

简化ALS活性测定方法的可行性探讨

窦维泽¹, 王宇欣¹, 李远良¹, 王艺凝¹, 玄光善², 李任植³, 吴明根^{1*}

¹延边大学, 吉林 延吉

²青岛科技大学, 山东 青岛

³南开大学, 天津

收稿日期: 2021年9月6日; 录用日期: 2021年10月25日; 发布日期: 2021年11月5日

摘要

为探讨在离体法测试ALS活性实验中简化提取ALS蛋白步骤和廉价易购的二硫苏糖醇(DTT)替代黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)可行性, 以暗培养的玉米幼苗为ALS提取材料, 测定了粗蛋白、半精蛋白、精蛋白提取方法提取的ALS蛋白对ALS活性的酶促反应效果; 分析了DTT替代FAD辅酶的可行性。试验结果, ALS蛋白提取过程中, 可用缓冲液代替液氮碾磨材料, 离心速度可降至为10,000 r/min; 酶促反应效果粗蛋白酶好于半精蛋白酶、半精蛋白好于精蛋白酶。在离体法测定ALS活性体系中, DTT替代黄素腺嘌呤二核苷酸FAD配制的缓冲液对ALS蛋白的提取及酶促反应效果类似于FAD缓冲液, 但由于提取ALS蛋白中携带痕量FAD分子, 所以尚未证明在酶促反应中DTT分子完全替代FAD分子起到了ALS辅酶作用。

关键词

离体法, ALS活性, ALS提取法, 黄素腺嘌呤二核苷酸, 二硫苏糖醇

Feasibility of Simplifying for Assay on the ALS Activity

Weize Dou¹, Yuxin Wang¹, Yuanliang Li¹, Yining Wang¹, Guangshan Xuan², Renzhi Li³, Minggen Wu^{1*}

¹Yanbian University, Yanji Jilin

²Qingdao University of Science and Technology, Qingdao Shandong

³Nankai University, Tianjin

Received: Sep. 6th, 2021; accepted: Oct. 25th, 2021; published: Nov. 5th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 窦维泽, 王宇欣, 李远良, 王艺凝, 玄光善, 李任植, 吴明根. 简化 ALS 活性测定方法的可行性探讨[J]. 植物学研究, 2021, 10(6): 761-769. DOI: 10.12677/br.2021.106095

Abstract

In order to investigate the feasibility of simplifying the steps of extracting ALS protein and replacing Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) with cheap and easily available Dithiothreitol (DTT) in the *in vitro* test of ALS activity, maize yellow seedlings were cultured for 5 days without light at 30°C as ALS extraction material. The enzymic reaction effect of ALS protein extracted by crude protein, Semispermic protein and pure protein extraction methods on ALS activity was determined and feasibility of DTT to replace FAD-coenzyme was analyzed. The results showed that in the process of ALS protein extraction, the buffering fluid could be used instead of liquid nitrogen milling material, and the centrifugal speed could be reduced to 10,000 r/min. The best enzyme reaction was crude protein ALS, and the worst was pure protein ALS. In the *in vitro* determination of ALS activity system, the effect of the buffer substituted for FAD by DTT on the extraction of ALS protein and enzymatic reaction was similar to buffer for contains the FAD. However, since the extracted protein carries trace amount of FAD molecule, it has not been proved that DTT molecule completely substituted for FAD molecule in the enzymatic reaction and played the role of ALS coenzyme.

Keywords

In Vitro, ALS-Activity, ALS-Extraction, FAD, DTT

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

乙酰乳酸合成酶(Acetolactate synthase 简称 ALS 或 Acetohydroxyacid synthase, 简称 AHAS)活性抑制效果分析是揭示新研发抑制剂作用机理、评价抑制效果指标的试验方法之一。其中, 离体法分析方法是常用的鉴定除草活性、作用机理的试验手段。

离体法 ALS 活性试验步骤比较繁琐、试验条件苛刻、费时费工。目前普遍接受的 ALS 活性检测步骤是由 Ray T.B. (1984)提出的方法[1], 试验步骤包括低温提取植物体内含 ALS 蛋白质及蛋白质含量测定→试管内酶促反应→反应产物 3-羟基丁酮的显色反应及吸光度测定步骤。其中, 低温提取含 ALS 蛋白质提取步骤细分为定量取试验材料→加入液氮及缓冲液(提取液 A)研磨→过滤→离心(15 K rpm)→提取上清液(粗蛋白)→半饱和态硫酸铵蛋白质沉淀→再次离心(20 K rpm, 沉淀物为半精蛋白)→缓冲液(B)溶解→溶解液过柱(Sephadex G-250 层析柱)→获得蛋白质溶液层(精酶)。

