

茶树鲜叶中维生素 B₆ 代谢酶 PNPO 的活性分析

李艳霞¹, 张剑韵², 黄龙全^{1*}

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

摘要: 采用液氮研磨、Tris-HCl+KPO₄ 缓冲液(pH8.5)浸提法和硫酸铵沉淀法从茶树鲜叶中提取磷酸吡哆醇氧化酶(PNPO)粗酶液, 并通过苯肼法研究其酶学性质。结果表明, 以磷酸吡哆胺(PMP)为底物, PNPO 催化反应的最佳时间为 30 min, 最适温度为 50℃, 最适 pH6.5。在 pH6.0~9.0, 温度 10~40℃ 的条件下, 此酶稳定。在最适条件下测得反应底物 PMP 的 K_m 值为 2.34 mmol/L。

关键词: 茶树, 磷酸吡哆醇氧化酶, 维生素 B₆

中图分类号: S571.1; Q563^{+.3}

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2010)04-273-04

Analysis on the Activity of PNPO of VB₆-metabolizing Enzymes from Tea Leaf

LI Yan-xia¹, ZHANG Jian-yun², HUANG Long-quan^{1*}

(1. Tea and Food Science College of AnHui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. Life Science College of Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstracts: The crude extract of Pyridoxamine (Pyridoxine)-5'-phosphate Oxidase (PNPO) extracted from fresh tea leaves which were grinded by liquid nitrogen with Tris-HCL+ KPO buffer (pH8.5) and fractionated with solid ammonium sulfate, the enzymatic properties were investigated with phenyl hydrazine method. Results showed that when Pyridoxamine phosphate (PMP) as the substrate, the best time for the PNPO oxidation was 30 min, and the optimum pH was 6.5, and the optimum temperature was 50℃. When the value of pH was from 6.0 to 9.0 and temperature was from 10℃ to 40℃, the enzyme was stable. The K_{m_{pmp}} of the reactive substrate PMP was 2.34 mmol/L under the optimum measure condition.

Keywords: tea plant, pyridoxamine (Pyridoxine)-5'-phosphate oxidase, vitamin B₆

磷酸吡哆醛(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)是维生素 B₆(VB₆)的主要辅酶形式, 在生物体的氨基酸代谢、抗生素的合成、调节免疫功能等^[1]方面发挥重要生理作用。在 PLP 从头合成和补救途径中, 磷酸吡哆醇氧化酶(Pyridoxine 5'-phosphate oxidase, PNPO)起重要作用。PNPO 催化磷酸吡哆醇(Pyridoxine-5'-phosphate, PNP)和磷酸吡哆胺(Pyridoxine-5'-phosphate,

PMP)的氧化反应, 生成 PLP^[2-3]。近年来的研究^[4]发现, VB₆是一种很强的生物抗氧化剂, 可有效淬灭单线态氧分子和超氧化物负离子; PLP 或其同系物作为细胞信号传导的调节分子, 对一些细胞膜上的离子通道具有调节作用; PLP 是植物胚后期的根系发育所必需的, 可保护植物免受高盐、紫外线、渗透压、氧化等环境胁迫因子的影响^[5-6]。植物体内 VB₆代

收稿日期: 2009-12-28

修订日期: 2010-03-22

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重点科研项目(KJ2010A116)

作者简介: 李艳霞(1983—), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 主要从事茶叶生物化学研究。*通讯作者: lqhuang218@yahoo.com.cn

谢途径与抗逆作用机制受到重视,成为植物生理学和一个新的研究热点。

本实验研究茶树鲜叶中 PNPO 的催化条件及在不同条件下的稳定性,为深入研究茶树中维生素 VB₆ 的代谢途径,探讨茶树逆境生理、老化机制和提高茶树的抗逆性措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、主要试剂与仪器

