

技术与方法 Techniques and Methods

具有原卟啉原氧化酶(PPO)抑制活性的离体测定方法探讨

李华斌, 李永红, 刘斌, 汪义丰, 吴超, 李斌, 邹小毛*, 杨华铮*

南开大学元素有机化学研究所, 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071

Study of Method for Measuring the Inhibition of Protoporphyrinogen Oxidase Activity *in vitro*

LI Hua-Bin, LI Yong-Hong, LIU Bin, WANG Yi-Feng, WU Chao, LI Bin, ZOU Xiao-Mao*, YANG Hua-Zheng*

State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Research Institute of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China

摘要: 以玉米黄化苗为材料和除草剂S-23142 (N-[4-氯-2-氟-5-炔丙氧基]苯基-3,4,5,6-四氢邻苯二甲酰亚胺)为抑制剂, 对其抑制PPO活性的离体测定方法进行了研究和改进, 并建立了一种简单而有效的离体测定方法。

关键词: 原卟啉原氧化酶(PPO); 抑制剂; 离体活性测定

原卟啉原氧化酶(protoporphyrinogen oxidase, PPO, EC 1.3.3.4)的作用是将其底物原卟啉原 IX 氧化成原卟啉 IX, 后者进一步参与叶绿素的生物合成。PPO 活性受抑会引起原卟啉原 IX 过量积累并自动氧化, 进而原卟啉 IX 过量积累, 在细胞内引发一系列破坏性氧化而导致植物死亡(Duck等 1990)。二苯醚类除草剂和四氢邻苯二甲酰亚胺类除草剂就是通过这种作用而达到除草效果的。

PPO 通过电子转移反应, 脱去原卟啉原 IX 的 6 个氢, 将其氧化成高度共轭、红色、对光敏感的原卟啉 IX。原卟啉原 IX 不吸收可见光或者荧光, 而产物原卟啉 IX 在波长 410 nm 处有特征吸收(激发光谱), 并且在波长 630 nm 处有较强的发射荧光(发射光谱)。抑制剂与底物原卟啉原 IX 竞争性地与酶活性中心结合, 从而抑制 PPO 转化原卟啉原 IX 成原卟啉 IX 的能力。因而可以通过紫外法或荧光分光光度法测定产物原卟啉 IX 的量, 确定抑制剂的抑制率, 进而确定 pI_{50} (Poulson 和 Polglase 1975), 从而可供 PPO 抑制剂的结构设计和研究参考。Jacobs 和 Jacobs (1982)报道 PPO 的性质以及紫外分光光度和荧光分光光度分析方法后, 此种方法即为人们用来测定 PPO 抑制剂的活性(Witkowak 和 Halling 1989; Lee 等 1993; Lee 和 Duke 1994; Böger 和 Wakabayashi 1999)。在已有的报道中, PPO 的提取、原卟啉原 IX 的制

备以及测定方法各不相同, 本文在综合这些方法的基础上, 对其进行了一些改进, 以期建立一种快速、简单而有效的方法。

材料与方法

1 材料

玉米(*Zea mays* L.), 品种‘纪元一号’, 种子。

2 试剂和仪器

主要试剂有: 原卟啉 IX (购自 Sigma)、除草剂 S-23142、HEPES、Tris、DTT、EDTA、MgCl₂、牛血清白蛋白(BSA)、考马斯亮蓝 G-250 (coomassie brilliant blue G-250)。

主要仪器有: Biofuge® Stratos 全能台式高速冷冻离心机、960MC 型荧光分光光度计、酶标仪、pH 计、FSH-2A 可调高速匀浆机。

3 测定方法

3.1 溶液的配制 酶的提取缓冲液组成为: 0.05 mol·L⁻¹ HEPES、0.5 mol·L⁻¹ 蔗糖、1 mmol·L⁻¹ DTT、

收稿 2007-07-02 修定 2007-11-12

资助 国家 973 计划(2003CB114400)、国家自然科学基金(20572054)和国家高等教育博士点基金。

* 通讯作者(E-mail: zouxiaomao1111@sina.com, Tel: 022-23506567; E-mail: nk_yanghz@126.com, Tel: 022-23503799)。

