

盐酸胍对毕氏海蓬子类囊体膜蛋白光谱特征的影响

周峰^{1,*}, 华春¹, 顾祝军¹, 秦晓春²

¹南京晓庄学院生物化工与环境工程学院, 南京211171; ²中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京100093

摘要: 研究了盐酸胍(GuHCl)处理对毕氏海蓬子类囊体膜蛋白亚基和光谱特征的影响。结果显示, 随着GuHCl处理浓度的增高, 类囊体膜蛋白的吸收光谱和荧光发射光谱明显下降, 峰位发生蓝移。这表明GuHCl处理下, 类囊体膜蛋白色素微环境发生明显变化, 色素蛋白结构遭到破坏; 较低浓度2 mmol·L⁻¹ GuHCl处理下, 随着GuHCl处理时间的延长, 类囊体膜蛋白的吸收光谱和荧光发射光谱也呈下降趋势, 但与GuHCl浓度梯度处理比, 下降程度略缓, 峰位也基本没有变化。这说明类囊体膜在2 mmol·L⁻¹ GuHCl不同处理时间下表现出的耐受性比在GuHCl浓度梯度处理条件强。

关键词: 盐酸胍; 类囊体膜; 光谱

Effect of GuHCl on Spectra Characteristic of Thylakoid Membrane Protein of *Salicornia bigelovii* Torr.

ZHOU Feng^{1,*}, HUA Chun¹, GU Zhu-Jun¹, QIN Xiao-Chun²

¹School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China; ²Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental, Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: The effects of GuHCl on protein subunit and spectra characteristic of thylakoid of *Salicornia bigelovii* were studied in this paper. The result showed that the absorption spectra and fluorescence spectra decreased significantly, and the peak position blue-shifted with increase concentration of GuHCl. It demonstrated that the microenvironment of thylakoid was changed and the structure of thylakoid was destroyed under GuHCl treatment. The absorption spectra and fluorescence spectra also decreased under prolongation treating time of 2 mmol·L⁻¹ GuHCl. In contrast, the decrease extent of absorption spectra and fluorescence spectra was smaller than that of under different GuHCl concentration gradient treatment. Moreover, the peak position was almost not changed under 2 mmol·L⁻¹ GuHCl treatment. It indicated that the tolerance ability of thylakoid under different time treatment of 2 mmol·L⁻¹ GuHCl was higher than that of under different GuHCl concentration gradient treatment.

Key words: GuHCl; thylakoid; spectra

光合作用的光能吸收、传递和转化过程是在具有一定分子排列和空间构象的色素蛋白复合体以及有关的电子载体中完成的。这些复合体大多数都镶嵌在基本的光合膜系统——类囊体膜中(周峰2007)。类囊体膜是基本的光合膜系统, 它由脂质双层膜和色素蛋白复合体构成。而表面活性剂与膜脂具有相似的结构, 皆为两亲分子, 在生物膜的研究中去污剂对膜蛋白的分离是不可缺少的, 不同的去污剂具有不同的作用。许多去污剂能够与膜蛋白或膜脂形成胶束结构, 扰乱了膜复合物的结构, 从而使膜蛋白发生去脂变性(le Maire等2000; 陈伟等2005)。已有的研究表明, 聚乙二醇辛基苯乙醚(Triton X-100, TX)可以恢复被十二烷基

磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)抑制的PSI颗粒的耗氧活性。SDS主要扰动PSII的可溶性外周蛋白, 对内在膜蛋白的影响较小, 而辛基葡萄糖苷(*n*-octyl β -D-glucopyranoside, OGP)则主要使PSII的内在膜蛋白受到扰动, 对水溶性蛋白的影响较小(黄浩等2003)。盐酸胍(guanidine hydrochloride, GuHCl)对菠菜光合膜蛋白内周天线CP47的影响要比内周天线CP43大, CP47的三级结构及Chl a的微

收稿 2011-11-12 修定 2011-12-10

资助 国家自然科学基金(41071281和30900095)、江苏省“青蓝工程”优秀青年骨干教师培养项目(2010)和南京市高等学校环境科学重点学科建设项目(2011)。

* 通讯作者(E-mail: zfbcas@163.com; Tel: 025-86178262)。

环境对GuHCl更敏感(曲元刚等2007; Qu等2006)。但关于GuHCl对与菠菜同属藜科的毕氏海蓬子(*Salicornia bigelovii* Torr.)光系统的影响尚未见报道。

目前,有关去污剂对光合膜蛋白的研究主要针对某个或某种蛋白,关于去污剂对整个光合膜系统即类囊体膜的影响尚无报道。本文通过一系列梯度浓度的盐酸胍处理毕氏海蓬子类囊体膜蛋白质复合物,通过吸收光谱和荧光光谱研究盐酸胍对整个光合膜系统的影响。