龙井 43 茶树二三叶(采于安徽省合肥市大杨镇);液氮(中国科技大学液氮公司);PVPP、磷酸氢二钾、磷酸二钾、PMSF(苯甲基磺酰氟)、甘油、苯肼、三氯乙酸(TCA)、浓硫酸均为分析纯,购自上海生物工程有限公司;磷酸吡哆胺盐酸盐(PMP-HCL)购自 Merck 公司;PLP 购自 sigma 公司。UV-2600 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 鲜叶中 PNPO 粗酶液提取及初步纯化

提取液为 0.2 mol/L pH8.5 Tris-HCl+KPO₄ 缓冲液;内含 50%甘油;PMSF 50 mg/L;EDTA. Na 1.5 mol/L。

称取茶树鲜叶,加入等量 PVPP 在液氮中研磨成粉末状后,然后按固液比 1:2.5 加入提取液继续研磨 1 min,4℃ 8 000 r/min 离心 20 min,上清液即为粗酶液。

粗酶液用硫酸铵分级沉淀蛋白质,收集饱和度 40%~60%之间沉淀物溶于 1~2 倍沉淀物体积的提取液中,然后透析去除小分子杂质,每 3 h 换一次透析液。

1.2.2 茶树鲜叶 PNPO 的活性分析

茶树鲜叶中 PNPO 的活力测定参照文献[7]的方法,略有改动。反应体系为 3 mL,由 0.2 mol/L pH6.5 磷酸钾缓冲液 2.35 mL、粗酶液 0.5 mL、40 mmol/L PMP-HCL 0.15 mL 构成。37℃下避光反应 30 min 后添加 100% TCA 0.5 mL 终止反应,离心取上清液。再添加 0.2 mL

苯肼溶液,冰浴反应 10 min 后,410 nm 下测定吸光度。测定设置 3 次平行试验,结果取其平均值。空白为先加 100% TCA,后加酶液。

制备不同浓度的 PLP 溶液,苯肼反应后在 410 nm 处测定吸光值,作成标准曲线,确定酶促反应生成的 PLP 量。酶活力单位(U)定义为 37℃下,每毫克蛋白每分钟催化生成 PLP 的纳摩尔数。

1.2.3 pH 值对茶树 PNPO 的影响

分别用 pH4.0~10.0 的 Britton-Robinson 缓冲液研究不同 pH 对茶树 PNPO 活性的影响,另用上述 pH 范围的 Britton-Robinson 缓冲液与酶液等量混合,在 4℃下放置 24 h 后分析此酶的酸碱稳定性。

1.2.4 温度对茶树鲜叶 PNPO 的影响

测定 10~70℃下的酶活力,研究温度对酶活力的影响。另将酶液在 10~60℃下热处理 30 min 后,迅速冷却到室温,37℃下检测酶的剩余活力。

1.2.5 PNPO 以 PMP 为底物时的 Km 值的测定

在最适反应条件下,以 PMP 为底物采用双倒数法,以底物浓度的倒数 1/[S]为横轴,各管光密度的倒数 1/OD(代表各管的反应速度的倒数)为纵轴作图,计算茶树 PNPO 的 Km 值。

2 结果与分析

2.1 茶树 PNPO 粗酶初步纯化

茶树 PNPO 粗酶经硫酸铵分级沉淀和透析处理后比活力为 0.719 nmol/(min·mg),纯化倍数为 4(表 1)。

2.2 茶树 PNPO 基本酶学性质

茶树 PNPO 体外催化反应的时间曲线如图 1 所示,在 30 min 内呈线性关系。反应的最适 pH 值为 6.5(图 2-A)。在 pH6.0~9.0 的环境下相对稳定(图 2-B)。此酶反应的最适温度为 50℃(图 3-A)。在 10~40℃的环境下相对稳定(图 3-B)。在最适反应条件下,以 PMP 为底物时,茶树 PNPO 的 Km 为 2.34 mmol/L(图 4)。

表 1 茶树鲜叶 PNPO 粗酶初步纯化效果

Table 1 Primary purification PNPO crude enzyme from tea leaf

处理 Treatment	体积 (mL)	蛋白质质量浓度 (mg/mL)	总蛋白质量 (mg)	活力 [nmol/(min·mL)]	总活力 (nmol/min)	比活力 [nmol/(min·mg)] Specific activity
	Volume	Protein concentration	Total protein	Activity	Total activity	
粗酶 Crude extract	110	1.65	181.5	0.318	34.97	0.193
沉淀 Deposition	5	7.82	39.25	5.643	28.217	0.719

