

La³⁺, Ce³⁺处理诱导菠菜 Rubisco 与 Rubisco 活化酶复合体的形成*

洪法水** 刘超 郑蕾 王雪峰 吴康 宋卫平 吕世鹏

(苏州大学生命科学院, 苏州 215006)

陶冶

(中国科学院高能物理研究所同步辐射实验室, 北京 100039)

赵贵文

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

摘要 用 LaCl₃, CeCl₃ 处理菠菜后证实 La³⁺, Ce³⁺处理可诱导菠菜体内形成 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的复合体. 从 LaCl₃, CeCl₃ 处理的菠菜体内纯化得到的蛋白其 SDS-PAGE 电泳分析证明除具有 Rubisco 的大小亚基(55, 14.4 kd)之外, 在邻近大亚基处还具有 Rubisco 活化酶的 45 和 41 kd 的两个大亚基; 非变性 PAGE 电泳分析证明除具有 Rubisco 的一条带(560 kd)以外, 在距 Rubisco 大约 2 倍距离处还有一条分子量在 1100 kd 左右的带, 推测为 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的复合体. La³⁺, Ce³⁺处理的酶活性分别是对照纯 Rubisco 的 1.8 和 2.8 倍, 吸收光谱和荧光发射光谱强度也明显高于对照的纯 Rubisco, 总巯基数均比对照纯 Rubisco 每摩尔多 36~39 个, 表面巯基数分别多 14~25 个, CD 光谱计算表明 La³⁺, Ce³⁺处理的酶二级结构与对照的有较大差异. 体内酶活性测定表明 La³⁺, Ce³⁺处理的为对照的 1.5 和 1.9 倍.

关键词 镧 铈 菠菜 Rubisco Rubisco 和 Rubisco 活化酶复合体 光谱学特征

诸多研究已证明, 稀土元素对光合作用有明显的促进作用, 人们过去对其机理的研究主要集中在 稀土对光合作用的光能吸收、光电转换、电子传递及光合磷酸化速率等光化学反应影响方面^[1~7]. 稀土促

2004-01-05 收稿, 2004-07-08 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 29805003)和江苏省高校自然科学基金项目(批准号: 03KJB180122)

** E-mail: hongfsh@hotmail.com

进光化学反应意味着促进了ATP和NADPH的形成,而这是 CO_2 同化的动力.我们认为稀土促进光合作用的机制应表现在光化学反应和化学酶促反应(暗反应)两方面,但人们对稀土促进光合碳同化的机理研究尚不够深入.国内外只见陈为钧等报道La能提高烟草体内Rubisco(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)的活性^[8,9].他们用低浓度的稀土离子进行体外实验,证明也能提高Rubisco的活性,但不如在体内提高幅度明显. Rubisco全称核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(E.C.4.1.1.39),存在于叶绿体基质中,是所有光合生物进行光合碳同化的关键性酶,具有双重功能,即在 CO_2 分压高时,使核酮糖-1,5-二磷酸羧(RuBP)羧化,产生2分子3-磷酸甘油酶(PGA),推动 C_3 碳循环;在 O_2 分压高时,产生1分子的PGA和1分子的磷酸乙醇酸而引起 C_2 氧化循环及光呼吸.但Rubisco只有处于活化状态时才具备上述催化功能^[10].近年来国内外对该酶的活化机制,结构功能以及分子生物学等方面的研究极为关注^[11,12]. Rubisco体内活性调节是由Rubisco活化酶控制的, Rubisco活化酶是一种核编码的叶绿体蛋白,它利用光合磷酸化生成的ATP使Rubisco能迅速与生理浓度的 CO_2 (10 $\mu\text{mol/L}$), Mg^{2+} 结合形成ECM(酶- CO_2 - Mg)而达到最大的活化程度,能解除磷酸糖对Rubisco活性的抑制作用,被认为是Rubisco的分子伴侣^[12-15]. Robison和Lan等^[16,17]提出Rubisco活化酶对Rubisco的活化机制可能是: Rubisco与Rubisco活化酶形成一种中间复合物,这种中间产物的出现改变了酶的构象,促进RuBP从Rubisco上的解离,使 CO_2 很容易进入活化位点,加速Rubisco的氨基甲酰化作用,使Rubisco的活化形式——氨基甲酰化迅速产生,但他们未能通过实验发现植物体内天然Rubisco和Rubisco活化酶的复合物.李立人,王忠等人^[18-20]也推测在Rubisco的活化过程中存在着Rubisco-Rubisco活化酶的复合物,但也未能通过实验纯化出该复合物. Parry, Potris等分别在2003年的综述中提到人们至今还未从植物体内结晶出Rubisco-Rubisco活化酶的复合物,只是对该复合物的可能模型提出了假设^[11,12].

