

百合鳞茎苯丙氨酸解氨酶的分离纯化及酶学性质研究

孙红梅*, 赵爽, 王春夏, 王锦霞, 赵波, 陈丽静

(沈阳农业大学园艺学院, 辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳 110161)

摘要: 经 40% ~ 75% 硫酸铵分级沉淀和 DEAE-Sepharose 离子交换层析, 从兰州百合 (*Lilium davidii* var *unicolor*) 鳞茎中分离纯化苯丙氨酸解氨酶 (PAL), 纯化倍数为 13.19, 酶回收率 4.68%。纯化的 PAL 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测为单一蛋白带, 其亚基分子量约 58.7 kD。酶学性质研究表明: 百合鳞茎的 PAL 不耐碱, 更不耐酸; 随着水浴时间延长和水浴温度提高, PAL 活性逐渐降低, 但 40 °C 水浴 30 min 后酶活性仍保留 47%; 以 L-苯丙氨酸为底物, 40 °C 下的 K_m 值为 $4.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 金属离子 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 促进 PAL 活性, 在供试范围内的最佳处理浓度分别为 1.0、1.0、2.0 和 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Ag^+ 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 抑制其活性, 其中 Ag^+ 的抑制作用最强。

关键词: 兰州百合; 鳞茎; 苯丙氨酸解氨酶; 纯化; 酶学性质

中图分类号: S 682.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 11-1653-08

Separation and Purification as well as Properties of Phenylalanine Ammonia-lyase in Lily Bulbs

SUN Hongmei*, ZHAO Shuang, WANG Chun-xia, WANG Jin-xia, ZHAO Bo, and CHEN Li-jing

(Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) was isolated and purified from lily (*Lilium davidii* var *unicolor*) bulbs via precipitating with ammonium sulphate grading from 40% to 75% and DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography techniques. A 13.19-fold purification with a yield of 4.68% was obtained. The subunit molecular weight was estimated as 58.7 kD by SDS-PAGE. Results of studies on zymological properties indicated that PAL in the lily bulbs was not able to endure acid and alkali, especially the former. The PAL activity declined gradually along with the increasing of temperature and prolonging of bath duration, however it still remained 47% after 30 min at 40 °C. This revealed that 40 °C was the optimum bath temperature. PAL had a K_m of $4.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for L-phenylalanine at 40 °C. Ions such as Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} enhanced the PAL activity and 1.0, 1.0, 2.0 and 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ were the most effective respectively within the tested concentrations. Ag^+ , Co^{2+} and Ca^{2+} inhibited the PAL activity and the impact of Ag^+ was the severest.

Key words: *Lilium davidii* var *unicolor*; bulb; PAL; purification; zymological property

兰州百合 (*Lilium davidii* var *unicolor*) 鳞茎中的酚类物质与鳞茎休眠密切相关 (孙红梅等, 2004a, 2005), 而苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 是酚类物质代谢的关键酶 (欧阳光察和薛应龙, 1988; Holger & Georg, 2004)。以蛋白质的结构和功能为基础, 从分子水平认识生命现象, 已经成为现代生物学发展的主要方向。研究蛋白质, 首先要得到高度纯化并具有生物活

收稿日期: 2008-09-01; 修回日期: 2008-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400307); 辽宁省教育厅基金项目 (2004F084; 20060787)

* E-mail: hmbh@sina.com

性的目的物质。然而,迄今为止,关于植物生命过程中 PAL 活性动态变化的研究较多,有关蛋白质分离、纯化和鉴定方法的系统研究尚少。目前,国内外研究者已经从甘薯 (Tanaka & Uritan, 1997)、油菜 (姜红林和梁颖, 2006) 和银杏 (刘卫红等, 2004) 等多种植物以及部分微生物如酵母 (江柯等, 2004)、细菌 (Jane et al, 2005)、原核生物 (Xiang & Bradley, 2005) 中分离纯化得到 PAL, 但对百合中 PAL 的分离纯化研究尚未见报道。本试验中从兰州百合鳞茎中分离纯化出 PAL, 并对其基本性质进行了研究, 旨在今后进行该酶的结构与功能分析、催化机理及酶基因克隆等工作打下基础, 为深入研究酚类物质与百合鳞茎休眠的关系以及鳞茎休眠的生理机制提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为休眠期较长的兰州百合鳞茎, 于 2006 年 4—10 月在沈阳农业大学园艺科研基地栽培, 常规管理, 花蕾透色后去除花蕾, 于 2006 年 10 月 1 日地上植株全部枯萎后取样。选鳞片饱和紧密、无病虫害、大小一致的鳞茎, 取淀粉含量较低 (孙红梅等, 2004b) 的内部鳞片 (含顶芽部分), 液氮速冻后放入 -50°C 超低温冰箱中保存备用。

