

应用荧光光谱法研究植物 LEA3 蛋白 11-氨基酸基序的保护功能

刘 昀¹, 邓银霞¹, 张玉芹¹, 徐 宏², 郑易之^{1*}

1 深圳大学生命科学学院, 深圳市微生物基因工程重点实验室, 广东 深圳 518060

2 深圳大学化学与化工学院, 广东 深圳 518060

摘 要 胚胎晚期富集蛋白 (late embryogenesis abundant, LEA) 是增强生物抵抗干旱、低温和盐渍等多种胁迫的重要功能蛋白, 但其保护机理仍不清楚。本文利用紫外光谱法证实, 含多拷贝 11-氨基酸基序的多肽 (如 PM2D 和 PM2E) 可较好的保护经冻融的乳酸脱氢酶 (LDH) 活性。进一步通过荧光光谱法证实, 含多拷贝 11-氨基酸基序的多肽可通过多位点协同结合模式, 稳定 LDH 酶的结构。而含低拷贝 11-氨基酸基序的多肽 (如 PM2F 和 PM2G) 与 LDH 酶只有一种结合位点, 二者的结合强度较弱, 因而不能表现出对 LDH 酶活性的保护作用。此外, 含多拷贝 11-氨基酸的多肽与海藻糖在保护 LDH 酶活性上存在协同作用, 且二者有着不同的保护机理。

关键词 紫外光谱; 荧光光谱; 胚胎晚期富集蛋白; 11-氨基酸基序; LDH 酶保护作用

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)06-1579-06

引 言

胚胎晚期富集蛋白 (late embryogenesis abundant, LEA) 与生物抵抗多种非生物胁迫 (干旱、高盐和低温) 的能力密切相关。LEA 蛋白一般分为 7~9 组^[1]。其中第三组 LEA 蛋白 (LEA3) 含有高保守、重复的 11-氨基酸基序 (TAQAAGEK-AGE)^[1-4]。LEA3 蛋白广泛分布于植物种子内, 也存在于受干旱、高盐胁迫的植物营养组织中^[1]。大量实验证明, 大麦 HVA1 (LEA3) 基因的导入可提高转基因水稻和小麦对干旱、高盐和低温胁迫的耐受性^[5-7]。生化实验结果证明, 含多拷贝 11-氨基酸基序的多肽可参与对蛋白质 (酶)、DNA 和细胞膜的保护作用, 其保护作用好于含低拷贝 11-氨基酸基序的多肽^[2, 8, 9]。然而, 11-氨基酸基序如何参与生物大分子保护的分子机理仍不清楚。

海藻糖也是一种胁迫保护剂^[10]。过量合成并积累海藻糖的转基因水稻对干旱、盐渍和冷冻胁迫的耐受性明显提高^[11, 12]。Goyal 等进一步证明, LEA 蛋白与海藻糖可协同保护柠檬酸合成酶^[13]。而体外实验结果显示, 如要获得对 LDH 酶同样的保护效果, 海藻糖的需要量要比 LEA 蛋白超

出近万倍^[14]。最近的研究结果表明, 干旱胁迫下过量表达 LEA 蛋白的转基因烟草叶片可保持较好的光合作用能力和较高的水势。而积累海藻糖的转基因植物叶片的光合作用能力和水势呈下降趋势^[15]。这些结果预示 LEA 蛋白与海藻糖对细胞及 LDH 酶的保护机制有差异。

荧光光谱法是研究蛋白质分子构象的一种常用而有效的方法, 荧光分析能够提供许多物理参数, 包括激发光谱、发射光谱以及荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等, 这些参数从不同角度反映出分子的成键、结构以及发光特性。通过对这些参数的测定, 不但可以做一般的定量分析, 而且还可以推断蛋白质分子在各种环境下的构象变化, 从而阐明蛋白质结构与功能之间的关系^[16]。荧光光谱法具有灵敏度高、选择性好、操作方便等优点, 在蛋白质的相互作用研究中应用较为广泛。

大豆 PM2 蛋白 (Genbank 登录号: M80664) 属 LEA3 蛋白^[3], 含 7 个重复的 11-氨基酸基序。本文分别利用紫外光谱法和荧光光谱法比较了含不同拷贝数 11-氨基酸基序的多肽对 LDH 酶活性的保护和酶结构的稳定作用。并进一步分析了含多拷贝 11-氨基酸基序多肽与海藻糖在保护 LDH 酶活性中的协同作用。