为准确、快速、简便测定新化合物的除草活性, 作者检索、分析了国内为重点的近期抑制剂对 ALS 活性抑制效果相关的公开论文 35 篇的试验方法, 发现多数论文采用了简化部分试验步骤的方法。在中国知网提供的国内离体法测定 ALS 活性论文 35 篇中, 采用标准离体法测试步骤提取精蛋白测定 ALS 活性的论文 3 篇[2] [3] [4], 采用提取半精蛋白步骤测定 ALS 活性的论文 14 篇[5], 采用提取粗蛋白步骤测定 ALS 活性的论文 2 篇[6] [7], 同时加 FAD 和 DTT 配置缓冲液的 3 篇[8] [9], 只加 DTT 配置缓冲液的 2 篇[10] [11], 还有减低离心速度的、没详细叙述 ALS 蛋白提取过程的、没标注 3-羟基丁酮的显色反应及吸光度空白对照的共 14 篇。

对此, 本文为准确、简便、快速测定 ALS 活性, 提供优化的试验方法及理论依据, 分析了不同 ALS

酶蛋白提取方法提取的 ALS 蛋白对酶促反应结果的差异性,探讨了 DTT 替代 FAD 的可能性。

2. 试验材料与方法

2.1. 试验材料

ALS 提取材料: 福莱 2 号玉米杂交种。盆栽,置于恒温培养箱,在 30℃条件下无光培养 5 d,黄化幼苗作为提取 ALS 材料。

化学试剂: 磷酸氢二钾,磷酸二氢钾,丙酮酸钠, FAD, TPP, DTT, MgCl₂, H₂SO₄, 肌酸, 甲萘酚, 氢氧化钠, 标准蛋白质和 3-羟基丁酮等。

ALS 靶除草剂: 苄嘧磺隆, 邻-XX 基---(正在研发的新磺酰脲类抑制剂,由青岛科技大学团队提供)。两种除草剂处理剂量: 2 μmol/ml

仪器: 低温离心机(Allegra X-30R),气相色谱仪(GC-6890 气相色谱仪), 日立高效液相色谱仪(日本 Hitachi 公司), UV1102 紫外分光光度计, 超声波清洗机, Sephadex G-25 层析柱(Sigma 公司), 控温光培养箱、恒温热水器以及其他常规设备仪器。

2.2. 试验方法

2.2.1. 离体法测定 ALS 活性

标准缓冲液试剂配制: 参考吴等提出的方法配制[4] pH 7.5 的蛋白提取液缓冲液(buffer A)和 pH 7.0 的酶促反应缓冲液(buffer C)。含 DTT 缓冲液中的 DTT 浓度: 0.1 mmol/L。

ALS 提取: 酶提取过程始终保持 0℃~4℃下进行。取 30℃暗培养 7 d 的玉米嫩芽 2 g 剪碎片放入研磨内, 到入酶提取缓冲液 A 12 ml, 研磨至匀浆, 滤纸过滤, 在 4℃离心(10 K rpm、30 min), 取上部澄清液作为粗酶(粗蛋白); 粗酶加同量饱和硫酸氨、再次离心(10 K rpm、30 min), 用缓冲液 A 溶解沉淀物获得与粗蛋白等量的半精酶; 半精酶过 Sephadex G-25 层析柱获得与粗蛋白等量的精酶。

蛋白定量:

1) 考马斯亮蓝的配制: 参照 Bredford 的方法配制。

2) 蛋白质含量测定方法: 将提取的粗酶液 4 μl 稀释 50 倍至 200 μl, 加入 4 ml 考马斯亮蓝工作液, 37℃温浴 30 min, 冷却至室温, 595 nm 波长下比色, 据标准曲线计算其浓度(μg/mL)。吸光值(Y)与蛋白质浓度(X)标准曲线数学模型: $Y = 0.0022X - 0.0021$, $R^2 = 0.9976$ 。