1.2 试验设计与测定方法

1.2.1 粗酶液的提取 取鳞片组织, 以 5 倍体积 pH 8.5、浓度为 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl (含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巯基乙醇和 0.5% PVP) 为提取缓冲液, 在冰浴条件下迅速研磨, 四层纱布过滤后于 4°C 下 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 弃沉淀取上清液即为粗酶提取物。

1.2.2 硫酸铵分级沉淀 将硫酸铵研磨成粉末后缓慢加入慢速而均匀搅拌的粗酶液中至 40% 饱和度, 静置 3 h, 于 4°C 下 $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 弃去沉淀; 再加硫酸铵于上清液中至 70% 饱和度, 静置 3 h, 于 4°C 下 $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 弃去上清液收集沉淀。

1.2.3 透析脱盐 以 10 mL pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液 (含 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巯基乙醇和 0.5% 甘油) 复溶沉淀, 再以 20 倍体积的相同缓冲液于 4°C 下透析, 更换缓冲液至缓冲液中 SO_4^{2-} 基本消失, 然后用 PEG 浓缩备用。

1.2.4 离子交换条件的优化 取透析后的酶液, 以小试管法 (汪家政和范明, 2002) 进行柱层析。

pH: 各称取离子交换层析的柱材料 DEAE-Sepharose Fast Flow 1.0 g, 分别用 pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0 的含 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液平衡, 各保留 1 mL 溶液, 然后加入 0.4 mL 酶液, 搅拌均匀, 静置 30 min, 取上清液, $5\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后, 取上清液测酶活性和蛋白质含量。

离子强度: 各称取 DEAE-Sepharose Fast Flow 1.0 g, 分别用含 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, pH 为 8.5 的 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液平衡, 各保留 1 mL 溶液, 然后加入 0.4 mL 酶液, 搅拌均匀, 静置 30 min, 取上清液, $5\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后, 取上清液测酶活性和蛋白质含量。

1.2.5 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析 按优化的条件进行柱层析试验。将 DEAE-Sepharose Fast Flow 用 pH 8.5、 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 快速达到平衡, 再用 pH 8.5、 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 平衡, 紫外检测仪检测, 至稳定后开始加样。加样后用同样的缓冲液洗涤杂蛋白, 再以含 $0.45\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的 pH 8.5、 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液进行洗脱, 洗脱流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 紫外检测仪检测。当蛋白峰出现后用自动部分收集器收集, 测定酶活性。收集酶活性高的部分, 放入透析袋中, 以 pH 8.5、 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液平衡过夜, 检测溶液中没有 Cl 后以 PEG 浓缩, 在 -20°C 保存备用。

1.2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 PAL 分子量, 分离胶质量分数为

12%，浓缩胶质量分数为 5%，以 pH 8.3 的 Tris - 甘氨酸为电泳缓冲液。取 DEAE-Sephacryl Fast Flow 纯化前后的 PAL 酶液各 20 μL ，各加入 20 μL 的样品缓冲液（含 SDS、巯基乙醇、蔗糖和溴酚蓝）混合后沸水浴 3 min，冷却后点样。标准蛋白的使用与样品处理相同。稳压 220 V，浓缩胶 15 mA，分离胶 35 mA 电泳（郭尧君，1999）。

1.2.7 酶学性质研究 pH 耐受性的研究：将加入底物（L - 苯丙氨酸）的酶液在 pH 4.0 和 pH 10.0 的硼砂缓冲液中于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴依次保温 5、10、20、30 和 60 min 进行反应。温度耐受性研究：将加入底物的酶液分别置于 40、50、60、70、80、90 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下分别保温 5、10、20 和 30 min，测定 290 nm 的光密度值，对照采用相同的反应体系，但不加底物。以每 mL 酶液每 min 增加 0.01 的 OD 值为 1 个酶活单位（U），以计算所得的酶活性与酶在 pH 8.8 的硼砂缓冲液中反应相同时间的活性的百分比分别作图和作表。

PAL 动力学曲线与 K_m 值的测定：分别用 2.5、5、10、20、30、40、50、60 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 L - 苯丙氨酸作为底物与酶液 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 min，Hanes-Woolf 作图法求 K_m 值（吴士良等，2004）。

金属离子对酶活性影响的试验：将 9 种金属离子的终浓度设定为 0.5、1、2、4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，加入底物和酶液后于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min，以每 mL 酶液每 min 增加 0.01 的 OD 值为 1 个酶活单位（U），对照不加底物和任何离子。