收稿日期: 2011-01-21, 修订日期: 2011-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670180), 国家自然科学基金国际合作与交流项目 (NSFC-RS, 30811130217) 和广东省自然科学基金博士启动项目 (8451806001001736) 资助

作者简介: 刘 昀, 1977 年生, 深圳大学生命科学学院讲师 e-mail: sunshine@szu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: yzzheng@szu.edu.cn

1 实验部分

1.1 PM2 系列多肽样品的制备

单拷贝 1F 氨基酸多肽由上海生工合成。以本实验室保存的大豆 PM2 基因为模板, 通过 PCR 扩增, 构建含不同拷贝 1F 氨基酸基序的 pET28a 表达载体, 并转化大肠杆菌。通过亲和层析技术分离纯化含 His 标签的目的多肽。

1.2 用紫外分光光度计法检测 LDH 酶的活性

将 PM2 系列蛋白与 LDH 酶配制成不同摩尔比例(蛋白: LDH = 0: 1, 1: 1, 2.5: 1, 5: 1, 10: 1)的酶混合液。按文献[3]进行冻融处理和酶活性测定。

1.3 荧光光谱实验

1.3.1 荧光光谱对 LDH 酶构象变化的检测

在蛋白质的三个荧光生色团(色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)中, 色氨酸的荧光强度最大。当激发波长大于 290 nm 时, 可以认为荧光仅来自于色氨酸残基。PM2 蛋白不含色氨酸残基。因此, PM2 系列蛋白与 LDH 混合液的发射光谱可认为是 LDH 酶的发射光谱。

将 PM2 系列蛋白与 LDH ($0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 混合(摩尔比为 5: 1)。再将该混合液进行 3 次冻融处理。检测在激发波长为 295 nm 时样品在 300~550 nm 的发射光谱。以冻融前、后的 LDH 酶的发射光谱作为对照。

1.3.2 ANS 荧光标记法对 LDH 酶构象变化的检测

苯胺基萘磺酸(ANS)为特异标记蛋白质疏水基团的荧光探针。当 ANS 荧光探针与蛋白质的疏水基团结合后, 激发波长为 380 nm 时, 可在 460 nm 发射波长处检测到荧光峰值^[14]。本实验将 PM2 系列蛋白与 LDH 酶($0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)按 5: 1 摩尔比混合后冻融 3 次, 加入终浓度为 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ANS。采用荧光分光光度计(F4500, 日本 HITACHI 公司)检测样品。

1.3.3 荧光光谱法研究 PM2 系列多肽与海藻糖稳定 LDH 酶活性的协同作用

将 PM2 系列多肽与 LDH 酶按摩尔比 1: 1 混合, 并添加终浓度为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的海藻糖。冻融 3 次后, 检测 LDH 酶激发波长为 295 nm 时内源荧光强度的变化或加入 ANS 检测其在激发波长为 380 nm 时荧光强度的变化, 与对照组(未加入海藻糖的 PM2 系列蛋白)进行比较。

上述实验重复 3 次, 利用 student's *t* 检验法分析。

2 结果与讨论

大豆 PM2 蛋白由 463 个氨基酸组成, 含 7 个拷贝 1F 氨基酸基序(第 296~379 位)。通过人工合成、大肠杆菌体系表达及纯化分别获得含 1, 3, 7 和 14 拷贝 1F 氨基酸基序的 PM2D, PM2E, PM2F 和 PM2G 多肽[图 1(a)]。SDS-PAGE 电泳检验纯化的目标蛋白均为一条特异条带, 纯度均达 90% 以上(结果未给出)。

