掉脱羧酶, 但它抑制酶活, 而同等浓度的 4-氨基丁酸和谷氨酰胺梯度洗脱没有作用。

[关键词] 谷氨酸; 谷氨酸脱羧酶; 亲和层析; 小麦

[中图分类号] Q 555⁺. 6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0030-03

4-氨基丁酸(4-Aminobutyric acid, BA)与植物逆境代谢、种子活力和细胞发育有关^[1], 它由谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase, GAD)催化 L-谷氨酸脱羧产生。GAD 的活力可作为禾本科作物种子活力和幼苗长势的指标, 它的辅酶是磷酸吡哆醛(Pyridoxal 5 phosphate, PLP)。目前, 根据酶的辅酶、底物和酶中的结构域设计了赖氨酸、谷氨酸和钙调蛋白亲和层析配体^[2~4], 其中 L-谷氨酸亲和层析效率高, 制备简单, 它可一步纯化马铃薯 GAD^[3], 但得率较低。植物体内存在 GAD 同工酶, 对其性质和作用尚不清楚, 而纯化它们需要高效亲和层析, 为此, 笔者分别将谷氨酸的 N-2 氨基、C-1 羧基和 C-5 羧基 3 个基团偶联在琼脂糖凝胶柱上, 初步分析不同偶联基团的谷氨酸对 GAD 的亲合性, 以期为小麦 GAD 同工酶的纯化及其性质和功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

小麦幼苗由安徽农业大学马传喜教授惠赠。Sepharose 4B (Pharmacia), 丁二胺(Merck), PLP、L-谷氨酸单钠盐、N,N'-二环己碳化二亚胺(Sigma), 苯甲基磺酰氟、L-谷氨酸、BA、Tris(华美), 其他试剂为国产分析纯产品。层析柜(Pharmacia), 离心机(Hitachi), 紫外可见分光光度计(Beckman), 凝胶成像系统(Kodak)。

1.2 缓冲液

缓冲液 A: 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液,

pH 5.8, 内含 5 mmol/L 的 PLP。缓冲液 B: 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液, pH 5.8, 内含 5 mmol/L 的 PLP 和 2 mmol/L 的苯甲基磺酰氟。缓冲液 C: 缓冲液 A 中内含 0.5 mol/L 的 NaCl。

1.3 方法

1.3.1 Sepharose 4B 的活化 方法参见文献[5], 有改进。取约 40 mL 的 Sepharose 4B 湿胶, 蒸馏水充分浸泡后, 水洗抽干, 加入 150 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 和 30 mL 的环氧氯丙烷, 60℃ 水浴搅拌反应 50 min 后抽滤, 蒸馏水洗 4 次, 抽干后溶于一定体积的质量分数 1% 丁二胺溶液中, 45℃ 水浴搅拌反应 3 h, 抽滤水洗几次, 抽干, 备用。从中取 10 mL 溶于一定体积的环氧氯丙烷, 45℃ 水浴搅拌反应 3 h, 抽滤水洗, 备用。

1.3.2 L-谷氨酸铜盐的制备 称取 0.5 g 的 L-谷氨酸, 溶于 50 mL 蒸馏水中, 缓慢加入适量的固体碱式碳酸铜, 45℃ 水浴反应 5 h 后用新华 1 号滤纸热过滤, 滤液冷却备用。

1.3.3 Glu-Sepharose 4B 的制备 方法参见文献[5], 有改进。谷氨酸的 N-2 氨基偶联: 将 50 mL 含 0.5 g 的 L-谷氨酸溶液加入上述 10 mL 环氧氯丙烷再活化的胶中, 45℃ 水浴搅拌反应 6 h, 抽干, 蒸馏水洗几次, 抽干后溶于一定体积的蒸馏水中, 装柱(1.0 cm × 6 cm), 以缓冲液 A 平衡 3 个层析柱体积, 备用。谷氨酸 C-5 和 C-1 羧基偶联: 将接臂的胶分为 2 组, A 组加入 50 mL 质量分数为 1% 的谷氨

[收稿日期] 2000-04-03

[基金项目] 安徽省教委自然科学基金资助项目(98JL099)

[作者简介] 范 军(1963-), 男, 副教授, 硕士, 主要从事农业生物技术研究。

酸 C-5 单钠盐, B 组加入 50 mL 上述谷氨酸铜盐, 同时加入等量 20 mL 1.3 mol/L 的 N,N-二乙基碳二亚胺, 调 pH 约 6.0, 室温反应 1 d, 蒸馏水洗几次, 抽干, 装柱 (1.0 cm × 6 cm), A 组用缓冲液 A 平衡 3 个层析柱体积, B 组用 0.1 mol/L 的 EDTA-Na₂ 洗脱 3 个层析柱体积, 用蒸馏水洗脱 3 个层析柱体积, 再用缓冲液 A 洗脱 3 个层析柱体积, 备用。

