

小麦 Rubisco 活化酶的纯化及其活性特性

李卫芳, 王 忠, 韩 鹰, 顾蕴洁

(扬州大学农学院农学系, 扬州 225009)

摘要: 试验以小麦为材料, 纯化了 Rubisco 活化酶, 经 SDS-聚丙烯酰胺电泳鉴定呈 2 条蛋白质谱带, 分子量为 41 000 和 45 000, 利用¹⁴C 标记法测定并探讨了 Rubisco 活化酶的活性, 并发现 Rubisco 活化酶在纯化和储藏过程中都需要 ATP 以稳定其活性。

关键词: 小麦; Rubisco 活化酶; ATP

Purification and Activity Characteristics of Rubisco Activase from Wheat Leaves

LI Wei-fang, WANG Zhong, HAN Ying, GU Yur-jie

(Department of Agronomy, Agricultural College of Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: In this paper, Rubisco activase was separated, purified from wheat leaves and showed two predominant bands at 41 000 and 45 000 presented by SDS-PAGE; Rubisco activase activity was determined and studied by ¹⁴C marking method and it was found that ATP is needed to stabilize its activity during purification and storage.

Key words: Wheat; Rubisco activase; ATP

Rubisco(1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶)存在于所有光合生物中,既能催化光合作用中的碳还原,又能催化光呼吸作用中的碳氧化^[5],对整个光合作用起着重要的调节作用,但是 Rubisco 只有处于活化状态时才具备有上述催化功能。在体外, Rubisco 的活化过程是一个依赖于一定 pH 值,并与活化分子 CO₂、Mg²⁺ 结合的过程;而在体内由于高浓度底物 RuBP 与非氨基甲酰化的 Rubisco 紧密结合,阻止了 Rubisco 的氨基甲酰化作用,再者,体内 CO₂ 浓度、pH 值等生理因子都不能满足体外活化所需要的条件,因此用 Rubisco 的体外活化机制来解释 Rubisco 体内活化过程是远远不够的。1985 年, Salvucci 等^[9]发现植物体内存在着一种促进 Rubisco 活性的酶,称之为 Rubisco 活化酶(Rubisco activase)。经过多年研究,现在人们普遍认为 Rubisco 活化酶活化 Rubisco 是最大限度地产生 Rubisco-CO₂-Mg²⁺ 形式的 Rubisco,即 Rubisco 活化酶克服了

其与磷酸糖类物质结合的不利效应,并且降低了催化氨基甲酰化所需要的 CO₂ 浓度而促进了 Rubisco 的活性。但是,有关 Rubisco 活化酶的理化特性、活化机理和调节因素至今还没有完全阐明,以往有关 Rubisco 活化酶的研究材料多以菠菜、拟南芥、烟草、水稻为主,小麦 Rubisco 活化酶的研究在国内外尚属空白。本试验以小麦为试验材料,摸索并建立了 Rubisco 活化酶的快速纯化和活性测定的方法,并对其活性作了一些探讨,为进一步研究 Rubisco 活化酶的生理特性和活性调节奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选用扬麦 5 号(*Triticum aestivum* L. CV Yang mai 5)于田间种植。ATP、PEP、Leupeptin、Benzamidine、PMSF、pyruvate kinase 及 RuBPNa₄ 盐均为 Sigma 公司产品,DEAE-TOYOPEARL 650 M

收稿日期:2001-08-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870463),江苏省自然科学基金项目(BK2001147)和中国科学技术大学博士生基金项目(99-231)

作者简介:李卫芳(1971-),女,安徽合肥人,博士,讲师,主要从事植物生理生化研究。Tel:0551-3601442; E-mail:liwf@ustc.edu.cn

为日本 Tosoh 公司产品。

1.2 Rubisco 的纯化、鉴定和活性测定

按李卫芳等^[1]的方法,将小麦鲜叶匀浆后通过 40%~55%饱和硫酸铵盐析,脱盐后再上 DEAE-纤维素阴离子交换柱,用 NaCl 0~0.5 mol/L 梯度洗脱,收集蛋白质峰。分别采用凝胶电泳和紫外光谱法进行纯度鉴定,用¹⁴C 同位素法测定其活性。