2 结果与分析

2.1 离子交换条件的优化结果

由图 1 可知，随着缓冲液 pH 值增大，上清液 PAL 活性增强，而蛋白质含量下降，说明 DEAE-Sephacryl Fast Flow 对于蛋白质的吸附能力随着 pH 的增大而增强，pH 为 8.5 时，吸附能力最强，PAL 的活性也达到最大值，随后降低，因此最适平衡缓冲液的 pH 为 8.5。

由图 2 可以看出，随着 NaCl 浓度的增大，上清液中蛋白质的含量逐渐增大，即缓冲液中 Cl^{-} 的大量增加，破坏了 DEAE-Sephacryl Fast Flow 原有的离子组成，带阴离子的蛋白质分子被洗脱下来，这个过程随着 Cl^{-} 增加而不断增强，达到一定程度后不再变化。

根据对银杏（刘卫红等，2004）和红酵母（江柯等，2004）的研究，在 0 ~ 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的浓度范围内就能够将 PAL 很好地洗脱出来，本试验中当 NaCl 达到 0.45 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，PAL 的活性达到最大值，洗脱效果最好（图 2）。

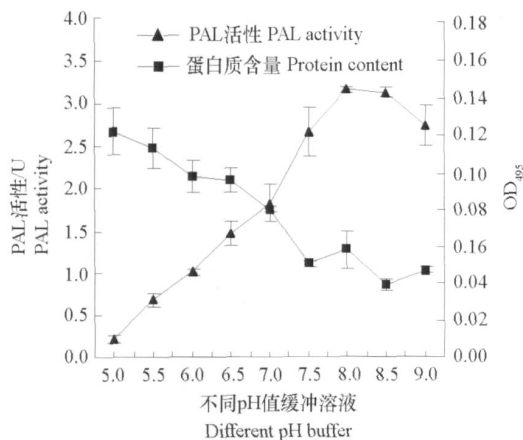


图 1 洗脱 pH 条件优化

Fig. 1 The selecting experiment of optimum pH

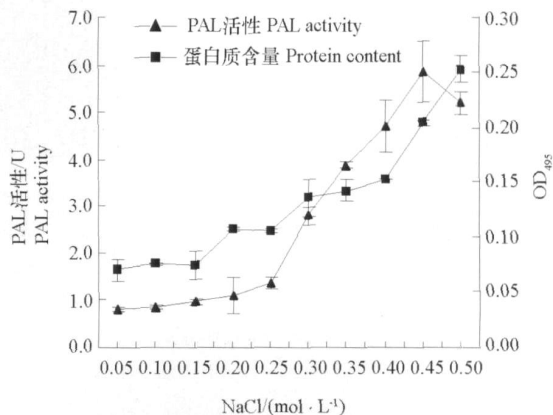


图 2 洗脱离子强度优化

Fig. 2 The selecting experiment of optimum ion intensity

综上, 确定 pH 8.5, 含 $0.45 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液为最佳洗脱条件。

2.2 PAL 的分离纯化及鉴定

图 3 为利用层析凝胶 DEAE-Sepharose Fast Flow 对 PAL 粗酶液进行离子交换层析的洗脱曲线, 共有两个蛋白峰, 第 1 个峰是上样流出液, PAL 活性较小, 基本上是杂质; 第 2 个是 $0.45 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的洗脱峰, PAL 的活性峰与蛋白峰重叠, 说明 PAL 在此时洗脱, 为纯化的 PAL 蛋白质。

