

油菜籽焦磷酸: 果糖-6-磷酸 1-磷酸 转移酶的动力学研究

Kinetics of Pyrophosphate Fructose-6-phosphate Phosphotransferase from *Brassica napus*

张洪渊 李霁* 刘克武 龚由彬 俞东

Zhang Hongyuan Li Ji Liu Kewu Gong Youbin Yu Dong

(四川大学生物系 四川成都 610064)

(Dept. of Biology, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610064, China)

摘要 采用 DEAE-Sephadex A-50及磷酸纤维素柱层析, 用底物亲和洗脱法从萌发油菜 (*Brassica napus*) 种子中分离纯化了焦磷酸: 果糖-6-磷酸 1-磷酸转移酶 (PFP) 纯化倍数 679.7倍, 比活力为 21.75 单位/毫克·蛋白, 活力回收率 22.9%。酶的最适 pH 值为 7.5, Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对酶有激活作用。进行酶的初级动力学及稳态动力学研究, 对果糖-6-磷酸 (F6P) 表现为典型的米氏规律, K_m 值为 3.33 mmol/L; 对焦磷酸 (PP) 的活力变化, 在 PP 浓度小于 1.0 mmol/L 时具有部分米氏酶特点 ($K_m = 1.0$ mmol/L), 大于 1.0 mmol/L 时, PP 对酶有抑制作用。从两底物 F6P 和 PP 的相互作用以及产物磷酸 (P_i) 与底物 (F6P 和 PP) 的相互关系分析, 初步推断油菜籽 PFP 的催化反应为双底物双产物的有序机制。

关键词 油菜 焦磷酸: 果糖-6-磷酸 1-磷酸转移酶 分离纯化 动力学

中图分类号 S 634.301

Abstract The pyrophosphate fructose-6-phosphate phosphotransferase (PFP) was isolated from germinating *Brassica napus* seeds mainly by DEAE-Sephadex A-50 chromatography and then by substrate affinity elution from phosphocellulose column. The multiple of purification is 679.7. The specific activity is 21.75 units/mg^o protein. The yield of activity is 22.9%. From the analysis of polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate, the enzyme consists of two subunits which molecular mass value is 60KD and 68 KD respectively. The optimum pH value is 7.5. The divalent metal ions of Mg^{2+} and Mn^{2+} could activate the enzyme. The preliminary kinetics and steady-state kinetics of the PFP from *Brassica napus* seeds were researched. For Fructose-6-phosphate (F6P), the enzyme exhibits a typical Michaelis-Menten hyperbolic kinetics and its K_m value is 3.33 mmol/L. For pyrophosphate (PP), when the concentration of PP is lower than 1.0 mmol/L, the enzyme displays partly the properties of Michaelis enzyme ($K_m = 1.0$ mmol/L). But when the concentration of PP is higher than 1.0 mmol/L, PP inhibits the activity of the enzyme. From the research of the reaction between two substrates (F6P and PP) and the relationship between product (P_i) and substrates (F6P and PP), a sequential enzyme mechanism with two substrates and two products are proposed preliminarily for the PFP from *Brassica napus*.

Key words *Brassica napus*, pyrophosphate fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, purification, kinetics

在细胞内的糖代谢中, 由果糖-6-磷酸 (F6P) 向果糖-1, 6-二磷酸 (F1, 6P₂) 转变的反应是糖酵解过程的一个关键反应, 由不可逆酶磷酸果糖激酶 (PFK) 催化, 以 ATP 提供能量和磷酸基。70 年代以来, 在植物体内发现一种新酶, 它也催化上述反应,

以焦磷酸 (PP) 提供能量和磷酸基, 故命名为焦磷酸: 果糖-6-磷酸 1-磷酸转移酶 (PFP, EC2.7.1.90)。自 1979 年 Carnal 等^[1]首先在高等植物 (菠萝叶) 中发现此酶以来, 已先后从绿豆^[2]、马铃薯^[3,4]、小麦^[5]、蓖麻^[6]、黄瓜^[7]、玉米^[8]、番茄^[9]等植物中纯化了该酶, 但在油料作物中未见任何报道。我们从萌发油菜种子中首次分离纯化 PFP, 并对其动力学特性及其作用机理进行了研究。

