

大肠杆菌 II 型丙酮酸激酶的纯化分析 及其作为偶联酶的应用

李鸿艳¹ 周思甜¹ 马建辉¹ 王艳兴^{1,2} 孙梅好^{1*}

(1 浙江师范大学化学与生命科学学院 金华 321004)

(2 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

摘要 目的:分析大肠杆菌 II 型丙酮酸激酶(pyruvate kinase II, PKII)的酶学特性及其作为偶联酶的可行性。方法:PCR 法从大肠杆菌基因组克隆 *pkII*, 构建入原核表达载体 pSKB4, 经 IPTG 诱导表达、纯化获得 PKII。利用乳酸脱氢酶偶联法分析其催化 ADP、GDP、UDP、CDP 磷酸化的能力以及不同 pH、温度对其活性的影响, 并利用 PKII 作为偶联酶对球形红细菌硫酸盐活化复合体(sulfate activating complex, SAC)及其突变体进行了活性分析。结果:原核表达、纯化、分析大肠杆菌 PKII, 发现其对 ADP、GDP、UDP 的催化效率与兔肌肉 PK 类似, 且由大到小分别为: A > G > C > U; 而对 CDP 的催化效率为兔肌肉 PK 的 6 倍。PKII 的最适 pH 为 7.0, 在 20 ~ 50℃ 范围内活性稳定, 且 18 个月的 -80℃ 低温及 24 hr 的室温存放基本不影响其活性。PKII 的高催化效率以及稳定性表明其可作为偶联酶进行 NDP 的测定。利用 PKII 作为偶联酶对球形红细菌 SAC 及其突变体的活性测定表明 S410 和 K409 参与了 5'-腺苷磷酸硫酸的磷酸化。

关键词 丙酮酸激酶 硫酸盐活化复合体 大肠杆菌 球形红细菌

中图分类号 Q555+.7

酶作为生物催化剂在生物体内发挥重要功能。酶活性的体外测定方法可分为连续测定和不连续测定, 其中连续测定可实时直接检测底物或者产物的吸光度、荧光、反应热、化学发光、光散射以及微量热泳等指标的变化, 使用操作较为简便。在实际生产生活中, 并不是所有反应的底物或者产物都具有此检测特性, 可利用偶联待测反应和可产生检测信号反应的偶联酶(coupling enzymes)进行偶联反应(coupling assay)方便酶活性的连续测定。如, 丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK, EC 2.7.1.40)可催化核苷 5'-二磷酸(NDP)的磷酸化形成核苷三磷酸(NTP)^[1]和丙酮酸, 而生成的丙酮酸可被乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)利用还原型辅酶 I(NADH, $\epsilon_{339\text{ nm}} = 6.22\text{ L}/\text{mmol} \cdot \text{cm}$)还原生成乳酸和在 339 nm 处没有光吸收的氧化型辅酶 I(NAD)^[2]。通过测定 339 nm 处光吸收的减小, 可间接

反映丙酮酸的生成, 从而计算出丙酮酸激酶的活性^[2]。

在细胞内, 丙酮酸激酶是糖酵解代谢的一个关键性调节酶, 催化磷酸烯醇式丙酮酸的磷酸基团转移至 NDP 的 β 磷酸基团, 产生丙酮酸和 NTP^[3]。大肠杆菌 PK 分为 PKI(PKF)和 PKII(PKA)两种类型, 其中 PKI 受 1,6-二磷酸果糖变构激活^[4], PKII 受 AMP 和多种单磷酸糖变构激活^[5]。对大肠杆菌 PKI 的研究主要集中在丙酮酸激酶的重组^[6]、激活剂对其活性的影响^[7-8]、结构分析^[9-10]、动力学分析^[11]以及功能分析^[12-13]等。目前对大肠杆菌 PKII 的研究较少。Waygood 等^[5]直接从大肠杆菌胞内纯化 PKII, 发现此酶不稳定, 对其生化特性进行了初步分析, 但尚未对其动力学常数等进行深入分析。

硫酸根离子作为细胞硫元素的基本来源, 在胞内经 ATP 硫化酶(ATP Sulfurylase, ATPS)催化形成高能化学键—磷硫键, 将硫活化为腺苷-5'-磷酸硫酸(adenosine 5'-phosphosulfate, APS)。APS 可被 APS 激

