

pH 诱导烟草多酚氧化酶二级结构变化的光谱学研究*

肖厚荣, 徐小龙, 解永树, 盛良全, 张艳鸽, 刘清亮**

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

摘要: 为了获得更多的关于多酚氧化酶二级结构和活性中心结构的信息, 应用 FT-IR 以及去卷积技术、荧光光谱、紫外差光谱研究了溶液 pH 的变化对烟草多酚氧化酶的二级结构的影响并对其活性中心的光谱跃迁进行了归属。实验结果表明, 随着 pH 值的降低或提高, 多酚氧化酶的二级结构发生了变化, α -螺旋和反平行 β -折叠含量减少, 无规卷曲含量有所增加, 同时色氨酸和酪氨酸残基的微环境发生了一定的变化。随 pH 的降低, 活性中心的 Cu^{2+} 与配位的组氨酸咪唑基的作用加强; 此外, 归属和讨论了酶活性中心金属离子与配体间全部电荷转移谱带。

关键词: 酸度; 多酚氧化酶; 二级结构; 光谱跃迁

中图分类号: Q657.31 文献标识码: A

Spectroscopic Studies on pH-induced Changes in Secondary Structure of Polyphenol Oxidase from *Tobacco**

Xiao Hourong, Xu Xiaolong, Xie Yongshu, Sheng Liangquan, Zhang Yange, Liu Qingliang**

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract In order to obtain that more information on the secondary and active site structure of polyphenol oxidase from nicotinan tobacco, FT-IR, synchronous fluorescence and Vis-UV have been employed to study the secondary structure changes of polyphenol oxidase induced by pH. The results show that, compared with native PPO (pH = 7), PPO at pH = 2 contains less both α -helix and anti-parallel β -sheet, more random coil, and almost the same amount of β -turn, and that PPO at pH = 11 contains less α -helix, anti-parallel β -sheet, β -turn, and more random coil. The microenvironments of both Trp and Tyr residues in PPO undergo some changes with pH changing. With the decrease in pH values at the range of pH = 7.0 ~ 3.38, the coordination between Cu^{2+} in the active site and imidazoles of histidine are strengthened. Different LMCT bands of the PPO active site have been observed by changing pH, which result from the structure of Cu(II)-imidazole and Cu(II)-imidazolate.

Keywords pH, Polyphenol oxidase (PPO), Secondary structure, Spectral transfer

1 引言

蛋白质的结构以及结构与功能的关系, 是生命科学研究的热点领域之一。近年来的研究发现, FT-IR 与去卷积 (Fourier self-deconvolution, FSD)、

二阶导数谱 (second derivative spectrum) 和曲线拟合 (curve fitting) 等数学处理方法结合起来研究蛋白质的二级结构, 是个颇有发展前景的新型研究方法^[1-4]。一般蛋白质的红外光谱 (IR) 的谱带归属主要有三大类: ① 所有蛋白质谱中具有氢键化的氨

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (30270321).

** Corresponding author, E-mail: qliu@ustc.edu.cn Received 8 July 2003; in final form 10 October 2003.

基或羧基等官能团的特征吸收带;②蛋白质内的氨基酸性质所决定的各类吸收;③蛋白质骨架肽链羰基伸缩振动引起的酰胺 I 带(1700 ~ 1620 cm^{-1})及酰胺 II 带(1600 ~ 1500 cm^{-1})。利用 IR 谱中的酰胺 I 带,可以对蛋白质的二级结构及其内部氢键结合的情况进行研究。

