

Cu²⁺与烟草多酚氧化酶相互作用研究

肖厚荣 施春华 夏炳乐 盛良全 张艳鸽 刘清亮*

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

本文通过酶活性测定, 荧光光谱和紫外光谱研究了外加 Cu²⁺与烟草多酚氧化酶(简称 PPO)的相互作用。结果表明, 微量铜的加入能增加酶的活性, [Cu²⁺]/[PPO] 为 0.20 左右时酶活性最大, [Cu²⁺]/[PPO] 为 0.91 时, Cu²⁺开始表现出对 PPO 活性的抑制; Cu²⁺对 PPO 内源荧光的猝灭机制属于形成络合物所引起的静态猝灭, 猝灭常数 K_s 为 $8.0375 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; Cu²⁺的加入使 PPO 蛋白质分子构象发生变化, α -螺旋含量增加, 多肽链及 Trp 和 Tyr 残基的芳香环进一步向分子内收缩, 疏水基团之间的疏水作用增强。

关键词: 铜 多酚氧化酶 荧光光谱 紫外光谱
分类号: O614.121

多酚氧化酶(简称 PPO)是一类广泛存在于植物体内的含铜氧化还原酶(EC 1.10.3.1)。它们的共同特征是通过分子氧催化酚类物质氧化成醌, 随后发生醌的聚合而棕色化。由于它与很多农产品及工业原料的加工、贮藏等密切相关, 并影响其品质和色泽, 因此, PPO 很早就引起了人们的注意, 并对它进行深入细致的研究。多酚氧化酶不但在烟草的整个生长过程中担当着重要的角色, 而且影响着烟叶的颜色和香吃味, 所以对烟草多酚氧化酶的研究有重要的应用前景。对酶分子进行激活与抑制研究, 是人们开发利用酶蛋白的基础工作, 也是研究催化作用机理的重要手段。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、结构和所处微环境及其分布情况、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与生物大分子相互作用的有关数据^[1-4]。紫外可见光谱是研究无机离子(特别是过渡金属离子)与蛋白质相互作用的又一重要手段。在蛋白质分子中, 生色基团有各种微环境。微环境的性质是由蛋白质分子构

象所决定的, 构象改变, 则微环境随之改变; 微环境改变, 则生色团的紫外可见吸收光谱亦随之改变。因此, 只要测出生色团紫外吸收光谱的变化, 就可以了解微环境的变化, 从而推断因金属离子扰动而引起的蛋白质分子在溶液中的构象变化。铜形成天然多酚氧化酶活性中心, 研究外加 Cu²⁺与 PPO 的相互作用, 无论是从应用还是从理论角度, 都具有一定的意义。本文综合运用酶活性测定、荧光光谱、紫外光谱, 研究外源 Cu²⁺与烟草多酚氧化酶的相互作用。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

硫酸铜, 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 (C₅₀), DEAE-Sephadex (A₅₀), Sephadex (G₇₅)均购自瑞典 Pharmacia 公司; 二次蒸馏水; M-850 型荧光分光光度计, Shimadzu UV-260 型分光光度计, pHs-10A 数字酸度/离子计, 微量注射器, Finn timer 可调式移液器等; 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.), 1000mL 梯度混合器(上海西巴琪生物技术开发公司),

收稿日期: 2002-12-10。收修改稿日期: 2003-03-03。

国家自然科学基金资助项目(No. 30270321)。

* 通讯联系人。E-mail: qliu@ustc.edu.cn; Tel: 0551-3603214(O), 3602052(H)

第一作者: 肖厚荣, 男, 39 岁, 博士, 副教授; 研究方向: 酶蛋白科学研究。

HD-21-88 蛋白核酸检测仪。

1.2 实验方法

1.2.1 酶的提取与纯化^[5]

