



米糠中钙调素的提取 及谷氨酸脱羧酶激活作用研究

刘敏,王立*,吕莹果,姜启兴,张晖

(江南大学食品学院,食品科学与工程国家重点实验室,江苏无锡 214122)

摘要:谷氨酸脱羧酶是一种钙调素(CaM)结合蛋白,能够在 Ca^{2+} -CaM的激活作用下专一地催化L-谷氨酸脱羧转变成 γ -氨基丁酸(CABA)。本文研究发现,经过三氯乙酸沉淀的提取方法和冷冻干燥可以有效提取CaM。同时研究发现:金属离子的存在会不同程度地抑制 Ca^{2+} -CaM对GAD的激活,其中 K^+ 和 Zn^{2+} 对CaM激活GAD的抑制作用较为明显;随着 Ca^{2+} 和CaM浓度在一定范围内的增加, Ca^{2+} -CaM对GAD的激活作用有所增强;C末端水解后的GAD被 Ca^{2+} -CaM的激活有一定程度的降低,由此推测GAD的C末端可能是 Ca^{2+} -CaM的结合区域。

关键词:钙调素,谷氨酸脱羧酶,C-末端水解, γ -氨基丁酸

Study on extraction of galmodulin and activity regulation of glutamate decarboxylase in rice bran

LIU Min, WANG Li*, LV Ying-guo, JIANG Qi-xing, ZHANG Hui

(Food Science and Technology, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Glutamate decarboxylase (GAD) is calmodulin (CaM) binding proteins, which can catalyse L-glutamic acid transform into γ -aminobutyric acid by the activation of Ca^{2+} -CaM. CaM can be extracted efficiently by the following method: extracted by buffer \rightarrow deposited by trichloroacetic acid (TCA) \rightarrow freeze-drying. The results showed that metallic ion can affect the activity of CaM. K^+ and Zn^{2+} could decrease the activity, but Ca^{2+} increase the activity. Ca^{2+} -CaM's activation ability on GAD decreased after GAD's C-terminal being hydrolyzed. It can be concluded that the C-terminal may be the right region where Ca^{2+} -CaM combines with GAD.

Key words: galmodulin; GAD; C-terminal hydrolyze; GABA

中图分类号: TS201.2⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)01-0084-04

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是由谷氨酸(Glutamic acid, Glu)经谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase, GAD)催化转化而来,是存在于哺乳动物脑、脊髓中的抑制性神经递质,对生物体生命活动的调节起着不可替代的作用^[1]。植

物组织中有两条合成和转化GABA的途径:一条由GAD催化谷氨酸合成GABA,另一条由多胺降解,主要是利用第一条途径^[2]。作为稻米加工的副产物,米糠(含米胚芽)同样可以利用其自身的谷氨酸脱羧酶富集GABA,米糠所含谷氨酸脱羧酶最适pH为5~6,最适温度为35~40℃。L-谷氨酸脱羧酶在最适转化条件下比酶活高达15036U。米糠具有相对较高的GAD活性,可用来富集生产GABA^[3]。CaM是迄今研究的一种分布最广、功能最重要的钙离子结合蛋白,它对钙离子有高度的特异性和亲和力。在钙离

收稿日期:2009-02-05 *通讯联系人

作者简介:刘敏(1986-),女,本科生。

基金项目:国家自然科学基金项目(20671044);江南大学食品学院青年博士科研创新开放基金资助(FS-200810)。

[10] Craig S A S, Maningat C C, Seib P A, et al. Starch paste clarity[J]. Cereal Chemistry, 1989, 66: 173-182.

[11] AACCC. General Pasting Method for Wheat or Rye Flour or Starch Using the Rapid Visco Analyser. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, 1995: 76.

[12] 张超,张晖,李翼新. 小米的营养以及应用研究进展[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(1): 51-55.

[13] 杜先锋,许时婴,王璋. 淀粉糊的透明度及其影响因素的

研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(1): 129-130.