ALS 活性体外(in vitro)测定: 参考吴明根等测定方法[3]将酶促反应 - 显色反应的样品在 525 nm 波长下比色, 测定 3-羟基丁酮含量表示 ALS 活性活性强度(μmolacetoin/mg protein·h)。吸光值(Y)与 3-羟基丁酮浓度(X)标准曲线数学模型: $Y = 0.0092X - 0.0093$, $R^2 = 0.9996$ 。

其中: 调零样品 1 (CK0)是标曲无 3-羟基丁酮显色液, 调零样品 2 (CK2)是酶促反应前加浓硫酸酶失活的反应 - 显色液。

2.2.2. 气相色谱法测定 3-羟基丁酮产物

参照练敏、Yixiao Fan 等提出的试验方法[12] [13]配制标准溶液, 进样得到不同浓度 3-羟基丁酮的峰面积, 绘制标曲吸光值(Y)与 3-羟基丁酮浓度(X)标准曲线数学模型($Y = 2E + 06X - 38045$, $R^2 = 0.9984$)。取分别含有 DTT 和 FAD 辅酶的 ALS 酶促反应样品 0.1 ml 用乙醇稀释至 1 ml, 然后根据样品色谱图中的 3-羟基丁酮的峰面积计算其含量。

毛细管气相色谱柱: agiLent SE-54 (30 m, 0.32 mm)弱极性, 气化室温度: 150℃, 检测器温度: 200℃, 柱温: 50℃, 维持 3 分钟, 10 度/分, 升至 150 度。

2.2.3. 高效液相色谱法测定提取蛋白中的 FAD 含量

参照韦京豫等提出方法[14]配制 FAD 的标准溶液, 进样得到不同浓度 FAD 的峰面积, 绘制标曲吸光值(Y)与 FAD 浓度(X)标准曲线数学模型($Y = 212.2X + 7109, R^2 = 0.9980$)。取 1 g 样品加入 6 ml 超纯水研磨至匀浆, 过滤, 将液体 10,000 r/min 离心 30 min, 离心后留上清液作为 ALS 粗酶; 粗酶加等体积饱和态硫酸铵沉淀, 12,000 r/min 离心 15 min, 超纯水溶解获得半精酶; 半精酶过 Sephadex G-25 层析柱, 超纯水定容至粗蛋白同量为精酶(精蛋白)。将粗酶、半精酶、精酶过滤膜后进行液相分析。

色谱柱: kromasil-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 检测器: 紫外检测器; 检测波长 450 nm; 流动相: 甲醇 - 乙酸铵(35:65); 流速 1 ml/min; 柱温为 25℃。

$$\text{抑制剂抑制率}(\%) = (\text{CK1的3-羟基丁酮量} - \text{处理的3-羟基丁酮量}) / \text{CK1的3-羟基丁酮量} * 100(\%)$$

3. 试验结果与分析

3.1. 不同提取过程的 ALS 蛋白量差异

以玉米暗箱培养的幼苗为材料, 首先分别通过标准缓冲液(提取液)提取粗蛋白、半精蛋白、精蛋白, 测定提取液蛋白质浓度结果(表 1), 均获得含有不同浓度蛋白质的提取液。统计分析结果, 标准缓冲液提取的粗蛋白与精蛋白浓度有显著性差异(表 1), 说明随提取 ALS 蛋白过程的延长和精制, 发生蛋白量的损失。相对粗蛋白, 半精蛋白和精蛋白过程中蛋白损失率分别为 13.4%和 22.6%左右。

Table 1. Protein concentration of standard buffer and H₂O extracts from maize seedling

表 1. 玉米幼苗体内标准缓冲液和水提的蛋白质浓度

蛋白提取液类型 Type of protein extract	蛋白浓度 Concentration of Protein (mg/ml)		
	粗蛋白 Crude protein	半精蛋白 Semispermic protein	精蛋白 Pure protein
FAD 提取 FAD extract	1.3492 ± 0.1185a	1.1689 ± 0.1461ab	1.0439 ± 0.0646b