稀土元素由于其独特的化学性质,提高 Rubisco

活性的机制可能与稀土加强 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的相互作用关系(形成复合物)或激活 Rubisco 活化酶活性有关.本文研究了 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜对 Rubisco 活性及光谱学性质的影响,实验证实 La^{3+} , Ce^{3+} 能诱导菠菜体内形成 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的复合物,该复合物酶的形成明显提高了 CO_2 的同化效率,从而为稀土提高光合效率的分子作用机制提供了重要的理论依据.

1 实验部分

1.1 试剂

Sephadex G-50 和 G-200、巯基乙醇、磷酸肌酸、磷酸肌酸激酶、磷酸甘油酸激酶、磷酸甘油醛脱氢酶、EDTA、Tris 等购自 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯.

1.2 材料处理和培养

供试材料为大叶菠菜(*Spinacia oleracea*)品种.种子购自种子公司.菠菜种子用 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{LaCl}_3$, $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{CeCl}_3$ 溶液在 10°C 下浸泡 48 h(每 24 h 更换 1 次溶液),用去离子水浸种作对照.处理后的种子播种于花盆(盆直径 20 cm,高 30 cm).当菠菜生长到 8 片叶时再用 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{LaCl}_3$, $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{CeCl}_3$ 溶液进行喷施处理(LaCl_3 , CeCl_3 处理浓度按我们以往的实验结果确定的,这可能与 Ce 的 4f 电子和变价特征有关).

1.3 菠菜生长状况的测定

LaCl_3 , CeCl_3 喷施处理 7 d 后测定单株鲜重和干重,用 Anon 法^[21]测定叶绿素含量,用 CI-301PS 便携式光合测定仪(美国 CID 公司生产)测定各处理的光合速率,按王维光等方法^[22]测定 Rubisco 活性.每项指标测定均重复 3 次以上.

1.4 Rubisco 的提取纯化、电泳分析

按王维光等^[22]方法提取纯化 Rubisco, Lowry 法测蛋白质含量^[23], SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳(5%浓缩胶,10%分离胶)、非变性 PAGE 电泳(3.5%浓缩胶,5%分离胶)方法按有关文献进行.

1.5 Rubisco 的 UV-Vis 吸收光谱和荧光发射光谱的测定

用日立 UV-3010 型分光光度计记录室温紫外可见吸收光谱(UV-Vis). 用日立 F-4500 荧光分光光度计测定低温(77 K)荧光发射光谱(激发波长 285 nm, 发射波长 368 nm). 蛋白浓度为 0.06 mg/mL.

1.6 Rubisco 的巯基测定

基本按Habeb^[24]方法, 用日立UV-3010 型分光光度计测定 2-硝基-5-巯基苯甲酸在波长 412 nm 吸收的增加($\epsilon_{412} = 13600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)计算巯基含量. 反应总体积为 1.3 mL, 内含 100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.2), 0.5~1.0 mg 酶蛋白, 5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB)分子数为酶分子数的 200 倍. 酶分子表面巯基数的测定是以加入DTNB开始反应, 然后测不同时间的 ΔA_{412} . 酶分子的总巯基数测定是将酶蛋白先用 8 mol/L 尿素于 25°C 处理 20 min, 然后加入DTNB 反应, 10 min 后测定 ΔA_{412} . 在 8 mol/L 尿素中, 摩尔消光系数为 $14290 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

1.7 Rubisco 的圆二色(CD)光谱测定

CD谱用JASCO-J-810 圆二色仪测定, 石英样品池的光程为 1 cm, Rubisco浓度为 0.1 mg/mL. 测定波长范围为 195~250 nm, CD谱数据为 3 次扫描平均值. 取平均氨基酸残基分子量为 115, CD强度以平均残基摩尔椭圆值 $[\theta]$ 表示($\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$). 采用LINCMB 处理CD谱数据, 以计算二级结构含量. 该程序按照 Perczel 等人的方法, 并进行了改进^[25].