注: 酶活单位 U 定义: 37℃ 下, 每毫克蛋白每分钟催化生成 PLP 的纳摩尔数。蛋白质浓度采用 Bradford 法^[8] 测定, 以牛血清蛋白作为标准。

Note: A unit of activity is defined as the nmol of PLP formed per minute per mg of protein at 37°C. Protein concentrations were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as standard.

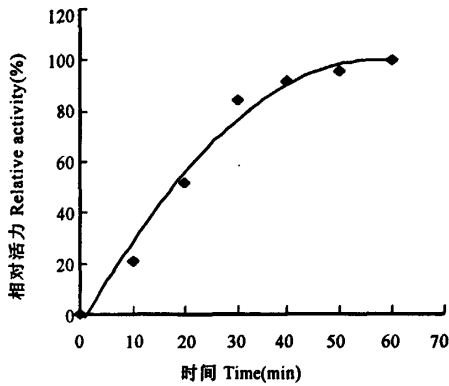


图 1 茶树 PNPO 催化反应的时间曲线

Fig. 1 Time curve of catalysis of PNPO from tea plant

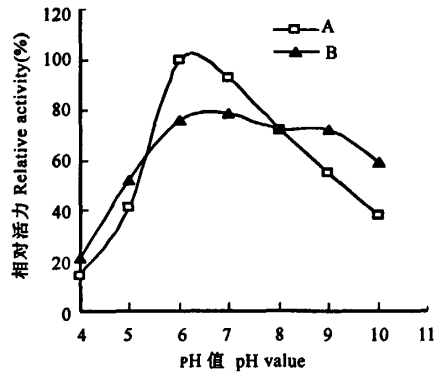


图 2 pH 值对茶树中 PNPO 酶活性的影响和酶的 pH 稳定性

Fig. 2 Impact of pH on activities and the stability of PNPO from tea plant

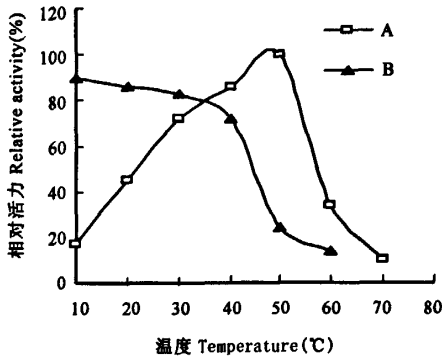


图 3 温度对茶树 PNPO 催化活性和稳定性的影响

Fig. 3 Impact of temperature on activities and the stability of PNPO from tea plant

注: A: 测定酶的活力, B: 纯化的酶液保温 30 min 后, 测定酶的剩余活力。

Note: A: The enzyme activity was determined. B: The enzyme residual activity was determined after the enzyme was treated for 30 min.

注: A: 测定酶的活力; B: 4℃ 下, 放置 24 h 后, 测定酶的剩余活力。

Note: A: The enzyme activity was determined under the optimum temperature. B: The enzyme residual activity was determined after the enzyme was treated for 24 h under 4°C.