注: 不同英文字母表示在 0.05 水平下的显著性差异, 下同。

3.2. 粗蛋白 ALS、半精蛋白 ALS、精蛋白 ALS 的酶促反应效果

不同提取法提取的 ALS 蛋白作为催化酶进行离体法 ALS 酶促反应结果, 检测到的反应液 3-羟基丁酮含量与添加的蛋白提取类型不同有差异, 同时吸光度调零样品的不同而出现很大差异(表 2)。统计分析结果, 总的酶促反应趋势为粗蛋白酶促反应体系中的 3-羟基丁酮总量、蛋白质中固有的量、酶促反应生成的量以及 ALS 活性强度大于半精蛋白和精蛋白酶促反应体系, 半精蛋白又大于精蛋白酶促反应体系; 其次是不管粗蛋白还是半精蛋白、精蛋白, 以 CK0 (以标曲 0 点)调零测定和以 CK2 (酶促反应前加浓硫酸酶失活)调零测定的正常酶促反应液的总量(CK1)、实际酶促生成量(CK4)有差异, 当以 CK0 调零测定正常酶促反应液的总量(CK1)值应该是酶促反应前蛋白携带的固有量(CK2) + 实际酶促生成量(CK4)的总和; CK2:CK4 的量比大约为 1:1, 分别占酶促反应液总量(CK1)的 45%和 55%。

本文认为粗蛋白酶促反应体系 3-羟基丁酮含量高的原因是半精蛋白和精蛋白精制过程中剔除了部分固有 3-羟基丁酮和部分蛋白质, 因此当同体积定容提取的粗蛋白、半精蛋白、精蛋白质溶液加入到反应液时, 后者附带进入酶促反应液的 ALS 蛋白和固有的 3-羟基丁酮量少于粗蛋白, 出现加粗蛋白的 ALS 催化酶反应体系中 3-羟基丁酮总含量相对高的现象。

Table 2. Comparison of enzymatic reaction between crude protein, Semispermic protein and pure-protein ALS
表 2. 粗蛋白 ALS 与半精蛋白、精蛋白 ALS 酶促反应效果的比较

ALS 提取方法 Extraction method of ALS	测定样品 Sample of determination	3-羟基丁酮含量 Concent.of acetoin umol/L	ALS 活性强度 ALS Activity μmolacetoin/ h.mg (prot.)
粗蛋白(ALS) Crude protein	CK1: 正常酶促反应液总量	89.17 ± 2.74a	323.38 ± 11.13a
	CK2: 酶促反应前固含量	40.67 ± 1.22d	147.02 ± 4.35d
	CK3: 理论酶促生成量	48.67 ± 1.42b	176.49 ± 4.64b
	CK4: 实际酶促生成量	44.70 ± 2.85c	161.52 ± 9.82c
半精蛋白(ALS) Semispermic protein	CK1: 正常酶促反应液总量	46.54 ± 1.10bc	186.10 ± 4.40b
	CK2: 酶促反应前固含量	18.10 ± 1.72h	72.38 ± 6.86gh
	CK3: 理论酶促生成量	21.33 ± 1.06fg	85.30 ± 4.23ef
	CK4: 实际酶促生成量	23.51 ± 1.55f	94.01 ± 6.18e
精蛋白(ALS) Pure protein	CK1: 正常酶促反应液总量	34.77 ± 0.91e	149.20 ± 3.91d
	CK2: 酶促反应前固含量	15.29 ± 0.88i	65.59 ± 3.75h
	CK3: 理论酶促生成量	19.11 ± 0.51gh	81.98 ± 2.18fg
	CK4: 实际酶促生成量	18.60 ± 0.87gh	79.81 ± 3.73fg

注: CK1: 以 CK0 (以标曲 0 点)调零测定的正常酶促反应液样品; CK2: 以 CK0 调零测定的酶促反应前预先加硫酸使酶失活的样品; CK3: 以 CK0 调零测定 CK1 和 CK2 的 3-羟基丁酮吸光值差代入 3-羟基丁酮标曲数学模型公式计算的 3-羟基丁酮量。CK4: 以 CK2 (酶促反应前加浓硫酸酶失活)调零测定的正常酶促反应液样品(CK1)。

由于作为 ALS 蛋白加入到酶促反应液的提取蛋白中存在携带的 3-羟基丁酮,所以选择正确的 525 nm 吸光度调零样品是消除误差的关键。以已知特性的苄嘧磺隆和新合成的邻-XX 基苯磺隆化合物作为 ALS 靶标除草剂,测定其抑制 ALS 活性结果(表 3, 表 4),以标曲 0 点样品调 525 nm 吸光度零点测定时,抑制率值小于以加浓硫酸酶失活样品 CK2 调零的抑制率值(表 3, 表 4)。理论上 CK2 反应体系中不能进行酶促反应,只存在蛋白携带的固有的 3-羟基丁酮,因此以 CK2 调零测定的抑制率才能真实地反映抑制剂对 ALS 活性的抑制效果,当 CK0 调零测定时,相对 CK2 调零测定出现 3-羟基丁酮含量值高而抑制率下降现象。