1999-09-27 收稿, 1999-11-29 修回。

* 浙江大学农学院生化研究所。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

实验材料为中国油料 821油菜 (*Brassica napus*) 种子,取自四川大学生物系植物遗传研究室。

F6P NADH α 磷酸甘油脱氢酶 磷酸丙糖异构酶均为 Sigma 产品,醛缩酶为上海生物化学研究所东风试剂厂产品, DEAE-Sephadex A-50 为 Pharmacia 公司产品,磷酸纤维素-11 为 Whatman 生产, SDS-PAGE 用标准蛋白为东风试剂厂产品,其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PFP 的分离纯化^[4,9]

油菜籽用自来水浸种 2 d,在 26°C 萌发 2 d 取萌发芽 60 g,按 1:1.25 (w/v) 比例加入缓冲液 A (每升含: 0.1 mol Tris-HCl, pH 值 8.0, 1 mmol EDTA, 1 mmol Mg Cl₂, 14 mmol 巯基乙醇, 100 ml 甘油),研磨 30 min,匀浆 4 次,每次 15 min 匀浆过滤后,滤液调 pH 值 7.5,用硫酸铵盐析,取 0.35 ~ 0.55 饱和度盐析物,溶于缓冲液 B (每升含: 0.02 mol Tris-HCl, pH 值 7.5, 1 mmol Mg Cl₂, 14 mmol 巯基乙醇, 0.1 mol KCl, 100 ml 甘油),即为酶粗提液。

粗酶液透析除盐后上 DEAE-Sephadex A-50 柱 (3.5 cm \times 12 cm),用含 0.10 mol/L 0.25 mol/L 0.40 mol/L KCl 的缓冲液 B 分段洗脱。合并活性部分,对缓冲液 C (将缓冲液 B 中的 KCl 改为 0.05 mol,其余成分相同)透析,以除去过量 KCl,用聚乙二醇 20 000 浓缩后上磷酸纤维素-11 柱 (2.5 cm \times 5.4 cm),用含 0.2 mol/L KCl 的缓冲液 B 洗脱至流出液 A₂₈₀ < 0.01 后,再用含 0.01 mol/L 焦磷酸的上述缓冲液进行亲和洗脱,合并活性部分,对每升含 0.02 mol Tris-HCl, pH 值 7.5, 7 mmol 巯基乙醇和 100 ml 甘油的缓冲液透析,去除 PR 和 KCl,浓缩后用含 30% 甘油的上述缓冲液保存于 -20°C。

1.2.2 PFP 活性测定

参照 Frederik 等^[7]的方法进行。在测活条件下,每分钟转化 1 μ mol F6P 为 F1, 6P₂ 的酶量为 1 个活力单位。

1.2.3 蛋白质含量测定

按 Bradford^[10]方法进行。

1.2.4 PFP 的初级动力学研究^[7]

不改变测活系统的其它条件,固定 PP 浓度为 0.5 mmol/L,测定在不同 F6P 浓度下酶反应初速度的变化,并作出 Lineweaver-Burk 双倒数图;另外,固定 F6P 浓度为 2 mmol/L,测定在不同 PP 浓度下酶

反应初速度变化,并作出双倒数图

1.2.5 PFP 的稳态动力学研究^[4]

1.2.5.1 底物的相互作用 不改变测活系统的其它条件,固定 PP 浓度分别为 0.1 mmol/L 0.3 mmol/L 和 0.5 mmol/L,测定一系列 F6P 浓度下的酶反应速度,在同一坐标系中作双倒数图;固定 F6P 浓度分别为 2.0 mmol/L 4.0 mmol/L 6.0 mmol/L,测定不同 PP 浓度时的酶反应速度,并作双倒数图

1.2.5.2 产物 P 对 PFP 催化反应的影响。不改变测活系统的其它条件,测定产物 P 浓度分别为 0.00 mmol/L 0.25 mmol/L 0.50 mmol/L 和 1.00 mmol/L 时,酶在一系列不同 F6P 浓度下的反应速度,作双倒数图;P 浓度固定为 0.0 mmol/L 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时,测定酶在一系列不同 PP 浓度下的反应速度,作双倒数图