1.3 Rubisco 活化酶的纯化

取 100g 小麦叶片,经液氮冷冻研磨成粉末,加入 250 ml Rubisco 活化酶提取液(50 mmol/L HEPES-KOH pH 7.0, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl₂, 0.4 mmol/L ATP, 15 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L Benzamide, 0.01 mmol/L Leupeptin, 2g 可溶性 PVP), 叶片匀浆后, 29 000g 离心 30 min, 上清液用(NH₄)₂SO₄(pH 7.0)盐析,取 20%~35%的蛋白质段,沉淀用 5 ml 含 35%饱和(NH₄)₂SO₄的缓冲液 I (20 mmol/L HEPES-KOH pH 7.0, 0.4 mmol/L ATP, 10 mmol/L DTT, 100 mmol/L KCl)悬浮, 10 000g 离心 10 min 后,沉淀再用 3 ml 不含(NH₄)₂SO₄的缓冲液 I 溶解,离心,经 Sephadex G-25(1.5cm×20cm)脱盐,用缓冲液 I 平衡和洗脱,收集到的蛋白质峰部分上 DEAE-阴离子交换柱(DEAE-TOYOPEARL-650 M, 1.5cm×20cm),先用 30 ml 缓冲液 II (20 mmol/L HEPES-KOH pH 7.0, 4 mmol/L DTT)洗脱,然后用 60 ml 含 0~0.5 mol/L KCl 的缓冲液 II 梯度洗脱。洗脱速度为 1 ml/min, 每 1 ml 收集一管,蛋白质峰进行纯度鉴定和活性测定,得到的蛋白质峰加 ATP 至 1 mmol/L,置液氮中保存。试验在(0~4℃下进行)。

1.4 Rubisco 活化酶的纯度鉴定

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[11]方法。12.5%分离胶,4.5%浓缩胶,0.1%SDS 在 1 mm 厚的胶板上 15 mA 电流电泳 5~6 h。用含 0.1%考马斯亮兰的水:甲醇:冰醋酸(5:5:2)混合液染色,7.5%冰醋酸和 5%的甲醇混合液脱色。

1.5 Rubisco 活化酶活性测定

Rubisco 活化酶的活性测定用¹⁴C 标记法测定。测定过程:(1)形成 ER 复合物(Rubisco-RuBP)。将纯化的 Rubisco 上一根 1 cm×20 cm 的 Sephadex-G50 柱,用缓冲液(Tris-HCl 100 mmol/L, EDTA 0.2 mmol/L, pH 8.0)平衡、洗脱,除去 Mg²⁺、CO₂,让酶充分失活,在收集的 Rubisco 峰中加入 RuBP(终浓度为 0.5 mmol/L RuBP),25℃保温 1 h,以形成 ER 复合物,使 Rubisco 钝化;(2)由 Rubisco 活化酶活化

Rubisco(ER)。在活化液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L MgCl₂, 4 mmol/L RuBP, 1 mmol ATP, 1 mmol/L PEP, 20 IU/ml 丙酮酸激酶)中加入 ER 复合物(浓度为 1 mg/ml)和 Rubisco 活化酶(浓度设计为 50 μg/ml 和 100 μg/ml)。活化酶要在 ER 加入前 0.5 min 加入反应液,活化温度为 25℃;(3)测 Rubisco 活性的增加值。在 ER 加入反应液后,在 0.1、2、3、4、...(min)各时间点取 50 μl 反应液加到 450 μl Rubisco 活性测定液中(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L NaH¹⁴CO₃ (0.2 Ci mol⁻¹), 10 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L RuBP)反应 1 min 后,加入 200 μl 1 mol/L HCl 终止反应。样品 65℃烘干后,加入 4.5 ml 闪烁液(4g PPO, 40 mg POPOP, 甲苯 600 ml, 乙醇 400 ml),用 LS-9800 液体闪烁仪计数。

1.6 蛋白质含量的测定

纯化的 Rubisco 和 Rubisco 活化酶采用紫外分光光度法测定,粗蛋白采用 Folin-酚试剂法测定,以牛血清蛋白作标样^[3]。

2 结果与分析

2.1 Rubisco 活化酶的纯化

匀浆、离心后的上清液经 20%~35%的(NH₄)₂SO₄盐析,除去了色素蛋白、Rubisco 等大量杂蛋白,经 DEAE-纤维素梯度洗脱后,有 2 个洗脱峰,其中在 KCl 浓度达 0.3 mol/L 的第 2 个洗脱峰的 Rubisco 活化酶含量较高(图 1)。所得样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,呈现 41 000 和 45 000 两条蛋白质谱带(图 2),含其它杂蛋白极少,说明小麦 Rubisco 活化酶与菠菜、水稻(具有 41 000 和 45 000 两条多肽)相似,不同于烟草、玉米(只有 41 000 一条多肽)。从小麦叶片中分离 Rubisco 活化酶的步骤和效果如表所示。Rubisco 活化酶经该方法被纯化了 28 倍,回收率达 53%。