1.3.4 小麦 GAD 的分离和亲和纯化 分离按文献[6]的方法, 略有改进。除非说明, 所有操作均在 4℃ 下进行。称取 200 g 小麦幼苗, 加入 400 mL 的缓冲液 B, 匀浆, 12 000 × g 离心 10 min, 弃沉淀, 上清液加入固体硫酸铵至 30% 饱和度, 离心弃沉淀, 上清液加入固体硫酸铵至 55% 饱和度, 离心弃上清, 沉淀用一定体积的缓冲液 B 溶解, 离心弃沉淀, 上清液在缓冲液 B 中透析, 加入等体积 -20℃ 预冷的丙酮, 6 000 × g 离心 10 min, 弃沉淀, 上清液以少量缓冲液 A 溶解, 透析, 分别上 3 种亲和柱, 先以缓冲液 A 洗脱两个层析柱体积, 再以缓冲液 A 和 C 梯度洗脱, 测定 GAD 酶活。此外, 分别以 0~100 mmol/L 的 4-氨基丁酸和谷氨酰胺对 GAD 洗脱, 测定 GAD 酶活。

1.3.5 GAD 的酶活测定 方法参见文献[2]。取

0.2 mL 质量分数为 1% 的 L-谷氨酸缓冲液 A, 加 0.1 mL 待测酶液, 37℃ 保温 30 min, 将反应管加 0.2 mL 的 2 mol/L pH 10 的硼酸缓冲液, 离心, 上清液加 0.03 mL 重蒸苯酚和 0.4 mL 质量分数为 10% 次氯酸钠, 震荡, 沸水浴加热 10 min 后立即冰浴 5 min, 待溶液出现蓝绿色化合物后, 加入 2 mL 的体积分数为 65% 的乙醇, 645 nm 比色, 以已知浓度的 BA 作对照, 测定每小时生成 4-氨基丁酸的 μmol 数。

1.3.6 蛋白质含量测定 采用 Bradford 法, 以牛血清白蛋白作对照。

2 结果与分析

用 3 种谷氨酸不同基团偶联的亲和层析洗脱表明, N-2 氨基偶联和 C-1 偶联的亲和材料对小麦谷氨酸脱羧酶有部分亲和作用, 梯度洗脱前后有 2 个蛋白峰, 2 个 GAD 酶活峰, 且洗脱的 GAD 酶活低, 最高酶比活分别约为 10 和 16 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$, 而 C-5 偶联的亲和柱梯度洗脱前后有 2 个蛋白峰, 只有在梯度洗脱后才显示 1 个 GAD 酶活峰 (图 1), GAD 比活性约为 26 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ 蛋白, 低于文献[2]报道的小麦纯 GAD 的酶活。

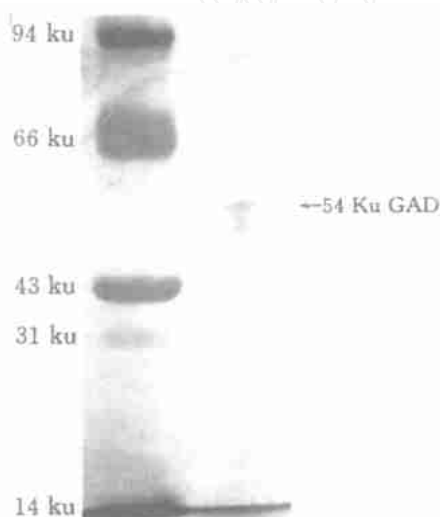


图 1 小麦 GAD 在 Glu Sepharose 4B 层析

Fig 1 The profile of GAD from wheat on Glu Sepharose 4B column

小麦 C-1 偶联的 GAD 亲和层析纯化中酶活峰仅有 1 个, 表明其对 GAD 完全亲和, 但也说明其不能分离 GAD 的同工酶。这和文献[3]的结果一致。

SDS-PAGE 结果显示 (图 2), 经亲和纯化的 GAD 除 1 条主带外, 还有几条杂带, 可能含有 GAD 同工酶带或与 L-谷氨酸反应有关的酶及其他酶带。

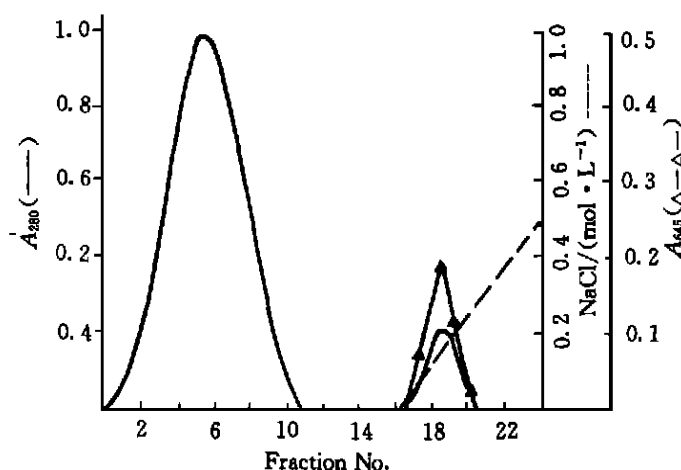


图 2 小麦 GAD 的 SDS-PAGE 图谱

Fig 2 The pattern of GAD from wheat on SDS-PAGE

以 NaCl 洗脱亲和柱获得一个酶活峰, 而用 0~100 mmol/L 的谷氨酸洗脱虽然专一性更好, 但洗脱下的酶比活仅有 12 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ 蛋白, 这可能是底物抑制的结果, 而 0~100 mmol/L 梯度的催化产物 4-氨基丁酸或底物类似物谷氨酰胺不能从亲和柱上将 GAD 洗脱下来, 推测是 GAD 催化反应不可

