

菠萝叶片 PEP 羧激酶与底物结合时构象的变化

林植芳 孙谷畴 林桂珠 郭俊彦

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘 要

菠萝叶片 PEP 羧激酶与底物 OAA 和 ATP 及配基 Mn^{2+} 等结合时引起紫外差示吸收光谱峰位和方向上的变化。OAA 与酶结合诱导产生的差示吸收光谱在 268—280nm 处有一个宽负峰。ATP 与酶结合出现两个差示负峰(242.5 和 273.5nm)。双底物 OAA 和 ATP 同时与酶结合, 光谱上呈现 252nm 和 268nm 两个峰。 Mn^{2+} 不论与 ATP 或与 ATP+OAA 一起与酶反应时, 皆使原来的峰位漂移, 且正负方向逆转。酶蛋白在 323nm 有最大的荧光发射。OAA 引起荧光发射强度增大, ATP 及 ATP+ Mn^{2+} 则减弱荧光发射。 Mn^{2+} 与 OAA 及 ATP 的复合效应导致荧光强度进一步减弱。

关键词: PEP 羧激酶; 菠萝叶片; 紫外差示吸收光谱; 荧光光谱

在光合作用 PCK 亚型的 CAM 和 C_4 植物中, CO_2 初固定产物草酰乙酸(OAA), 在 ATP 和 Mn^{2+} 的参与下, 由 PEP 羧激酶(PEPCK, EC4.1.1.49)催化脱羧形成 CO_2 和 PEP, 作为 RuBpCase 和 PEPCase 的底物。 C_4 与 CAM 植物的 PEPCK 分别存在于不同组织的绿色细胞中^[8,10]。对 C_4 植物来源的 PEPCK 的特性已有较多的研究^[3,7,9], 但对 CAM 植物 PEPCK 的结构、功能与调节特性, 酶与底物结合及催化机理等所知甚少。

通常, 酶与底物结合形成中间络合物是一种识别过程。有报道指出 PEPCase^[3], CAT (过氧化氢酶)和 POD(过氧化物酶)^[1]与其底物结合时发生了特征吸收峰的出现或消失。酶构象的变化可为其催化功能的实现提供前提。因此, 本文从 CAM 植物菠萝叶片中提取纯化 PEPCK, 研究 PEPCK 与底物结合过程中构象的变化, 作为进一步了解 PEPCK 催化机理的依据。

材料和方法

PEPCK 的提取和纯化 盆栽菠萝(*Ananas comosus*)按常规管理。上午 9—10 时取顶端成熟叶, 以含 1mmol/L $MnCl_2$, 20mmol/L 巯基乙醇, 1%PVP 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)捣碎提取。10 000×g 离心 10min 后, 上清液参照 Hatch 和 Mau 的方法^[7]以硫酸铵分步沉淀, Sephadex G-200 凝胶过滤, DEAE-cellulose 离子交换层析进行纯化。

PEPCK 活性的测定 粗提取物的 PEPCK 活性按 Hatch^[6] 和 Hatch 与 Mau^[7] 的方法,测定 OAA 在 280nm 吸收的减少,并校正 OAA 的自发脱羧。部分纯化和纯化的 PEPCK 活性则以丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶偶联 NADH 的氧化而测定。反应系统同 Hatch 与 Mau^[7],但增加 2.5mmol/L 的 MgCl₂。

紫外差示光谱测定 用分隔的双杯法^[12],对照光路的两个比色杯分别盛酶或配基的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0);样品光路的两个杯则分装酶加配基的反应液或单一的缓冲液。于 220—300nm 作差示扫描 (DU-7HS 紫外分光光度计)。

荧光光谱测定 酶蛋白 (35μg/3ml) 溶液以 290nm 激发,300—380nm 测定室温 (~25℃) 发射光谱 (Hitachi MPF-荧光分光光度计)

