

巴西橡胶树胶乳磷脂酶 A₂ 的分离 纯化及部分酶学性质鉴定

邓 治, 刘实忠, 校现周 *

(中国热带农业科学院 橡胶研究所 农业部橡胶树生物学重点开放实验室, 海南 儋州 571737)

摘 要: 通过丙酮沉淀、DEAE-纤维素离子交换柱层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析等分离纯化技术, 对巴西橡胶树胶乳 C-乳清磷脂酶 A₂ 进行分离纯化。用 SDS-PAGE 测定其亚基的相对分子量。测定该酶最适温度和 pH, 动力学常数 K_m 和 V_{max} 。并测定 Ca^{2+} 和 La^{3+} 对酶活性的影响。结果显示: 该酶被纯化了 49.47 倍, 产率为 5.12%。SDS-PAGE 检测为单一一条带, 其亚基相对分子量约 43 kDa。最适反应温度为 37 °C, 最适反应 pH 为 8.0, K_m 为 $0.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, V_{max} 为 $7.22 \mu\text{mol} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$ 。最适 Ca^{2+} 浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 稀土元素 La^{3+} 离子对磷脂酶 A₂ 活性有抑制作用, 但加入 Ca^{2+} 后可缓解 La^{3+} 对磷脂酶 A₂ 活性的抑制作用。胶乳 C-乳清磷脂酶 A₂ 与其他植物磷脂酶 A₂ 在 Ca^{2+} 的依赖性上存在差异。研究结果为今后探索橡胶树胶乳磷脂酶 A₂ 的催化机理、调节机理及生理功能等奠定了基础。

关键词: 巴西橡胶树; 磷脂酶 A₂; 酶的纯化; 酶的性质

中图分类号: Q556 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)06-0876-05

Purification and enzymatic characterization of phospholipase A₂ from latex of *Hevea brasiliensis*

DENG Zhi, LIU Shi-Zhong, XIAO Xian-Zhou *

(Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory
of Rubber Biology, Ministry of Agriculture, Danzhou 571737, China)

Abstract: A phospholipase A₂ (PLA₂) was purified from the latex C-serum of *Hevea brasiliensis* by acetone precipitation, DEAE-Cellulose ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration. SDS-PAGE was used to determine the Mr of the subunit of PLA₂. Then the K_m , V_{max} , the optimum temperature and pH of PLA₂ were tested. The effect of Ca^{2+} and La^{3+} on PLA₂ activity were assayed. A 49.47-fold purification was obtained with the recovery of 5.12% activity. The results showed that a single band on SDS-PAGE with a subunit Mr of 43 kDa. Latex C-serum PLA₂ had an optimum temperature at 37 °C, and an optimum pH at 8.2. The K_m was $0.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The V_{max} was $7.22 \mu\text{mol} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$. The Ca^{2+} ion optimum concentration for activity was determined to be $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The activity of PLA₂ was inhibited by La^{3+} . The inhibited effect of La^{3+} was palliated after added calcium ion. There are differences of Ca^{2+} dependence between latex C-serum and other plant PLA₂. The results provide a research basis for catalytic mechanism, regulation, and physiology function of PLA₂ in latex.

Key words: *Hevea brasiliensis*; phospholipase A₂; purification of enzymes; enzymological properties

收稿日期: 2009-03-09 修回日期: 2010-007-30

基金项目: 海南省自然科学基金(30104)[Supported by the Natural Science Foundation of Hainan Province(30104)]

作者简介: 邓治(1977-), 女, 云南昭通人, 助理研究员, 从事植物逆境生理生化研究工作, (E-mail) zizip@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: xiao_xianzhou@126.com)