2.2 Rubisco 活化酶的活性

2.2.1 Rubisco 活化酶的活性测定 Rubisco 活化酶的活性测定是依据在 RuBP 生理浓度条件下, Rubisco 活化酶促进 Rubisco 的能力来测定的(图 3)。未活化的 Rubisco 加入含 CO₂、Mg²⁺的介质后,活性含 10 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L MgCl₂ 的活化液中活化 10 min,它的活性仍然极小,说明在体内条件下 Rubisco 自发活化的可能性很少。当加入 Rubisco 活化酶后,这种无活性的 Rubisco-RuBP 复合物能够很快地恢复活性,且活性的增加与 Rubisco

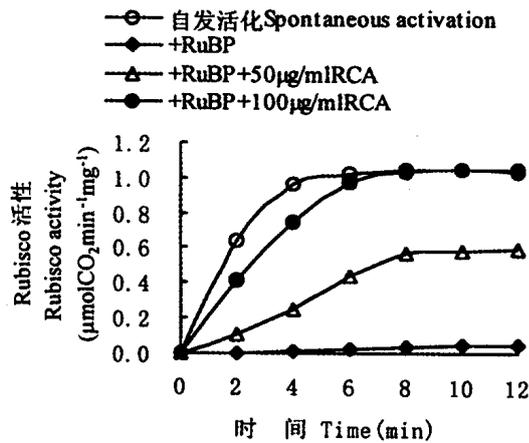


图 1 Rubisco 活化酶在 DEAE-TOYOPEARL-650 M 柱上的梯度洗脱图

Fig.1 The gradient elution profiles of Rubisco activase on columns of DEAE-TOYOPEARL-650 M

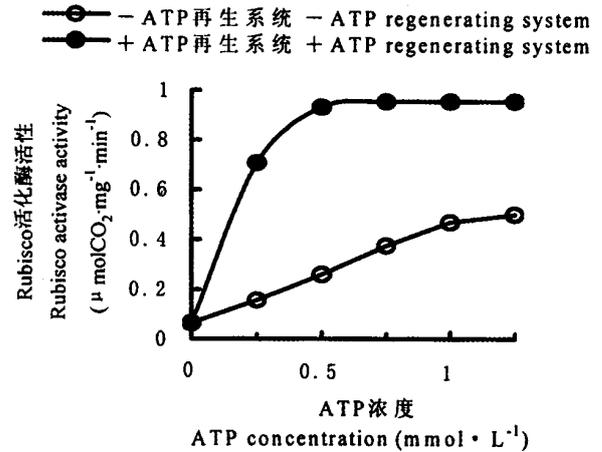
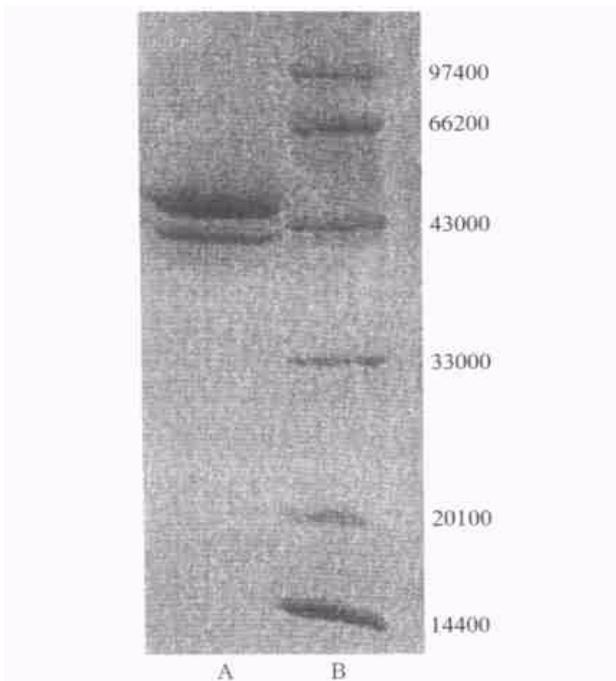