1 mmol·L⁻¹ MgCl₂、1 mmol·L⁻¹ EDTA、0.2% BSA, 以 KOH 溶液调 pH 为 7.8。溶酶缓冲液的组成为: 0.05 mol·L⁻¹ Tris、2 mmol·L⁻¹ EDTA、20% (V/V) 甘油, 以 HCl 调 pH 为 7.3。反应缓冲液的组成为: 0.1 mol·L⁻¹ Tris、1 mmol·L⁻¹ EDTA、4 mmol·L⁻¹ DTT, 以 HCl 调 pH 为 7.5。测试缓冲液的组成为: 0.1 mol·L⁻¹ Tris、1 mmol·L⁻¹ EDTA、5 mmol·L⁻¹ DTT、1% (V/V) 吐温 80, 以 HCl 调 pH 为 7.8。配制 S-23142 溶液时, 称量 1.5 mg S-23142, 加 1 mL 二甲基甲酰胺(DMF)溶解, 并加 1 mL 吐温 80, 再以蒸馏水定容至 100 mL, 而后稀释成所需浓度。

3.2 反应底物的制备 配制 10 mmol·L⁻¹ KOH 的乙醇/水混合溶液(82% KOH 0.017 g, 5 mL 无水乙醇, 蒸馏水定容至 25 mL), 精确称量 4.5 mg 原卟啉 IX, 用 4 mL KOH 的乙醇/水溶液溶解, 再稀释至 10 mL, 避光氮气保护下, 按 1.5 g·mL⁻¹ 加入 3% 钠汞齐, 反应 2 h。避光氮气保护下过滤, 用 10% 盐酸调 pH 为 8 左右, 按 1:3 的体积比加入反应缓冲液, 分装至样品管中, 每份 1 mL, 于液氮中保存(浓度约 0.1 mmol·L⁻¹)。

3.3 标准曲线的制作 分别取 0.08 mmol·L⁻¹ 的原卟啉 IX 标准溶液 10、20、30、40、50、60、70 和 80 μL, 移入 0.92~0.99 mL 反应缓冲液中, 再加 2 mL 测试缓冲液, 总体积为 3 mL, 立即测定波长 630 nm (激发波长为 410 nm) 处的发射荧光强度。每个处理重复 3 次, 取平均值。以原卟啉 IX 浓度为横坐标, F 值为纵坐标, 绘制标准曲线。以最小二乘法计算得出线性回归方程。

3.4 PPO 的提取 取暗室中培养 6~7 d 的玉米黄化苗, 照光 2 h 微变绿后, 取地上部分剪碎后加 5 倍体积的提取缓冲液, 经高速匀浆机匀浆, 以 100 目尼龙绸过滤后再以 800×g 离心 2 min (温度为 0 ℃), 取上清液并以 17 000×g 离心 6 min (温度为 0 ℃)。沉淀以溶酶缓冲液溶解后, 即为酶样品(-70 ℃ 避光保存), 操作在 0~4 ℃ 下进行。

3.5 蛋白质含量测定 采用改进的考马斯亮蓝法 (Bradford 1976)。取 60 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 100 mL 3% 的过氯酸溶液中, 滤去未溶的染料后, 置于棕色瓶中保存。以牛血清白蛋白(BSA)

为标准品作标准曲线。取 1 μL 酶样品, 加蒸馏水至 200 μL, 加 200 μL 染液。于波长 620 nm 处比色测定吸光度。每个处理重复 3 次, 取平均值。以蛋白质浓度为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线。依据标准曲线的回归方程计算酶蛋白含量。

3.6 PPO 的动力学分析 在 15 mL 的具塞试管中加入 0.80~0.89 mL 反应缓冲液和 100 μL 酶样品, 于 30 ℃ 水浴中振荡 10 min 后分别加入 10、20、30、40、50 和 100 μL 原卟啉 IX 溶液, 总体积为 1 mL, 置于 30 ℃ 水浴中振荡暗反应 30 min 后各加入 2 mL 测试缓冲液, 测波长 630 nm 处的荧光强度, 以加热灭活的酶样品为空白对照, 每个处理重复 3 次, 取平均值。得到反应速度与底物浓度的反应曲线。酶活性以 nmol·mg⁻¹·h⁻¹ 蛋白表示。

3.7 反应时间的确定 选取含有 100 μL 酶样品, 50 μL 原卟啉 IX 溶液的反应体系, 分别测定反应 5、10、20、30 和 40 min 后的波长 630 nm 处的荧光强度, 以加热灭活的酶样品为空白对照, 每个处理重复 3 次, 取平均值。