[14] 包劲松. 应用RVA测定米粉淀粉成糊温度[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(5): 543-546.

[15] 舒庆尧,吴殿星,夏英武,等. 稻米淀粉RVA谱特征与食用品质的关系[J]. 中国农业科学, 1998, 31(3): 25-29.

[16] 王玉文,李会霞,田岗,等. 小米外观品质及淀粉RVA谱特征与米饭适口性的关系[J]. 山西农业科学, 2008, 36(7): 34-39.

子所介导的各种细胞功能中, CaM 作为钙离子细胞内的受体以 Ca^{2+}/CaM 的复合体形式参与各种细胞功能的调节。CaM 不仅存在于细胞内, 根据对细胞外 CaM 的存在、生理功能及跨膜信号转导机制的研究结果, 研究者提出了细胞外 CaM 可能是作为一种多功能肽类信使在植物生长发育过程中发挥作用的观点^[4-6]。 Ca^{2+}/CaM 在激活谷氨酸脱羧酶, 进而使其富集生产 GABA 方面有着重要的作用和研究价值。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

米糠 上海粮食储运公司提供, 4℃ 储存; 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、EGTA Amresco 公司; 风味酶 (Flavourzyme) 无锡酶制剂厂; 环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 广西南宁庞博生物有限公司; 眼镜蛇蛇毒 浙江义乌市后力山蛇厂; 环核苷酸 (cAMP) 杭州美亚生物技术有限公司; 标准蛋白质 (SDS-PAGE 用) 上海西巴斯生物技术开发有限公司; 其余试剂 均为分析纯。

20PR-520 冷冻离心机 日本日立公司; SD-1500 喷雾干燥机 上海沃迪科技机械有限公司; ACPHA1-4 冷冻干燥机 CHRIST 公司; XHF-1 高速分散器 上海金达生化仪器厂; SCM 杯式超滤器 上海亚东核级树脂公司; Waters 600 高效液相色谱仪 配 2487 紫外检测器和 Empower 工作站。

1.2 实验方法

1.2.1 CaM 的提取 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液的配制: 称取 Tris 6.05g, 加入 900mL 水溶解, 用浓 HCl 调 pH7.5, 再定容到 1000mL。提取缓冲液的配制: 称取 PMSF 0.01742g, EDTA 0.292g, NaCl 0.0087g, $NaHSO_3$ 2.0812g, 用 Tris-HCl 缓冲液约 400mL 加热溶解, 冷却, 加入 2-3 滴 β -巯基乙醇, 调 pH7.5, 再用 Tris-HCl 定容至 1000mL。CaM 的提取: 称取 200g 米糠置于 1000mL 缓冲液中, 用高速分散器匀浆 5min, 冷冻离心 5000r/min, 20min。四层纱布过滤, 冷冻离心 6000r/min, 25min。取上清液, 加入 3% 的三氯乙酸 (TCA), 静置 2h, 冷冻离心 6000r/min, 25min, 弃上清液, 沉淀用去离子水溶解, Tris 溶液调 pH7.5, 沸水浴 3min, 冰浴冷却, 冷冻离心 7000r/min, 25min, 取上清液, 真空浓缩 (真空度 0.01MPa, 温度 50℃, 转速 60r/min), 干燥。

干燥方法考虑喷雾干燥、冷冻干燥、TCA 沉淀冻干, 具体操作步骤及操作条件和参数如下: A. 喷雾干燥: 进风 180℃, 出风 80℃; B. 冷冻干燥: 温度 -55℃, 压力 0.1MPa; C. TCA 沉淀冻干: 样品先用 3% TCA 沉淀, 静置 2h 后进行冷冻干燥。