收稿日期: 2012-11-20 修回日期: 2013-03-01

* 通讯作者, 电子信箱: 973885589@qq.com

酶(APS kinase, APSK)磷酸化形成 3'-磷酸-腺苷-5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, PAPS), 可进行硫的还原代谢或者作为硫酸根供体参与调节化合物的生理功能及蛋白之间的互作^[16]。许多生物体内 ATPS 和另外的酶组成硫活化酶复合体(sulfate activating complex, SAC)来促进硫的活化,其中球形红细菌 SAC(由 ATPS 和 APSK 构成的双功能酶)可通过底物通道将 ATPS 合成的 APS 直接传递到 APSK 活性位点^[16-17],此 SAC 的催化机理以及通道机理尚有待于进一步分析。

原核表达、纯化大肠杆菌 PKII,分析其酶学特性,比较 PKII 与 PKI^[4]和兔肌肉 PK^[14-15]的催化效率,并进一步以 PKII 为偶联酶对来自球形红细菌的硫酸盐活化复合体(sulfate activating complex, SAC)^[16-17]及其突变体进行了活性分析。

1 材料与方法

1.1 菌株与载体

菌株 *Escherichia coli* DH5 α 及 BL21 (DE3)、pSKB4 (源自 pGEX-6P-1 的双标签表达载体,在 PreScission Protease 编码区和 *Bam*H I 识别位点之间加入 *Nde* I 识别位点且融合蛋白 GST 的 N 端具有 6 (Histines) 以及球形红细菌 SAC 表达载体 pSKB4-SAC 由本实验保存。pMD18-T simple 载体购自 TaKaRa 公司。

1.2 酶与生化试剂

溶菌酶、DTT、IPTG、Pepstatin A 购自 Amresco 公司;磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)、ATP、PMSF 为 BBI 产品;NADH、GSH、兔肌肉 PK 购自 Sigma 公司;Ni-NTA His \cdot Bind Superflow Resin 购自 Novagen 公司,PreScission Protease、Glutathione-Sepharose 4 Fast Flow 为 GE Healthcare 产品;突变试剂盒购自 Stratagene;超滤管购自 Millipore 公司;兔肌肉 LDH 购自罗氏公司;酵母腺苷 5'-磷酸硫酸激酶(adenosine 5'-phosphosulfate kinase, APSK)和酵母 3'-核苷酸酶按照发表方法纯化获得;其他生化试剂为购自国内公司的分析纯化合物。

1.3 方法

1.3.1 大肠杆菌 *PKII* 基因克隆及蛋白表达、纯化 以大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 基因组为模板扩增 *pkII* 基因(P1: GGAATTCCATATGATGTCCAGAAGGCTTC; P2: CCCAAGCTTTTACTCTACCGTTAAATAC)。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收、纯化、酶切(*Nde* I)后连接入表

达载体 pSKB4(*Nde* I/*Sma* I 位点)构建重组表达载体 pSKB4-pkII。利用 pSKB4-pkII 载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞,挑取单菌落于 LB 液体培养基(100 mg/L Amp)中 37 $^{\circ}$ C 过夜培养(240r/min)。取 1ml 菌液接种 500ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 。将菌液冷却至 16 $^{\circ}$ C,加入 0.5mmol/L IPTG 继续培养 16h (16 $^{\circ}$ C),离心 5 min (5 000r/min)收集菌体。经裂解(裂解液:0.40mol/L KCl, 5.0mmol/L β -巯基乙醇, 1mmol/L PMSF, 1mmol/L Pepstatin A, 10mg/L 溶菌酶, 50mmol/L K_2HPO_4 , pH 7.3),超声波破碎,离心(22 000r/min, 40min)收集上清液,参照组氨酸-GST 双标签融合蛋白纯化方法^[17]纯化 PKII。离心上清液上样至镍柱,经 5 倍柱体积洗涤液(洗涤液:0.40mol/L KCl, 5.0mmol/L β -巯基乙醇, 10mmol/L 咪唑, 50mmol/L K_2HPO_4 , pH 7.3)洗涤后,用含 250mmol/L 咪唑的洗涤液洗脱蛋白至 GST 柱,经 5 倍体积的 GST 洗涤液(0.40mol/L KCl, 5.0mmol/L β -巯基乙醇, 50mmol/L K_2HPO_4 , pH 8.0)洗涤后,经 GST 洗脱液(10mmol/L GSH, 100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)洗脱获得融合蛋白。经过夜透析(25mmol/L Hepes, pH 7.5, 50mmol/L KCl, 2.0mmol/L DTT)及 PreScission Protease 蛋白酶处理,酶切混合液上样至重新活化的 GST 柱,收集不结合 GST 柱而流出的目的蛋白,经 10kDa 超滤管浓缩、考马斯亮蓝定量后储存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