实验结果

纯化酶经聚丙烯酰胺凝胶电泳,得到一个单一的带,纯化倍数 38 倍 (图 1)。

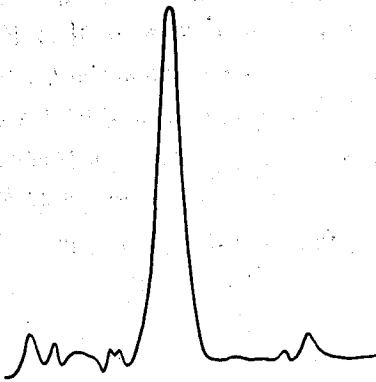


图 1 纯化的菠萝叶片 PEPCK 的 PAGE 扫描
Fig 1 The PAGE scanning of purified PEPCK of pineapple leaves

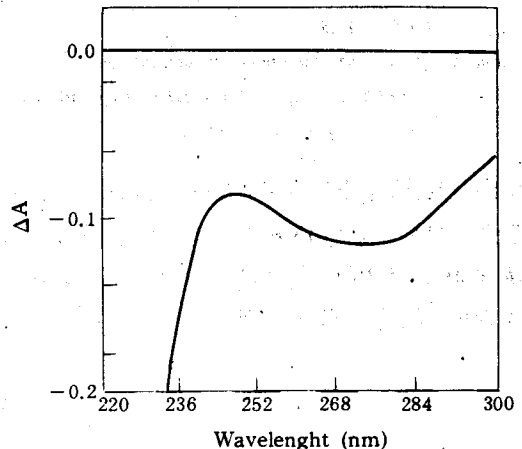


图 2 菠萝叶片 PEPCK 与 OAA 结合产生的紫外差示吸收光谱
Fig 2 Ultraviolet absorption difference spectrum of pineapple leaf PEPCK binding to OAA PEPCK 50μg, OAA 0.1 mmol/L

一、酶与底物反应时的紫外差示光谱

PEPCK 催化 OAA 催羧反应需要 ATP 和 Mn²⁺ 的参与。在所用的反应系统中,当酶与 OAA 结合,并对应于分隔在两个杯中的 OAA 和酶的缓冲液进行吸收校正时,发现其在 220—300nm 的差示光谱中呈一个宽的负峰 (268—280nm),中间最低处为 271nm (图 2)。

PEPCK 与 ATP 反应时,观察到差示光谱上 242.5 和 273.5nm 的两个强负峰 (图 3)。当 ATP 及 Mn²⁺ 与 PEPCK 作用,差示光谱变为两个明显的正峰 (246.5nm 及 270.5nm),峰位分别红移 4nm 和蓝移 3nm,使峰距缩短,而且正峰 246.5nm 的高度比未加 Mn²⁺ 前的 242.5nm 负峰大。

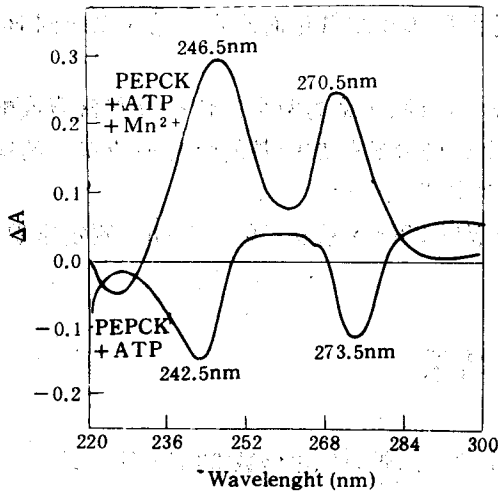


图3 ATP及ATP+Mn²⁺与菠萝叶片PEPCK结合形成的紫外差示吸收光谱

Fig 3 Ultraviolet absorption difference spectra of pineapple leaf PEPCK binding to ATP or ATP+Mn²⁺ PEPCK 50 μ g, ATP 0.25 mmol/L, MnCl₂ 0.5 mmol/L

PEPCK与双底物(OAA+ATP)结合, 则于252nm和268nm有明显的差示吸收, 并有一个285nm负峰(图4)。有Mn²⁺存在下, OAA+ATP诱导的酶的差示光谱变为具249nm及270nm的负峰(图5)。这表明ATP及ATP+Mn²⁺对PEPCK与OAA的结合有复合影响, Mn²⁺导致吸收峰方向转变, 并使吸收分别蓝移3nm及红移2nm。