1.2.2 CaM 的活性测定——磷酸二酯酶 (PDE) 法^[7-8] CaM 本身并无酶活性, 用 CaM 激活环核苷酸磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, 简称 PDE) 法来确定 CaM 的量, 反应为: cAMP 在 PDE 的催化下生成 5'-腺苷酸, 5'-腺苷酸在蛇毒中含有的 5'-核苷酸酶的催化下生成腺苷和 Pi, 此反应体系中有足够的 5'-核苷酸酶, 因而最后通过定磷即可知 PDE 活性 (用 A_{620} 值表示)。

配制 1mmol/L 的 KH_2PO_4 , 稀释成不同的浓度梯度, 按照上述实验步骤得到磷标准曲线, $y = 1.6532x - 0.0239$, $R^2 = 0.9936$ 。

1 个活性单位的 CaM 是指在 pH7.5、30℃ 和 0.01mmol · L⁻¹ Ca^{2+} 存在的条件下, 激活 0.008 个单位 PDE 至 50% 最大活性时所需要的 CaM 的量 (Sigma 公司的 CaM 活性定义)。在每次测定中, 以一组不加 CaM 的试管作为 PDE 激活的零对照 (PDE 基础活性)。

1.2.3 CaM 样品的 SDS-PAGE 电泳 采用不连续系统凝胶配制, 分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 6%, 电极缓冲液 (内含 0.025mol/L Tris - 0.2mol/L 甘氨酸, pH8.3), 样品缓冲液 (内含 0.1mol/L Tris - HCl, pH6.8)。用垂直板电泳槽, 以 1% 琼脂封底。板胶厚度 0.75mm, 进样量 15 μ L (样品蛋白质含量 1mg/mL 左右)。根据已知分子量的标准蛋白质在 SDS-PAGE 中的相对迁移率 R_f , 作 $R_f - \lg M_r$ 图, 由米糠 GAD 的相对迁移率计算其分子量。 Ca^{2+} 存在电泳体系中, 含有 0.1mmol/L 的 $CaCl_2$; Ca^{2+} 去除电泳体系中, 含有 1mmol/L 的 EGTA。

电泳条件: 采用稳压操作, 电泳开始时电压为 180V, 待样品进入分离胶后, 改为 200V, 当指示剂溴酚蓝前沿距硅胶框底边约 1cm 时停止电泳。电泳时间浓缩胶大约 1h, 分离胶大约 3h, 凝胶采用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.4 CaM 样品的分子量分布测定

1.2.4.1 色谱条件 色谱柱: TSKgel 2000 SWXL 300mm × 7.8mm; 流动相: 乙腈/水/三氟乙酸, 45/55/0.1 (V/V); 检测: UV220nm; 流速: 0.5mL/min; 柱温: 30℃。

1.2.4.2 样品制备 吸取样品 2mL 于 10mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 用微孔过滤膜过滤后供进样。

1.2.4.3 分子量校正曲线所用标准品 细胞色素 C (MW12500); 杆菌酶 (MW1450); 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (MW451); 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (MW189)。

1.2.4.4 仪器操作方法及计算 操作参照中华人民共和国药典 2000 版, 第二部附录 VD; 数据处理及计算由 Waters M32 GPC 软件自动进行。

1.2.5 金属离子对 Ca^{2+} -CaM 激活 GAD 的影响 用磷酸缓冲液 (PBS) 配 CaM 溶液, 50mg/L。按照表 1 添加不同体积的 $CaCl_2$ (20mmol/L), 总体积 1mL。取离心管 (2.5mL) 按表 1 分别加入试剂, 混合均匀。

1mL 的酶液加 1mL 底物溶液, 40℃ 反应 2h, 沸水浴 5min, 冷却, 离心 (10000r/min, 10min), 上清液测 GABA 含量 (以 520nm 处的吸光度表示)。

各种金属离子的浓度为 20mmol/L, 加入代替 Ca^{2+} , 同上反应。

1.2.6 C-末端氨基酸水解对 Ca^{2+} -CaM 激活 GAD 的影响 称取谷氨酸脱羧酶 (GAD) 样品 100~200mg, 用 PBS 溶解, 混匀, 10000r/min 离心 10min, 配制成稀溶液, 加入风味酶 (Flavourzyme), 250U/g (原料), 置