2.1 紫外光谱法检测 PM2 系列多肽对冻融的 LDH 酶活性的保护作用

LEA3 蛋白多具有 5 拷贝以上的 1F 氨基酸基序^[1]。遗传学实验证明, 大麦 HVA1(具 6 拷贝 1F 氨基酸基序)蛋白的过表达可改善转基因植物的耐旱能力^[6, 7]。而复苏植物 pcC3-06 蛋白(具单拷贝 1F 氨基酸基序)未能提高转基因烟草的耐旱性^[17]。体外实验也证实, 在 1~8 个拷贝间, 含多拷贝 1F 氨基酸基序的短肽对 LDH 酶的保护效果好于低拷贝的短肽^[13]。本文结果显示, LDH 酶经冻融后的残留酶活仅为 5%。PM2F 或 PM2G 多肽的加入(1: 1, 2.5: 1, 5: 1, 10: 1)均未显示出明显的对 LDH 酶活性的保护作用。而加入 PM2D 或 PM2E(与 LDH 酶摩尔比为 1: 1)时, LDH 的残留酶活分别为 24% 和 20%; 与 LDH 酶摩尔比为 10: 1 时, LDH 的残留酶活均为 80% 左右, 与对照组差异显著。加入 1: 1 的溶菌酶(对照组)后, LDH 残留酶活性仅为 5% 左右[图 1(b)]。

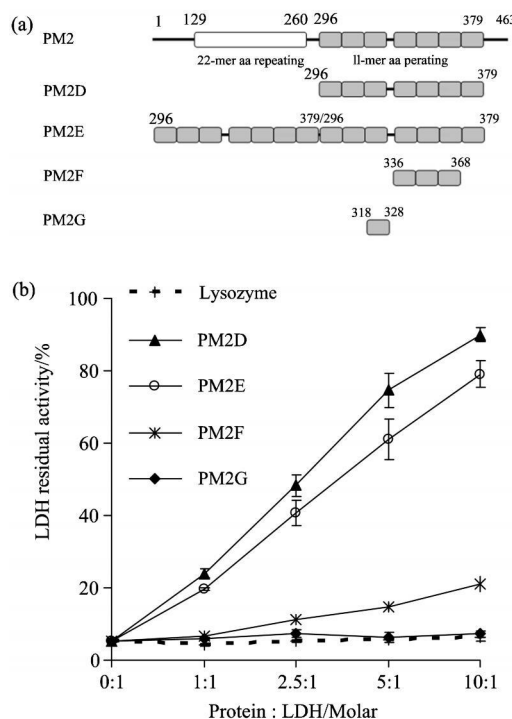


Fig 1 Schematic illustration and protective effect of PM2 protein series on LDH activity from freeze and thaw for 3 times

1: Lysozyme; 2: PM2D; 3: PM2E; 4: PM2F; 5: PM2G

2.2 荧光光谱法研究冻融条件下 PM2 系列多肽对 LDH 酶构象的稳定作用

2.2.1 LDH 酶的内源荧光发射光谱

由图 2(a) 可见, 冻融处理后 LDH 酶的荧光强度显著低于未冻融样品。可以认为, 冻融处理后的 LDH 酶结构受到破坏, 维持其三级结构的疏水键和氢键被破坏, 蛋白结构趋于松散。含荧光生色团的氨基酸大多暴露在溶剂中, 故酶的自发荧光明显减弱。而添加 PM2D 或 PM2E 多肽的 LDH 酶混合液经冻融处理后荧光强度明显高于对照样品(经冻融处理的 LDH 酶)。添加 PM2F 和 PM2G 短肽的 LDH 酶混合液经冻融后的荧光强度仅略高于对照样品。表明 PM2 系列多

肽可不同程度的维持 LDH 酶的高级结构, 其中 7 拷贝和 14 个拷贝的 1F 氨基酸基序能较好地稳定 LDH 酶的高级结构。

2.2.2 ANS 标记 LDH 酶的发射光谱

由图 2(b) 可见, 经 ANS 标记的 LDH 酶在 460 nm 处的荧光值为 8。冻融处理后其荧光强度为 70。表明冻融使 LDH 酶疏水基团外露并与 ANS 结合产生荧光。添加 PM2F 和

PM2G (摩尔比为 5:1) 的酶混合液经冻融后, 荧光强度分别为 72 和 73。而添加 PM2D 和 PM2E 的酶混合液冻融后的荧光强度为仅为 18 和 22。可见 PM2 多肽可不同程度的减少由冻融引起的 LDH 酶疏水残基的外露, 其中 7 拷贝和 14 个拷贝的 1F 氨基酸基序的保护效果更好。这一结果与前述的 LDH 酶内源荧光发射光谱结果一致。