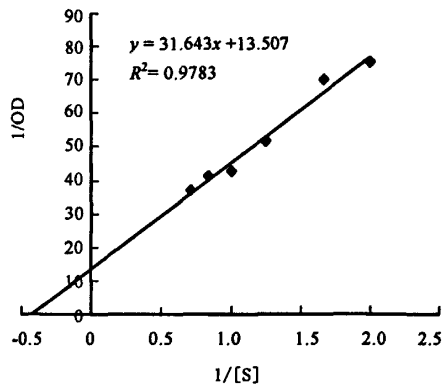


图 4 茶树 PNPO 的 $K_{m_{pmp}}$ 值

Fig. 4 $K_{m_{pmp}}$ of PNPO from tea leaf

3 讨论

茶鲜叶富含多酚类物质,在细胞破碎后多酚类物质会在内源多酚氧化酶的作用下形成茶褐素,这些色素以共价键吸附蛋白使许多酶失活^[9]。使用 PVPP (不溶性聚乙烯吡咯烷酮) 吸附多酚能减少多酚与蛋白质的接触,防止蛋白变性,有效地保护了酶和蛋白质,可获得满意的提取效果。本实验研磨茶叶时加入与鲜叶等量的 PVPP 提取 PNPO 酶液,经初步纯化后,利用产物 PLP 和苯胍发生衍生化反应生成在 410 nm 下具有吸光度的衍生物这一特征检测 PNPO 的活性^[10]。结果表明,提取的 PNPO 酶液具有活性。

茶树 PNPO 的体外最佳反应时间为 30 min,最适温度为 50℃,在 10~40℃、pH5.0~9.0 的环境下可以维持较高活性。茶树 PNPO 反应的最适 pH 值为 6.5,与兔肝和家蚕 PNPO 最适 pH 值不同,造成此现象的原因可能是种间差异,具体原因尚需进一步研究。以 PMP 作为底物,茶树 PNPO 的 K_m 为 2.34 mmol/L,而动物体内的 PNPO 酶以 PMP 为底物时, K_m 值的范围是 3.6~100 $\mu\text{mol/L}$ ^[11]。这表明在茶树体内的 VB₆ 代谢途径中,PMP 对 PNPO 的亲合力远低于动物体。

参考文献:

- [1] Roll L C, Mayodan S N. Vitamin b-6 and immune competence. *Nutrition Reviews*, 1993(51): 217-225.
- [2] McCormick D B, Chen H. Update on introversions of vitamin b-6 with its coenzyme[J]. *Journal of Nutrition*, 1999, 129(2): 325-327.
- [3] McCormick D B, Gregory M E, Snell E. Pyridoxal phosphor kinase I Assay, distribution, I Assay, distribution, purification, and properties[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1961(236): 2076-2084.
- [4] Bilski P, Li M Y, Ehrenshaft M, *et al.* Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants[J]. *Photo chem Photobiology*, 2000(71): 129-134.
- [5] Shi H, Xing L, Stevenson B, *et al.* The Arabidopsis salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance[J]. *Plant Cell*, 2002 (14): 575-588.
- [6] Chen H, Xing L. Pyridoxine is required for postembryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses[J]. *Plant J*, 2005(44): 396-408.
- [7] Eugenia Gonzalez, David Danehower, Margaret E Daub. Vitamin Levels, Stress Response, Enzyme Activity, and Gene Regulation of Arabidopsis Lines Mutant in the Pyridoxine/Pyridoxamine 5'-Phosphate Oxidase (PDX3) and the Pyridoxal Kinase (SOS4) Genes Involved in the Vitamin B₆ Salvage Pathway[J]. *Plant Physiology*, 2007(145): 985-996.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976(72): 248-254.
- [9] Scopes R K. Protein purification: Principles and practice. 2nd Ed[M]. New York: Spring-Verlag New York Inc, 1988.
- [10] HiroshiWada, Esmond E Snell. The Enzymatic Oxidation of Pyridoxine and Pyridoxamine Phosphates[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236(7): 2089-2095.
- [11] Jung-DoChoi, Delores M, Bowers-Komro, *et al.* Kinetic properties of Pyridoxamine (pyridoxine)-5'-phosphate oxidase from rabbit Liver[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(2): 840-845.