从田间采集由青变黄烟叶 (KY-46, 大田生长 96d, 中部, 青黄各占叶表面 50% 左右), 洗净后切碎, 用食品搅拌机粉碎, 加预冷 (-18°C) 丙酮, 浸泡过夜; 六层纱布过滤, 滤渣置冰柜中阴干, 再次粉碎至 120 目以下, 加入到 $\text{pH } 7.5, 50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液中 (其中含 $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cys, $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Polyvinylpyrrolidone), 六层纱布过滤, 滤液经 $4000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心; 向上清液加硫酸铵至饱和度 35%, 静置 6h, 离心弃沉淀, 继续加硫酸铵至饱和度 80%, 离心收集沉淀; 沉淀用 Tris 缓冲液溶解后, 经透析除盐后上 DEAE-Sephadex (A_{50}) 柱层析, 收集其中第二个活性峰, 分别经 Sephadex (G_{75})、CM-Sephadex (C_{50}) 柱层析, 活性部分浓缩除盐。经 PAGE 电泳, 呈单一染色带。测定 PPO 分子量和除盐后酶液蛋白质含量。

1.2.2 储备液的配制

配制 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液 (内含 $100\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $\text{pH } 7.0$); 然后用该 Tris 缓冲液将纯化后的 PPO 稀释至 $4.0 \times 10^{-6}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用二次蒸馏水配制 CuSO_4 溶液至 $1.0 \times 10^{-2}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 实验步骤

1.2.3.1 外源 Cu^{2+} 对 PPO 活性影响

取 $10\mu\text{L}$ 酶液, 加入不同量的 CuSO_4 溶液, 25°C 下作用 30min, 再加入 $3\text{mL } 0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二酚 (Tris 缓冲液配制), 30°C 下保温 10min。然后测 420nm 处的吸光度。

1.2.3.2 荧光滴定

移取 $4\text{mL } 4.0 \times 10^{-6}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PPO 于 1cm 石英比色池中, 用微量注射器 (范围: $1 \sim 5\mu\text{L}$) 逐次加入 $3.2\mu\text{L } \text{Cu}^{2+}$ 的溶液进行荧光滴定, 每次加入溶液后混合均匀, 在 30°C 下作用 10min, 以 282nm 为激发波长, 在 M-850 型荧光分光光度计 (Shimadzu, Japan) 上记录 $300 \sim 500\text{nm}$ 波长范围内的发射光谱。

1.2.3.3 同步荧光测定

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} 之间的波长差 $\Delta\lambda$, $\lambda_{\text{em}} = \lambda_{\text{ex}} + \Delta\lambda$, 分别在 $\Delta\lambda = 20\text{nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 下测定纯 PPO 以及 PPO 与 Cu^{2+} 不同物质的量比情况下的发射峰

强度及峰位。

1.2.3.4 外源 Cu^{2+} 对 PPO 紫外光谱影响

移取 $4\text{mL } 4.0 \times 10^{-6}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PPO 于 1cm 石英比色池中, 用微量注射器 (范围: $1 \sim 5\mu\text{L}$) 或可调式移液器逐次加入 $3.2\mu\text{L}$ 或其整数倍的 Cu^{2+} 溶液, 每次加入溶液后混合均匀, 在 30°C 下作用 10min, 以相应浓度 CuSO_4 溶液 (用 Tris 缓冲液 (内含 $100\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $\text{pH } 7.0$) 配制) 为参比, 在 Shimadzu UV-260 型分光光度计上记录 $200 \sim 500\text{nm}$ 范围内吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 外源 Cu^{2+} 对 PPO 活性的激活与抑制

当加入微量铜时, 能增加酶活性, 继续加入外源铜时, 酶活性则反而下降 (见图 1), 结果与有关文献报道一致^[6,7]。从图上可以看到, 当 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{PPO}]$ 为 0.2 左右时, PPO 活性最高。这表明, PPO 活性增加不是由于外源 Cu^{2+} 与 PPO 结合而引起的构象变化使之更加亲合底物分子所引起的, 而可能是外源 Cu^{2+} 与部分脱金属的酶进行重组, 或外源 Cu^{2+} 与抑制活性的小分子结合, 解除抑制作用; 高浓度的 Cu^{2+} 使酶蛋白部分变性, 从而引起酶活性下降。