2 结果

2.1 油菜籽 PFP 的分离纯化

经过匀浆、硫酸铵盐析、DEAE-Sephadex A-50 柱、磷酸纤维素-11 柱层析等步骤,从油菜籽中分离纯化了 PFP 纯化倍数 679.7 倍,比活力 21.75 单位/毫克。蛋白 活力回收率为 22.9%。纯化过程及结果见表 1

表 1 油菜籽 PFP 的分离纯化

Table 1 Isolation and purification of PFP from germinate of *Brassica napus*

步骤 Step	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (单位 units)	比活力 Specific activity (单位·毫克 ⁻¹ ·蛋白 ⁻¹)	纯化率 Purification multiple (%)	回收率 Yield (%)
粗提液 Crude extract	1188.0	38.0	0.032	—	100
盐析 Salting-out	251.9	31.3	0.124	3.9	82.4
DEAE-Sephadex A-50	29.0	15.8	0.545	17.0	41.6
磷酸纤维素-11 Phosphocellulose-11	0.4	8.7	21.750	679.7	22.9

经盐析、透析的粗提液上 DEAE-Sephadex A-50 柱,用含不同浓度 KCl 的缓冲液阶段洗脱,流速 16 ml/h,每管 6 ml,分部收集,洗脱曲线见图 1 活力部分在含 0.25 mol/L KCl 区段被洗脱,但活力峰与蛋白峰不重合,说明尚含较多杂蛋白。

DEAE-Sephadex A-50 柱洗脱活力部分经浓缩后上磷酸纤维素柱,在含 0.2 mol/L KCl,用 0.01 mol/L PR 亲和洗脱下得到纯化 (图 2)。

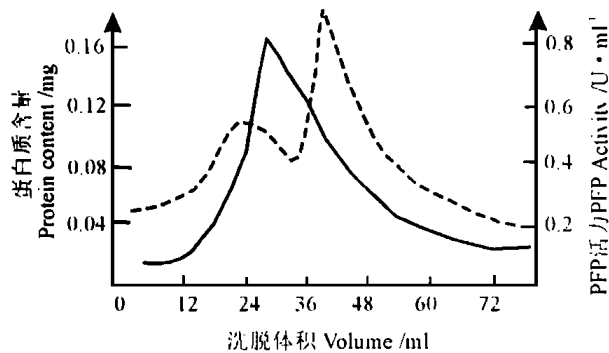


图 1 PFP经 DEAE-Sephadex A-50柱层析

Fig. 1 Chromatography of PFP on DEAE-Sephadex A-50 column

— A₂₈₀蛋白质 A₂₈₀Protein; ---- PFP

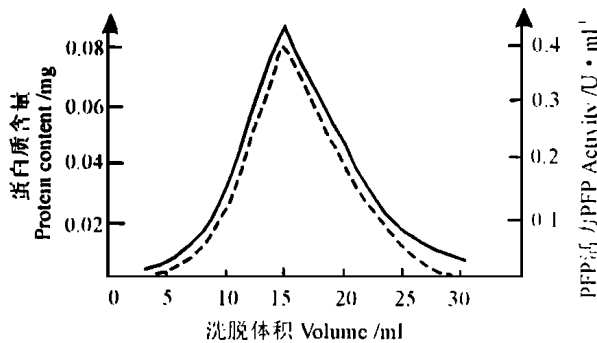


图 2 PFP经磷酸纤维素-11柱层析

Fig. 2 Chromatography of PFP on phosphocellulose-11 column

— A₂₈₀蛋白质 A₂₈₀Protein; ---- PFP

2.2 PFP催化反应的初级动力学

底物之一 F6P对 PFP活力的影响见图 3和图 4 可见 F6P浓度的变化, 遵从米氏动力学规律, 由图 4求得 K_m 值为 3.33 mmol/L

底物之二 PR对 PFP活力的影响见图 5和图 6 PR在低浓度下符合米氏动力学, 但 PR浓度大于 1 mmol/L时, 表现出底物抑制现象。在低浓度时求得 PFP对 PR的 K_m 值为 1.0 mmol/L