图 3 Rubisco 活化酶(RCA)对 Rubisco RuBP 的活化作用

Fig.3 Activation of Rubisco activase(RCA) on Rubisco RuBP



A: 纯化的 Rubisco 活化酶谱带

B: 标准蛋白质谱带

A: The purified Rubisco activase

B: Protein molecular weight marker

图 2 Rubisco 活化酶的 SDS- PAGE 图谱

Fig.2 SDS- PAGE fraction of Rubisco activase

因自发活化而显著增加;但若首先加入 RuBP, RuBP 和 Rubisco 结合后, Rubisco 的活性几乎为 0, 即使在活化酶的浓度成正相关, 当 Rubisco 活化酶浓度为 100µg/ml 时, 在测定的第 5~6 min 时, Rubisco 的活性可以恢复 80%, 10 min 时活性达最高, 基本与无 RuBP 的自发活化持平, 之后由于底物 CO₂、ER 的

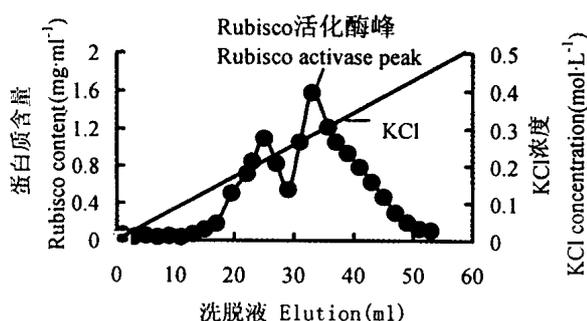
减少, 活化型酶与未活化型酶比例的变化等因素而略呈缓慢下降趋势。因此我们在测定 Rubisco 活化酶活性时, 标准测试液中的 Rubisco RuBP 复合物和 Rubisco 活化酶的浓度都设定为 100µg/ml, 用 Rubisco 活性增加的初始速率来表示活化酶活性, 把酶活力单位定义为每分钟增加的 Rubisco 比活性为 1µmol CO₂/min·mg Rubisco。经纯化的小麦 Rubisco 活化酶活性可以达到 2~3 个酶活力单位(表)。
2.2.2 Rubisco 活化酶对 ATP 的依赖 Rubisco 活化酶活性依赖于 ATP 的存在, 而被 ADP 抑制^[10]。因此在活性测定过程中需加入 ATP 再生系统 (1 mmol/L PEP, 20IU/ml 丙酮酸激酶), 以维持 ADP 至最低浓度水平, 从而减少 ADP 对 Rubisco 活化酶的抑制作用。我们在 ATP 过量而不加 ATP 再生系统的情况下也测得了活化酶的活性, 但在相同活化时间、相同 ATP 浓度下, 该活性比存在 ATP 再生系统情况下要小(图 4)。有 ATP 再生系统时, ATP 浓度达 0.5 mmol/L 时, 就趋于饱和。无 ATP 再生系统时, 在 ATP 浓度达 1 mmol/L 以前 Rubisco 活性呈线性增长, 但最终仍达不到具有再生系统的 Rubisco 活性。

唐如航等^[2]报道 ATP 对纯化的 Rubisco 活化酶的储藏有很大影响。我们将提纯的小麦 Rubisco 活化酶保存于液氮中, 发现不加 ATP 时, Rubisco 活化酶活性下降很快, 24h 后检测基本无活性; 加入 0.5 mol/L ATP, 24h 后检测其活性仍有 70%; 加入 1.0 mol/L ATP, 24h、36h 后分别检测, 其活性基本无变化。为此我们建议提纯的 Rubisco 活化酶应立即加入 ATP 至 1.0 mol/L, 置液氮中保存。

表 小麦叶片中 Rubisco 活化酶的纯化

Table Purification of Rubisco activase from wheat leaves

| 纯化步骤 Purification step | 总蛋白 Total protein (mg) | 总活力 Total activity (units) | 比活力 Activity (units/mg) | 回收率 Recovery (%) | 纯化倍数 Purification (fold) |
|--|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 匀浆 Homogenate | 1 015 | 91 | 0.089 | 100 | 1.0 |
| 20% ~ 35% (NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析 Ammonium sulfate salting out | 70 | 90 | 1.29 | 99 | 15 |
| DEAE-纤维素柱层析 DEAE-TOYOPEARL-650 M chromatography | 19 | 48 | 2.5 | 53 | 28 |