为了进一步验证是否在提取的粗蛋白溶液中存在 3-羟基丁酮,采用气相色谱法测定玉米粗蛋白 ALS 酶促反应的 3-羟基丁酮含量。测定结果(表 5),酶促反应预先停止的 CK2 反应液能够检测出比较高浓度的 3-羟基丁酮,含量接近正常酶促反应结束的(CK1)的 60%左右,统计分析结果,酶促反应前后的三羟基丁酮含量有显著性差异而 DTT 和 FAD 缓冲液之间没有显著性差异。

Table 3. Comparison of inhibitory effect of inhibitors under different zero setting conditions
表 3. 在不同调零条件下抑制剂抑制效果的比较

抑制剂类型 Inhibitor type	以标曲 0 点为零点 CK0 zero		CK2 调零 CK2 zero	
	3 羟基丁酮含量 3-hydroxybutanone content μmol/L	抑制率 Inhibition rate (%)	3 羟基丁酮含量 3-hydroxybutanone content μmol/L	抑制率 Inhibition rate (%)
加浓硫酸 CK2	18.40 ± 0.11d	80.07 ± 0.06a	0.00 ± 0.00d	100.00 ± 0.00a
苄嘧磺隆	38.89 ± 0.71c	57.83 ± 0.45b	21.23 ± 0.87c	72.30 ± 1.00b
邻-xx 基苯磺隆	40.58 ± 0.44b	56.00 ± 0.20c	23.08 ± 0.98b	69.93 ± 1.15c
对照 CK1	92.26 ± 0.60a	0.00 ± 0.00d	76.72 ± 0.38a	0.00 ± 0.00d

Table 4. Influence of different blank samples for zero-adjusted on determination value of 3-hydroxybutanone
表 4. 不同空白样品调零对抑制率测定值的影响

抑制剂类型 Inhibitor type	抑制率 Inhibition rate (%)			
	以标曲 0 点为零点 CK0 zero	CK2 调零 CK2 zero	t	t _{0.05}
加浓硫酸 CK2	80.07	100.00	591.39*	2.776
苯嘧磺隆	57.83	72.30	22.84*	2.776
邻-xx 基苯磺隆	56.00	69.93	21.44*	2.776

注：*表示横向比较的显著性差异。

Table 5. The content of 3-hydroxybutanone in the reaction solution of crude protein extracted from corn was added
表 5. 加入玉米粗提取蛋白的反应液 3-羟基丁酮含量

	正常酶促反应 CK1		反应预先停止 CK2	
	DTT 缓冲液	FAD 缓冲液	DTT 缓冲液	FAD 缓冲液
3-羟基丁酮含量(mg/L) The content of 3-hydroxybutanone	3.566 ± 0.725a	3.538 ± 0.356a	2.232 ± 0.207b	2.172 ± 0.246b

3.3. DTT 替代 FAD 辅酶缓冲液的可行性分析

二硫苏糖醇(Dithiothreitol, 简称 DTT)是氧化还原功能类似于辅酶 FAD 的一种结构简单的有机小分子(图 1), 常作为巯基化 DNA 的还原剂和去保护剂, 在 DNA 溶液中加入 DTT 可以降低 DNA 的二聚化, DTT 也常常被用于蛋白质中二硫键的还原, 可用于阻止蛋白质中的半胱氨酸之间所形成的蛋白质分子内或分子间二硫键[15] [16]。试验结果, 采用仅含有 DTT 的缓冲液(包括提取缓冲液 A、酶促反应缓冲液 C)提取粗蛋白, 进行酶促反应也能催化生成 3-羟基丁酮(表 6), 统计分析结果, 两种体系提取、反应的粗蛋白固有的 3-羟基丁酮含量 CK2 之间、酶促反应生成量 CK4 之间差异不显著。