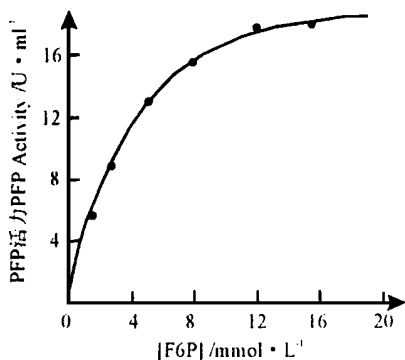


图 3 F6P浓度对酶活力的影响

Fig. 3 The effect of F6P concentration on PFP activity

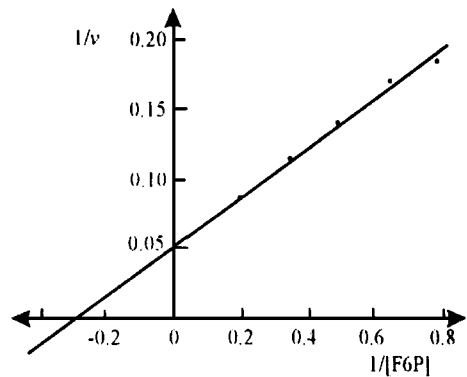


图 4 PFP对 F6P的米氏常数测定

Fig. 4 Determination of PFP Michaelis constant on F6P

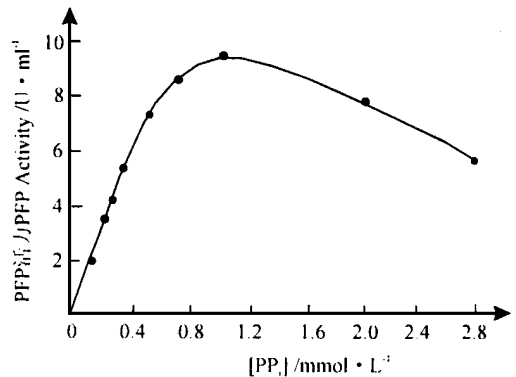


图 5 Pi浓度对酶活力的影响

Fig. 5 The effect of P_i concentration on PFP activity

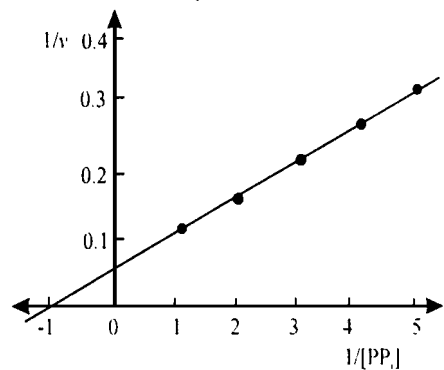


图 6 PFP对 PR的米氏常数测定

Fig. 6 Determination of PFP Michaelis constant on PR

2.3 PFP催化反应的稳态动力学

在 3种 PR浓度下, F6P浓度的变化与酶活性的关系见图 7; 在 3种 F6P浓度下, PR浓度的变化与酶活性的关系见图 8

在不同的固定 P浓度下, 产物 P对 F6P和 PR与反应初速度双倒数曲线的影响结果见图 9和图 10

两个底物对初速度的影响结果表明, F6P和 PR与初速度的双倒数作图均在纵轴左侧有一交点, 说明油菜籽 PFP催化反应的机制不是乒乓机制, 而是迅

速平衡随机机制或有序机制。产物抑制研究的结果,在不同的 P 浓度影响下, F_6P P_P 与初速度的双倒数作图在横轴上有一交点,说明 P 对 F_6P 和 P_P 均