磷脂酶 A₂ (EC 3. 1. 1. 4, phospholipase A₂, 简称 PLA₂) 是一种重要的代谢和调节酶类。在生物体内广泛分布, 按其来源可分为五种类型 (Schaloske 等, 2006): 分泌型 PLA₂ (sPLA₂)、胞质型 PLA₂ (cPLA₂)、Ca²⁺ 不依赖型 PLA₂ (iPLA₂)、血小板活化因子乙酰水解酶 (PAF-AH) 和溶酶体 PLA₂。PLA₂ 催化细胞膜上甘油磷脂的 Sn-2 位脂肪酸水解, 生成溶血磷脂及自由脂肪酸。这些脂类产物可以充当细胞内的第二信使, 也可进一步代谢产生茉莉酸及相关复合物 (Narváez-Vásquez 等, 1999)。此外, PLA₂ 在抗菌 (Harwig 等, 1995)、抗炎 (王秋雁等, 2001)、脂代谢 (May 等, 1999)、活性氧和生物碱的产生 (Munnik 等, 1998; Roos 等, 1999)、离子通道功能 (Mancuso 等, 2000) 和生长素刺激生长 (Paul, 1998) 等细胞的许多生理过程中起到重要作用。目前对于动物的 PLA₂ 已有广泛的研究, 但是对植物 PLA₂ 的研究报道则相对较少。Kostyal 等 (1998) 对胶乳过敏原 *Hev b7* 进行 cDNA 克隆, 发现它与 patatin 同源, patatin 具有类 PLA₂ 活性。但是, 目前尚未见到有关胶乳 PLA₂ 纯化及其性质研究的报道。本文对胶乳 PLA₂ 进行了分离纯化, 并对其部分酶学性质进行了研究, 以期为橡胶树胶乳 PLA₂ 的结构、催化机理等研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

选取本院试验农场沙田队橡胶树无性系热研 7-33-97 的胶乳为实验材料。

1.2 方法

1.2.1 PLA₂ 的分离与纯化 酶的分离纯化参照汪家政 (2002) 和吴冠芸 (2002) 的方法, 将采集的新鲜胶乳置于 4 °C 下, 19 000 rpm, 离心 1 h, 利用穿刺针收集中层 C-乳清为粗酶液。取 20 mL C-乳清加入 4× 体积的冰丙酮混匀, -20 °C 放置 1 h 后, 4 °C, 10 000 rpm 离心 10 min。弃上清, 使沉淀风干。用 1~2 倍沉淀体积的缓冲液 I (0.05 mol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.2, 5 mmol · L⁻¹ β-巯基乙醇) 悬浮沉淀。将重悬液上样于 DEAE-纤维素柱中 (柱长 300 mm, 直径 16 mm), 先用 330 mL 的缓冲液 I 洗脱掉未结合的杂蛋白质。然后用 0~3 mol · L⁻¹ NaCl 溶液进行线性梯度洗脱, 洗脱速度为 0.5 mL · min⁻¹, 6 mL · 管⁻¹。收集具有 PLA₂ 活性的溶液放入透析袋中, 4 °C 下在缓冲

液 II (0.25 mol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.2; 5 mmol · L⁻¹ β-巯基乙醇, 1% Tween-20) 中透析过夜。将透析后的溶液经 PEG 20 000 浓缩, 上样于 Sephadex G-100 柱中 (柱长 600 mm, 直径 26 mm), 用缓冲液 II 进行洗脱, 洗脱速度为 0.5 mL · min⁻¹, 6 mL · 管⁻¹。最后, 将具有 PLA₂ 活性的溶液放入透析袋中, 用 PEG 20 000 进行浓缩, -20 °C 保存备用。

1.2.2 PLA₂ 活性的测定 酶活性测定按 Kush 等 (1990) 的方法进行。底物母液配制: 称取 28 mg 对-硝基苯棕榈酸溶于 100 mL 1% Triton-X 100 中, 加入 1% SDS 1.7 mL 后加热溶解, 定容后室温放置备用。取 1 mL 底物母液和 1 mL 反应缓冲液 (0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.2) 于试管中, 再加入 0.5 mL 酶液, 摇匀, 放入 37 °C 水浴锅中温育 30 min 后, 取出, 加入 1 mL 无水乙醇中止反应, 测 OD₄₁₀。以蒸馏水代替酶液, 同法操作, 作为空白对照。PLA₂ 活性以每分钟催化生成 1 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位 (U) 表示, 比活力 (U · mg⁻¹) 用每毫克蛋白所含的酶活性单位数表示。

1.2.3 蛋白质的测定及电泳检测 蛋白质浓度测定采用 Bradford (1976) 的方法, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。采用 SDS-PAGE 测定酶蛋白质亚基相对分子量, 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 4%。参照 Gabriel (1971) 的方法, 电泳后酶活性的测定采用分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 4% 的 Native-PAGE, 电泳结束后, 将凝胶分成两半, 一半用于染色, 根据染色结果将另一半相同位置上的凝胶切下测定 PLA₂ 活性。