二、酶与底物反应时的荧光光谱

PEPCK酶蛋白的最大荧光激发波长290nm, 最大荧光发射波长323nm(图6)。ATP受290nm激发, 于323nm处也有很强的荧光发射, OAA

在同一激发光下, 只在305nm有微弱的发射。PEPCK与底物的反应引起荧光发射强度的改变。OAA与PEPCK结合后, 相对荧光强度显著升高。ATP与PEPCK结合, 则荧光强度降至低于PEPCK或ATP的本底荧光发射。Mn²⁺+ATP诱致PEPCK的荧光发射光谱与不加Mn²⁺的完全叠合。然而, Mn²⁺及双底物与PEPCK反应, 荧光强度进一步减弱。

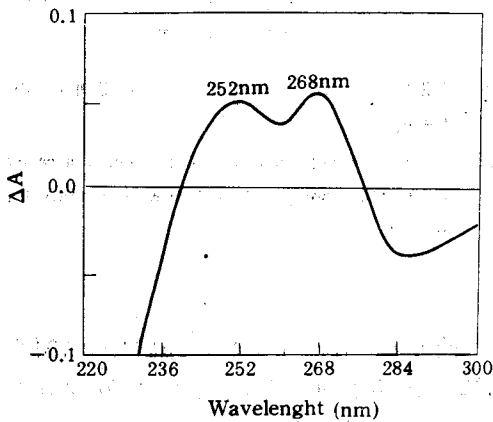


图4 菠萝叶片PEPCK与OAA+ATP结合时的紫外差示吸收光谱

Fig 4 Ultraviolet absorption difference spectrum of pineapple leaf PEPCK binding to OAA+ATP PEPCK 50 μ g, ATP 0.25 mmol/L, OAA 0.1 mmol/L

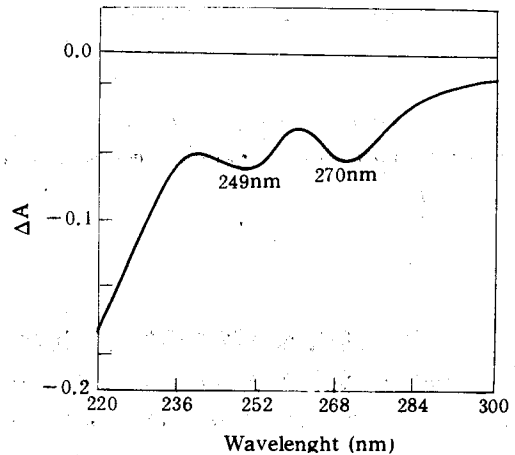


图5 有Mn²⁺下, OAA+ATP与PEPCK结合的紫外差示吸收光谱

Fig 5 Ultraviolet absorption difference spectrum of pineapple leaf PEPCK binding to OAA+ATP in the presence of Mn²⁺

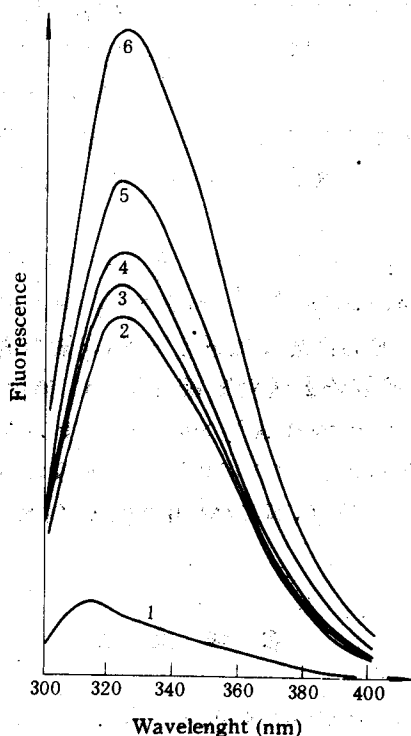


图 6 底物和配基对菠萝叶片 PEPCK 荧光光谱的影响

Fig 6 Effects of substrate and ligande on fluorescence Spectra of pineapple leaf PEPCK