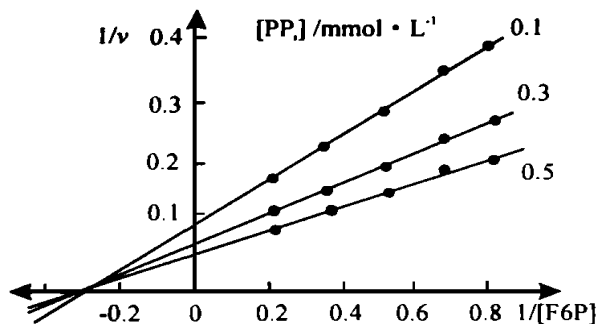


图 7 在 P 存在下 PFP 对 F_6P 的动力学

Fig. 7 F_6P saturation kinetics of PFP in the presence of P

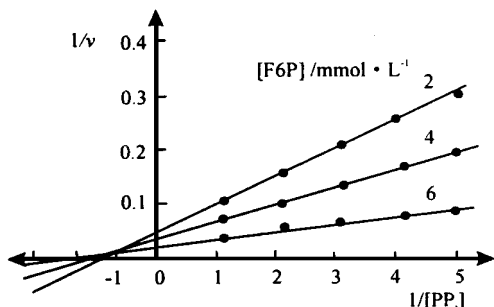


图 8 在 F_6P 存在下 PFP 对 P 的动力学

Fig. 8 P saturation kinetics of PFP in the presence of F_6P

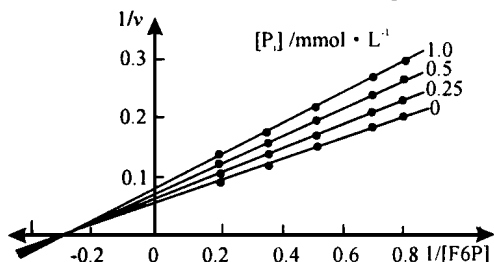


图 9 在 R 存在下 PFP 对 F_6P 的动力学

Fig. 9 F_6P saturation kinetics of PFP in the presence of R

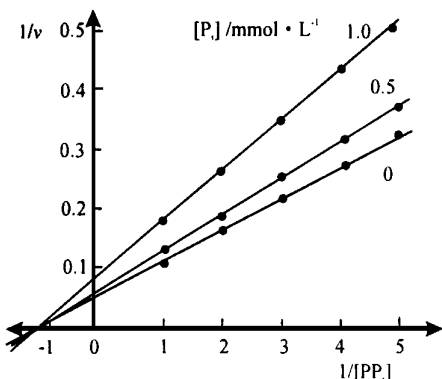


图 10 在 P 存在下 PFP 对 P 的动力学

Fig. 10 P_P saturation kinetics of PFP in the presence of P

表现非竞争性抑制,这就排除了迅速平衡随机机制的可能。因此,我们初步推断,油菜籽 PFP 催化反应的机制为双底物双产物的有序机制。

3 讨论

在糖的分解代谢中, F_6P 向 $F_1, 6P$ 的转化,在植物和动物体内都由 PFK 催化,但在植物体内 PFP 也催化这步反应(至今在动物体内尚未发现此酶)。PFK 只能催化 F_6P 向 $F_1, 6P$ 的单向反应,而 PFP 催化这步反应是可逆的;果糖-2, 6-二磷酸 ($F_2, 6P$) 可激活动物细胞中的 PFK,但不调节植物细胞中的 PFK 活性, $F_2, 6P$ 刺激植物组织 PFP 的正向反应。这些特点说明植物组织中可能存在受 $F_2, 6P$ 和 P 调节的另一条酵解途径^[11]。而且在多种植物中,种子萌发时 PFP 的活性常常高于 PFK,在缺乏 R 缺氧等条件下 PFK 活性保持不变,而 PFP 活性增加^[12]。这些事实说明, PFP 在植物细胞的基础代谢中起着重要作用,不仅涉及能量代谢(ATP 生成),而且与物质代谢紧密相关。在油料作物中,可能对种子萌发、脂肪酸合成等生理生化过程起着一定的调节作用,有待深入研究。

我们用 DEAE-Sephadex A-50 和磷酸纤维素柱层析,并用 P 亲和洗脱纯化萌发油菜籽的 PFP,通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,该酶含有分子量分别为 60 KD 和 68 KD 两个亚基,这与马铃薯块茎^[3,4]、小麦幼苗^[5]、番茄果实^[9]一致,而且从现有研究表明,植物 PFP 可能都是寡聚酶,可以有几种不同分子酶型。我们测得油菜籽 PFP 催化正向反应的最适 pH 值为 7.5,在 pH 值 7~8 范围具有较高活性。催化正向反应的最适 pH 值,黄瓜种子为 7.2~7.6^[7]、蓖麻种子为 7.3~7.7^[6],表明不同植物中 PFP 催化正向反应的 pH 值适应性可能十分接近。 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对 PFP 的活性有激活作用,其中 Mg^{2+} 的激活作用最强。