1.2.4 PLA₂ 的酶学性质研究 酶活性最佳反应 pH 值实验: 将加入底物母液的酶液放在 pH 0~14.0 之间的反应缓冲液中, 间隔为 pH 1.0 的条件下 37 °C 反应 30 min, 测定酶活性。根据测定的酶活结果再选取 pH 7.0~9.0 之间的反应缓冲液, 间隔为 pH 0.2 的条件反应测定酶活性。酶活性最佳反应温度实验: 将加入底物母液的酶液分别放在 20~60 °C 条件下间隔为 10 °C 反应, 反应缓冲液 pH 8.2, 反应时间 30 min, 测定酶活性。根据结果再选取 30~40 °C 之间, 间隔 1 °C 的条件反应测定酶活性。金属离子对酶活性的影响实验: ① Ca²⁺ 对 PLA₂ 活性的影响: 在反应体系中加入 Ca²⁺ 浓度为 0~300 μmol · L⁻¹, 间隔 50 μmol · L⁻¹, 其余条件同 1.2.2; ② Ca²⁺ 存在条件下稀土元素 La³⁺ 对 PLA₂ 活性的影响: 在反应缓冲液中加入浓度为 50 μmol · L⁻¹ 的

Ca^{2+} , 然后再加入 La^{3+} 浓度为 $0 \sim 120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 间隔为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余条件同 1.2.2。 K_m 及 $V_{\max}$ 值测定: 配制不同浓度的底物溶液, 分别与酶液在最适 pH 和温度下反应, 采用双倒数法确定 PLA_2 的 K_m 及 $V_{\max}$ 值。

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

PLA_2 的粗提液经丙酮沉淀后上样于 DEAE-纤维素离子交换层析柱, 洗脱液中出现 8 个蛋白质峰 (图 1)。经测定, 第 7 个峰具有酶活性, 收集此峰的洗脱液共 30 mL, 浓缩后进行下一步纯化。

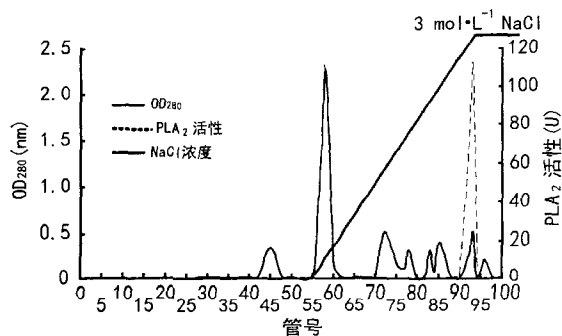


图 1 PLA_2 的 DEAE-纤维素离子交换层析洗脱图
Fig. 1 Elution profiles of PLA_2 on Ion-exchange Chromatography of DEAE-Cellulose

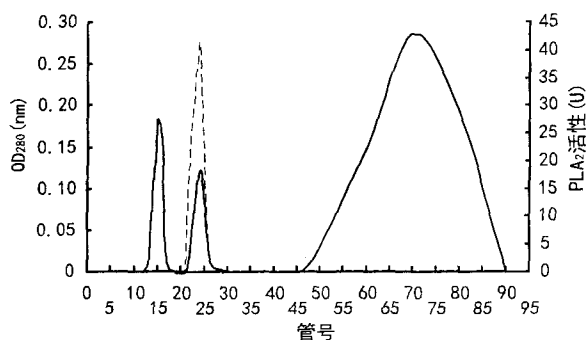


图 2 PLA_2 的 Sephadex G-100 凝胶过滤层析洗脱图
Fig. 2 Elution profiles of PLA_2 on Gel filtration chromatography of Sephadex G-100

将上述具有酶活性的洗脱液上样于 Sephadex G-100 凝胶过滤层析柱后, 经洗脱出现 3 个蛋白质峰 (图 2), 经测定第 2 个峰具有酶活性, 收集此峰的洗脱液共 36 mL, 经 PEG 20 000 浓缩至 2 mL 左右后保存备用。

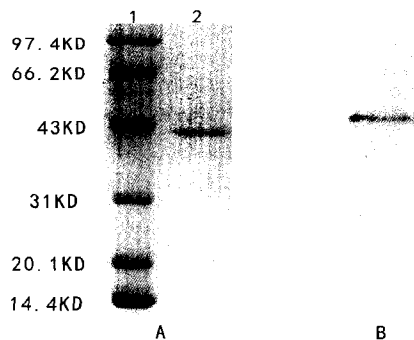


图 3 PLA_2 的凝胶电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis pattern of PLA_2