荧光光谱法是研究生物大分子,特别是蛋白质与各种有机小分子、金属离子和无机化合物相互作用的重要手段。通过对荧光发射特征峰及其在不同条件下的位移情况、荧光偏振、同步荧光、能量转移效率、荧光寿命、荧光猝灭、荧光增强等的研究,可以获得蛋白质分子中荧光生色基团的种类、分布、结构和所处微环境以及蛋白质分子构象变化等有用信息,同时还可以得到外源物质(包括 H^+)与生物大分子相互作用的有关数据^[5]。此外,紫外差光谱也可用于研究酶活性中心金属离子与配体间电荷转移谱带^[6]。多酚氧化酶(polyphenol oxidase,简称 PPO)是植物中广泛存在的一类含铜蛋白质。多酚氧化酶催化的酶促棕色化反应是导致水果蔬菜等的变味以及营养物质损失的重要原因之一,所以它一直倍受植物、营养和生化科学家的关注^[7]。多酚氧化酶不但在烟草的整个生长过程中担当重要角色,而且影响着烟叶的质量、颜色、香味和有害物质的产生,我们已对烟草多酚氧化酶的分离纯化和基本性质进行了研究^[8,9]。本工作主要运用紫外可见吸收光谱、红外光谱及荧光光谱研究 pH 诱导的烟草多酚氧化酶二级结构变化。

2 实验

2.1 试剂与仪器

邻苯二酚、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠等均为分析纯;CM-Sephadex(C_{50})、DEAE-Sephadex(A_{50})、Sephadex(G_{75})均购自瑞典 Pharmacia 公司;RF-5301pc 型荧光分光光度计,Shimadzu UV-2401pc 型分光光度计,pHS-10A 数字酸度/离子计,Z 型系列层析柱(上海锦华实验器械厂),BS-100 型自动部分收集器(上海沪西电子仪器厂),800 型离心机(上海手术器械厂),真空干燥机(Corrosion Resistant Freeze Dryer, U. S. A.),HD-21-88 蛋白核酸检测仪。多酚氧化酶按文献^[8]的方法制备。

2.2 实验步骤

2.2.1 FT-IR 以及去卷积 FT-IR 测定:分别用 pH

值为 2.0、7.0 和 11.0 的磷酸盐缓冲液溶解 PPO 至 40 g/L,取 50 μL 溶液至溴化铊-碘化铊窗口材料上,使成水化膜,用 N_2 吹干,在 Nicolet Magna750 傅里叶变换红外光谱仪上测量。测定范围为 400 ~ 4000 cm^{-1} ,扫描 64 次,分辨率 4 cm^{-1} 。FT-IR 原谱用 OMNIC 软件包处理得到去卷积傅里叶转换红外光谱,有关参数是:半峰宽 30.2 nm 增强因子 1.8。

2.2.2 烟草多酚氧化酶 pH 作用下的荧光研究:配制 3 mL 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 PPO 于 1 cm 石英比色池中,用微量注射器(1 ~ 5 μL)逐次加入一定量的盐酸溶液,使溶液的 pH 分别为 7.0、5.0、3.0 和 2.0,每次加入后混合均匀,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 10 min,进行荧光测定。激发和发射单色器同时进行扫描,改变发射波长 λ_{em} 与激发波长 λ_{ex} 的差 $\Delta\lambda$ ($\lambda_{em} = \lambda_{ex} + \Delta\lambda$),分别使 $\Delta\lambda = 20$ 和 60 nm。在 RF-5301pc 型荧光分光光度计上记录 300 ~ 500 nm 发射光谱的峰强及峰位。

2.2.3 pH 滴定差示紫外可见光谱测定:用磷酸缓冲液(pH = 6.62)配制 6 mL 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 PPO,透析纯化后等分为两份,一份作测试样,一份作参比。参比在搅拌下依次缓慢滴加 1.0、0.5、0.5、0.5、1.0、3.5 μL 3 mol/L 盐酸降低 pH 值,使之分别为 5.96、4.12、3.38、2.90、2.40,每次加入后平衡 30 min,测试样中同时加入等量磷酸缓冲液以保持和参比的蛋白质浓度相等。在 UV-2401pc 紫外可见分光光度计上扫描 220 ~ 600 nm 的吸收光谱。

3 结果与讨论

3.1 红外光谱分析

在多肽链的不同部位,存在着酸性氨基酸残基(Asp 和 Glu)和碱性氨基酸残基(His, Lys 和 Arg)。因而,在多肽链的不同部位的侧链基团之间,存在着静电的相互作用(相互吸引,或者是相互排斥)。如果是异性电荷相吸,则有助于维持蛋白质的构象;如果是同性电荷相斥,则不利于蛋白质构象的稳定性,导致构象松散。对蛋白质而言,在 pH 大大低于其等电点时,产生较多的净的正电荷;在 pH 大大高于其等电点时,产生较多的净的负电荷。由于同性电荷的相斥以及盐键的断裂,使蛋白质分子构象松散。