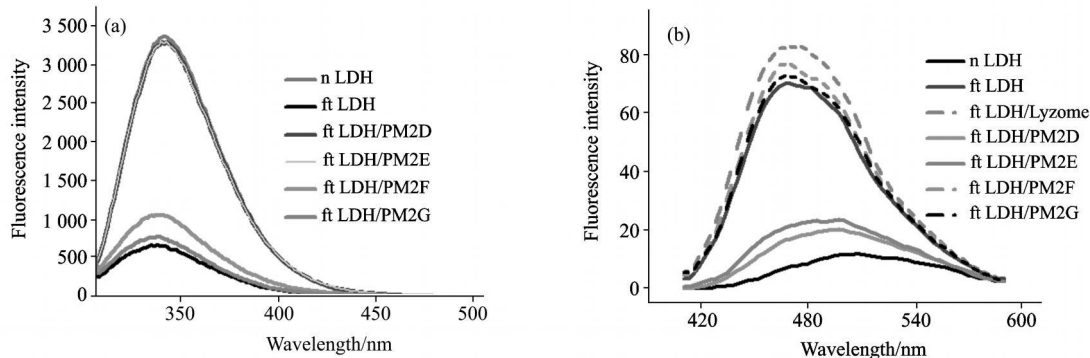


Fig 2 Fluorescence emission spectra of ANS targeted and untargeted LDH

The molar ratio of PM2 protein series to LDH is 5:1. To detect the endogenesis fluorescence emission spectra of LDH, the excitation wavelength is 295 nm (b). To detect the fluorescence emission spectra of LDH tagged by phenylamino naphthalenesulfonic acid (ANS), the excitation wavelength is 380 nm. "ft" short for freeze thaw treatment and "n" for no treatment

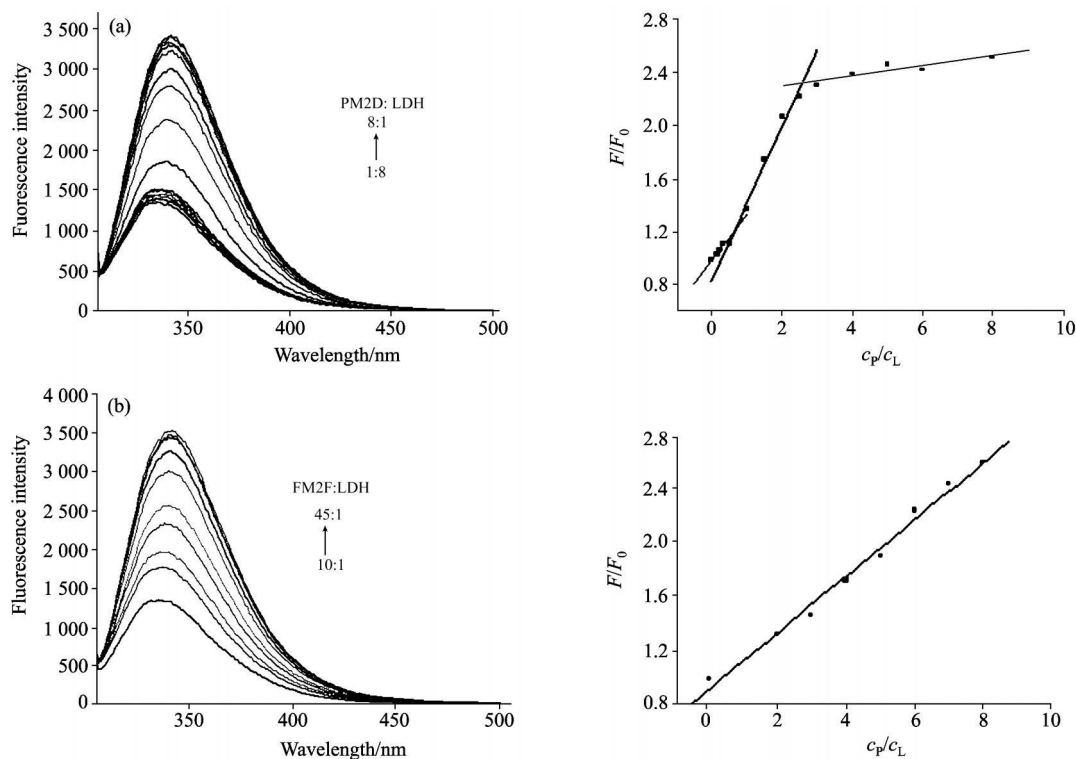


Fig 3 Fluorescence emission spectra of LDH in the presence of different concentration of PM2D and PM2F protein