3.8 酶对抑制剂敏感性的测定 在 15 mL 的具塞试管中加入反应缓冲液和 100 μL 5×10⁻⁷ mol·L⁻¹ 的 S-23142 以及 100 μL 的分别于 -20 ℃ 和 -70 ℃ 条件下保存的 0 (当天测试)、1、2 和 3 d 的酶样品, 于 30 ℃ 水浴中振荡 10 min 后加入 50 μL 原卟啉 IX 溶液, 于 30 ℃ 水浴中振荡暗反应 30 min。再加 2 mL 测试缓冲液后立即测定波长 630 nm (激发波长为 410 nm) 处的发射荧光强度。以加热灭活的酶样品为空白对照。每个处理重复 3 次, 取平均值。得到随酶的保存时间而变化的抑制率变化曲线。

3.9 化合物对 PPO 抑制活性的离体测定 在 15 mL 的具塞试管中加入反应缓冲液和 100 μL 各种浓度的除草剂 S-23142 以及 100 μL 的酶样品(当日提取), 于 30 ℃ 水浴中振荡 10 min 后加入 50 μL 原卟啉 IX 溶液, 于 30 ℃ 水浴中振荡暗反应 30 min。再加 2 mL 测试缓冲液后立即测定波长 630 nm (激发波长为 410 nm) 处的发射荧光强度。以加热灭活的酶样品为空白对照。每个处理重复 3 次, 取平均值。

4 方法可行性的验证

用上述方法测定我们自行设计合成的新化合物1~8的抑制活性。此外,还用盆栽法作了验证,即在直径8 cm的塑料小杯中放入一定量的土,加入一定量的水,播种[分别是稗草(*Echinochloa crusgalli*)、油菜(*Brassica campestris*)、马唐(*Digitaria sanguinalis*)和反枝苋(*Amaranthus retroflexus*)等4种种子]后覆盖一定厚度的土壤,于花房中培养,幼苗出土前以塑料覆盖。每天加定量的清水以保证正常植物生长。在幼苗一叶一心期叶面喷施药剂。20 d后测定地上部鲜重,以鲜重受抑百分数表示药效。并与PPO抑制活性进行比较。

实验结果

1 酶的特性

1.1 酶蛋白质含量 由图1计算出的酶蛋白质浓度为 $15.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,与文献中的 $33 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Ishida等 2000)比较接近。

1.2 K_m 和 v_m 在测定反应速度(v)随底物浓度(S)而变化时,根据图2的标准曲线,由测定的荧光强度

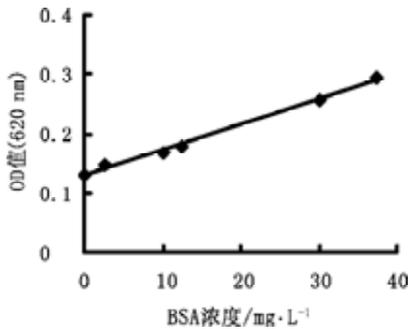


图1 BSA的标准曲线

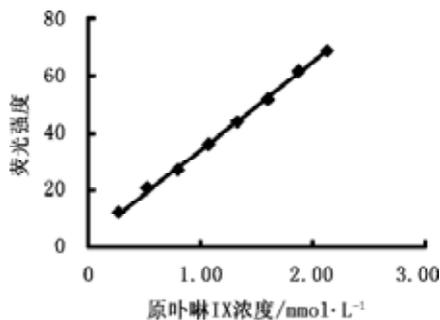


图2 原卟啉IX标准曲线

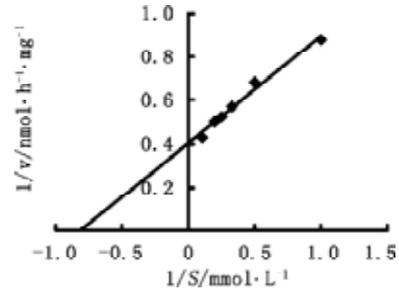


图3 双倒数曲线

求出底物的转化速度 v [$\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白) $\cdot\text{h}^{-1}$],然后根据Lineweaver-Burk作图(双倒数),得到图3。求得 $K_m=1.23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $v_m=2.49 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白) $\cdot\text{h}^{-1}$ 。