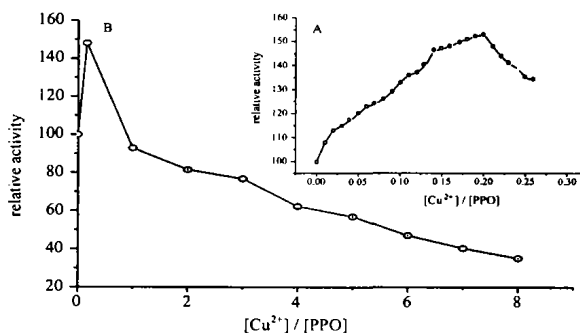


图 1 铜对多酚氧化酶活性的影响

Fig. 1 Effect of Cu^{2+} on the activity of polyphenol oxidase

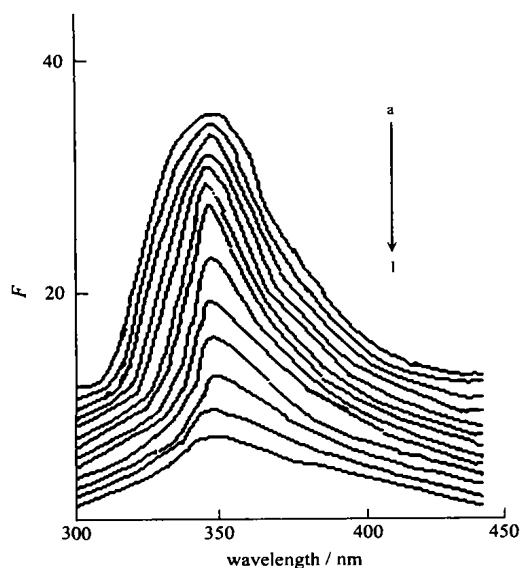
2.2 外源 Cu^{2+} 对 PPO 荧光的影响

用 Cu^{2+} 溶液滴定 PPO, 其 343nm 处的荧光发射峰被猝灭, 见图 2。

若将 Cu^{2+} 对 PPO 荧光的猝灭归因于分子碰撞引起的动态猝灭, 按照 Stern-Volmer^[8] 方程:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [\text{Cu}^{2+}]_i = 1 + K_{sv} [\text{Cu}^{2+}]_i \quad (1)$$

式中: K_q 为双分子猝灭过程速率常数, τ_0 为猝灭剂不存在时物质的荧光寿命, K_{sv} 为动态猝灭常数, 显

图2 外源 Cu^{2+} 对 PPO 荧光光谱的影响Fig. 2 Effect of Cu^{2+} on the fluorescence spectra of polyphenol oxidase

$[\text{PPO}] = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

$\lambda_{\text{ex}} = 282 \text{ nm}$ (30°C, pH 7.0);

Cu^{2+} concentration: a: 0, b: $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

c: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, d: $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

e: $1.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, f: $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

g: $2.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, h: $2.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

i: $3.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, j: $3.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

k: $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, l: $4.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

m: $4.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

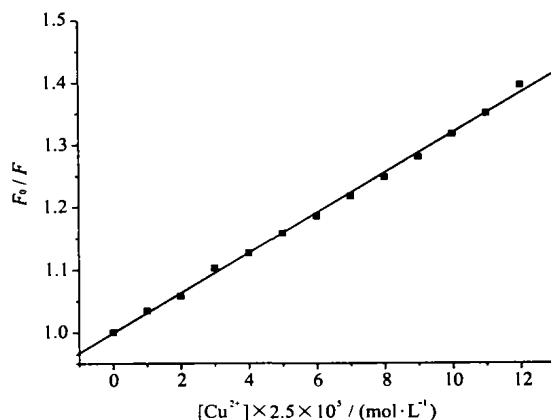
然有 $K_{\text{sv}} = K_q \tau_0$, $[\text{Cu}^{2+}]_i$ 即猝灭剂的浓度。由于滴定时 Cu^{2+} 的累积体积为 $38.4 \mu\text{L}$, 远小于 4 mL PPO 的体积, 可忽略滴定过程中的体积变化。以 F_0/F 对 $[\text{Cu}^{2+}]_i$ 绘图, 得到图 3。

由图 3 可以求出 $K_{\text{sv}} = 8.0375 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 由于生物大分子荧光平均寿命大约为 10^{-8} s ^[9], 因而可以求得 K_q 为 $8.0375 \times 10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 而各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[10]。显然, Cu^{2+} 对 PPO 荧光猝灭的过程速率远大于扩散控制的 K_q , 由此可以看出, 猝灭过程可能为形成络合物所引起的静态猝灭, 不是由于分子碰撞所引起的动态猝灭。