茶树鲜叶中维生素B6代谢酶PNPO的活性分析

作者: 李艳霞, 张剑韵, 黄龙全, LI Yan-xia, ZHANG Jian-yun, HUANG Long-quan
作者单位: 李艳霞, 黄龙全, LI Yan-xia, HUANG Long-quan (安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽, 合肥, 230036), 张剑韵, ZHANG Jian-yun (安徽农业大学生命科学学院, 安徽, 合肥, 230036)
刊名: 茶叶科学 ISTIC PKU
英文刊名: JOURNAL OF TEA SCIENCE
年, 卷(期): 2010, 30(4)

参考文献(11条)

1. Jung-DoChoi;Delores M;Bowers-Komro [Kinetic properties of Pyridoxamine\(pyridoxine\)-5'-phosphate oxidase from rabbit Liver](#) 1983(02)
2. HiroshiWada;Esmond E Snell [The Enzymatic Oxidation of Pyridoxine and Pyridoxamine Phosphates](#) 1961(07)
3. Roll L C;Mayodan S N [Vitamin b-6 and immune competence](#) 1993(51)
4. Scopes R K [Protein purification:Principles and practice](#) 1988
5. Bradford M M [A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding](#) 1976(72)
6. Eugenia Gonza'lez;David Danehower;Margaret E Daub [Vitamin Levels, Stress Response, Enzyme Activity, and Gene Regulation of Arabidopsis Lines Mutant in the Pyridoxine/Pyridoxamine 5'-Phosphate Oxidase\(PDX3\)and the Pyridoxal Kinase\(SOS4\)Genes Involved in the Vitamin B6 Salvage Pathway](#) 2007(145)
7. Chen H;Xing L [Pyridoxine is required for postembryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses](#) 2005(44)
8. Shi H;Xing L;Stevenson B [The Arabidopsis salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance](#)[外文期刊] 2002(14)
9. Bilski P;Li M Y;Ehrenshaft M [Vitamin B6\(pyridoxine\)and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants](#) 2000(71)
10. McCormick D B;Gregory M E;Snell E [Pyridoxal phosphor kinase I Assay, distribution, I Assay, distribution, purification, and properties](#) 1961(236)
11. McCormick D B;Chen H [Update on intrnversions of vitamin b-6 with its coenzyme](#) 1999(02)

本文读者也读过(9条)

1. 叶勇. 张剑韵. 黄龙全. YE Yong. ZHANG Jian-Yun. HUANG Long-Quan [甘油和戊二醛对丝素膜性能的改良效果](#)[期刊论文]-[蚕业科学](#)2006, 32(2)
2. 毛清黎. 王星飞 [酶法制茶专用多糖水解酶的发酵生产技术研究](#)[期刊论文]-[食品工业科技](#)2001(6)
3. 魏克芳. 李叶云. WEI Ke-fang. LI Ye-yun [文献检索与利用课教学效果研究与实践](#)[期刊论文]-[安徽农业大学学报\(社会科学版\)](#) 2007, 16(2)
4. 钮甜甜. 张剑韵. 黄龙全. NIU Tian-tian. ZHANG Jian-yun. HUANG Long-quan [茶树鲜叶中维生素B6代谢酶PLK的活性分析](#)[期刊论文]-[茶叶科学](#)2010, 30(4)
5. 王振. 张剑韵. 黄龙全. WANG Zhen. ZHANG Jian-Yun. HUANG Long-Quan [家蚕磷酸吡哆醇氧化酶在E. coli中的表达及酶学特征研究](#)[期刊论文]-[蚕业科学](#)2010, 36(3)
6. 蒋守花. 张剑韵. 黄龙全. JIANG Shou-hua. ZHANG Jian-yun. HUANG Long-quan [采用高效液相色谱技术分析茶树体](#)

内维生素B₆[期刊论文]-茶叶科学2010, 30(2)

7. 石瑞君, 张剑韵, 江昌俊, 黄龙全, Ruijun Shi, Jianyun Zhang, Changjun Jiang, Longquan Huang 家蚕磷酸吡哆醛激酶cDNA的克隆和酶活表征[期刊论文]-遗传学报2007, 34(8)
8. 陈海松 动态浊度法定量测定头孢噻肟钠中的细菌内毒素[期刊论文]-中国热带医学2004, 4(3)
9. 邓鸣, 张素芬, 潘静 氯霉素葡萄糖注射液的细菌内毒素定量检测[期刊论文]-中国药业2002, 11(3)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_cyxx201004007.aspx