A: SDS-PAGE 图谱 (1. Marker; 2. 纯化 PLA_2); B: PAGE 图谱

分离纯化后的 PLA_2 , 用 SDS-PAGE 检测得到一条蛋白带, 其分子量约 43 kDa (图 3: A)。用 Native-PAGE 检测得到一条带, 切取含有该条带的凝胶检测到 PLA_2 活性 (图 3: B), 从而确定该条带确为 PLA_2 。经过上述纯化步骤可知, PLA_2 已基本纯化, 可以对其进行下一步酶学性质的研究。各纯化步骤所得到的纯化倍数和产率见表 1。

2.2 酶学性质

2.2.1 PLA_2 反应的最适 pH 加入底物母液的酶液在反应缓冲液 pH 0~14.0, 间隔为 pH 1.0 的条件下反应, 可知 pH 7.0~9.0 之间 PLA_2 活性较高 (数据未显示)。随后选取 pH 7.0~9.0 之间的反应缓冲液, 间隔为 pH 0.2 的条件反应, 结果可知 PLA_2 最适 pH 值为 8.2 (图 4)。

2.2.2 PLA_2 反应的最适温度 加入底物母液的酶液分别放在 $20 \sim 60^\circ\text{C}$ 条件下反应, 结果 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 之间 PLA_2 活性较高 (数据未显示)。然后选取 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 之间的反应温度, 间隔 1°C 的条件反应, 结果可知 PLA_2 最适温度为 37°C (图 5)。

2.2.3 不同浓度钙离子对 PLA_2 活性的影响 Ca^{2+} 对 PLA_2 的影响多种多样, 为研究 Ca^{2+} 对胶乳 C-乳清中 PLA_2 的影响, 在反应体系中加入 Ca^{2+} , 结果发现, Ca^{2+} 可促进 PLA_2 活性, 最适 Ca^{2+} 浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余都没有该浓度的促进作用明显 (图 6)。这与 Jung 等 (2000) 报道的蚕豆 PLA_2 、马铃薯晚疫病诱导的胞质 PLA_2 (Senda 等, 1996) 等植物 PLA_2 为不依赖 Ca^{2+} 的结果不同。

2.2.4 不同 La^{3+} 浓度对 PLA_2 活性的影响 稀土元素 La^{3+} 对 PLA_2 活性有抑制作用。低浓度稀土抑制作用不很明显, 当 La^{3+} 浓度达 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时

表 1 胶乳 PLA₂ 的分离纯化
Table 1 Purification of PLA₂ from latex

纯化步骤 Purification step	总蛋白 (mg) Total protein	总活力 (U) Total activity	比活力 (U·mg ⁻¹) Specific activity	纯化倍数 Purification fold	产率 (%) Recovery
粗酶抽提	3 068.00	465.07	0.15	1.00	100.00
丙酮沉淀	2 018.00	431.87	0.21	1.42	92.86
DEAE-纤维素离子交换柱层析	10.60	67.23	6.34	42.27	14.46
Sephedax G-10 柱层析	3.21	23.82	7.42	49.47	5.12

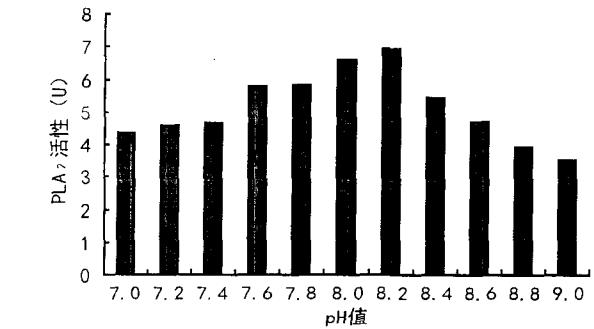


图 4 不同 pH 对 PLA₂ 活性的影响
Fig. 4 Effects of different pH on the activity of PLA₂

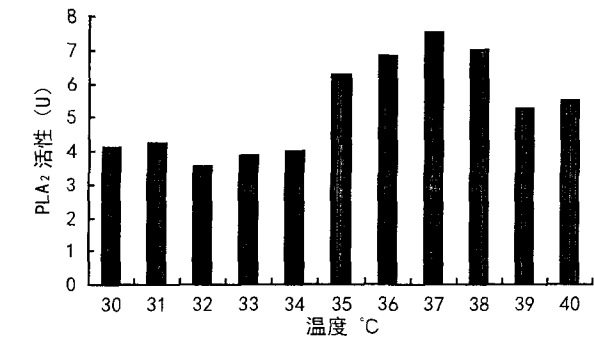


图 5 不同温度对 PLA₂ 活性的影响
Fig. 5 Effects of different temperatures on the activity of PLA₂