1.3 反应时间的确定 如图4所示,在选取的反应体系中($100 \mu\text{L}$ 酶溶液, $50 \mu\text{L}$ 原卟啉IX), 30 min 以内的反应速度基本是恒定的,在这段时间内,产物的累积与反应时间基本上成正比关系,反应速度呈一级反应,而 30 min 后,反应速度趋于平缓,因而以 30 min 为反应时间。

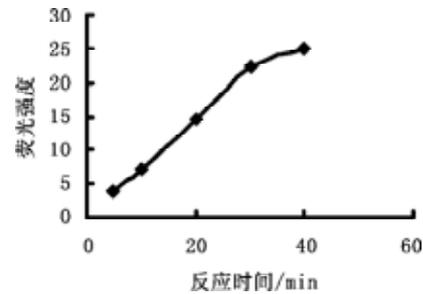


图4 酶促反应速度曲线

1.4 酶对抑制剂的敏感性 从图5可见,酶对抑制剂的敏感性随着时间进程呈下降趋势,在 -20

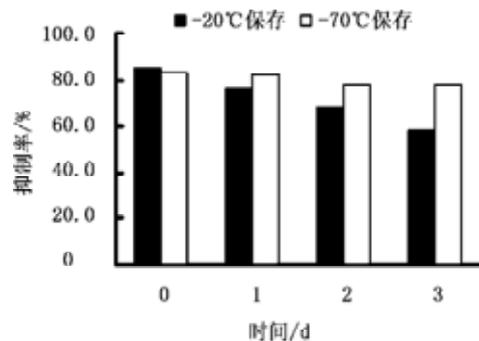


图5 随着时间进程而变化的抑制率

条件下保存的酶对抑制剂的敏感性下降更快, 经过3 d后, $5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 S-23142 对 PPO 的抑制率下降 26.6%, 而酶在 -70°C 条件下保存时, 抑制率只下降 5.4%。

2 S-23142 对酶的抑制活性

根据图 6, 求出 $pI_{50}=8.95$, 与文献中的 8.97 (Böger 和 Wakabayashi 1999) 基本一致。

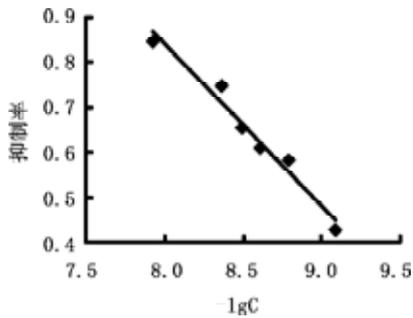


图 6 S-23142 的浓度的负对数及其与抑制率的关系

3 方法可行性的验证

用此法测定我们自行设计合成的新化合物 1~8 的 pI_{50} , 并通过盆栽测定的活体抑制率进行相关性分析, 相关性较好(图 7)。

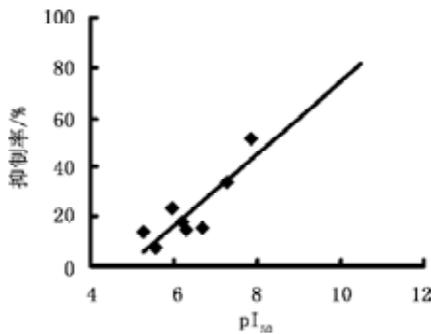


图 7 pI_{50} 与抑制率的相关性

讨 论

所有的有关 PPO 抑制剂的离体活性测定方法, 对材料的选择、酶的提取和纯化、原卟啉 IX 的制备、测试体系的大小、酶及底物的浓度等都不相同。为了建立一种快速、简单和有效的离体活性测定方法, 本文对这些方法作了如下改进。

(1) PPO 的准备, 用暗室中培养 6~7 d 的玉米黄化苗为材料, 其叶中 PPO 含量较多, PPO 酶活性也较高(Ishida 等 2000)。用两次离心法: 先以 $800 \times g$ 离心 2 min 除去植物碎片, 上清液经 $17\,000 \times g$ 离心 6 min, 所得沉淀即为粗酶, 毋需进一步纯化, 以溶酶缓冲液溶解后可直接用于测试。常用方法以提取缓冲液溶解酶蛋白(Jacobs 和 Jacobs 1982; Lee 和 Duke 1994), 这样得到的酶样品经加热灭活处理后出现大量沉淀, 干扰吸光度测定, 本文采用的溶酶缓冲液中加入 20% 的甘油, 既不影响酶活性, 且加热灭活时产生的沉淀能重新溶解, 不会影响吸光度的测定, 重复性好, 可信度高。