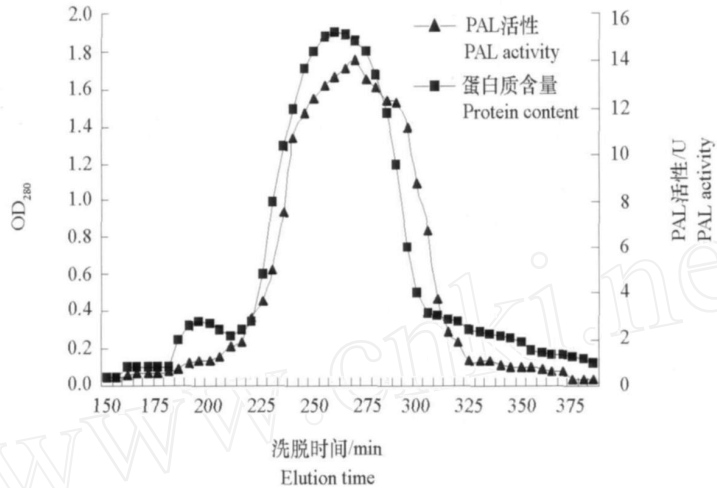


图 3 PAL 在 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析柱上的洗脱图

Fig. 3 Elution profiles of PAL on DEAE-Sepharose Fast Flow

取盐析后的粗酶液和经 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析后纯化的 PAL 进行 SDS-PAGE 检测, 粗酶液有 10 条带, 纯化后的酶液为一条单一的蛋白带, 其位置同粗酶液的第 4 条带的位置相同 (图 4), 分子量约为 58.7 kD, 与原核细胞中纯化出的 PAL 亚基分子量相同 (Xiang & Bradley, 2005)。

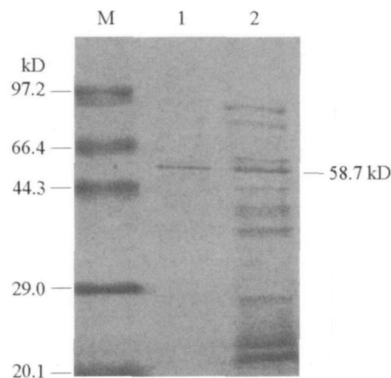


图 4 PAL 的 SDS-PAGE 图谱

1. 经 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱纯化后的 PAL; 2 盐析后的 PAL 粗酶液; M. 标准蛋白分子量 (kD), 从上到下为: 兔磷酸化酶 b 97.2, 牛血清蛋白 66.4, 卵清蛋白 44.3, 碳酸苷酶 29.0, 胰蛋白酶抑制剂 20.1。

Fig. 4 Electrophoretogram of the fraction of PAL by SDS-PAGE

1. PAL after DEAE-Sepharose Fast Flow; 2. PAL after sulphate salting-out; M. Protein molecular weight marker (kD): Phosphatase b 97.2, bovine serum albumin 66.4, egg albumen 44.3, carbonic acid glucoside enzyme 29.0, trypsin inhibitor 20.1.

据报道, PAL 由 4 个大小的亚基构成 (欧阳光察和薛应龙, 1988), 由此可推测全酶的分子量在 235 kD 左右, 大于甘蓝型油菜的 184 kD (姜红林和梁颖, 2006), 小于番茄的 304 kD (孙旭东和荣

瑞芬, 2006) 和红酵母的 320 kD (江柯等, 2004), 在大多数已知 PAL 的分子量 220 ~ 340 kD 范围内 (程水源等, 2003)。经过一系列的分离纯化, 蛋白质得率为 0.35%, 酶的得率为 4.68%, 纯化倍数为 13.19 (表 1)。

表 1 百合鳞茎中 PAL 纯化结果

Table 1 The result of PAL isolation and purification from lily bulb

| 样品 Material | 总蛋白含量 /mg Total protein content | 总酶活性 /U Total enzyme activity | 酶比活力 / (U · mg ⁻¹) Ratio activity | 蛋白质回收率 /% Protein returns-ratio | 酶活回收率 /% Enzyme returns-ratio | 纯化倍数 Purification multiple |
|---|---------------------------------------|-------------------------------------|---|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 粗酶液 Raw enzyme | 12.83 | 5 988.89 | 466.68 | 100.00 | 100.00 | 1 |
| 上清液 Supernatant fluid [40% (NH ₄) ₂ SO ₄] | 7.96 | 4 570.22 | 573.89 | 62.06 | 76.31 | 1.23 |
| 沉淀 Precipitation [75% (NH ₄) ₂ SO ₄] | 0.38 | 371.11 | 971.06 | 2.98 | 6.20 | 2.08 |
| DEAE-Sepharose Fast Flow | 0.05 | 280.00 | 6 156.50 | 0.35 | 4.68 | 13.19 |

2.3 PAL 的酶学性质

2.3.1 pH 耐受性 在碱性范围内, PAL 对 pH 的耐受性强于酸性范围内的耐受性 (图 5), 而且在反应初始阶段, pH 10.0 的 PAL 活性显著高于 pH 4.0 时的活性。随着反应时间延长, 酶活性下降, 但仍以 pH 10.0 的活性较高。反应 60 min 后 PAL 活性都降到最小值。