Rubisco RuBP 复合物、Rubisco 活化酶浓度均为 0.1 mg/ml, Rubisco 活化酶加入后 10 min 测定其活性

The concentration of Rubisco RuBP compound and Rubisco activase were all 0.1 mg/ml, each activity assay was tested 10 min after adding rubisco activase

图 4 再生系统对 Rubisco 活化酶活性的影响

Fig. 4 The effects of ATP regenerating system on activation of rubisco activase

3 讨论

3.1 Rubisco 活化酶的纯化

Salvucci 等^[9]最早采用分子筛从菠菜叶绿体中纯化 Rubisco 活化酶,得率仅 36%,且周期长,易造成酶失活。后来 Robinson 等^[7]发现 Rubisco 活化酶可在 35% 的饱和硫酸铵下完全沉淀,于是采用经硫酸铵盐析和 FPLC-MonoQ 离子交换从液氮研磨的叶子干粉提纯了菠菜的 Rubisco 活化酶,但这种方法因样品仅通过 1 次 Sephadex G50 柱脱盐,流出液粘度大,易使 MonoQ 柱堵塞,对 FPLC-MonoQ 柱子寿命影响很大。唐如航等^[2]增加了 DEAE-Sephacel 阶段洗脱,有效地吸附了一些核酸、色素及杂蛋白,回收率达 67%。FPLC 分离的效率虽高,但仪器昂贵,一般实验室难以支付,而离子交换柱法纯化酶蛋白是生化中常用的方法,翁晓燕等^[4]采用 DEAE-Cellulose 柱,并用不同饱和度硫酸铵沉淀法,发现经 20% 饱和度的硫酸铵沉淀后,可基本除尽 100 000 左右的蛋白(主要为叶绿素蛋白部分)。因此,采用

20% ~ 35% 硫酸铵盐析,用 DEAE-Cellulose 和 MonoQ 连用,纯化了水稻 Rubisco 活化酶,回收率为 30% 左右。我们根据本实验室的条件采用液氮研磨,20% ~ 35% 硫酸铵盐析, G-25 柱脱盐,再上 DEAE-TOYOPEARL-650 M 柱梯度洗脱,纯化了小麦的 Rubisco 活化酶,收集的蛋白质峰经 SDS-PAGE 分析,仅呈 41 000 和 45 000 两条谱带,得率为 53%,该方法因步骤简单,缩短了纯化时间(仅需 15 h),减少了蛋白质的丢失和酶的失活,从而提高了酶的回收率。

3.2 小麦 Rubisco 活化酶的特性

体外试验表明, Rubisco 活化酶可以活化因 RuBP 紧密结合而不能自发活化的 Rubisco 的活性。据 Portis 等研究发现^[6]在 H⁺、Mg²⁺ 生理浓度下,离体 Rubisco 达 1/2 最大活化值所需要的 CO₂ 浓度为 23 ~ 40 μmol/L(依该值计算,在大气 CO₂ 浓度且无 RuBP 的条件下仅约 20% 的 Rubisco 活化位点被氨基甲酰化),而当 Rubisco 活化酶和 RuBP 共同存在下,其值降低了 4 倍多至 4 μmol/L(即相当于在大气 CO₂ 浓度下,约有 70% ~ 90% 的 Rubisco 活化位点被氨基甲酰化)。因而植株体内 Rubisco 活化酶的存在,有效地保证了 Rubisco 能在体内生理条件下处于高度的活化状态。

小麦 Rubisco 约占叶片可溶性蛋白的 50%^[1], Rubisco 活化酶约占 2%(表),两者质量比为 25:1,而 Rubisco、Rubisco 活化酶的摩尔分子量分别为 550 000 和 200 000^[9],表明两者在体内的分子比率为 9:1,即每一个 Rubisco 活化酶要同时与几个 Rubisco 全酶反应,并轮流激活它们。但是由于至今仍未分离到 Rubisco 活化酶和天然 Rubisco 的双重复合体,有关蛋白质与蛋白质相互作用的区域也没有被明确,因此 Rubisco 活化酶和 Rubisco 相互作用的具体过程还有待进一步阐明。