2 结果与讨论

2.1 La^{3+} , Ce^{3+} 对菠菜生长的影响

据表 1, 用 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜后其单株鲜重和干重分别增加了 56.48%, 81.48%和 72.34%, 100.0%, 叶绿素含量增加了 29.6%, 42.22%, 净光合速率提高了 24.32%, 51.84%. 由此可见 La^{3+} , Ce^{3+} 对菠菜的生长、叶绿素的合成及光合作用均有明显的促进作用, 尤其对干重的增加特别显著, 表明 La^{3+} , Ce^{3+} 处理促进了菠菜有机物的积累, 这与以往的研究结果是一致的^[2-4]. 从表 1 看出, La^{3+} , Ce^{3+} 处理的菠菜Rubisco羧

化酶活性分别是对照的 1.5 和 1.9 倍, 这可能是 La^{3+} , Ce^{3+} 促进菠菜光合作用效率提高, 导致有机物积累的主要原因. 另外, 从表 1 还可看出, Ce^{3+} 处理比 La^{3+} 处理的各项指标均显著得多. 陈为钧等^[8,9]研究认为低浓度的稀土能提高烟草Rubisco羧化酶活性, 其活化效应为 $\text{La}^{3+} > \text{Ce}^{3+} > \text{Gd}^{3+}$. 而本文实验表明 Ce^{3+} 处理比 La^{3+} 处理的菠菜Rubisco羧化酶活性增加更显著, 提高 59.62%, 这种差异与Ce的 4f 电子层结构和变价特征有一定关系, 近两年我们无论是在室内人工气候箱培养还是在盆栽实验中均取得一致结果. 稀土处理提高菠菜Rubisco羧化酶活性的作用机理可能是与稀土加强Rubisco与Rubisco活化酶的相互作用关系有关, 但需通过进一步实验证实.

表 1 La^{3+} , Ce^{3+} 对菠菜生长的影响

指标	对照	La^{3+} 处理	Ce^{3+} 处理
单株鲜重/g	1.08 ± 0.21 ^{a)}	1.69 ± 0.23 ^{b)}	1.96 ± 0.21 ^{b)}
单株干重/g	0.47 ± 0.06 ^{a)}	0.81 ± 0.07 ^{b)}	0.94 ± 0.07 ^{b)}
叶绿素含量/mg · g ⁻¹ FW	1.35 ± 0.11 ^{a)}	1.75 ± 0.18 ^{b)}	1.92 ± 0.16 ^{b)}
净光合速率 /mg CO ₂ · dm ⁻² · h ⁻¹	20.35 ± 1.18 ^{a)}	25.30 ± 1.22 ^{b)}	30.90 ± 1.25 ^{b)}
Rubisco 羧化酶活性/ μmol CO ₂ · mg ⁻¹ · protein · min ⁻¹	0.48 ± 0.01 ^{a)}	0.72 ± 0.02 ^{b)}	0.93 ± 0.02 ^{b)}

a), b) 表示同一行不同字母在 $p = 0.05$ 水平上差异显著

2.2 La^{3+} , Ce^{3+} 处理的菠菜 Rubisco 纯化、电泳分析

去了叶脉的菠菜叶片匀浆离心后, 经 Sephadex G50 脱盐, G200 层析得到洗脱图(略). 洗脱图只有一个蛋白洗脱峰, 无任何其他杂峰, 且紫外光谱分析表明 A_{280}/A_{260} 比值均大于 1.8, 符合蛋白纯化要求. 对得到的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 非变形 PAGE 电泳, 结果如图 1, 2.