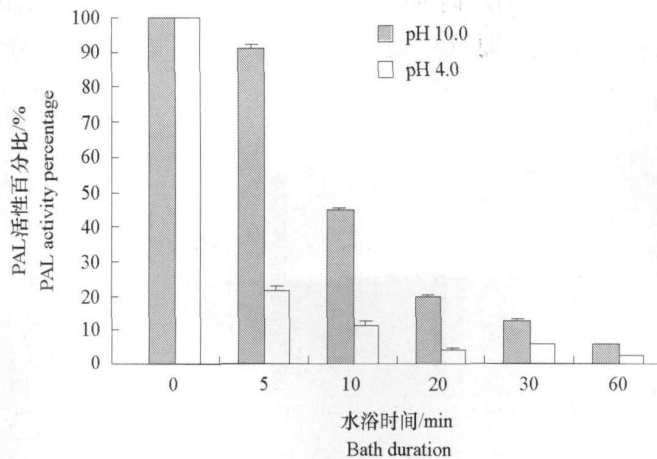


图 5 不同 pH 值和水浴时间对酶活性的影响

Fig. 5 Effects of different pH of buffer and bath duration on PAL activity

2.3.2 最适温度及温度耐受性 如表 2 所示, 水浴 5 min 后, 40、50、60、70、80 处理的酶活性仍残存 88% 以上, 下降并不明显, 90 和 100 处理的酶活性分别有 57% 和 40%; 在 90 和 100 水浴 10 min、80 水浴 20 min 后, 酶活性丧失; 在 60 和 70 水浴 30 min 后, 还分别有 16% 和 13% 的活性残存。

由此可见, 百合鳞茎中的 PAL 有一定的耐热性。

表 2 PAL 对于不同水浴温度的耐受性

Table 2 The tolerance of PAL to different bath temperature

| 水浴温度 / Bath temperature | PAL 活性百分比 /% PAL activity percentage | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|----------|----------|----------|
| | 5 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| 40 | 97 ± 3.7 | 83 ± 4.0 | 69 ± 2.1 | 47 ± 1.3 |
| 50 | 97 ± 3.9 | 83 ± 4.0 | 67 ± 2.0 | 42 ± 1.0 |
| 60 | 94 ± 1.2 | 30 ± 1.0 | 26 ± 1.6 | 16 ± 1.2 |
| 70 | 89 ± 3.8 | 24 ± 2.3 | 17 ± 1.7 | 13 ± 1.0 |
| 80 | 88 ± 3.1 | 22 ± 1.2 | 0 ± 0.6 | 0 ± 0.4 |
| 90 | 57 ± 4.0 | 0 ± 2.0 | 0 ± 1.0 | 0 ± 0.7 |
| 100 | 40 ± 2.0 | 0 ± 1.0 | 0 ± 0.5 | 0 ± 0.3 |

2.3.3 百合鳞茎 PAL 的 K_m 值 以 L-苯丙氨酸为底物, 在不同浓度下测定 PAL 活性, 用 Hanes-Woolf 法作图得一直线 (图 6), 其延长线与横轴的截距为 $-K_m$, 计算得出百合鳞茎 PAL 的 K_m 值为 $4.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。已纯化的多数 PAL 的 K_m 值在 $0.3 \times 10^{-4} \sim 1.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 如水稻为 $5.94 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 小麦 PAL 的 K_m 有 2 个, 分别为 0.625×10^{-4} 和 $3.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (欧阳光察等, 1985); 红酵母为 $3.87 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (江柯等, 2004); 油菜的两个 K_m 值分别为 1.01×10^{-3} 和 $0.778 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (姜红林和梁颖, 2006)。百合鳞茎 PAL 的 K_m 在上述范围内居中, 说明其与底物 L-苯丙氨酸亲和性一般。

2.3.4 金属离子对百合鳞茎 PAL 的影响 研究 9 种离子对 PAL 活性的影响, 结果 (图 7) 表明: Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 4 离子对 PAL 活性有不同程度的促进作用, 且都呈单峰曲线, 在供试范围内最佳处理浓度分别为: 1.0、2.0、1.0 和 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 Ag^+ 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 对 PAL 活性有不同程度的抑制作用, 其中 Ag^+ 的抑制作用最显著, 随着离子浓度增加抑制作用增强; Co^{2+} 、 Ca^{2+} 在供试范围内都呈单峰曲线, 在 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制作用达到最强。在供试范围内, Na^+ 随着浓度的升高, 对 PAL 的作用由抑制变为促进作用, 而 Mg^{2+} 随着浓度升高对 PAL 的作用由促进变为抑制。