1. OAA 0.2mmol/L; 2. PEPCK+OAA+ATP+Mn²⁺ (35μg+0.2+1.0+2.0 mmol/L); 3. PEPCK (35μg)+ATP(1 mmol/L) or PEPCK+ATP+Mn²⁺; 4. ATP (1 mmol/L); 5. PEPCK; 6. OAA+PEPCK

讨 论

紫外差示光谱与荧光光谱的分析结果清楚表明, PEPCK 与底物结合和催化过程中发生了构象的变化。通常, 酶与底物结合成络合物可能引起微环境的变化, 从而导致酶分子发色团的紫外光谱与荧光光谱特性的相应改变。PEPCK 与底物结合时紫外差示光谱的变化, 反映其特定的具有结合与催化功能的活性构象区域的特点。

蛋白质和酶的紫外吸收和荧光光谱主要由于其多肽侧链上三种芳香氨基酸残基 Try、Tyr 和 Phe 的吸收。这三种氨基酸残基发色团的紫外差示吸收峰分别为 292nm 和 228nm(吡啶环), 259nm 和 218nm(苯环), 287nm 和 228nm(苯酚环)。当 Tyr 的苯酚环电离时, 吸收峰变为 243nm^[12]。邻近发色团相对取向的变动, 可改变发色团的最大吸收波长和消光系数^[2]。本文中, 加入半底物 OAA 后, 差示光谱在 268—280nm 区呈现一个负的宽峰, 可能酶与底物的结合使原来酶蛋白中 Tyr 和 Try 的吸收(280nm 附近)向短波方向蓝移, 改变了峰形。另一个半底物 ATP 与酶的结合, 除了 273nm 的吸收外, 还出现 242.5nm 的负峰, 我们推测, 这是由于 Tyr 残基发色团的电离或 Try 的吡啶发色团与邻近发色团的偶联而导致吸收带加宽或分裂之故^[5]。

OAA 与 ATP 单独与 PEPCK 作用出现差示光谱的差异, 反映其与 PEPCK 形成络合

物的构象不同,可能是两者在 PEPCK 上有各自的结合位点。双底物与 PEPCK 反应出现二个正峰和一个负峰,且吸收波长红移,显示酶与双底物结合形成更复杂的构象。值得注意的是加 Mn^{2+} 后,皆使底物与 PEPCK 结合产生的差示光谱吸收峰反向。Zijias 和 Rossmann^[13] 指出,金属离子与蛋白质的相互作用可改变蛋白质的构象。我们的结果表明, Mn^{2+} 对 CAM 植物的 PEPCK 的激活作用可能是 Mn^{2+} 能引起酶-底物复合物构象的扭曲,从而诱导酶的催化活性。

在中性水溶液中, Try、Tyr 和 Phe 的荧光激发和最大荧光发射波长(Ex/Em)分别为 283/348nm, 275/303nm, 260/282nm^[2,11]。PEPCK 与 OAA 结合导致荧光强度增高及与 ATP 或 ATP+OAA+ Mn^{2+} 的结合使荧光强度下降,可能与酶分子构象及荧光发色团微环境的变化而使 Try 与 Tyr 残基外露或受屏蔽有关。C₄ 植物来源的 PEPCK 在 Mn^{2+} /ATP 为 1 时具有最大活性,因此, Burnell 认为 Mn^{2+} 与 ATP 以复合物形式作为 PEPCK 的底物^[4]。菠萝叶片 PEPCK 与 ATP 或 ATP+ Mn^{2+} 反应时荧光发射光谱重叠,可能表明 Mn^{2+} 与 ATP 结合于 PEPCK 的同一位点,即 CAM 植物的 PEPCK 也与 Mn^{2+} -ATP 复合物相结合而实现其催化功能。