图 1 变性SDS-PAGE电泳显示对照Rubisco有两条带, 分别代表大小亚基, 用Genesnap tools软件分析, 分子量分别在 55 和 14.4 kd左右, 同文献报道的Rubisco大小亚基的分子量一致^[22,26,27], 对 La^{3+} 和 Ce^{3+} 处理的蛋白洗脱峰收集电泳, 除显示出Rubisco的大小亚基两条带外, 在紧靠Rubisco的大亚基处还显示出 45 和 41 kd两个大亚基. 人们已分别从菠菜、水稻、小麦等植物中纯化得到 45 和 41 kd的多肽, 证实是Rubisco活化酶^[13-17,28,29]. 而唐如航等人以烟草

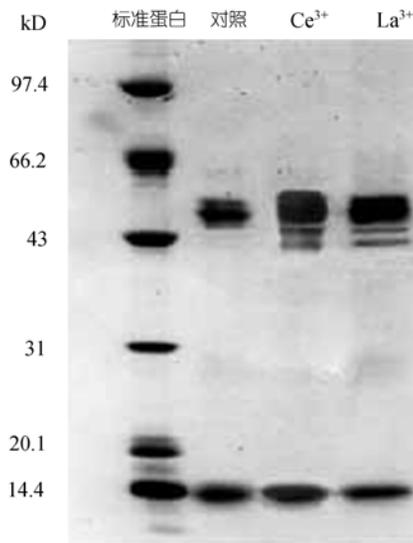


图1 变性 SDS-PAGE 电泳图

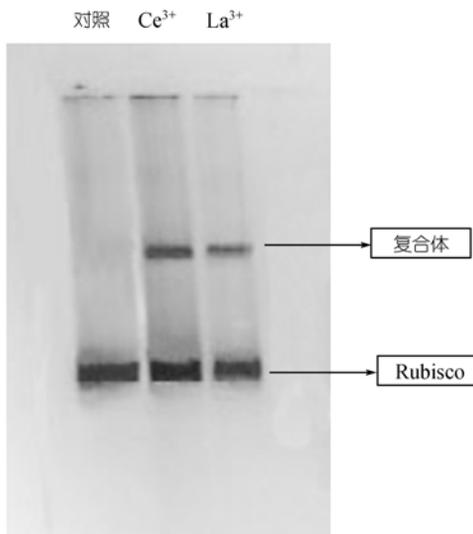


图2 非变性 PAGE 电泳图

叶片为材料纯化出的 Rubisco 活化酶是由一种 42 kD 的亚基组成^[29]。推测 La^{3+} 和 Ce^{3+} 处理的 Rubisco 大亚基附近的这两个大亚基为 Rubisco 活化酶，而非其降解产物。Rubisco 活化酶在叶绿体内具有激活 Rubisco 的功能，在生理水平 RuBP, CO_2 浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$) 下使 Rubisco 达到最大的活化程度^[14]。图 2 非变性 PAGE 电泳结果显示，对照的 Rubisco 为一条带 (已知为 560 kD)，也同文献上 Rubisco 的非变性 PAGE 电泳结果一致

^[22,26,27]，而 La^{3+} 和 Ce^{3+} 处理的除显示出与对照相同的一条 Rubisco 带以外，在距该带约 2 倍距离处都还有另外一条带，且分子量相同，在 1100 kD 左右，推测这条带为 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的复合体。根据以上事实，由此我们初步认为经 La^{3+} 和 Ce^{3+} 处理的菠菜，纯化得到的 Rubisco 是既有 Rubisco 又有 Rubisco 和 Rubisco 活化酶复合体的双重复合体，稀土诱导或促进了酶复合体的形成，相对于 Rubisco 的量而言，Rubisco 和 Rubisco 活化酶复合体的量较少，而对照菠菜中没有这种复合体或含量更少。重复 4 次盆栽实验、纯化和电泳均得到完全一致的结果。目前一般认为 Rubisco 活化酶的分子量在 250 kD 左右 (6 聚体)，而 Robison 等用凝胶过滤分析认为最大的分子量在 500 kD 左右^[16]，Rubisco 活化酶具有自发聚合的特性，确定全酶的分子量比较困难。Jimenez 等认为 Rubisco 活化酶是 Rubisco 的分子伴侣^[15]，因此人们设想 Rubisco 活化酶在活化 Rubisco 的过程中存在着 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的复合体，但至今人们还未分离出这种复合体^[11,12,16-20]。由于稀土可能促使 Rubisco 活化酶改变 Rubisco 的结合动力学而形成两者的复合体，因而在纯化 Rubisco 时同时得到 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的复合体；另外稀土可能也具有促进 Rubisco 活化酶的聚合反应。对照的 Rubisco 和 Rubisco 活化酶可能结合较弱或天然复合体量极微，因而人们难以分离得到。上述结果还需通过酶活性测定进一步证实。