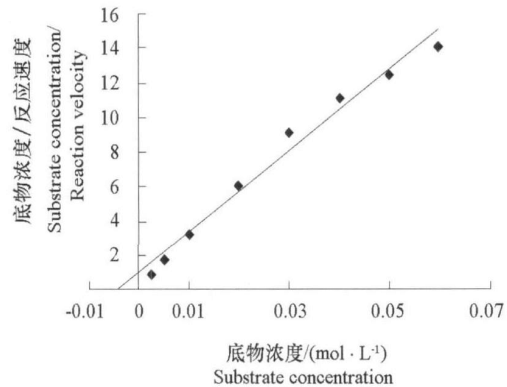


图 6 PAL 催化 L-苯丙氨酸降解的 Hanes-Woolf 图

Fig 6 Hanes-Woolf plot of PAL in generation of L-phenylalanine

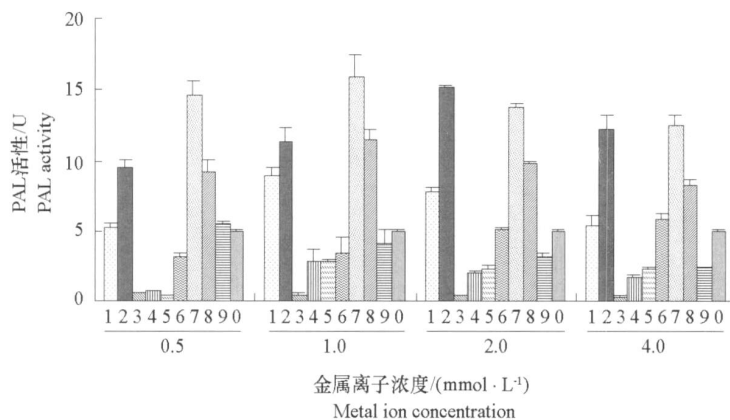


图 7 不同金属离子对 PAL 活性的影响

横坐标 1~0 依次为: MnCl_2 、 CuCl_2 、 AgCl 、 CoCl_2 、 CaCl_2 、 NaCl 、 FeCl_3 、 FeSO_4 、 MgCl_2 和对照。

Fig 7 Effects of different ions on PAL activity

Abscissa 1-0 indicate MnCl_2 , CuCl_2 , AgCl , CoCl_2 , CaCl_2 , NaCl , FeCl_3 , FeSO_4 , MgCl_2 and control, respectively.

3 讨论

从离子交换的洗脱条件来看, 多数研究直接使用了碱性范围内 (pH 8.0~8.9) 任一 pH 的 Tris-HCl 缓冲液进行洗脱, 洗脱离子 (NaCl) 浓度一般选择 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右 (姜红林和梁颖, 2006; 孙旭东和荣瑞芬, 2006)。刘卫红等 (2004) 以银杏叶为试材的研究表明, 最适洗脱缓冲液的 pH 值为 8.9, 最佳洗脱离子 (NaCl) 浓度为 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本试验中对百合鳞茎内 PAL 分离纯化的洗脱条件进行了系统研究, 结果表明 pH 8.5、含 $0.45 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液为最佳洗脱条件, 表明不同材料之间存在差异, 也可能与酶液浓度和缓冲液性质有关。离子交换剂有阳离

子交换剂(羧甲基纤维素,即CM-纤维素)和阴离子交换剂(二乙氨基乙基纤维素,即DEAE纤维素)。本试验中使用DEAE-Sepharose Fast Flow柱材料进行层析试验,与对红酵母(江柯等,2004)的研究中所用的柱材料相同。刘卫红等(2004)、孙旭东和荣瑞芬(2006)分别在银杏叶片和番茄果实上的研究也都使用了DEAE纤维素。鉴于目前鳞茎类植物的PAL系统研究尚为空白,本研究的结果可为其他变态器官的相关研究提供参考。酶分离纯化的材料一般认为经过光诱导或黄化处理效果更佳,今后的研究将考虑以刚萌发鳞茎的顶芽为试材,为鳞茎类作物PAL的深入研究提供依据。

酶学性质研究表明,百合鳞茎的PAL最适反应温度为40℃,略低于山药的45℃(江力等,2006)和银杏的50℃(王燕等,2004),这可能与植物的起源和生长适应性有关。不同种类金属离子及同一金属离子的不同浓度,对百合鳞茎的PAL活性有明显影响,其中 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 的显著促进作用,可能是金属离子作为辅基与酶蛋白相互结合的结果,而 Ag^+ 和 Co^{2+} 等重金属离子的抑制现象与一般蛋白质的变性理论相符合,与 Ba^{2+} 对甘蓝型油菜PAL的抑制作用相似(姜红林和梁颖,2006)。 Ca^{2+} 在信号转导和许多生理代谢活动中起着重要的调节作用,其作用机理较复杂,有待于进一步研究。