表1 Ca²⁺添加量(mL)

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GAD	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CaM		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
EGTA			0.2							
EDTA				0.2						
CaCl ₂					0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2
Glu-Na	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PBS	0.4	0.2			0.18	0.16	0.14	0.12	0.1	

表2 CaM 样品的分子量分布

峰号	保留时间 (min)	峰面积	峰面积 (%)	出峰时间 (min)	结束时间 (min)	M _n	M _w	M _p
1	10.311	2766952	5.58	9.617	11.267			
2	12.106	3716220	7.50	11.267	12.267	17306	17332	17545
3	12.606	4325016	8.73	12.267	12.867	13971	14064	13820
4	13.225	9772776	19.72	12.867	14.400	8921	9247	10283
5	14.658	1399223	2.82	14.400	14.817	5292	5311	5192
6	15.281	6176429	12.47	14.817	17.467	3111	3378	3855
7	17.824	528502	1.07	17.467	18.300	1107	1120	1145
8	20.500	3876820	7.82	18.300	20.500	440	473	319
9	21.899	10365792	20.92	20.500	22.350	193	205	164
10	22.424	6620757	13.36	22.350	24.817	113	114	128

于55℃水浴锅中反应5.5h。分别测定未经水解,水解2、6、10min,1h后和水解5.5h后的GAD被CaM激活的情况。

2 结果与讨论

2.1 CaM 的干燥方法选择

未经三氯乙酸沉淀所得样品上清液,采用浓缩后喷雾干燥、冷冻干燥等方法得到固体,由于粗样CaM含糖量较高,较为粘稠,效果很不理想,尤其是喷雾干燥时样品附着在干燥缸的内壁,很难刮下来,造成提取出来的CaM样品的浪费;冷冻干燥得到的CaM样品比浓缩之后喷雾干燥的粘度低,但是耗时较长,相对于实验效率并不可行;后来在提取过程中加入三氯乙酸沉淀蛋白质,去除了很大一部分杂质和糖,冷冻干燥后得到CaM粗产品。

准确称取不同方法提取出的CaM粗样0.05g,溶于2mL去离子水中,取100μL参加反应,测定其对PDE的激活作用。

由图1可以看出,采用TCA沉淀-冷冻干燥法所得CaM对PDE的激活作用最为明显;而采用其他方法得到的CaM活力较低。

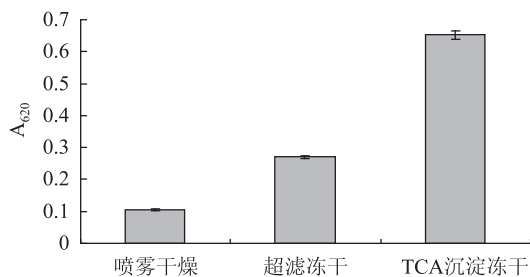


图1 不同方法提取出的CaM活性

2.2 CaM 样品的 SDS-PAGE 电泳

由图2中的相对迁移率R_i计算得出添加和去除Ca²⁺的电泳系统中,CaM的相对迁移率不同,去除

Ca²⁺的条件下CaM迁移率增大,在Ca²⁺存在条件下CaM相对分子量为1.9kDa,而去除时CaM显示的相对分子量约为1.7kDa。

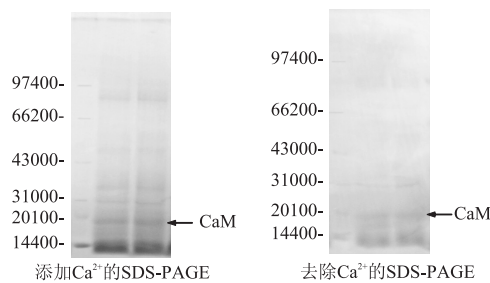


图2 CaM 样品的 SDS-PAGE 电泳图

2.3 CaM 样品的分子量分布测定

CaM是一种小分子量单链可溶性球蛋白,分子量约16.7~16.8kDa。由图3及表2可以看出,提取出来的CaM粗样里面的蛋白质、多肽的含量较为复杂,分子量分布于100~18000Da。