2.3 Cu^{2+} 与生色基团的结合情况以及对 PPO 构象的影响

2.3.1 荧光光谱分析

为研究 Cu^{2+} 在不同浓度下对 Trp 和 Tyr 残基微

图3 Cu^{2+} 对 PPO 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线Fig. 3 Stern-Volmer curve on fluorescence quenching of Cu^{2+} with polyphenol oxidase

$[\text{PPO}] = 4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}} = 282 \text{ nm}$ (30°C, pH 7.0), $\lambda_{\text{em}} = 343 \text{ nm}$, $[\text{Cu}^{2+}]_i = 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively.

环境以及 PPO 构象的影响, 我们分别测定了纯 PPO, PPO: Cu^{2+} 为 1:3, 1:12 (物质的量比) 三种情况下的同步荧光。

固定激发和发射的波长差为 60 nm , 令激发波长在 $260 \sim 360 \text{ nm}$ 范围内扫描, 可以得到不同物质的量比时 Trp 荧光光谱 (见图 4(a))。与纯 PPO 溶液的荧光光谱相比, PPO 与 Cu^{2+} 物质的量比为 1:3, 1:12 两种情况下, 荧光峰的位置略有变化, 从 341 nm 蓝移至 338 nm , 说明 Trp 残基微环境极性逐渐降低。纯 PPO 溶液的荧光光谱与游离 Trp 荧光发射峰相比, 也说明 PPO 中 Trp 残基位于比水的极性小的微环境。Trp 残基荧光强度的下降, 是由于 Cu^{2+} 与 Trp 残基之间存在无辐射能量转移。

当固定 $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ 时, 得到 PPO 中 Tyr 残基的荧光光谱 (见图 4(b))。同游离 Tyr 在中性水溶液中的荧光发射峰相比, 纯 PPO 中 Tyr 残基的荧光发射峰有一定程度的蓝移, 这表明, Tyr 残基位于比水的极性小的微环境。从图中可以看出, Tyr 荧光峰在纯 PPO 溶液、PPO 与 Cu^{2+} 物质的量比为 1:3, 1:12 三种情况下, 荧光峰的位置约从 310 nm 蓝移至 307 nm , 表明 Tyr 微环境极性也是逐渐降低。Tyr 残基荧光峰强度的下降, 由下列两种原因之一或由它们共同引起的: (1) 由于 Cu^{2+} 与 PPO 结合, 引起 PPO 构象变化, 更有利于分子内从 Tyr 残基到 Trp 残基之间发生能量转移; (2) Cu^{2+} 直接猝灭了 Tyr 的

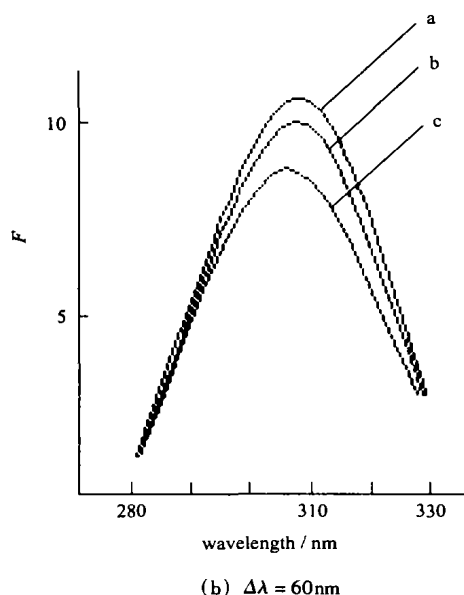
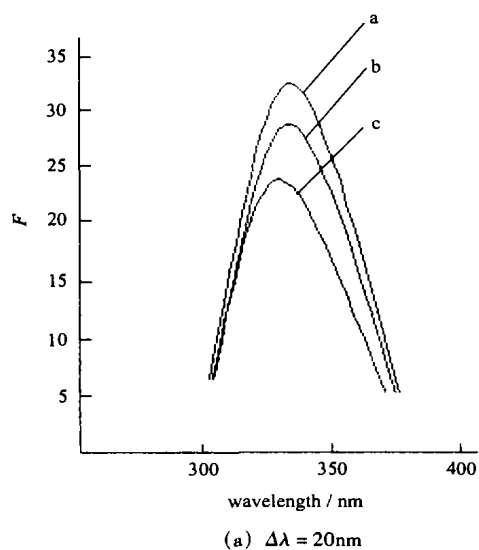
图 4 Cu^{2+} 对 PPO 同步荧光的影响