Molar ratio of PM2D to LDH is from 1:8 to 8:1 (a), and PM2F to LDH is from 10:1 to 45:1 (b). Fluorescence emission spectra were measured after 3 freeze thawing cycles. In illustration, the relative fluorescence was set as vertical axis, the ratio of concentration of protein (c_p , PM2D or PM2F) to LDH (c_L) was set as abscissa

综上所述, PM2D 和 PM2E 多肽可有效地稳定 LDH 酶的高级结构、阻止或减少其疏水基团的外露, 这是两种多肽保护 LDH 酶的分子机理。

2.2.3 不同浓度 PM2D 和 PM2F 多肽对 LDH 酶荧光光谱的影响

由图 3 可知, 随着 PM2F 浓度的增加, LDH 的荧光发射

均匀增强, 显示 PM2F 与 LDH 只有一种相互作用类型。而随着 PM2D 浓度的增加, LDH 的荧光在结合数分别为 2: 3 和 5: 2 时出现明显的拐点, 说明 PM2D 与 LDH 的相互作用有三种结合类型。具体地说, 随着 PM2D 的加入, 该多肽能有效与 LDH 蛋白结合, 表现为荧光的明显增强; 当 PM2D 与 LDH 的浓度之比增加到 2: 3 时, PM2D 通过第二种结合方式与 LDH 结合, 荧光的增强更为明显, 说明第二种结合方式较第一种结合方式更靠近色氨酸发光基团; 随着 PM2D 浓度的进一步增加, 当 PM2D 与 LDH 的浓度之比达到 5: 2 时, PM2D 以第三种结合方式与 LDH 结合, 此时 LDH 的结合位点接近饱和, 荧光的增强不明显。从荧光强度增加的幅度看, 即使换算成单拷贝的肽链, PM2D 与 LDH 结合导致

的荧光增强远高于 PM2F 与 LDH 的相互作用引起的荧光强度的增加, 说明 PM2D 的多拷贝氨基酸之间存在协同作用, 能有效增强 PM2D 与 LDH 的结合强度, 从而能更有效地维持 LDH 的疏水构象及其高级结构。

2.3 荧光光谱法研究 PM2 系列多肽与海藻糖保护 LDH 酶活性的协同作用

从图 4(a) 可见, 与 PM2G 和 PM2F 短肽相比, PM2D 和 PM2E 多肽对 LDH 酶(摩尔比 1: 1)活性有较好的保护作用(残留酶活分别为 24% 和 20%)。且添加海藻糖可明显增强 PM2D 和 PM2E 多肽对 LDH 酶活性的保护(残留酶活分别为 34% 和 31%)。这一结果证实了海藻糖与含多拷贝 1H-氨基酸基序的多肽对 LDH 酶的保护有协同作用。