油菜籽 PFP 的底物动力学,对 F_6P 遵从米氏规律,对 P 则有双重表现: P 浓度小于 1 mmol/L 时遵从米氏规律,但大于 1 mmol/L 表现出底物抑制现象,这与马铃薯^[4]、玉米^[8]、豌豆等植物一致,只是不同植物 PFP 表现底物抑制的浓度有差异。这种动力学现象与高浓度 ATP 对 PFK 的抑制作用相类似。

从底物的相互作用及产物对反应的影响动力学,我们初步推断油菜籽 PFP 的催化反应机制为双底物双产物的有序机制。李林等^[4]对土豆块茎的研究表明,土豆 PFP 为有序机制,但 Carnal 等^[13]报道菠萝 PFP 的反应机制为乒乓机制,可能在不同的植物中, PFP 催化反应的机制不尽相同,其原因有待进一步

参考文献

- 1 Carnal N M, Black C C. Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase a new glycolytic enzyme in pineapple. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, 86: 20~26.
- 2 Sarbulare D C, Anderson R L. Inorganic pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase in mung bean and its activation by D-fructose 1, 6-bisphosphate and D-glucose 1, 6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, 100: 1423~1429.
- 3 Van Schaftingen E et al. A kinetic study of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. *Eur J Biochem*, 1982, 129: 191~195.
- 4 李林, 潘力, 许根俊. 马铃薯块茎焦磷酸: 果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶的初速度动力学. *生物化学与生物物理学报*, 1990, 22 (3): 277~283.
- 5 Yan Tyan-Fuh L, Tao M. Multiple forms of pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from wheat seedlings. *J Biol Chem*, 1984, 259: 5087~5092.
- 6 Kombrink E, Kruger N J, Beevers H. Kinetic properties of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean

- endosperm. *Plant Physiol*, 1984, 74: 395~401.
- 7 Frederik C, Botha J G, Chris S et al. Isolation and characterization of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from cucumber seeds. *Plant Cell Physiol*, 1986, 7: 1285~1295.
- 8 吴敏贤, 查静娟, 施教耐. 玉米叶片依赖焦磷酸的磷酸果糖激酶两种分子型动力学特性的研究. *植物生理学报*, 1986, 12 (4): 342~354.
- 9 胡志元, 查静娟, 吴敏贤等. 番茄果实中焦磷酸: D-果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶两种酶型的分离纯化及其特性. *植物生理学报*, 1992, 18 (2): 151~159.
- 10 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 73: 248~254.
- 11 Black C C, Smyth D A, Wu M X. Pyrophosphate-dependent glycolysis and regulation by fructose-2, 6-bisphosphate in plants. In: Ludden P W, Burris J E. Nitrogen fixation and CO₂ metabolism. Elsevier Science Publishing Co. 1985, 361~370.
- 12 李霁, 张洪渊. PFP的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 1995, 22 (4): 307~312.
- 13 Carnal N M, Black C C. Kinetic characteristics of pineapple pyrophosphate-dependent phosphofructokinase. *Plant Physiol*, 1983, 72: 124~128.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 56页 Continue from page 56)

参考文献

- 1 许士凯. 抗衰老药理学. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 40.
- 2 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal Chem*, 1956, 28: 350.

- 3 李雪华, 龙盛京. 三种根茎类食物抗氧化自由基的比较研究. *食品科学*, 1998, 19 (2): 13.
- 4 龙盛京, 秦爱娟. 化学发光分析法研究广西茶叶水提取物抗活性氧的作用. *广西医学院学报*, 1992, 9 (3): 1.
- 5 陈季武, 胡天喜. 测定[•]OH产生与清除的化学发光体系. *生物化学与生物物理进展*, 1992, 19 (2): 136.
- 6 徐孝仪, 程松高. 人全血化学发光技术及其临床应用. *中国免疫学杂志*, 1986, 2 (1): 34.

(责任编辑: 蒋汉明)