2.3 La^{3+} , Ce^{3+} 处理的菠菜纯酶活性分析

为了论证纯化的洗脱蛋白是否具有酶活性，实验测定了对照纯化的 Rubisco 活性及 La^{3+} , Ce^{3+} 处理的菠菜纯化的酶活性，结果列于表 2。从表 2 看出，从 La^{3+} , Ce^{3+} 处理的菠菜中纯化得到的酶复合体活性明显高于对照单一的 Rubisco 活性，分别是对照 Rubisco 的 1.8 和 2.8 倍，这表明 Rubisco 活化酶与 Rubisco 形成复合体后更有利于 Rubisco 的活化。同时表明 Ce^{3+} 处理的酶复合体活性又明显比 La^{3+} 处理的高 (高出 56.96%)，这与体内酶活性的测试结果是一致的，而陈为钧等体外实验结果显示 La^{3+} 对烟草纯 Rubisco 的活化效应大于 Ce^{3+} ^[8]。我们以前的诸多研究表明 Ce^{3+} 处理的菠菜在光能吸收、光电转换、电子传递及

光合磷酸化速率等方面均明显高于 La^{3+} 处理的 [1-6]。

上述实验结果说明稀土可诱导菠菜体内形成 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的复合物, 由此阐明了稀土提高 Rubisco 羧化酶活性的原因, 又进一步阐明了稀土促进光合作用的分子机制。至于 La^{3+} , Ce^{3+} 处理的体外纯化的酶活性与对照体外纯化的 Rubisco 羧化酶活性差异比体内(表 1)更大, 可能是在对照的菠菜体内 Rubisco 有 Rubisco 活化酶的活化作用或也有极少量的天然复合物存在, 而对照体外纯化的 Rubisco 缺乏 Rubisco 活化酶的活化作用或无复合物, 酶活性相对较低。

表 2 La^{3+} , Ce^{3+} 处理对菠菜纯 Rubisco 羧化酶活性的影响

	对照	La^{3+}	Ce^{3+}
酶活性/ $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein} \cdot \text{min}^{-1}$	$0.44 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.79 \pm 0.03^{\text{b}}$	$1.24 \pm 0.04^{\text{c}}$

a), b), c) 表示同一行不同字母在 $p = 0.05$ 水平上差异显著

2.4 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜后纯化的 Rubisco 吸收光谱

图 3 所示为对照和 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜后纯化的酶 UV-Vis 吸收光谱, 它们在 274 nm 处都有一个酪氨酸或色氨酸的特征吸收峰; 在远紫外处(210~220 nm)有酰胺键的特征吸收峰, 但 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜后纯化的酶与对照相比分别红移了 4, 5 nm。从酶蛋白吸收峰的强弱可以看出, Ce^{3+} 处理 > La^{3+} 处理 > 对照。可见它们在酪氨酸或色氨酸和酰胺键的含量上有些差异, 这可能是由于 La^{3+} , Ce^{3+} 处理诱导了酶复合物

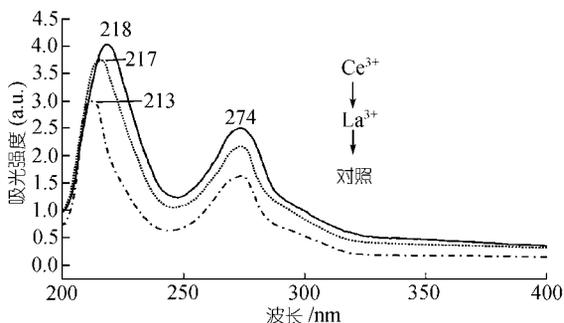


图 3 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜后纯化的 Rubisco UV-Vis 光谱形成的缘故。