1.3.2 球形红细菌 SAC 突变体的构建、表达纯化 球形红细菌 SAC 蛋白为 ATP 硫酸化酶(ATP sulfurylase, ATPS)和 APSK 构成的双功能酶^[17]。序列分析发现 APSK 具激酶结构域保守的 K409,其附近有多个丝氨酸可能参与了磷酸基团的转移。根据球形红细菌 SAC 基因序列及所需突变位点,按照 Stratagene 的 QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit 突变方法(突变 PCR 引物见表 1)分别进行如下突变:S405A, S407A, S410A, K409E。SAC 及其突变体的纯化、定量参照上述方法(见方法 1.3.1)。

1.3.3 PK 活性测定 利用分光光度法(瓦里安 UV4000)进行丙酮酸激酶活性测定^[2]。活性测定原理为 PK 催化 NDP 的磷酸化生成 NTP 和丙酮酸,产物之一丙酮酸可被 LDH 还原为乳酸,同时 NADH 被氧化为 NAD^+ 。根据在 339 nm 光吸收的降低可计算出丙酮酸的生成速度。测定反应溶液包括以下试剂:50mmol/L Hepes(pH 8.0);50mmol/L KCl;不同浓度的 NDP(0.2

~5 倍 K_m 值);不同浓度的 PEP (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mmol/L); 3 mmol/L $MgCl_2$; 0.25 mmol/L NADH; 20 U/ml LDH; 利用 0.2 μ mol/L 大肠杆菌 PKII 起始反应, 反应温度为 25 $^{\circ}C$ 。

表 1 定点突变引物

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis

引物名称	引物序列(5'-3')
S405A-F	CTTCTTCACGGGGCTCGCCGGCTCGGGCAAGTCC
S405A-R	GGACTTGCCCGAGCCGGGAGCCCCGTGAAGAAG
S407A-F	CACGGGGCTCTCCGGCGCGGCAAGTCCACCATC
S407A-R	GATGGTGGACTTGCCCGCGCCGAGAGCCCCGTG
S410A-F	CGGGGCTCTCCGGCTCTGGCAAGGCCACCATCGCGAACGCCCTC
S410A-R	GAGGGCGTTCGCGATGCTGGCCTTGCCAGAGCCGAGAGCCCCG
K409E-F	CTCTCCGGCTCGGGCGAGTCCACCATCGCGAAC
K409E-R	GTTCGCGATGGTGAAGTCCCGAGCCGAGAG

Nucleotides for the mutagenesis amino acids were underlined.

1.3.4 PKII 活性的影响因素 pH 值: 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 4.3, 5 和 6) 和 50 mmol/L Hepes-KOH 缓冲液 (pH 7, 7.5, 8, 8.5) 分别用来测定 pH 对 PKII 活性的影响。测定条件如下: 50 mmol/L KCl; 1 mmol/L ADP; 2 mmol/L PEP; 2 mmol/L $MgCl_2$; 0.2 mmol/L NADH; 20 U/ml LDH; 不同 pH 的缓冲液; 1.0 μ mol/L PKII 起始反应, 反应温度为 25 $^{\circ}C$ 。

温度: PKII 经不同温度 (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65 和 70 $^{\circ}C$) 水浴处理 10 min, 对其活性在 pH 8.0 的缓冲液体系进行测定, 其余条件同 pH 值对 PKII 活性测定体系。