上述试验结果, DTT 代替 FAD 的酶促反应也能检测出 3-羟基丁酮。常理认为 FAD 作为 ALS 的辅酶与 ALS 蛋白牢牢结合在一起, 在蛋白质提取过程中不容易两者分离, 不能排除提取蛋白中含有 FAD 的可能性。对此采用高效液相色谱法, 测定了以纯水作为提取液提取玉米幼苗粗蛋白、半精蛋白、精蛋白中的 FAD 含量。试验结果, 粗蛋白、半精蛋白、精蛋白提取液中, 确实含有痕量的 FAD (表 7), 其含量相当于加入缓冲液添加 FAD 浓度(FAD 10 μmol/L)的 1/10 量, 半精蛋白中含有 1/1000、精蛋白中含有 1/3000 量。

Table 6. Comparison of effects of between the FAD buffer and DTT buffer on the ALS enzymatic reaction
表 6. 含 FAD、DTT 缓冲液对 ALS 酶促反应效果的比较

缓冲液类型	测定样品	3-羟基丁酮含量
Type of buffer	Sample of determination	Concent. of acetoin (μmol/L)
FAD 缓冲液 FAD buffer	CK1: 正常酶促反应总量	172.48 ± 6.120a
	CK2: 酶促反应前固有量	49.76 ± 3.217c
	CK4: 实际酶促生成量	112.72 ± 3.560b
DTT 缓冲液 DTT buffer	CK1: 正常酶促反应总量	163.85 ± 26.433a
	CK2: 酶促反应前固有量	48.60 ± 4.325c
	CK4: 实际酶促生成量	115.25 ± 22.837b

Table 7. Content of FAD in crude protein, Semispermic protein and pure protein extracted from maize seedlings by water
表 7. 水提取玉米幼苗粗蛋白、半精蛋白、精蛋白中的 FAD 含量

蛋白类型 protein type	FAD 浓度 Content of FAD $\mu\text{mol/L}$
粗蛋白 Crude protein	$1.0226 \pm 0.00207a$
半精蛋白 Semispermicprotein	$0.0086 \pm 0.00097b$
精蛋白 Pure protein	$0.0035 \pm 0.00116c$

由于 FAD 作为 ALS 辅酶分子在 ALS 活性中心与特定位置的氨基酸残基分子对接, 对接亲和力、稳定性强(图 1(A)、图 1(B)), 所以本试验的离心速度、蛋白质沉淀过程、过柱等分离方法很难从蛋白质中分离除掉对接的 FAD 分子。所以目前的研究结果不能完全认定 DTT 完全取代 FAD 空间位、起到了与 FAD 相同功能。但上述多种试验结果证明, 在离体法试验中, 不管粗蛋白、半精蛋白还是精蛋白作为 ALS 酶促反应的催化酶时, DTT 替代 FAD 也能完成丙酮酸转化生成 3-羟基丁酮的酶促反应。

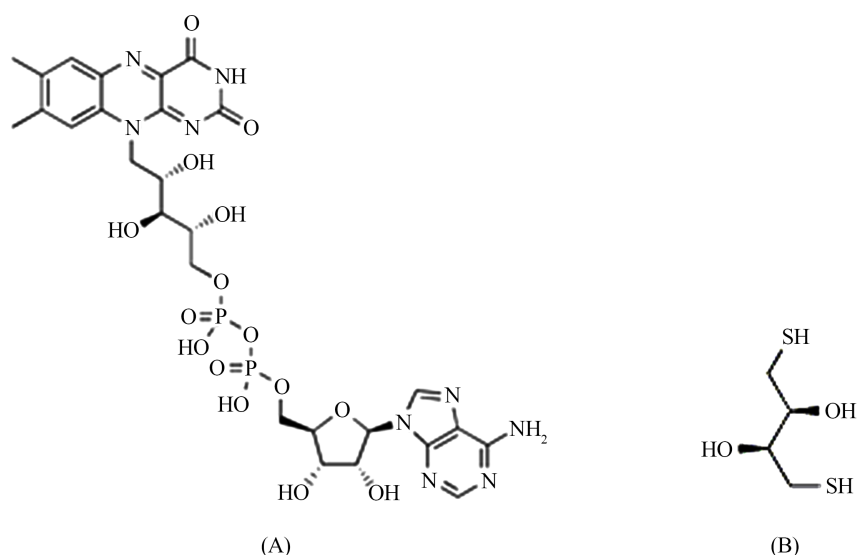


Figure 1. Molecular structures of flavin adenine dinucleotide (FAD) (A) and Dithiothreitol (DTT) (B)

图 1. 黄素腺嘌呤二核苷酸分子结构(A), 二硫苏糖醇分子结构(B)