天然烟草 PPO(pH = 7.0)在 4000 ~ 400 cm^{-1} 的红外光谱如图 1A。3292.9 cm^{-1} 的峰指认为 PPO 的 $\nu_{\text{N-H}}$, 1750 ~ 1600、1600 ~ 1500、1350 ~ 1200 cm^{-1} 分别被指认为 amide I、amide II 和 amide III^[10,11], 其最大值分别在 1659.2、1535.3 和 1286.2 cm^{-1} 。

pH = 2.0 和 11.0 时的红外光谱分别见图 1 B 和 C, 它们的 amide I 和 amide II 的最大峰位与天然烟草 PPO (pH = 7.0) 相比, 没有变化, 但峰强度均增加, 此外, amide III 中的 1286.2 cm^{-1} 峰均几乎消失.

图 2A 是天然 PPO (pH = 7.0) 在 1800 ~ 1200 cm^{-1} 的红外去卷积 (FSD) 谱. 其 1656.4 cm^{-1} 强的峰被指认为 α -helix, 1610 cm^{-1} (肩峰) 和 1286.2 cm^{-1} 左右的吸收被认为反平行的 β -折叠 (anti-parallel β -sheet). 1674 cm^{-1} 的吸收峰被指认为 β -转角 (β -turn)^[12-16], 无规则卷曲在 1650 cm^{-1} 的峰可能与 α -螺旋重叠并被掩盖^[13-16].

在 pH = 2 的 FSD 谱见图 2B 和天然 PPO 相比, 1658.1 cm^{-1} 的谱带降低, 同时, 被指认为无规则卷

曲的 1538.2 cm^{-1} 带增强, 1286.2 cm^{-1} 左右的吸收有较大降低, 以上的变化显示在酸性条件下, PPO 二级结构的 α -螺旋含量和 β -折叠均减少, 无规卷曲含量增加. 1639.8 cm^{-1} 的出现, 更加证明低 pH 下肽链伸展^[17]. β -转角含量基本不变.

当 pH = 11 时, 和天然 PPO 的 FSD 谱相比, 1658.5 cm^{-1} 进一步降低, 而 1639.7 cm^{-1} 略微增加, 1538.2 cm^{-1} 带增强 (见图 2C), 这两种现象同时出现, 表明 PPO 在高 pH 条件下的二级结构中的 α -螺旋有较大幅度下降. 1286.2 cm^{-1} 的吸收也有较大的下降, 1674 cm^{-1} 的吸收有所下降, 这意味着在高 pH 条件下, 二级结构中 β -转角和反平行 β -折叠的含量均下降. 1512 cm^{-1} 带被指认为酪氨酸苯环的