1.3.5 SAC 及其突变体的活性测定 ATPS 催化生成的 APS 经 APSK 的磷酸化生成 ADP, 进一步通过 PK/LDH 偶联酶系统与 NADH 的氧化相偶联。ATPS 活性测定的反应体系为: 50 mmol/L Hepes (pH 8.0); 50 mmol/L KCl; 不同浓度的 Na_2SO_4 (0.5, 1, 2, 5, 10 和 20 mmol/L); 不同浓度的 ATP (0.1, 0.2, 0.5, 1 和 2 mmol/L); 25 mmol/L PEP; 3 mmol/L $MgCl_2$; 0.4 mmol/L NADH; 10 U/ml PKII; 20 U/ml LDH; 6 U/ml 酵母 APSK; 1 U/ml 焦磷酸酶 (PPiase); 球形红细菌 SAC 或其突变蛋白 0.25 μ mol/L。

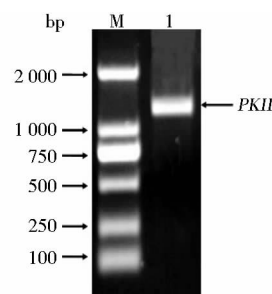
SAC 的 APSK 结构域催化 APS 磷酸化生成的产物之一 ADP 可通过 PK/LDH 偶联酶体系进行测定。因 APS 的 K_m 值较低 (~0.3 μ mol/L), 可利用 3'-核苷酸酶分解 APSK 产物 3'-磷酸腺苷 5'-磷酸硫酸的 3'-磷酸基团实现 APS 的再生^[17]。APSK 结构域活性测定体系包括: 50 mmol/L Hepes 缓冲液 (pH 8.0); 50 mmol/L KCl; 2 mmol/L $MgCl_2$; 25 mmol/L PEP; 0.4 mmol/L NADH; 10 U/ml PKII; 20 U/ml LDH; 0.5 U/ml 酵母 3'-核苷

酶; 球形红细菌 SAC 或其突变蛋白为 25 nmol/L; 底物 APS 分别为 65, 88, 166, 1 500 nmol/L; ATP 分别为 5, 7, 14, 120 μ mol/L。反应的初速度数据利用 Cleland 的加权最小二乘法程序 sequeno 处理^[18], 计算得 APS 及 ATP 的 K_m 和 k_{cat} 。

2 结果

2.1 大肠杆菌 *pkII* 基因的克隆及蛋白表达纯化

PCR 法扩增大肠杆菌 *pkII* 基因, 其产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见在 1 400 bp 附近的扩增产物, 大小与预期结果相符 (图 1)。经酶切验证及测序表明载体构建成功。经表达菌株 BL21 (DE3) 的诱导表达、镍柱和 GST 柱亲和层析及脱标签过程 (图 2), 纯化获得纯度达 90% 以上 PKII。

图 1 *pkII* 的 PCR 电泳检测结果Fig. 1 Electrophoresis detection of PCR product of *pkII*

M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR amplification product of *pkII*

2.2 酶活性测定

PK 在胞内的主要功能是磷酸化 NDP 生成相应的 NTP。利用不同浓度的底物 ADP 和 PEP 对 PKII 的动力学常数分析发现, 其 $K_m(ADP)$ 与 $K_m(PEP)$ 分别为 $42.6 \pm$

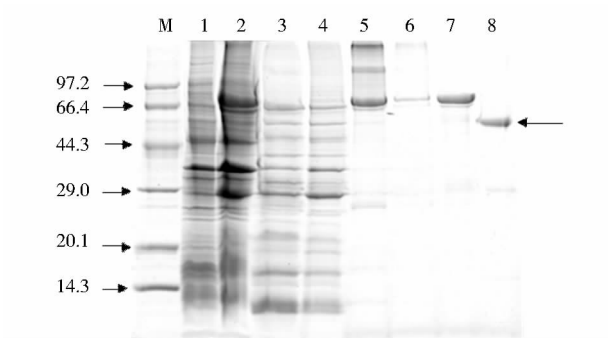


图2 大肠杆菌丙酮酸激酶 PKII 的表达与纯化
Fig.2 Expression and purification of pyruvate kinase II from *E. coli*.