参 考 文 献

- [1] 陈石根、周润琦编著,酶学。湖南科学技术出版社,1986,377—414。
- [2] 陶慰孙、李惟、姜涌明、罗贵民、林永齐,蛋白质分子基础。人民教育出版社,1981,225—251。
- [3] 焦进安、汤小仪、查静娟、吴敏贤、施教耐,高粱叶片磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶溶液构象状态的紫外差示吸收光谱研究。植物生理学报,1986,12(3):266—271。
- [4] Burnell J. N., Purification and properties of phosphoenol-pyruvate carboxykinase from C₄ plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1986, 13: 577—587。
- [5] Donovan J. W., Ultraviolet difference spectroscopy-new techniques and applications. *Method Enzym.*, 27: 497—524。
- [6] Hatch M. D., An assay for PEP carboxykinase in crude tissue extracts. *Anal. Biochem.*, 1973, 52: 280—285。
- [7] Hatch M. D., S-L Mau., Properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase operative in C₄ pathway photosynthesis. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1977, 4: 207—216。
- [8] Ku M. S. B., M. H. Spalding, G. E. Edwards, Intracellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in leaves of C₄ and CAM plants. *Plant Sci. Lett.*, 1980, 19: 1—8。
- [9] Ray T. B., C. C. Black, Characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Panicum maximum*. *Plant Physiol.*, 1976, 58: 603—607。
- [10] Spalding M. H., M. R. Schmitt, M. S. B. Ku, G. E. Edwards, Intracellular localization of some key enzymes of crassulacean acid metabolism in *Sedum praealtum*. *Plant Physiol.*, 1979, 63: 738—743。
- [11] Urbanke C., Fluorimetry. In Bergmeyer H. U. (ed), *Method of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel. 1983, vol I: 326—339。
- [12] Wetlaufer D. B., Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. *Advance in Protein Chemistry*. 1962, vol XVII: 304—383。
- [13] Zijias A., M. G. Rossmann, X-ray studies of proteins interactions. *Ann. Rev. Biochem.*, 1974, 43: 475。

CHANGES OF CONFORMATION STATES OF PHOSPHOENOLPYVATE CARBOXYKINASE FROM PINEAPPLE LEAF DURING BINDING WITH ITS SUBSTRATES

Lin Zhifang, Sun Guchou, Lin Guizhu and Guo Junyan
(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract

Phosphoenolpyvate carboxykinase (PEPCK, EC 4. 1. 1. 49) from pineapple leaf was purified by the procedures including amm-onium sulfate precipitation, chromatography on Sephadex G—200 and DEAE-cellulose. The purified enzyme showed a homo-genous band on polyacrylamide gel electrophoretogram. The conformation of PEPCK protein was studied by ultraviolet absorption difference spectrum and fluorescence spectrum.

The binding of enzyme with substrate and Mn^{2+} resulted in the changes of ultraviolet absorption difference spectra at peak sharpness, height and orientation. Substrate OAA induced a broad negative band at 268—280nm, but two negative bands at 242. 5nm and 273. 5nm were observed when another substrate ATP was bound alone to PEPCK. By addition of both ATP and OAA, the spectrum showed two positive peaks at 252nm and 268nm. The changes of spectra orientation and shift of wavelength were found in the presence of Mn^{2+} either with ATP or ATP+OAA.

The enzyme protein solution showed a maximum fluorescence emission at 323nm. OAA markedly enhanced the emission, whereas ATP or ATP + Mn^{2+} declined the fluorescence. The combination of OAA + ATP + Mn^{2+} with PEPCK induced the further decrease of fluorescence.

These results suggest that the alternative conformation states was generated during the binding of PEPCK to its substrate and metal ion. The difference conformation state between PEPCK + OAA and PEPCK + ATP indicated that these two compounds were bound to different sites of PEPCK protein. Mn^{2+} might bind together with ATP on the same site of enzyme. The changes of spectra orientation caused by Mn^{2+} may be explained as a beneficial conformation for catalysis of PEPCK.

Key words: PEP carboxykinase; Pineapple leaf; Ultraviolet absorption difference spectrum; Fluorescence spectrum