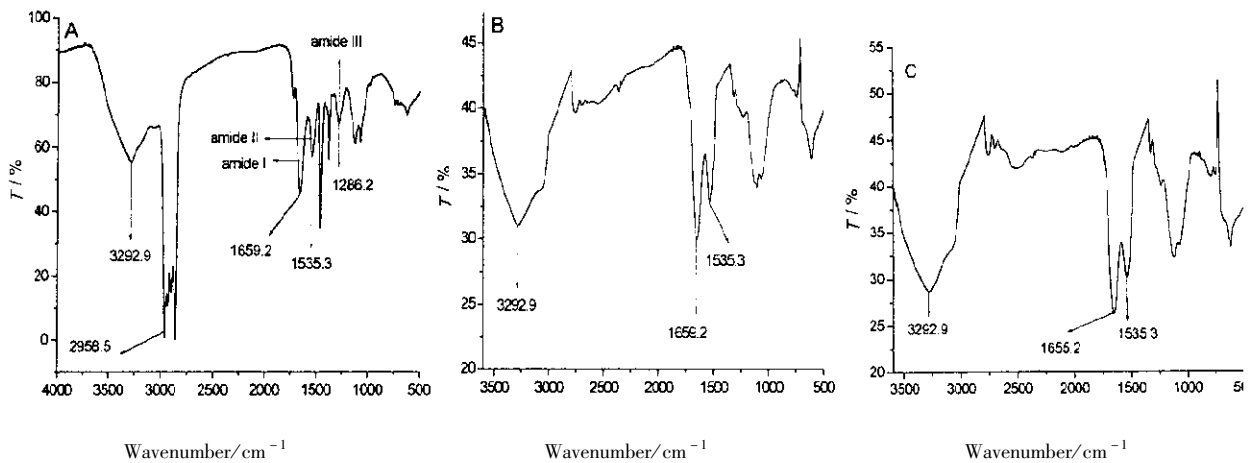


图 1 不同 pH 下烟草多酚氧化酶红外光谱

Fig. 1 FT-IR spectra of polyphenol oxidase at different pH
A : Native PPO ; B : PPO at pH = 2 ; C : PPO at pH = 11.

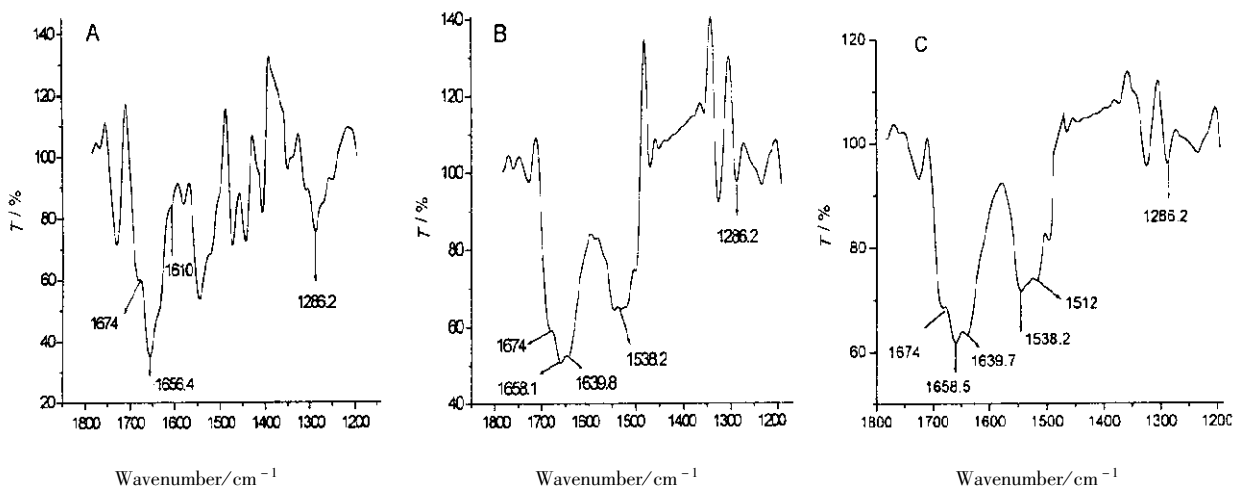


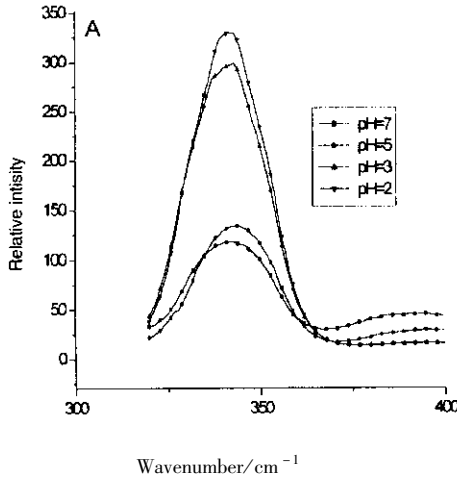
图 2 烟草多酚氧化酶的红外去卷积谱

Fig. 2 Fourier self-deconvolution spectra of polyphenol oxidase
A : Native PPO ; B : PPO at pH = 2 ; C : PPO at pH = 11

振动^[18].