M: Protein molecular marker; 1: Before IPTG induction; 2: After IPTG induction; 3: Supernatant of cell lysate; 4: Washing of Ni²⁺ column; 5: Elution of Ni²⁺ column; 6: Washing of GST column; 7: Elution of GST column; 8: Final target protein PKII

3.5 μmol/L 和 829.4 ± 1.2 μmol/L, k_{catADP} 为 24.1 ± 0.5/s, k_{catPEP} 为 30.0 ± 3.9/s。

2.3 pH、温度以及低温保存对酶活影响

反应体系中 pH 值的高低会影响酶的活性,甚至使酶失活。如图 3 所示,PKII 的最适 pH 为 7.0,低于 7.0 会导致活性急剧下降且低于 6.0 的 pH 几乎使酶活性丧失,而 7.5 ~ 8.0 时,为其最大酶活的 70% 左右。在 20℃ ~ 50℃ 范围内,PKII 的活性基本不受温度影响,温度超过 50℃ 后其酶活急剧下降(图 4)。经 -80℃ 低温保存 18 个月的 PKII 活性为保存前的 95% ± 5%,表明此酶在 Hepes-KOH 溶液中较为稳定。此外在室温(25℃)放置 24 hr 的 PKII 活性为对照的 96% ± 5%。

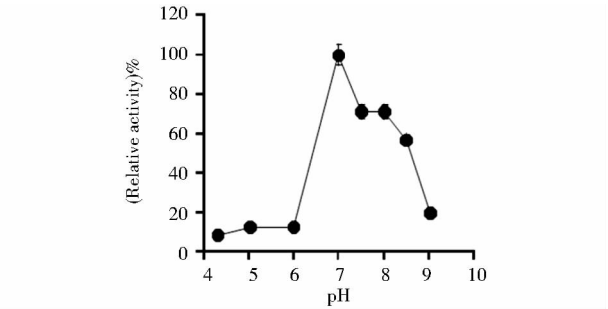


图3 pH 对 PKII 活性的影响
Fig.3 Effects of pH on activity of PKII

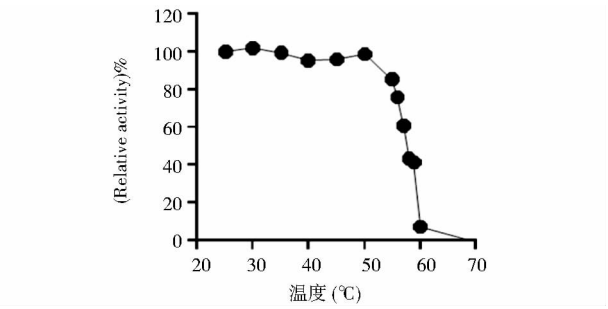


图4 温度对 PKII 活性的影响
Fig.4 Effects of temperature on activity of PKII

2.4 PKII 对 GDP、CDP、UDP 的磷酸化

利用不同的 NDP 对 PKII 的动力学常数进行测定,结果发现 PKII 的最适底物为 ADP,其催化效率为 5.7 × 10⁵ L/mol · s,其 UDP 的催化效率最低为 9 × 10⁴ L/mol · s(见表 2),且与发表的 PKII^[5] 对不同 NDP 底物的米氏常数是一致的。

表2 大肠杆菌 PKI、PKII 以及兔肌肉 PK 的动力学常数比较

Table 2 Kinetic parameters of PKs from *E. coli* and rabbit muscle

	<i>E. coli</i> PK II			<i>E. coli</i> PK I ^a			Rabbit muscle PK		
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
ADP	42.6 (3.5)	24.1 (0.5)	0.57	240	46.5	0.19	301 (29)	199.1 (1.7)	0.66
UDP	242.2 (45.9)	21.9 (2.9)	0.09	420	74.4	0.18	3376 (243)	329.3 (2.6)	0.1
CDP	134.2 (10)	17.5 (0.2)	0.13	6700	39.7	0.006	7120 (100)	131.7 (2.1)	0.02
GDP	186.3 (22)	68.4 (2.1)	0.37	50	93	1.86	1073 (100)	401.2 (4.8)	0.37

^a data from reference^[4]. Units for K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m are μmol/L, /s and L/mol · s × 10⁶, respectively