Fig. 4 Influence of Cu^{2+} on the synchronous fluorescence of polyphenol oxidase

$[\text{PPO}] = 4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{Cu}^{2+}] = \text{a: } 0$;
b: $12 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; c: $48 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

荧光。

综合图 4, 我们可以看出: (1) 外源铜的加入使 PPO 的构象发生了变化, Trp 残基和 Tyr 残基的微环境极性均减小; (2) 外源铜对 Trp 残基和 Tyr 残基的荧光均有猝灭作用, 但机制可能不同。 Cu^{2+} 对 Trp 残基荧光的猝灭, 是由于 Cu^{2+} 与 Trp 残基间的无辐射能量转移, Cu^{2+} 对 Tyr 残基荧光的猝灭, 当 Tyr 位于 PPO 分子表面时, 其机制与 Cu^{2+} 对 Trp 残基荧光猝

灭的机制一样, 当 Tyr 位于分子内部时, 则是由于 Cu^{2+} 与 PPO 分子结合后, 引起 PPO 分子构象变化, 导致能量更易于从 Tyr 残基到 Trp 残基的转移所致。

2.3.2 外源 Cu^{2+} 对 PPO 紫外吸收光谱的影响

外源 Cu^{2+} 对 PPO 紫外光谱的影响见图 5。PPO-280nm 的吸收峰是其肽链上 Trp 残基和 Tyr 残基的芳杂环 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的。从图中可以看出, 纯 PPO-280nm 的吸收峰较弱。这表明, 纯 PPO 中疏水基团之间的疏水作用较强。随着外源 Cu^{2+} 浓度的增加, 其 280nm 吸收强度逐渐降低, 说明 Cu^{2+} 与 PPO 结合诱导 PPO 分子发生了类似增加 pH 值所出现的蛋白质肽链收缩现象, 使 Trp 和 Tyr 残基的芳杂环进一步向分子内收缩, α -螺旋含量随之增加^[11], 同时疏水基团之间的疏水作用增强, $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁能量增大, 吸收峰发生紫移^[12]。由此可见, 荧光光谱分析与紫外光谱分析是一致的。

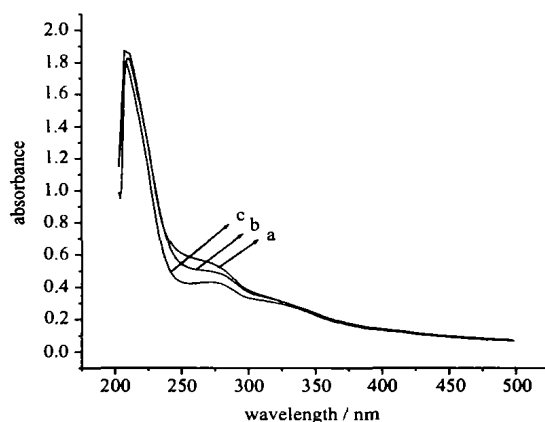
图 5 Cu^{2+} 对 PPO 紫外吸收光谱的影响

Fig. 5 Influence of Cu^{2+} on the UV-Vis spectrum of polyphenol oxidase

$[\text{Cu}^{2+}]/[\text{PPO}]$ is equal to 0:1 for a, 12:1 for b, and 36:1 for c

3 结 论

通过酶活性测定, 荧光光谱和紫外光谱的方法研究了 Cu^{2+} 与烟草多酚氧化酶的相互作用。外源 Cu^{2+} 的加入刚开始对酶活性有提高作用, 本实验条件下, 当 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{PPO}]$ 约为 0.20 左右时酶活性最高, 然后开始下降, 与空白对比, 当 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{PPO}]$ 达到 0.91 时, 外源 Cu^{2+} 对 PPO 表现出抑制作用。外源 Cu^{2+} 对 PPO 普通荧光和同步荧光均有影响, 其作用