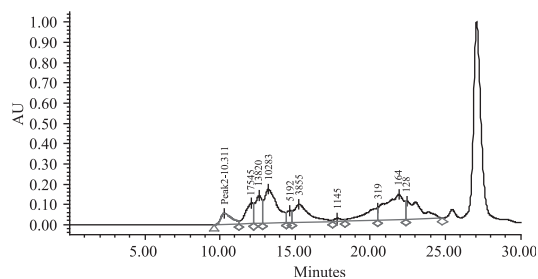


图3 CaM 样品的分子量分布

2.4 Ca²⁺ 浓度对 CaM 激活谷氨酸脱羧酶作用的影响

从图4可以看出,随着Ca²⁺的浓度在一定范围内增加,Ca²⁺-CaM对GAD的激活作用有所上升,其中Ca²⁺的加入量为0.04mL时,激活作用最好,与上面的实验结果形成对照。推测米糠中的GAD可能

也是一种钙调素结合蛋白 (CaM-binding protein, CaMBP), 而且是一种钙依赖的 CaMBP, 其活性受 Ca^{2+} 调节。所以在利用米糠 GAD 制备 GABA 时, 还可以利用 Ca^{2+} 对米糠 GAD 的激活作用来提高 GABA 的产量。

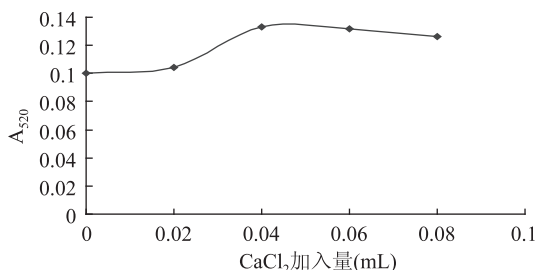


图4 钙离子浓度增加对 CaM 激活谷氨酸脱羧酶作用的影响

2.5 金属离子对稻米 CaM 激活 GAD 的影响

金属离子的浓度为 20mmol/L, 加入代替 Ca^{2+} , 同上反应, 测定各管在 520nm 处的吸光度。

由图 5 可见, Al^{3+} , Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对反应体系的影响较小, K^+ 和 Zn^{2+} 对 CaM 激活 GAD 的抑制作用较为明显。

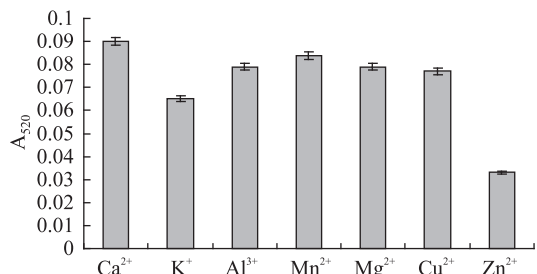


图5 金属离子对稻米 CaM 激活 GAD 的影响

2.6 不同浓度的 CaM 对 CaM 激活谷氨酸脱羧酶作用的影响

配制 CaM 溶液, 约 1mg 蛋白/mL, 改变 CaM 的浓度梯度, 测定其对 GAD 的激活作用。

由图 6 可知, CaM 在一定范围内的浓度增加会增强其对谷氨酸脱羧酶的激活作用, 刚开始的增强幅度并不明显, 在 CaM 的加入量梯度跨度加大比较明显, 尤其 CaM 的加入量达到 0.5mL 时, 有较大幅度的增加, 之后趋于平缓, GAD 是一种 Ca^{2+}/CaM 依赖的酶。