严重抑制 PLA₂ 酶活性,酶活仅为无 La³⁺ 时的 56%。当 La³⁺ 浓度达 120 μmol·L⁻¹ 时几乎完全抑制了 PLA₂ 活性(图 7)。这与稀土离子对蛇毒 PLA₂ 的影响情况一致(李伟国等,2002)。而加入 Ca²⁺ 后可缓解 La³⁺ 对 PLA₂ 的抑制作用。这可能是 Ca²⁺ 具有和 La³⁺ 相近的离子半径和配位化学环境,Ca²⁺ 离子可以竞争性地结合在酶的活性部位。

2.2.5 PLA₂ 的 K_m 和 V_{max} 值测定 在 pH8.2、37℃下,采用双倒数法测得胶乳 C-乳清 PLA₂ 对对硝基棕榈酸的 K_m 为 0.44 mmol·L⁻¹,V_{max} 为 7.22 μmol·(mL·min)⁻¹。

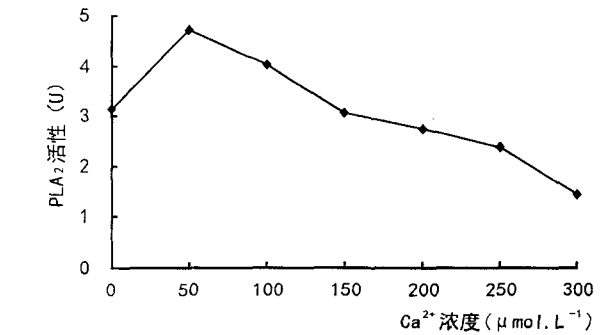


图 6 不同浓度钙离子对 PLA₂ 活性的影响
Fig. 6 Effects of different calcium ion concentrations on the activity of PLA₂

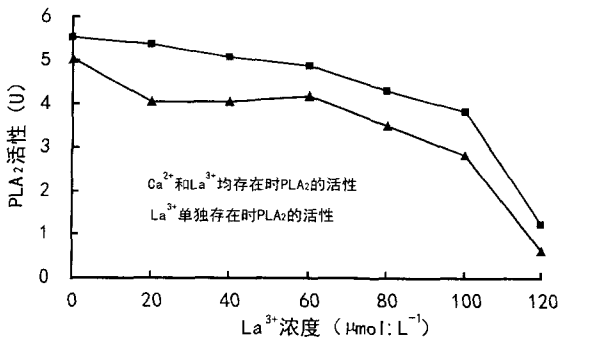


图 7 不同 La³⁺ 浓度对 PLA₂ 活性的影响
Fig. 7 Effects of different lanthanum ion concentrations on the activity of PLA₂

3 讨论

胶乳 C-乳清通过丙酮沉淀、离子交换层析、凝胶过滤层析等分离纯化方法,获得 43 kDa 左右电泳纯的 PLA₂。与蚕豆叶片 PLA₂ 纯化结果相比,胶乳 C-乳清中纯化倍数较低,这可能是不同的分析条件下底物的量不同所造成的。而橡胶树胶乳 C-乳清中 PLA₂ 的最适 pH 为 8.2,这可能与物种的起源及生长适应性有关。Ca²⁺ 对 PLA₂ 的影响是多种多样的,Ca²⁺ 离子对于低分子量的 PLA₂ 具激活作用,也可触