2.5 不同丙酮酸激酶的动力学常数比较

按照 PKII 活性的测定条件对兔肌丙酮酸激酶活性进行测定,结果发现其最适底物为 ADP,其催化效率为 $6.6 \times 10^5 \text{ L/mol} \cdot \text{s}$,其对 CDP 的催化效率最低为 $2 \times 10^4 \text{ L/mol} \cdot \text{s}$ (表 2),此结果与发表的数据^[14-15]是一致的。大肠杆菌 PKI 的最适底物为 GDP,其催化效率为 $1.8 \times 10^6 \text{ L/mol} \cdot \text{s}$,对 CDP 的催化效率最低为 $6 \times 10^3 \text{ ML/mol} \cdot \text{s}$ ^[4]。PKII 催化 ADP,UDP,CDP,GDP 磷酸化反应的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 分别为 PKI^[4] 的 3,0.5,22 和 0.2 倍(表 2)。除磷酸化 CDP 的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 为兔肌肉 PK^[14-15] 的 6.5 倍外,它们对 ADP,UDP,GDP 磷酸化的催化效率类似(表 2)。

2.6 PKII 作为偶联酶的应用

SAC 为 ATPS 和 APSK 两种酶活组成的复合体^[17],其 APSK 结构域的 S405,S407,S410,K409 为保守氨基酸,可能与其激酶活性密切相关。通过定点突变的方法,我们构建 SAC 的 S405A,S407A,S410A,K409E 突变体,经诱导表达、纯化获得相应蛋白。

ATPS 的产物 APS 经 APSK 的磷酸化生成 ADP,可利用 PKII 作为偶联酶对球形红细菌 SAC 活性进行测定^[2]。如表 3 所示,野生型 SAC 的 ATPS 以及 APSK 活性测定结果均与发表数据^[17]一致,且此四种突变均没有影响 ATPS 的活性,S405A 和 S407A 突变没有影响其激酶活性,而 S410A 或者 K409E 的突变导致 APSK 活性丧失或者低于我们的检测水平。

表 3 球形红细菌 SAC 突变体的活性参数

Table 3 Kinetic parameters of *Rhodobacter sphaeroides* SAC and its mutants

	ATPS			APSK		
	$K_{\text{m}}(\text{SO}_4^{2-})$	$K_{\text{m}}(\text{ATP})$	k_{cat}	$K_{\text{m}}(\text{ATP})$	$K_{\text{m}}(\text{APS})$	k_{cat}
SAC	915(41)	180(21)	126(6.3)	21.6(0.7)	0.40(0.03)	226(16)
S405A	1216(85)	184(21)	107(5.4)	18.3(0.7)	0.58(0.04)	231(15)
S407A	1168(95)	213(24)	127(4.7)	21.8(0.9)	0.51(0.07)	216(18)
S410A	1086(39)	219(20)	134(7.4)	N. D.	N. D.	N. D.
K409E	1379(77)	206(31)	140(8.5)	N. D.	N. D.	N. D.

Units for K_{m} and k_{cat} are $\mu\text{mol/L}$ and min^{-1} , respectively. Standard deviations were indicated in parentheses. N. D. none detected.

3 讨论与展望

偶联酶法是广为应用的生化测定方法,在实际的实验设计中,偶联酶的用量过少会加大延迟时间,严重时会导致偶联反应不能正确反映待测酶的活力;偶联酶用量过多会浪费,且容易加大反应的背景,加大准确测定反应速度的难度。将偶联酶的底物(B)降低到一定量所需时间^[19] $t^* = -\ln(1 - F_{\text{B}})/k_2 = -\ln(1 - F_{\text{B}})/(V/K_{\text{m}}) = -\ln(1 - F_{\text{B}})/(k_{\text{cat}}[E]/K_{\text{m}})$,与酶催化效率 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 及酶浓度成反比关系。高催化效率酶的应用可降低酶的使用浓度,达到经济节约,降低背景等要求/优势。

丙酮酸激酶是细胞内糖代谢的关键酶,可磷酸化 NDP 的同时生成丙酮酸,广泛的应用于体外 NDP 生成反应的生化分析。目前常用的有 Sigma,罗氏等来自兔肌肉的丙酮酸激酶,其 $K_{\text{m}}(\text{ADP})$ 为 0.3 mmol/L ,其催化效率为 $6.6 \times 10^5 \text{ L/mol} \cdot \text{s}$ (表 2)。