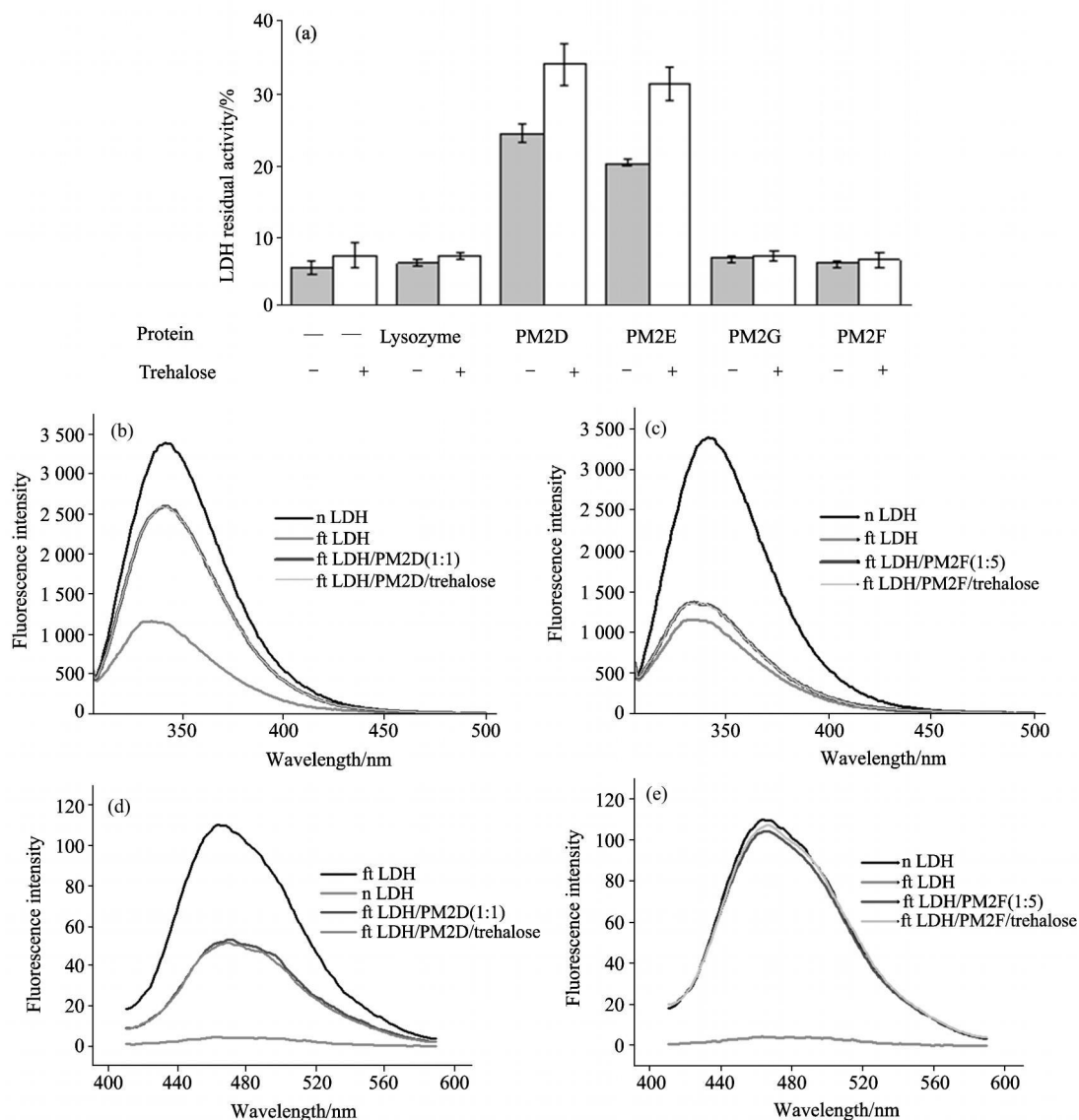


Fig 4 Synergistic effect of trehalose and PM2 protein series on LDH activity

The molar ratio of PM2 protein series to LDH is 1: 1, and the freeze thaw cycles is 3 (a). Fluorescence emission spectra of LDH containing PM2D or PM2F were determined in the presence or absence of trehalose (b, c). LDH tagged by ANS (d, e). "ft" short for freeze thaw treatment and "n" for no treatment

在 PM2D 或 PM2F 多肽与 LDH 酶混合液中添加海藻糖并不影响经冻融处理的 LDH 酶或其 ANS 标记物的荧光强度,说明 PM2D 或 PM2F 多肽与 LDH 酶结合,而加入的海藻糖未能改变与 PM2D 或 PM2F 多肽作用后的 LDH 酶表面色氨酸位点的疏水环境,也不影响 ANS 与 LDH 酶内部疏水基团的结合[图 4(b)~(e)]。由此我们推测,海藻糖并不直接与 LDH 酶相互作用而改变其结构,而是与 PM2 多肽-LDH 酶复合体形成一种类似水晶状的玻璃体结构^[18],从而稳定其活性。这一结果为前述“LEA 蛋白与海藻糖对细胞及 LDH 酶有着不同的保护机制”的结论提供实验支持。