影响PAL基因表达的因素较多,如水分(许丽颖等,2007)、机械损伤(Kao et al, 2002)、不同光质(Dennis et al, 2004; 王莉等, 2007)、壳聚糖(Wajahatullah et al, 2003)和麦角甾醇(Stephanie et al, 2006)等,已经在紫叶李(许丽颖等, 2007)、紫萍(Dennis et al, 2004)、红景天(王莉等, 2007)等植物上得到证实,而在植物变态器官方面的研究尚少。分离和纯化PAL并进行酶学性质研究,可以为全面调控PAL活性奠定基础,进而调控酚类物质代谢,最终实现人工调节百合鳞茎的休眠,并为其他变态器官的休眠机制研究提供理论依据。

References

- Cheng Shui-yuan, Chen Kun-song, Liu Wei-hong, Du He-wei. 2003. Regulation and expression of the PAL in plant and its outlook. *Journal of Fruit Science*, 20 (5): 351 - 357. (in Chinese)
- 程水源, 陈昆松, 刘卫红, 杜何为. 2003. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望. *果树学报*, 20 (5): 351 - 357.
- Dennis C G, Lan L G, Jerry W M, Alfredo J H. 2004. Effects of a PAL inhibitor on phenolic accumulation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia* (Koch). *Journal of Experimental Botany*, 55 (398): 919 - 927.
- Guo Yao-jun. 1999. Protein electrophoresis technology. Beijing: Science Press (in Chinese)
- 郭尧君. 1999. 蛋白质电泳技术. 北京: 科学出版社.
- Holger R, Georg E S. 2004. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. *The Plant Cell*, 16 (12): 3426 - 3436.
- Jane S W, Marie T, David J C. 2005. The gene *stA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Horvathdus luminescens* T101. *Microbiology*, 151: 2543 - 2550.
- Jiang Li, Yuan Huai-bo, Zhang Shi-jie, Jiang Han-hu. 2006. Study on the characteristics of phenylalanine ammonia-lyase in yam. *Food Science*, 27 (10): 36 - 40. (in Chinese)
- 江力, 袁怀波, 张世杰, 江汉湖. 2006. 山药苯丙氨酸解氨酶特性的研究. *食品科学*, 27 (10): 36 - 40.
- Jiang Hong-lin, Liang Ying. 2006. Studies on purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in *B. russica napus*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 22 (7): 282 - 286. (in Chinese)
- 姜红林, 梁颖. 2006. 甘蓝型油菜苯丙氨酸解氨酶的分离纯化与性质研究. *中国农学通报*, 22 (7): 282 - 286.
- Jiang Ke, Lu Tao, Zhao De-li, Xia Kai, Yang Ya-li, Yang Shun-kai, Liu Cheng-jun. 2004. Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotoula* sp. A1401. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*, 41 (4): 865 - 868. (in Chinese)
- 江柯, 卢涛, 赵德立, 夏凯, 杨亚力, 杨顺凯, 刘成君. 2004. 红酵母苯丙氨酸解氨酶的分离纯化及性质研究. *四川大学学报: 自然科学版*, 41 (4): 865 - 868.
- Kao Y Y, Harding S A, Tsai C J. 2002. Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiology*, 130 (2): 796 - 807.