4. 讨论与结论

常用的离体法 ALS 活性检测试验是属于试验步骤比较繁琐、试验条件苛刻、费时费工的酶活性试验之一。因此, 后期很多论文作者在 ALS 活性测定试验中采用了比较简化的步骤, 其中很多论文试验是在 ALS 蛋白酶过程中采用了省略 Sephadex G-25 层析柱纯化过程的简化方法[5], 甚至简化到省略粗蛋白沉淀、省略 Sephadex G-25 层析柱纯化过程的粗蛋白的[6] [7], 还有缓冲液、反应液中添加 FAD 和 DTT 加的[8] [9], 只加 DTT 的[10] [11]等。

试验结果, 作为玉米暗培养的幼苗试材时, 因提取的蛋白质是粗蛋白、半精蛋白或精蛋白, 所获得的蛋白质含量有差异, 表现出粗蛋白法提取液的蛋白质浓度最高, 半精蛋白法次之, 精蛋白法最低趋势。

比较不同提取方法所提取的粗蛋白、半精蛋白或精蛋白对 ALS 活性影响, 首先粗蛋白、半精蛋白或精蛋白溶液固有的 3-羟基丁酮量含量大小排序为粗蛋白质的浓度最高, 半精蛋白的次之, 精蛋白的最低

趋势；酶促反应生成的 3-羟基丁酮量含量大小排序也是粗蛋白质的浓度最高，半精蛋白的次之，精蛋白的最低趋势。如果粗蛋白代替精蛋白作为 ALS 酶，可省时省工，但必须以酶促反应之前预先加硫酸备制的样品调零，消除粗蛋白溶液固有的 3-羟基丁酮的吸光度。否则出现偏差，导致抑制剂抑制效率的降低误差。比如，假设当固有 3-羟基丁酮含量(CK2)和酶促反应生成量(CK4)比为 1:1，而抑制剂的抑制效果 100%时，如果标曲空白调零点时公式计算的抑制效果只能为 50%。所以调零样品以预先加硫酸的调零方法消除固有量 CK2 = 0，才能得到真实的抑制效果 100%。

值得关注的是 DTT 替代 FAD 的缓冲液体系中，酶促反应生成的 3-羟基丁酮含量类似于 FAD 缓冲液体系。如果 DTT 替代可行，不仅节省试验成本，而且可进一步揭示 ALS 与辅酶 FAD 的相互作用机理，探讨除草剂抑制作用机理与辅酶 FAD 的关系具有重要意义。范等[2]试验结果，离体法酶促反应体系中缺 FAD 时，没检测到 3-羟基丁酮的生成量，而陈以峰等[10]试验结果 DTT 替代 FAD 也能促进酶促反应。

本试验结果，以 DTT 替换辅酶 FAD 配制缓冲液不影响酶促反应。无论提取的是粗蛋白、半精蛋白还是精蛋白，提取液中含有一定量的 FAD。其中，粗蛋白当中的含量缓冲液添加 FAD 浓度(FAD 10 $\mu\text{mol/L}$)的 1/10 相当量，半精蛋白中含有 1/1000、精蛋白中含有 1/3000 相当量的 FAD。虽然在离体法测定 ALS 活性体系中，DTT 替代 FAD 的缓冲液对 ALS 蛋白的提取及酶促反应效果类似于 FAD 的缓冲液的效果，但毕竟提取蛋白液中含有 FAD 分子，因此不能说明 DTT 完全替代 FAD 功能。

按照酶学理论酶分子和辅酶下分子对接是具有高度专一性，在植物细胞内丙酮酸转化 3-羟基丁酮的酶促反应过程中，辅酶 FAD、TPP 与 ALS 活性中心的氨基酸残基对接完成氧化还原过程。在功能特性上虽然 DTT 与 FAD 具有相似的还原性，但分子结构相差甚大，而且 DTT 并不是 ALS 辅酶分子。在本文离体法 ALS 活性试验中，DTT 替代辅酶 FAD、与植物中提取的 ALS 蛋白共同催化生成 3-羟基丁酮，说明起到了与 FAD-ALS 复合物相同的功能。假设在 *In vitro* 酶促反应体系中，DTT 小分子与 ALS 活性中心氨基酸残基对接形成与 FAD-ALS 复合物结构相似的 DTT-ALS 复合物，则 DTT 与 ALS 是如何对接形成复合物，对接位是否否与 FAD 相同等需要进一步究明，同时还需要深层次揭示酶与辅酶专一性对接理论。