我们在测定 Rubisco 活化酶活性时,发现缺乏 ATP 再生系统时, Rubisco 活化酶的活性降低,说明

Rubisco 活化酶对 Rubisco 的活化依赖于 ATP,其机理可能为:在有 RuBP 存在下,Rubisco 的活化需要 ATP 水解以供给能量。据 Robinson^[8]报道,纯化的 Rubisco 活化酶具有 ATP 水解酶的功能,可以达到 $1.5\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 蛋白质,同时释放等量的 ADP 和 P_i ,表明 ATP 的水解是 Rubisco 活化酶的一个重要性质。有关 Rubisco 活化酶在纯化、保存过程中对 ATP 的需求,可能是由于 ATP 对 Rubisco 活化酶构象的维持起着必不可少的作用,至于 ATP 的具体机理也还有待于作进一步的探讨。

References

- [1] Li W F, Yao X Q, Wang Z. Purification, identification and activity measurement of Rubisco in wheat. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2001, 29(2): 146 - 148. (in Chinese)
李卫芳,姚晓群,王忠. 小麦 Rubisco 的纯化、鉴定及其活性测定. *安徽农业科学*, 2001, 29(2): 146 - 148.
- [2] Tang R H, Jia W J, Li L R. Purification and characterization of Rubisco activase from tobacco. *Acta Photophysiological Sinica*, 1997, 23(1): 89 - 94. (in Chinese)
唐如航,贾军伟,李立人. 烟草 Rubisco 活化酶的纯化及其特性. *植物生理学报*, 1997, 23(1): 89 - 94.
- [3] Wang J Z, Fan M. *The Protein Technical Manual*. Beijing: Science Press, 2000: 39 - 51. (in Chinese)
汪家政,范明. 蛋白质技术手册. 北京:科学出版社, 2000: 39 - 51.
- [4] Weng X Y, Jiang D A. Purification of Rubisco activase from rice. *Journal of Zhejiang Agriculture University*, 1999, 25(3): 263 - 266. (in Chinese)
翁晓燕,蒋德安. Rubisco 活化酶的提取和纯化. *浙江农业大学学报*, 1999, 25(3): 263 - 266.
- [5] Mizioro H M, Lorimer G H. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Ann. Rev. Biochem.* 1983, 52: 507 - 511.
- [6] Portis A R Jr, Salvucci M E. Activation of Rubisco at physiological CO_2 and ribulose bisphosphate concentrations by Rubisco activase. *Plant Physiol.* 1986, 82: 967 - 971.
- [7] Robinson S P, Streusand V J, Chatfield J M. Purification and assay of Rubisco activase from leaves. *Plant Physiol.* 1988, 88: 1008 - 1014.
- [8] Robinson S P, Portis A R. Adenosine triphosphate hydrolysis by Rubisco activase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 268: 93 - 99.
- [9] Salvucci M E, Weneke J M, Orger W L, Portis A R Jr. Purification and species distribution of Rubisco activase. *Plant Physiol.* 1987, 84: 930 - 936.
- [10] Streusand V J, A R Portis J R. Rubisco activase mediates ATP-dependent activation of ribulosebisphosphate carboxylase. *Plant Physiol.* 1987, 85: 152 - 154.
- [11] Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969, 244: 4406 - 4412.

欢迎订阅

《作物学报》是中国科协主管,中国作物学会主办的学术刊物。刊载农作物遗传育种耕作栽培、生理生化、生态、种质资源、谷物化学、贮藏加工以及与作物有关的生物技术、生物数学、生理物理等学科具基础理论或实践应用性的学术报告、专题研究报告、研究简报等。双月刊。大 16 开,每期 148 页,定价 26 元/册。国内外公开发行人,全国各邮局均可订阅。国内统一刊号;CN11-1809/S,邮发代号;82-336,国外刊号;BM445,国际标准刊号:ISSN 0496-3490。编辑部地址:北京市中关村南大街 12 号中国农业科学院作物育种栽培研究所《作物学报》编辑部;邮政编码:100081,电话:(010)68918548,传真:(010)68975212;E-mail:xbzw@chinajournal.net.cn。

《中国水稻科学》为中国水稻研究所主办的全国性、学术性刊物,主要报道以水稻为研究对象的未经发表的原始论文。所设栏目包括研究报告、研究简报、研究简讯、实验技术、学术专论、文献综述等。读者对象为国内外从事水稻科研、教学、生产和管理的有关人员。2003 年为季刊,大 16 开本,96 页,国内外公开发行人。每期定价 10.00 元(全年 40.00 元),邮发代号 32-94,国外代号 Q6533。读者可在各地邮局订阅,也可向编辑部订阅。编辑部地址:浙江省杭州市体育场路 359 号中国水稻研究所内,邮政编码:310006。电话:03571-63370278, E-mail:cjrs@fy.hz.zj.cn。