2.5 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜后纯化的 Rubisco 荧光光谱

图 4 显示 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜后纯化的 Rubisco 与对照相比荧光发射光谱特征峰未产生位移即均在 345 nm 处, 归属于色氨酸残基, 说明荧光生色团的极性环境相似。但三者的峰强差异显著, La^{3+} , Ce^{3+} 处理的分别是对照的 1.5 和 2.0 倍, 这可能是三者色氨酸残基量及微环境上的差异造成。 La^{3+} , Ce^{3+} 处理后形成的蛋白是由 Rubisco 和 Rubisco 与 Rubisco 活化酶复合体的双重复合物组成, 色氨酸残基的量多, 因而发射荧光的能力加强。或者是 La^{3+} , Ce^{3+} 处理后形成的蛋白在微环境上与对照的相比发生了变化。至于 Ce^{3+} 处理的荧光发射光谱峰强明显大于 La^{3+} 处理的 (34.11%), 除了微环境有差异以外, 也可推测是 Ce^{3+} 处理的诱导酶复合物形成的量比 La^{3+} 处理的多, 这与体内外 Rubisco 羧化酶活性的差异是一致的。

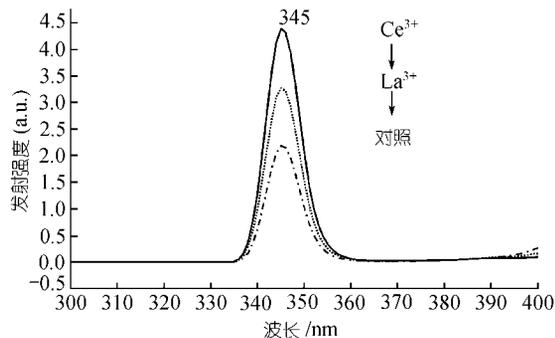


图 4 La^{3+} , Ce^{3+} 处理后菠菜纯化的 Rubisco 荧光发射光谱

2.6 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜后纯化的 Rubisco 巯基含量

为了证实酶复合物与 Rubisco 组分上的差异, 实验进行了巯基含量的测定, 结果列于表 3。由表 3 看出, 用 8 mol/L 尿素处理并利用 DINB 修饰菠菜 Rubisco, 其对照 Rubisco 的总巯基数与缪有刚, Takabe 和 Chollet 等在水稻, 烟草, 菠菜等植物上的测定结果一致 [27,30,31], 为每摩尔 96 个。而 La^{3+} , Ce^{3+} 处理的酶总巯基数均比对照单一的 Rubisco 每摩尔分别多 36 个和 39 个。在非变性条件下, 利用 DINB 修饰菠菜活化状态的 Rubisco, 测出 La^{3+} , Ce^{3+} 处理的酶表面巯基数每摩尔分别比对照单一 Rubisco 多 14 个和 25 个,

由此也表明表面巯基数与酶活性大小趋势一致. 缪有刚等^[27]研究指出水稻活化的Rubisco表面巯基数(32个)比钝化(24个)的多. 可见, La^{3+} , Ce^{3+} 处理的酶复合体在总巯基数上与对照单一的Rubisco是明显不同的, 也表明在二硫键、含硫氨基酸上是有差异的, 这也可以推测 La^{3+} , Ce^{3+} 处理诱导了酶复合体的形成, 其二级结构也可能不同.

表3 La^{3+} , Ce^{3+} 处理对菠菜纯 Rubisco 巯基含量的影响

	对照 Rubisco	La^{3+} 处理的酶	Ce^{3+} 处理的酶
总巯基含量(-SH 个 · mol ⁻¹)	96±2	132±4	135±5
表面巯基含量(-SH 个 · mol ⁻¹)	24±1	38±1	49±2

2.7 La^{3+} , Ce^{3+} 处理菠菜后纯化的 Rubisco 圆二色光谱

为了比较酶的二级结构差异, 实验测定了三个样品的圆二色光谱. 由图5可见, 对照菠菜纯Rubisco在200~250 nm远紫外区域内的圆二色光谱与Tomimatsu和缪有刚等在菠菜, 水稻上报告的基本相同, 分别在208和218 nm处有一负峰^[27,32]. La^{3+} , Ce^{3+} 处理的酶峰型与对照有较大差异. 根据光谱图算出的二级结构指标列于表4中. Tomimatsu和缪有刚等计算表明菠菜Rubisco α -螺旋含量为32%, 水稻为47%, 烟草为30%. 由于我们考虑了 β -折叠, β -转角, 无规则卷曲, 二硫键和芳香残基含量对 $[\theta]$ 值的贡献, 而Tomimatsu等计算未考虑这些影响, 所以对照菠菜纯Rubisco的计算结果有所不同, 但趋势相同, 以 α -螺旋为主. 而 La^{3+} , Ce^{3+} 处理的酶二级结构指标与对