机制可能属于形成络合物所引起的静态猝灭; 外源 Cu^{2+} 加入后 Trp 残基和 Tyr 残基的微环境极性均减少; Cu^{2+} 与 PPO 结合后使蛋白质肽链收缩, α -螺旋含量有所增加。

参 考 文 献

- [1] YU Tian-Zhi(俞天智), TAO Zu-Yi(陶祖贻) *Guangpuxue Yu Guangpufenxi (Spectroscopy and Spectral Analysis)*, **1999**, **19**(3), 453.
- [2] YI Ping-Gui(易平贵), LIU Jun-Feng(刘俊峰), SHANG Zhi-Cai(商志才), YU Qing-Sen(俞庆森) *Guangpuxue Yu Guangpufenxi (Spectroscopy and Spectral Analysis)*, **2001**, **21**(6), 826.
- [3] CHOU Ju(仇菊), DU Jiang-Yan(杜江燕), FENG Yu-Ying(冯玉英), YANG Xiu-Juan(杨秀娟), LU Tian-Hong(陆天虹) *Fenxi Huaxue (Chinese Journal of Analytical Chemistry)*, **2001**, **29**(2), 219.
- [4] FENG Xi-Zeng(冯喜增) et al *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chem. J. Chinese Universities)*, **1996**, **17**, 866.
- [5] SHI Chun-Hua, DAI Ya, XU Xiao-Long, XIE Yong-Shu, LIU Qing-Liang *Protein Expression and Purification*, **2002**, **24**, 51.
- [6] LI Rong-Lin(李荣林), FANG Hui-Sui(方辉遂) *Chaye (Tea)*, **1998**, **24**(1), 18.
- [7] JIANG Yue-Ming *Food Chemistry*, **1999**, **66**, 75.
- [8] CHEN Guo-Zhen(陈国珍) *Analytical Method with Fluorescence, Second Edition (荧光分析法, 第二版)*, Beijing: Science Press, **1990**, p112.
- [9] Lakavicz J. R., Weber G. *Biochemistry*, **1973**, **12**, 4161.
- [10] LU Ji-Xin(卢继新) *Huaxue Xuebao (Chinese Journal of Analytical Chemistry)*, **1997**, **55**, 915.
- [11] GUO Yao-Jun(郭尧君) *Spectrophotometric Technology and its Application in Biochemistry (分光光度技术及其在生物化学中的应用)*, Beijing: Science Press, **1987**, p230 ~ 231.
- [12] LI Xiao-Jing(李晓晶), WANG Zhi-Qiang(王志强), CHEN Ji(陈继), ZHANG Shu-Gong(张树功) *Yingyong Huaxue (Chinese Journal of Applied Chemistry)*, **1998**, **15**(1), 5.

Study on the Interaction between Cu^{2+} and Polyphenol Oxidase from *Nicotinna Tobaccum*

XIAO Hou-Rong SHI Chun-Hua XIA Bing-Le SHENG Liang-Quan ZHANG Yan-Ge LIU Qing-Liang*
(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

The interaction between Cu^{2+} and PPO(polyphenol oxidase) has been studied by employing enzymatic activity assay, fluorescence spectroscopy and UV/Visible spectroscopy. The results show that the activity of PPO was enhanced by the addition of Cu^{2+} , reaching maximum when $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{PPO}]$ was about 0.20, and then, the inhibition for it was appeared due to the existence of Cu^{2+} . The quenching mechanism of the combination of Cu^{2+} with PPO is a static quenching procedure, the quenching constant K_s is $8.0375 \times 10^3 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$. The conformation of PPO is changed, the α -helix content is increased, the polypeptide chain and the aromatic ring in Trp and Tyr residues are contracted to the inner of molecule, the hydrophobic interaction among hydrophobic groups enhanced after Cu^{2+} was added to it.

Keywords: Cu^{2+} polyphenol oxidase fluorescence spectroscopy UV/Visible spectroscopy