3.2 同步荧光研究

为研究 pH 对 Trp 和 Tyr 残基微环境的影响 ,我们分别测定了不同 pH 时的同步荧光. 当固定 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时 ,令激发波长在 $240 \sim 360 \text{ nm}$,得到了 PPO 中 Trp 的荧光光谱(图 3A). 如图 3A 所示 ,与 pH = 7 时溶液的荧光光谱相比 ,随着 pH 降低 ,其最大 λ_{em} 基本不变 ,均为 342.3 nm 左右 ,但荧光强度不断增大 ,表明随着 pH 降低 ,肽链松散 ,可能是由于原来



带正电荷且靠近 Trp 残基的带电基团离开 ,解除了对 Trp 荧光的猝灭作用.

固定激发光和发射光的波长差为 20 nm (即 $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$) ,可以得到不同溶液中 Tyr 的荧光光谱. 从图 3B 中可以看出 ,与 pH = 7 时溶液的荧光光谱相比 ,随着 pH 降低 ,其 λ_{em} 由 311 nm 蓝移至 296.8 nm ,且荧光强度不断增大 ,表明随着 pH 降低 ,Tyr 残基微环境发生了一定的变化.

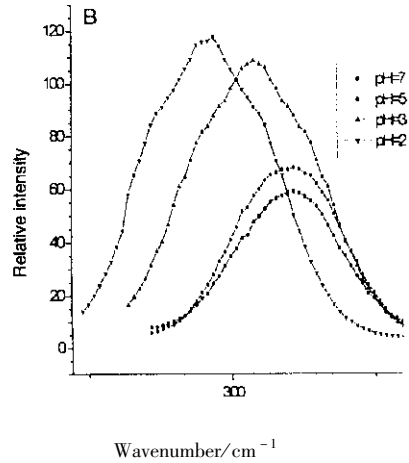


图 3 烟草多酚氧化酶的同步荧光

Fig. 3 Synchronous fluorescence of polyphenol oxidase from tobacco

A : $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$; B : $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$

3.3 pH 滴定差示光谱

梁贤振等在牛红细胞 SOD 紫外差示光谱研究中发现 ,降低参比溶液的 pH 值可以增强质子对金属中心配位位置的竞争力 ,导致铜离子和锌离子从酶蛋白上脱离出来 ,使得样品溶液金属中心的电荷转移谱带的相对强度逐渐增大^[6]. 我们进行 PPO 差示光谱研究^[4] 结果却完全相反 ,出现负吸收. 表明随 pH 下降 ,活性中心的 Cu^{2+} 与配位的组氨酸咪唑基作用加强. 我们曾用 6 mol/L 盐酸胍变性烟草 PPO ,再分别对 EDTA 溶液和去离子水透析 ,采用 ICP-AES 分析处理样品的 Cu^{2+} 含量 ,与未变性烟草 PPO 相比 ,几乎没有下降 ,表明 PPO 中氨基酸残基与 Cu^{2+} 有很强的结合. 图 4 是按上述方式得到的 pH 滴定差示光谱 ,参比的 pH 值由 6.62 逐渐降低 ,依次为 5.94 、 4.12 、 3.38 、 2.90 至 2.40 . 从光谱上看 ,当 pH 由 4.12 降至 3.38 跨越咪唑桥断开的 pH = 4.0 时 ,吸收峰位置由 238 nm 移至 259 nm ; pH = 3.38 时 ,吸收强度最大 ; pH 继续下降 ,吸收强度开始降低 ,但最大峰位不变 ; 330 nm 左右的弱吸收的

峰位在实验的 pH 范围内没有变化.