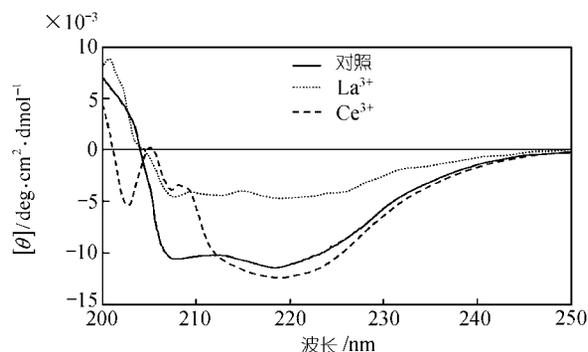


图5 La^{3+} , Ce^{3+} 处理后菠菜纯化的 Rubisco 圆二色光谱

表4 La^{3+} , Ce^{3+} 处理对菠菜纯 Rubisco 二级结构的影响

样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲	二硫键和芳香残基
对照	42%	12%	6%	29%	11%
La^{3+}	21%	47%	11%	4%	17%
Ce^{3+}	54%	5%	17%	2%	22%

照单一 Rubisco 有很大差异, 由此也证实形成了酶复合体, 且 La^{3+} , Ce^{3+} 处理之间复合体构象也有较大差异, 二硫键和芳香残基含量的增加与紫外可见吸收光谱、荧光光谱强度及巯基数的增加相对应, 证实了前述的有关推测.

3 结论

本文研究表明稀土促进植物光合碳同化的机制在于诱导了 Rubisco 与 Rubisco 活化酶形成复合体, 该复合体的总巯基数和表面巯基数、吸收光谱、荧光光谱、圆二色光谱(二级结构)与单一 Rubisco 均有明显差异, 其羧化酶活性也显著高于单一的 Rubisco, 更有利于 CO_2 的同化, 因而光合效率提高, 菠菜生长加快. Ce^{3+} 处理的羧化酶活性及吸收光谱和荧光光谱强度均明显比 La^{3+} 处理的强, 其一是二级构象有差异; 其二是诱导 Rubisco 与 Rubisco 活化酶复合体形成的量多, 因为同样重量的 Ce^{3+} 处理从菠菜叶片纯化得到的蛋白比 La^{3+} 处理的多(多20%左右). 至于稀土为何能诱导复合体的形成可能是与核基因、叶绿体基因表达有关或稀土促使 Rubisco 与 Rubisco 活化酶结合在一起, 但需进一步研究.

参 考 文 献

- 1 洪法水, 魏正贵, 陶冶, 等. 天然植物铁芒其体内稀土元素的分布及叶绿素铜的结构表征. 植物学报, 1999, 41(8): 851~855
- 2 洪法水, 魏正贵, 赵贵文. 铜元素与菠菜体内叶绿素的作用关系. 中国科学, C辑, 2001, 31(5): 392~400[摘要][PDF]
- 3 洪法水, 王雪峰, 刘超, 等. Ce^{3+} 对菠菜 D1/D2/Cytb559 复合物影响的光谱研究. 中国科学, B 辑, 2002, 32(6): 519~526 [摘要][PDF]
- 4 Hong F S, Wang L, Meng X X, et al. The effect of cerium (III) on the chlorophyll formation in spinach. Biological Trace Element Research, 2002, 89: 263~275[DOI]
- 5 洪法水, 魏正贵, 赵贵文, 等. 稀土在天然植物铁芒其体内结合形式的光谱学研究. 高等学校化学学报, 2001, 22(11): 1790~1794
- 6 Hong F S, Wei Z G, Zhao G W, et al. Extended X-Ray Absorption