总之，在 30℃ 条件下暗培养 5 d 的玉米黄化幼苗作为提取 ALS 材料时，可以不用液氮直接用提取液碾磨(4℃ 条件)，可以离心速度降低到 10 K rpm；可以用粗蛋白作为酶促反应的 ALS 蛋白。

粗蛋白提取步骤提取的粗蛋白 ALS 酶促反应效果好于半精蛋白，半精蛋白好于精蛋白，但粗蛋白作为酶促反应的 ALS 蛋白进行酶促反应测定 3-羟基丁酮吸光度时，必须以酶促反应之前预先加硫酸备制的样品调零，否则出现偏差，导致抑制剂抑制效率的降低误差。

在离体法测定 ALS 活性体系中，DTT 替代 FAD 的缓冲液对 ALS 蛋白的提取及酶促反应效果类似于 FAD 的缓冲液的效果。

基金项目

国家自然科学基金(编号：31760521)。

参考文献

- [1] Ray, T.B. (1984) Site of Action of Chlorsulfuron: Inhibition of Valine and Isoleucine Biosynthesis in Plants. *Plant Physiology*, **75**, 827-831. <https://doi.org/10.1104/pp.75.3.827>
- [2] 范志金, 于维强, 艾应伟, 等. 玉米乙酰乳酸合成酶活性的测定及其性质初探[J]. 安全与环境学报, 2003, 3(2): 19-23.
- [3] 吴明根, 吴松权, 朴仁哲, 等. 磺酰脲类除草剂对抗、感性慈姑 ALS 活性的影响[J]. 农药, 2007, 46(10): 701-703.
- [4] 张淑东, 张双, 王禹博, 等. 稻田萤蓼对苄嘧磺隆的抗药性[J]. 农药, 2019, 58(8): 621-624.
- [5] 卢宗志, 张朝贤, 傅俊范, 等. 稻田雨久花对苄嘧磺隆的抗药性[J]. 植物保护学报, 2009, 36(4): 354-358.

- [6] 陈杰, 袁军, 刘继东, 等. 新型除草剂丙酯草醚的作用机理[J]. 植物保护学报, 2005, 32(1): 49-52.
- [7] 韩明丽, 兰大伟, 刘永立, 等. 丙酯草醚对几种果树乙酰乳酸合成酶活性的影响[J]. 果树学报, 2009, 26(2): 250-253
- [8] 李平生, 魏松红, 纪明山, 等. 辽宁省稻田野慈姑对苄嘧磺隆的抗药性[J]. 植物保护学报, 2015, 42(4): 663-668.
- [9] 付丹妮, 赵铂锤, 陈彦, 等. 东北稻田野慈姑对苄嘧磺隆抗药性研究[J]. 中国植保导刊, 2018, 38(1): 17-23.
- [10] 陈以峰, 李宜慰, 汤日圣, 等. 乙酸乳酸合酶活性的简易测定方法建立[J]. 江西农业大学学报, 1996, 18(2): 213-217.
- [11] 王强, 王勇, 赵学平, 等. 水稻和稗草 ALS 活性测定及农美利选择性机理研究[J]. 浙江农业学报, 2000, 12(6): 303-307.
- [12] 练敏, 纪晓俊, 胡南, 等. 气相色谱法快速测定产酸克雷伯氏杆菌发酵液中的代谢产物[J]. 分析试验室, 2008, 27(S1): 19-21.
- [13] Fan, Y.X., Tian, Y.J., Zhao, X.Y., *et al.* (2013) Isolation of Acetoin Producing Bacillus Strains from Japanese Traditional Food Natto PREP. *Biochemistry and Biotechnology*, **43**, 551-564.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2012.762631>
- [14] 韦京豫, 郭长江, 徐静, 等. 测定外周血核黄素及其衍生物含量的 HPLC 方法研究[J]. 营养学报, 2006, 28(2): 79-82.
- [15] 姜闯道, 高辉远, 邹琦, 等. 二硫苏糖醇处理导致大豆叶片两光系统间激发能分配失衡[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(6): 561-568.
- [16] 董改宁, 王新军, 唐量, 等. 二硫苏糖醇对小鼠运动耐力、肝组织自由基代谢、肝糖原含量及血清 GPT 活性影响研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2003, 31(2): 63-66.