逆的结果。

3 讨 论

亲和层纯化的小麦 GAD 在 SDS-PAGE 中存在几条杂蛋白带,推测原因一可能是前期处理差异,马铃薯 GAD 在亲和纯化前分离用加热法除杂蛋白,穆小民等^[6]认为加热会使酶活大大降低,因此采用丙酮沉淀法。但此法不能除去对亲和吸附剂有吸附的某些催化 L-谷氨酸反应的酶。二是存在 GAD 同工酶,大麦的胚和根分别有分子质量为 260 ku 和 310 ku 的 GAD^[8],南瓜种子 GAD 纯化中经羟基磷灰石层析有 3 个酶活峰^[9],矮牵牛发芽的种子中分别有 48, 58 和 66 ku 的多肽与 GAD 抗体发生免疫

反应^[10]。从拟南芥获得了 2 个 GAD 的 cDNA 克隆^[11]。三是亲和层析的非特异性吸附。虽然如此, C-5 偶联的谷氨酸亲和层析对小麦 GAD 的专一性大大高于赖氨酸配基。通过羟基磷灰石层析分离小麦 GAD 的同工酶,有望用此亲和层析将 GAD 纯化至均一,为研究不同 GAD 的性质,在植物生长发育和逆境中的作用打下基础。

植物中谷氨酸作为氨基酸代谢的核心,除了氨基转移外,它的 C-1 羧基可以脱羧,还能还原后经一系列反应生成脯氨酸,在叶绿体内其 C-5 羧基还原后经一系列反应分别生成血红素和叶绿素^[12]。作者制备的这些谷氨酸亲和层析也有可能用于催化这些起始反应酶类的高效亲和纯化。

[参考文献]

- [1] Satyanarayan V, Nair P M. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in high plants[J]. Phytochemistry, 1990, 29: 367-375
- [2] 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(5): 641- 644
- [3] Satyanarayan V, Nair P M. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from solanum tuberosum [J]. Eur J Biochem, 1985, 150: 53- 60
- [4] Arazi T, Baum G, Snedden W A, et al Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase[J]. Plant Physiol, 1995, 108: 551- 561
- [5] 阎伯旭, 马 林, 左汉田, 等. 用亲和层析技术分离纯化天冬氨酸酶[J]. 生物化学杂志, 1992, 8(2): 755- 758
- [6] 穆小民, 沈黎明, 吴显荣. 林生山黎豆谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分性质研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 2: 181- 185
- [7] Yamaguchi T, Matsumura Y. Purification of L-glutamate decarboxylase by affinity chromatography[J]. Biochim Biophys Acta, 1977, 481: 706- 711
- [8] Inatomi K, Slaughter J. Glutamate decarboxylase from barley embryos and roots[J]. Biochem J, 1975, 147: 479- 484
- [9] Matsumoto T, Yamaura I, Funatsu M. Purification and properties of glutamate decarboxylase from squash[J]. J Agric Biol Chem, 1986, 59(6): 1413- 1417
- [10] Chen Y, Baum G, Fromm H. The 58-kilodalton calmodulin-binding glutamate decarboxylase is a ubiquitous protein in petunia organs and its expression is developmentally regulated[J]. Plant Physiol, 1994, 106: 1381- 1387
- [11] Turano F J, Fang T K. Characterization of two glutamate decarboxylase cDNA clones from Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 1998, 117: 1411- 1421
- [12] Beal S I. Biosynthesis of the tetrapyrrole pigment precursor, δ -aminolevulinic acid, from glutamate[J]. Plant Physiol, 1990, 93: 1273- 1279

Affinity chromatography materials for glutamate decarboxylase

FAN Jun, LI Pei-jin, LI Chen, JI Yao-qin, LU Cui-zhen

(Biotechnology Centre, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract Sepharose gels were activated with epichlorohydrin, spaced with putrescine and reactivated with epichlorohydrin. They were coupled with α -amino group of L-glutamate. Spaced gels were coupled with α -carboxylic and δ -carboxylic group of L-glutamate by the aid of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide respectively. The glutamate decarboxylase from wheat was completely absorbed by Glu Sepharose with coupled δ -carboxylic group, partly absorbed by other affinity gels. Glutamate could elute the enzyme but inhibit the enzyme activity. Glutamine and 4-aminobutyrate could not elute the enzyme at the same concentration.

Key words glu sepharose; glutamate decarboxylase; affinity chromatography; wheat