- Fine Structure Study of the Bound Form of Lanthanide in Chlorophyll-A from *Dicranopteris Dichotoma*. *Biological Trace Element Research*, 2001, 82: 289~295
- 7 Zeng F L, An Y, Ren L, et al. Effect of lanthanum and calcium on photoelectron transport activity and the related protein complexes in chloroplast of cucumber leaves. *Biological Trace element Research*, 2000, 77: 83~91[DOI]
- 8 Chen W J, Gu Y H, Zhao G W, et al. Effects of rare earth ions on activity of RuBPase in tobacco. *Plant Science*, 2000, 152: 145~151[DOI]
- 9 陈为钧, 顾月华, 王圣兵, 等. 镧对烟草 RuBPcase 活性影响研究. *中国稀土学报*, 2000, 18(3): 258~261
- 10 Robert J. Spreitzer. Questions about the complexity of chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Photosynthesis Research*, 1999, 60: 29~42[DOI]
- 11 Parry M A, Andralojc P J, Mitchell R A C, et al. Manipulation of Rubisco: The amount, activity, function and regulation. *J Expt Bot*, 2003, 54(386):1321~1333[DOI]
- 12 Portis A R Jr. Rubisco activase: Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research*, 2003, 75(1): 11~27[DOI]
- 13 Portis A R Jr, Salvucci M E, Ogren W L. Activation of ribulose-bisphosphate carboxylase.oxygenase at physiological CO₂ and ribulosebisphosphate concentrations by Rubisco activase. *Plant Physiol*, 1986, 82: 967~971
- 14 Portis A R Jr. The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *J Expt Bot*, 1995, 46: 1285~1291
- 15 Jimenez E S D, Medrano L, Martinez-Barajas E. Rubisco activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry*, 1995, 34: 2826~2831
- 16 Robinson S P, Streusand V J, Chatfield J M, et al. Purification and assay of Rubisco activase from leaves. *Plant Physiol*, 1988, 88: 1008~1014
- 17 Lan Y, Mott K A. Determination of apparent Km values for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase using the spectrophotometric assay of Rubisco activity. *Plant Physiol*, 1991, 95: 604~609
- 18 唐如航, 李立人. Rubisco 活化酶的研究进展. *生命科学*, 1998, 10(4): 159~166
- 19 韩 鹰, 陈 刚, 王 忠. Rubisco 活化酶的研究进展. *植物学通报*, 2000, 17(4): 306~311
- 20 李卫芳, 王 忠, 韩 鹰, 等. 小麦 Rubisco 活化酶的纯化及其活性特性. *中国农业科学*, 2002, 35(8): 929~933
- 21 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1~15
- 22 王维光, 李立人. 菠菜二磷酸核酮糖(RuBP)羧化酶简化提纯研究. *植物生理学报*, 1980, 40(3): 256~262
- 23 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem*, 1951, (193): 265~275
- 24 Habeeb A F S A. Reaction of protein sulfhydryl group with Ellman's reagent. *Methods Enzymol*, 1972, 227: 457~464
- 25 Perczel A, Park K, Fasman G D. Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: A practical guide. *Analytical Biochemistry*, 1992, 203: 83~89
- 26 Paulsen J M, Lane M D. Spinach ribulose diphosphate carboxylase. I. Purification and properties of the enzyme. *Biochemistry*, 1966, 5(7): 2350~2357
- 27 缪有刚, 李立人. 水稻 Rubisco 的纯化及其与烟草 Rubisco 性质的比较. *植物生理学报*, 1991, 17(2): 183~191
- 28 Salvucci M E, Klein R R. Site-Directed mutagenesis of reaction lysyl residue(Lys-247) of Rubisco activase. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 314: 178~185[DOI]
- 29 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
- 30 Takabe T, Akazawa T. The role of sulfhydryl groups in the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase reaction. *Arch Biochem Biophys*, 1975, 169: 686~694
- 31 Chollet R, Anderson L L. Conformational changes associated with the reversible cold inactivation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochem Biophys Acta*, 1977, 482: 228~240
- 32 Tomimatsu Y, Donovan J W. Effect of pH, Mg²⁺, CO₂ and mercurials on the circular dichroism, thermal stability and light scattering of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylases from alfalfa, spinach and tobacco. *Plant Physiol*, 1981, 68: 808~813