(2) 缩小反应体系, 所有测试都是在 1 mL 体系中进行, 这就减少了酶和底物的用量。确定的反应时间为 30 min, 这可以避免原卟啉 IX 自氧化发生, 从而提高了测试的灵敏度和可重复性。

(3) 用盆栽法(茎叶处理)验证方法的可行性, 抑制剂对杂草活性的抑制可直接反映化合物的除草活性, 以及离体条件下 PPO 的 pI_{50} 反映抑制剂与酶蛋白的结合能力, 此二指标的良好相关性说明离体测试方法可以直接用于新化合物初步筛选, 和可快速而简便的了解化合物的潜在除草活性, 从而缩短了新农药研制的周期。

根据我们的经验, 操作中有以下几点值得注意:(1)原卟啉 IX 的制备是关键, 如果还原得不好, 就会略带浅褐色。通常采用钠汞齐进行还原, 钠汞齐的制备尤为重要。制备钠汞齐的关键就是应彻底清洗汞和彻底清除钠表面的氧化物(Jacobs 和 Jacobs 1982)。同时还有很多因素也影响原卟啉 IX 的还原, 如氮气保护、光照强度、温度、湿度、搅拌速度、pH 值等, 操作时也应注意。(2)制备成的原卟啉 IX 分装好后放在液氮中保存, 至少可以保存 6 个月而不影响使用。酶对抑制剂的敏感性会随着时间进程呈下降趋势, -20°C 下保存的此种趋势更明显, 而在 -70°C 下保存时, 酶对抑制剂的敏感性下降很慢, 显示提取的酶可以用液氮保存。(3)不同玉米品种的酶浓度、活性和对抑制剂的敏感性可能有差异, 这时可重新选择酶和底物之间的比例和用量, 用来测定抑制剂的抑制率和 pI_{50} , 如果用 pI_{50}

进行抑制剂结构与活性关系的计算时,则必须确保所有的数据都是来自同一个品种的玉米。(4)暗反应时,需保证恒温(30)和恒定的振荡速度(75 r·min⁻¹)。反应 30 min 后立即取出,置于冰水浴中,并加磨口塞,这样可以大大降低酶继续氧化原卟啉原 IX 的活性,从而保证所测数据的可靠性。

总之,经过如上改进后的方法操作简单而方便,测得除草剂 S-23142 的值与文献中报道的基本上一致,因而可行、可靠。我们用此法筛选自行合成的新化合物 100 余个,测得 pI₅₀ 值的有 8 个。盆栽实验中所测得的结果与离体方法测得的结果相关性较好,因此认为可用于筛选化合物和测定 pI₅₀。

参考文献

- Bradford MM (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248~254
- Böger P, Wakabayashi K (1999). *Peroxidizing herbicides*. Berlin Herdelberg: Springer-Verlag, 101~106, 279~291
- Duke SO, Becerril JM, Sherman TD, Lydon J, Matsumoto H (1990). The role of protoporphyrin IX in the mechanism of action of diphenyl ether herbicides. *Pestic Sci*, 30: 367~378
- Ishida S, Miller-Sulger R, Kohno H, Böger P, Wakabayashi K (2000). Enzymatic activity of protoporphyrinogen-IX oxidase from various plant species: Its sensitivity to peroxidizing herbicides. *J Pesticide Sci*, 25: 18~23
- Jacobs NJ, Jacobs JM (1982). Assay for enzymatic protoporphyrinogen oxidation, a late step in heme synthesis. *Enzyme*, 28: 206~219
- Lee HJ, Duke MV, Duke SO (1993). Cellular localization of protoporphyrinogen-oxidizing activities of etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Plant Physiol*, 102: 881~889
- Lee HJ, Duke SO (1994). Protoporphyrinogen IX-oxidizing activities involved in the mode of action of peroxidizing herbicides. *J Agric Food Chem*, 42: 2610~2618
- Poulson R, Polglase WJ (1975). The enzymatic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX. Protoporphyrinogen oxidase activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 250: 1269~1274
- Witkowiak DA, Halling BP (1989). Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorfen-methyl. *Plant Physiol*, 90: 1239~1242