为分析大肠杆菌 PKII 是否可用来作为偶联酶进行 NDP 的测定,我们对 PKII 进行活性分析的结果表明,

PKII 对不同 NDP 的催化效率由大到小为: $A > G > C > U$,其对底物的选择性与 PKI 的优先性($G > A > U > C$)以及兔肌肉 PK($A > G > U > C$)具一定差异。在将偶联酶的底物降低到一定浓度所需时间一定的情况下,与酶催化效率 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 及酶浓度成反比关系^[19]。PKII 对 ADP 的催化效率与兔肌肉来源相当,是大肠杆菌 PKI 的 3 倍。PKII 对 CDP 的催化效率是兔源的 6.5 倍(表 2),作为测定 CDP 的偶联酶,PKII 的效果将优于兔源 PK。因 PKI 对 GDP 具较高的催化效率(表 2),在测定 GDP 生成的反应中,PKI 为较好的选择。

酶活性一般受反应体系 pH 值的影响。研究表明在 2 mmol/L PEP 的情况下,PKII 的最适 pH 为 7.0,低 pH 对其活性影响较大,此结果与 Waygood 等^[5]的研究结果是一致的。在 $20 \sim 50^\circ\text{C}$ 范围内其活性基本不受温度的影响,超过 50°C 的高温迅速降低其活性(图 4)。虽然有报道表明大肠杆菌 PKII 不稳定,我们发现在本文的纯化、测定体系中 PKII 是比较稳定的。经 -80°C 低温的 18 个月的保存,其活性为保存前的 $95\% \pm 5\%$ 。室温 24 h 存放,其活性为对照的 $96\% \pm 5\%$ 。我们推测

本文所用储存缓冲液 (100mmol/L KCl, 1.5mmol/L DTT, 5% 甘油和 25mmol/L Hepes, pH 7.5) 与 Waygood 等^[5] 所用缓冲液 (10mmol/L MgSO₄, 10% 甘油和 50mmol/L Tris-Cl, pH 7.5) 的不同可能是造成 PKII 稳定性不同结论的主要原因。在中性、室温条件下的较高活性以及方便的低温保存表明 PKII 可用来作为偶联酶进行 NDP 的测定。

球形红细菌 SAC 具有 ATPS 和 APSK 活性,通过序列分析,发现其 APSK 结构域活性中心的 K409、S410、S405、S407 为保守氨基酸。利用 PKII 作为偶联酶的活性分析表明 S405A、S407A 的 APSK 结构域活性基本未发生改变,而突变体 K409E、S410A 失去 APSK 活性。在激酶活性中心存在的赖氨酸与 ATP 磷酸转移的过程密切相关^[20],赖氨酸的缺失会导致激酶活性的丧失。球形红细菌 K409 位于 APSK 活性位点附近,推测该位点参与了磷酸基团的转移。而 S410 突变导致其活性丧失的原因尚需进一步研究。

对大肠杆菌 PKII 的深入研究,包括 PKII 的稳定性影响因素分析以及两种丙酮酸激酶在大肠杆菌中的功能研究等,将进一步明确 PKI 和 PKII 在细胞内各自功能分工,也为 PK 的进一步开发利用奠定基础。