3 结 论

结果显示,冷冻胁迫将破坏 LDH 酶结构或构象,使其

疏水基团外露,导致蛋白质酶活性下降。本文还首次报告了多拷贝 11-氨基酸基序通过多位点协同结合模式,能有效稳定 LDH 酶的结构。我们推测多拷贝 11-氨基酸基序可能为 LEA3 蛋白的功能结构域;在胁迫下该结构域形成兼性 α 螺旋结构,进一步驱动全长 LEA3 蛋白形成高级结构,并通过与 LDH 酶的多位点结合,稳定 LDH 酶的结构及保护酶的活性;而含低拷贝 11-氨基酸基序多肽(如 PM2F 和 PM2G)未能驱动全长 LEA3 蛋白形成有功能的 α 螺旋结构,它们与 LDH 酶只有一种结合位点,其结合强度也相对较弱,因而不能保护蛋白质的活性。此外,海藻糖可能通过与多拷贝 11-氨基酸多肽和 LDH 酶的复合体形成玻璃体混合物而进一步增强其活性。上述结果为 LEA 蛋白的作用机理研究提供了光谱学基础,对进一步在生产实际中应用 LEA 蛋白具有重要的指导意义。

References

- [1] Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, et al. *Plant Physiology*, 2008, 148(1): 6.
- [2] LIU Yun, LIU Guo-bao, LI Rair-hui, et al(刘 昀, 刘国宝, 李冉辉, 等). *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2010, 26(5): 569.
- [3] Liu Y, Zheng Y, Zhang Y, et al. *Current Microbiology*, 2010, 60(5): 373.
- [4] Liu Y, Zheng Y Z. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 331(1): 325.
- [5] Babu R C, Zhang J X, Blum A, et al. *Plant Science*, 2004, 166(4): 855.
- [6] Xu D, Duan X, Wang B, et al. *Plant Physiology*, 1996, 110(1): 249.
- [7] Sivamani E, Bahieldin A, Wraith J M, et al. *Plant Science*, 2000, 155(1): 1.
- [8] Tolleter D, Jaquinod M, Mangavel C, et al. *Plant Cell*, 2007, 19(5): 1580.
- [9] Honjoh K, Matsumoto H, Shimizu H, et al. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64(8): 1656.
- [10] Iturriaga G. *Biochemical Journal*, 2008, 410(2): e1.
- [11] Garg A K, Kim J K, Owens T G, et al. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America*, 2002, 99(25): 15898.
- [12] Penna S. *Trends Plant Science*, 2003, 8(8): 355.
- [13] Goyal K, Walton L J, Tunnacliffe A. *Biochemical Journal*, 2005, 388: 151.
- [14] Reyes J L, Rodrigo M J, Colmenero Flores J M, et al. *Plant Cell and Environment*, 2005, 28(6): 709.
- [15] Park S, An G, Hong Y, et al. *Journal of Plant Biology*, 2003, 46(4): 277.
- [16] LIU Zheng, XIA Zhi-ning(刘 峥, 夏之宁). *Laser Journal(激光杂志)*, 2001, 22(6): 9.
- [17] Iturriaga G, Schneider K, Salamini F, et al. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20(3): 555.
- [18] Shimizu T, Kanamori Y, Furuki T, et al. *Biochemistry*, 2010, 49(6): 1093.

Application of Fluorescence Spectroscopy in Studying the Protective Function of 11-Amino Acid Motif of Group3 Late Embryogenesis Abundant Protein

LIU Yun¹, DENG Yi-r xia¹, ZHANG Yu-qin¹, XU Hong², ZHENG Yi-zhi^{*}

1. College of Life Sciences, Key Laboratory of Microorganism and Genetic Engineering of Shenzhen University, Shenzhen 518060, China
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

Abstract Late embryogenesis abundant protein (LEA) can enhance the tolerance of organisms under drought, low-temperature and other stress conditions. However, their protection mechanisms are still unclear. In the present paper, the peptides consisting of multi-copies of 11-amino acid motif, such as PM2D and PM2E are proved to protect the activity of the lactate dehydrogenase.

ase (LDH) from freeze thaw by using ultraviolet spectrometry. Furthermore, the fluorescence spectroscopic results show that the peptide consisting of multi copies of 11 amino acid can stabilize the structure of LDH through synergy and multi sites binding. However, the peptides consisting of less copies of 11 amino acid, such as PM2F and PM2G bind to LDH through one site, and the binding is weak. They thus can not protect the activity of LDH. In addition, the peptides consisted of multi copies of 11 amino acid protect LDH by acting with trehalose synergically, and the protection mechanisms of LEA and trehalose on LDH are different.

Keywords Ultraviolet spectrometry; Fluorescence spectroscopy; Late embryogenesis abundant protein; 11 amino acid motif; LDH enzyme protective action

(Received Jan. 21, 2011; accepted Mar. 20, 2011)

* Corresponding author