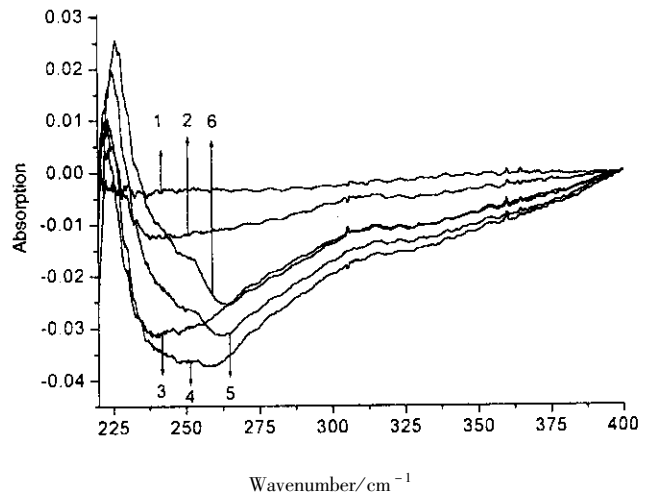


图 4 烟草多酚氧化酶的紫外差示光谱
样品的 pH = 6.62 ,参比 pH 值 1 ~ 6 :
 6.62 , 5.96 , 4.12 , 3.38 , 2.90 , 2.40 .

Fig. 4 The pH dependence of the difference spectra
Sample pH 6.62 ; reference pH values from Line 1 ~ 6
are 6.62 , 5.96 , 4.12 , 3.38 , 2.90 , 2.40 , respectively.

我们应用差示光谱消除了酶蛋白谱的干扰,利用 pH 滴定提示观察到的峰的来源,同时参考梁贤振等人、Fawcett 关于咪唑铜配合物的结果归属^[6,19],对有关吸收峰进行结果归属,见表 1。

表 1 紫外可见差谱归属一览表

Table 1 The UV spectra of PPO with differential spectroscopy

λ/nm	Assignment
225	(ImH) $\sigma_{\text{N}} + \sigma_{\text{N}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$
238	(ImH) $\sigma \rightarrow \text{Cu}^{2+}$
259	(ImH) $\pi_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$
265	(ImH) $\pi_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$
330	(ImH) $\pi_1 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$

参 考 文 献

- [1] Xing Bengang (邢本刚), Liang Hong (梁宏). Chinese Journal of Guangxi Normal University (广西师范大学学报), 1997, **15** (3) : 45
- [2] Chen Xiyi (陈习意), Lin Hai (林海), Wang Dong (王东), Zhu Qingshi (朱清时). Chin. J. Chem. Phys. (化学物理学报), 2000, **13** : 129
- [3] Ren Li (任丽), Kong Fanao (孔繁敖). Chin. J. Chem. Phys. (化学物理学报), 2002, **15** : 81
- [4] Shen Yuhua (沈玉华), Yang Zhanlan (杨展澜), Wu Jinguang (吴瑾光). Chinese Journal of Perkin University (北京大学学报), 1999, **35** : 432
- [5] Yu Tianzhi (俞天智), Tao Zuyi (陶祖贻). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析). 1999, **19** : 453
- [6] Liang Xianzhen (梁贤振), Li Lianzhi (李连之), Hu Xuying (胡绪英), et al. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology (中国生物化学与分子生物学报), 1998, **14** : 175
- [7] Ding C K, Chachin K, Ueda Y. J. Agric. Food Chem., 1998, **46** : 4144
- [8] Shi CH H, Dai Y, Xu X L, et al. Protein Expression and Purification, 2002, **24** : 51
- [9] Shi CH H, Dai Y, Xu X L, et al. Journal of Protein Chemistry, 2001, **20** : 463
- [10] Ruan X, Xu Q, Wang J D, et al. Journal of Molecular Structure, 2000, **525** : 97
- [11] Adreeva A E, Karamancheva I R. Journal of Molecular Structure, 2001, **565** : 177
- [12] Iconomidou V A, Chryssikos G D, Gionis V, et al. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001, **31** : 877
- [13] Weert M, Haris P I, Hennink W. E, et al. Analytical Biochemistry, 2001, **297** : 160
- [14] Cais S, Singh B R. Biophys. Chem., 1999, **80** : 7
- [15] Jackson M, Mantsch H H. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 1995, **30** : 95
- [16] Shi H, Xiong L, Yang K Y, et al. Journal of Molecular Structure, 1998, **446** : 137
- [17] Byler D M, Brouillette J N, Susi H. Spectroscopy, 1986, **3** : 29
- [18] Macdonald G M, Barry B A. Biochemistry, 1992, **31** : 9848
- [19] Fawcett T G, Bermardicci E E, Krogh Jespersen K, et al. J. Am. Chem. Soc., 1980, **102** : 2598