参考文献

- [1] Kayne F. Pyruvate kinase. The Enzymes. 1973, 8: 353-382.
- [2] Malcovati M, Valentini G. AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. Methods Enzymol. 1982, 90 Pt E: 170-179.
- [3] Munoz M E, Ponce E. Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2003, 135(2): 197-218.
- [4] Waygood E B, Sanwal B D. The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. I. Physicochemical and regulatory properties of the enzyme activated by fructose 1,6-diphosphate. J Biol Chem. 1974, 249(1): 265-274.
- [5] Waygood E B, Rayman M K, Sanwal B D. The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. II. Effectors and regulatory properties of the enzyme activated by ribose 5-phosphate. Can J Biochem. 1975, 53(4): 444-454.
- [6] Valentini G, Mattevi A, Barilla D, et al. Recombinant pyruvate kinase type I from *Escherichia coli*: overproduction and revised C-terminus of the polypeptide. Biol Chem. 1997, 378(7): 719-721.
- [7] Speranza M L, Valentini G, Malcovati M. Fructose-1, 6-bisphosphate-activated pyruvate kinase from *Escherichia coli*. Nature of bonds involved in the allosteric mechanism. Eur J Biochem. 1990, 191(3): 701-704.
- [8] Boiteux A, Markus M, Plessner T, et al. Analysis of progress curves. Interaction of pyruvate kinase from *Escherichia coli* with fructose 1,6-bisphosphate and calcium ions. Biochem J. 1983, 211(3): 631-640.
- [9] Zhu T, Bailey M F, Angley L M, et al. The quaternary structure of pyruvate kinase type I from *Escherichia coli* at low nanomolar concentrations. Biochimie. 2010, 92(1): 116-120.
- [10] Mattevi A, Valentini G, Rizzi M, et al. Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. Structure. 1995, 3(7): 729-741.
- [11] Markus M, Plessner T, Boiteux A, et al. Analysis of progress curves. Rate law of pyruvate kinase type I from *Escherichia coli*. Biochem J. 1980, 189(3): 421-433.
- [12] Siddiquee K A, Arauzo-Bravo M J, Shimizu K. Effect of a pyruvate kinase (pykF-gene) knockout mutation on the control of gene expression and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2004, 235(1): 25-33.
- [13] Ponce E, Flores N, Martinez A, et al. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. J Bacteriol. 1995, 177(19): 5719-5722.
- [14] Ainsworth S, MacFarlane N. A kinetic study of rabbit muscle pyruvate kinase. Biochem J. 1973, 131(2): 223-236.
- [15] Ainsworth S, Kinderlerer J, Gregory R B. The regulatory properties of rabbit muscle pyruvate kinase. The influence of substrate concentrations. Biochem J. 1983, 209(2): 401-411.
- [16] 王艳兴, 杨玲, 孙梅好. 硫酸盐活化复合体的分类及其功能. 生命的化学 2011, 31(2): 252-257.
Wang Y, Yang L, Sun M H. Classification and functions of sulfate activating complexes. Chemistry of Life. 2011, 31(2): 252-257.
- [17] Sun M, Leyh T S. Channeling in sulfate activating complexes. Biochemistry. 2006, 45(38): 11304-11311.
- [18] Cleland W W. Statistical analysis of enzyme kinetic data. Methods Enzymol. 1979, 63: 103-138.
- [19] McClure W R. A kinetic analysis of coupled enzyme assays. Biochemistry. 1969, 8(7): 2782-2786.
- [20] Carrera A C, Alexandrov K, Roberts T M. The conserved lysine of the catalytic domain of protein kinases is actively involved in the phosphotransfer reaction and not required for anchoring ATP. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993, 90(2): 442-446.

Purification and Characterization of Pyruvate Kinase II from *Escherichia coli* and Its Application as a Coupling Enzyme

LI Hong-yan¹ ZHOU Si-tian¹ MA Jian-hui¹ WANG Yan-xing^{1,2} SUN Mei-hao¹

(1 College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

(2 Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Pyruvate kinase (PK), catalyzes the transfer of the phosphoryl group from phosphoenolpyruvate to ADP during glycolysis, which step is essentially irreversible under intracellular conditions and is allosterically controlled. In *Escherichia coli*, there are two kinds of PKs, namely PKI (PKF) and PKII (PKA) which were activated by fructose 1,6-bisphosphate and adenosine 5'-monophosphate, respectively. PKI had been extensively studied, while PKII had little been investigated largely due to its instability reported by Waywood et al. in 1975. To further characterize PKII, it was prokaryotically overexpressed and purified. Following the determination of kinetic constants for NDP, their catalytic efficiencies (CEs) were calculated and compared. PKII and PK from rabbit muscle (PKr) had similar CEs respect to ADP, GDP and UDP, and PKII had 6.5 times higher CE with CDP than that for PKr. Distinct from published results, little activity decrease was found during 18 months -80°C storage or 24 h room temperature treatment. High catalytic efficiency and stability enabled PKII as a potentially good coupling enzyme. Together with lactate dehydrogenase, PKII was successfully used as coupling enzyme to determine the kinetic constants of sulfate activating complex (SAC) from *Rhodobacter sphaeroides* and its mutants, and K409 and S410 were found to be essential for its activity of APSK domain.

Key words Pyruvate kinase Sulfate activating complex *Escherichia coli* *Rhodobacter sphaeroides*