- Liu Wei-hong, Wang Yan, Du He-wei, Cheng Shui-yuan 2004. Study on the conditions of isolating and purifying L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in *Ginkgo biloba* leaves. Journal of Hubei Agricultural College, 24 (3): 196 - 198. (in Chinese)
- 刘卫红, 王 燕, 杜何为, 程水源. 2004. 银杏叶苯丙氨酸解氨酶分离纯化条件的研究. 湖北农学院学报, 24 (3): 196 - 198
- Ouyang Guang-cha, Ying Chu-yan, Wo Shao-gen, Xue Ying-long 1985. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Purification and some properties of PAL from etiolated seedlings of rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*). Acta Photophysiological Sinica, 11 (2): 204 - 214. (in Chinese)
- 欧阳光察, 应初衍, 沃绍根, 薛应龙. 1985. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究. 水稻、小麦 PAL 的纯化及基本特性. 植物生理学报, 11 (2): 204 - 214.
- Ouyang Guang-cha, Xue Ying-long 1988. Physiological role and regulation of phenylpropanoid metabolism in plant. Plant Physiology Communications, 24 (3): 9 - 16. (in Chinese)
- 欧阳光察, 薛应龙. 1988. 植物苯丙烷代谢的生理意义及调控. 植物生理学通讯, 24 (3): 9 - 16
- Stephanie R, Estelle L, Jean-Michel P, Janine B, Gabriel R. 2006. Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergo sterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. Journal of Experimental Botany, 57 (6): 1245 - 1252.
- Sun Hong-mei, Li Tian-lai, Li Yun-fei 2004a. Physiological mechanism of metabolism of carbohydrate, phenols, free amino acid and endogenous hormones in middle scales of *Lilium davidii* var. *unicolor* bulbs stored at low temperature for dormancy release. Scientia Agricultura Sinica, 37 (11): 1777 - 1782. (in Chinese)
- 孙红梅, 李天来, 李云飞. 2004a. 低温解除休眠过程中兰州百合鳞茎酚类物质含量及相关酶活性变化. 中国农业科学, 37 (11): 1777 - 1782
- Sun Hongmei, Li Tian-lai, Li Yun-fei 2004b. Starch metabolism and sprouting of bulb in *Lilium davidii* var. *unicolor* stored at different cold temperatures. Acta Horticulturae Sinica, 31 (3): 337 - 342. (in Chinese)
- 孙红梅, 李天来, 李云飞. 2004b. 不同贮藏温度下兰州百合种球淀粉代谢与萌发关系初探. 园艺学报, 31 (3): 337 - 342
- Sun Hongmei, Li Tian-lai, Li Yun-fei 2005. Physiology mechanism of metabolisms in the middle scales of *Lilium davidii* var. *unicolor* bulbs stored at low temperature for dormancy release. Scientia Agricultura Sinica, 38 (2): 376 - 382. (in Chinese)
- 孙红梅, 李天来, 李云飞. 2005. 低温解除休眠过程中兰州百合中部鳞片物质变化的生理机制. 中国农业科学, 38 (2): 376 - 382
- Sun Xu-dong, Rong Run-fen 2006. Separation and purification of PAL from harvested tomato peel after induced by UV-C irradiation. Academic Periodical of Food Products Processing, (8): 67 - 70, 74. (in Chinese)
- 孙旭东, 荣瑞芬. 2006. 短波紫外线诱导采后番茄苯丙氨酸解氨酶的分离纯化. 农产品加工·学刊, (8): 67 - 70, 74.
- Tanaka Y, Uritani I 1997. Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase in cut-injured sweet potato. Journal of Biochemistry, 81 (4): 963 - 970.
- Wajahatullah K, Balakrishnan P, Donald L S 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine phenylalanine ammonia-lyase in soybean leaves. Journal of Plant Physiology, 160 (8): 859 - 863.
- Wang Jia-zheng, Fan Ming 2002. Manual of protein technology. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 汪家政, 范 明. 2002. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社.
- Wang Li, Shi Ling-ling, Liu Yu-jun 2007. Effects of different light treatments on growth and PAL activity of the suspension-cultured cells of *Rhodiola fastigiata*. Scientia Silvae Sinicae, 43 (6): 52 - 56. (in Chinese)
- 王 莉, 史玲玲, 刘玉军. 2007. 不同光质对长鞭红景天悬浮细胞生长及苯丙氨酸解氨酶活性的影响. 林业科学, 43 (6): 52 - 56
- Wang Yan, Liu Wei-hong, Du He-wei, Cheng Shui-yuan 2004. Study on the general properties of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from *Ginkgo biloba* Leaves. Hubei Agricultural Science, (5): 72 - 74. (in Chinese)
- 王 燕, 刘卫红, 杜何为, 程水源. 2004. 银杏叶苯丙氨酸解氨酶基本特性的研究. 湖北农业科学, (5): 72 - 74.
- Wu Shi-liang, Qian Hui, Zhou Ya-jun 2004. Experimental tutorial of biochemistry and molecular biology. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 吴士良, 钱 晖, 周亚军. 2004. 生物化学与分子生物学试验教程. 北京: 科学出版社.
- Xiang L K, Bradley S M. 2005. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia-lyase. Journal of Bacteriology, 187 (12): 4286 - 4289.
- Xu Li-ying, He Yu-ping, Wang Gang, Zhao He-xiang, Zhao Qi-jun, Guo Tai-jun 2007. Effect of water stress on pigment content and PAL activity of purple leaf plum. Journal of Jilin Agricultural University, 29 (2): 168 - 172. (in Chinese)
- 许丽颖, 赫玉苹, 王 刚, 赵和祥, 赵启军, 郭太君. 2007. 水分胁迫对紫叶李叶片色素含量与 PAL 活性的影响. 吉林农业大学学报, 29 (2): 168 - 172.