发 IV 类 cPLA₂ 转移定位到膜上。植物中的 PLA₂ 多为钙不依赖型(Wang, 2001), 但 Ca²⁺ 却对本文中所纯化得到的 PLA₂ 有激活作用, 由于 Ca²⁺ 在信号转导和许多生理代谢活动中起重要的调节作用, 其作用机理较复杂, 所以 Ca²⁺ 对胶乳 PLA₂ 的激活机制还有待进一步研究。本文纯化得到的胶乳 C-乳清 PLA₂ 是否是一种新型的植物 PLA₂ 呢? 这还需进行蛋白质测序和结构分析等研究后才能确定。稀土元素影响植物的许多生理功能, 包括植物生长、营养代谢、光合作用、特别是对植物抗逆性。其中稀土元素 La³⁺ 与 Ca²⁺ 无论性质及结构均很相似, 其不同之处是 La³⁺ 的电荷高于 Ca²⁺, 因而有人将稀土离子称为“超级钙”(倪嘉缙, 1995)。它不仅可占据钙的位置, 还可取代包括结合的 Ca²⁺。并且已有研究表明稀土元素与钙还有一定的拮抗作用(Rangel, 1994; Hodick & Sievers, 1998)。本文研究结果表明稀土元素 La³⁺ 离子对 PLA₂ 活性有抑制作用, 但加入 Ca²⁺ 后可缓解 La³⁺ 对 PLA₂ 活性的抑制作用, 这可能是稀土元素与钙之间的竞争或拮抗作用的结果。

参考文献:

- 吴冠芸, 潘华珍, 吴攀. 2002. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京: 科学出版社: 38—62
- 倪嘉缙. 1995. 稀土生物无机化学[M]. 北京: 科学出版社: 4
- 汪家政, 范明. 2002. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社: 61—62
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biol Chem*, **72**: 248—254
- Gabriel O. 1971. Locating enzymes on gels[J]. *Methods in Enzymology*, **22**: 578—604
- Harwig SS, Tan L, Qu XD, et al. 1995. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A₂ [J]. *J Clin Invest*, **95**(2): 603—610
- Hodick D, Sievers A. 1988. The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis[J]. *Planta*, **174**: 8—18
- Jung KM, Kim DK. 2000. Purification and characterization of a membrane-associated 48-kilodalton phospholipase A₂ in leaves of Broad Bean[J]. *Plant Physiol*, **123**: 1 057—1 068
- Kostyal DA, Hickey VL, Noti JD, et al. 1998. Cloning and characterization of a latex allergen (Hev b7): homology to patatin, a plant PLA₂ [J]. *Clin Exp Immunol*, **112**(3): 355—362
- Kush A, Goyvaerts E, Chye M, et al. 1990. Lactifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 1 787—1 790
- Li WG(李伟国), Lu ZW(卢振伟), Zhao DQ(赵大庆). 2002. Effects of rare earth ions and their complexes on the activity of snake venom phospholipase A₂ (稀土及其配合物对蛇毒磷脂酶 A₂ 活性的影响)[J]. *Chem Res* (化学研究), **13**(1): 1—4
- Mancuso DJ, Jenkins CM, Gross RW. 2000. The Genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A₂ [J]. *J Biol Chem*, **275**: 9 937—9 945
- May C, Preisig-Müller R, H? hne M, et al. 1998. A phospholipase A₂ is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies[J]. *Biochim Biophys Acta*, **1 393**(2—3): 267—276
- Munnik T, Irvine RF, Musgrave A. 1998. Phospholipid signaling in plants[J]. *Biochim Biophys Acta*, **1 389**(3): 222—272
- Narváez-Vásquez J, Florin-Christensen J, Ryan CA. 1999. Positional specificity of a phospholipase a activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves[J]. *Plant Cell*, **11**(11): 2 249—2 260
- Paul RU, Holk A, Scherer GFE. 1998. Fatty acid and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of a phospholipase A₂ activity by auxin in suspension cultured parsley and soybean cell[J]. *Plant J*, **16**(5): 601—611
- Rangel Z. 1994. Disturbance of cell Ca²⁺ homeostasis as a primary in aluminum rhizo toxicity I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake[J]. *Plant Physiol*, **143**: 47—51
- Roos W, Dordschbal B, Steighardt J, et al. 1999. A redox-dependent G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica* [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1 448**(3): 390—402
- Schaloske RH, Dennis EA. 2006. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, **1 761**: 1 246—1 259
- Senda K, Yoshioka H, Doke N, et al. 1996. A cytosolic phospholipase A₂ from potato tissues appears to be patatin[J]. *Plant Cell Physiology*, **37**(3): 347—353
- Wang QY(王秋雁), Zhuang MX(庄茂辛), Lin WZ(林文珍), et al. 2001. Myotoxic activity study of acid PLA₂ from Guangxi *Ophiophagus hannah* Venom(广西眼镜王蛇毒酸性磷脂酶 A₂ 的肌毒性研究)[J]. *J Snake* (蛇志), **13**(1): 12—14
- Wang XM. 2001. Plant phospholipases [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio*, **52**: 211—231