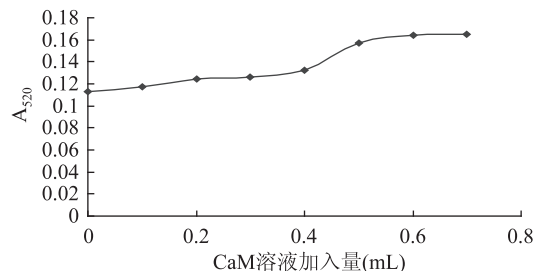


图6 CaM 浓度增加对 CaM 激活谷氨酸脱羧酶作用的影响

2.7 C-末端氨基酸水解对 Ca^{2+} -CaM 激活 GAD 的影响

从图 7 可以看出, 由风味酶水解之后的 GAD,

CaM 对其的激活作用随水解时间的延长而下降。由此证明, Ca^{2+}/CaM 与 GAD 的结合与 C 末端有一定的联系。

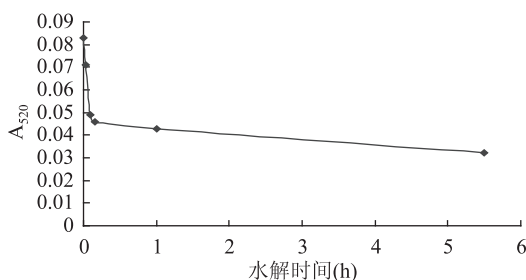


图7 GAD 的 C 末端水解前后 CaM 对其的激活作用

3 结论

3.1 经过三氯乙酸 (TCA) 沉淀的提取方法和冷冻干燥法比较适合 CaM 的提取和分离, 这种方法得到的 CaM 对 PDE 的激活作用相比于其他方法提取出来的更加明显。通过分子量分布分析可以看出, 提取出来的蛋白质含有 CaM, 缺点是杂质和多肽较多, 有待于进一步分离纯化。

3.2 GAD 是一种 Ca^{2+}/CaM 依赖型的酶, Ca^{2+} 和 CaM 浓度在一定范围的增加可以增强 Ca^{2+}/CaM 对其的激活作用, 金属离子对 Ca^{2+}/CaM 激活 GAD 的反应体系有一定的影响, Al^{3+} , Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对反应体系的影响较小, K^+ 和 Zn^{2+} 对 CaM 激活的抑制作用较为明显。

3.3 Ca^{2+}/CaM 与 GAD 的结合可能与 C 末端有一定的联系。

参考文献

- [1] 张晖, 姚惠源, 姜元荣. γ -氨基丁酸的功能性及其在稻米制品中的富集利用[J]. 粮食与饲料工业, 2002(8): 41-43.
- [2] 白松, 林向阳, 等. γ -氨基丁酸的分布和制备[J]. 现代食品科技, 2005(2): 202-205.
- [3] 姚惠源. 世界稻米深加工的发展趋势和中国的潜在优势[C]. 中国粮油学会第二届学术年会论文选集, 2002: 12-16.
- [4] Anireddy S N Reddy, Irene S Day, S B Narasimhulu, et al. Isolation and characterization of a novel calmodulin binding protein from potato [J]. J Biol Chem, 2001(6): 4206-4214.
- [5] Raymond E, Zielinski. Calmodulin and calmodulin binding proteins in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49(3): 697-725.
- [6] Moriyah Zik, Yael Fridmann - Sirkis, Hillel Fromm. C-terminal residues of plant glutamate decarboxylase are required for oligomerization of a high-molecular weight complex and for activation by calcium/calmodulin [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006(3): 872-876.
- [7] 黄号栋, 杨静, 龚明. 用磷酸二酯酶定量检测植物钙调素方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39: 156-160.
- [8] 丁文勇, 赵宝昌, 韩旭. 钙调素的环核苷酸磷酸二酯酶检测法[J]. 大连医科大学学报, 1999, 21: 3-6.