材料与方法

1 材料

植物材料为毕氏海蓬子(*Salicornia bigelovii* Torr.)。参照笔者(Zhou等2009; Wang等2009)的方法,制备具光化学活性的类囊体膜。

2 GuHCl处理

GuHCl处理浓度梯度为0、1、2、3、4和5 mmol·L⁻¹,处理时间梯度为15、30、45和60 min,GuHCl处理方法参照Qu等(2006)的方法。

3 光谱测定

吸收光谱用天津港东UV4501分光光度计进行检测,扫描速率为100 nm·min⁻¹,分辨率为0.5 nm;样品中Chl浓度调至10 μg·mL⁻¹。荧光光谱用天津港东WGY-10荧光分光光度计检测,样品中Chl浓度调至10 μg·mL⁻¹。激发光波长为436 nm,激发狭缝和发射狭缝分别是10和5 nm。

实验结果

1 不同浓度GuHCl处理对类囊体膜吸收光谱的影响

从图1可以看出,未经GuHCl处理的类囊体膜吸收光谱主要有3个吸收峰:436、470和683 nm。436和683 nm主要是Chl a的吸收峰;470 nm主要是Chl b和胡萝卜素类的吸收峰。从图1还可看出,类囊体膜吸收峰的面积随GuHCl处理浓度的增加表现出下降趋势,红区最大吸收峰发生蓝移,这说明GuHCl处理破坏了类囊体膜的结构,影响到对光能的吸收。

2 不同浓度GuHCl处理对类囊体膜荧光发射光谱的影响

从图2可以看出,未经GuHCl处理的类囊体膜

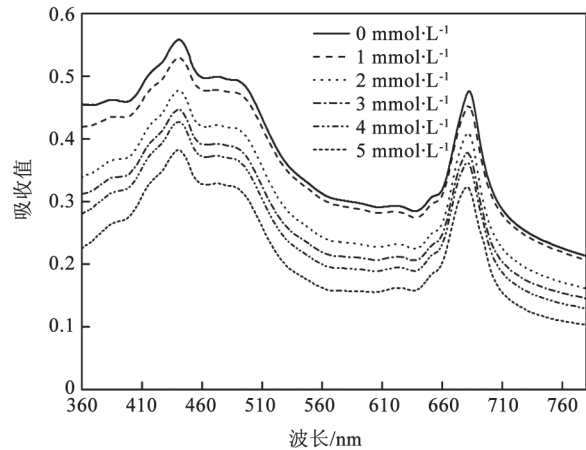


图1 不同浓度GuHCl处理对类囊体膜吸收光谱的影响
Fig.1 Effect of different concentration GuHCl treatment on absorption spectra of thylakoid

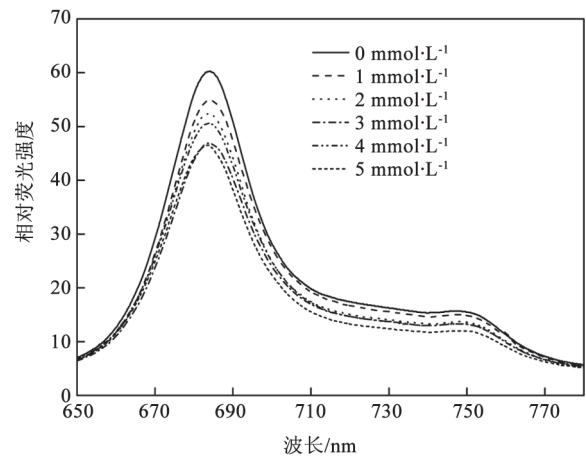


图2 不同浓度GuHCl处理对类囊体膜室温荧光发射光谱的影响

Fig.2 Effect of different concentration GuHCl treatment on fluorescence emission spectra at room temperature of thylakoid

荧光发射光谱主要有2个荧光发射峰,685和750 nm。685 nm是类囊体膜PSII的荧光发射峰;750 nm是类囊体膜PSI的荧光发射峰。随GuHCl处理浓度的升高,685 nm的荧光发射峰明显降低,并发生蓝移。这说明,类囊体膜PSII的荧光发射光谱对GuHCl非常敏感;而PSI的荧光发射峰略有下降,这说明PSI对GuHCl的耐受性比PSII强。

3 GuHCl不同处理时间对类囊体膜吸收光谱的影响

从图3可以看出,2 mmol·L⁻¹ GuHCl浓度下,随着处理时间的延长,吸收峰的面积下降明显,尤其

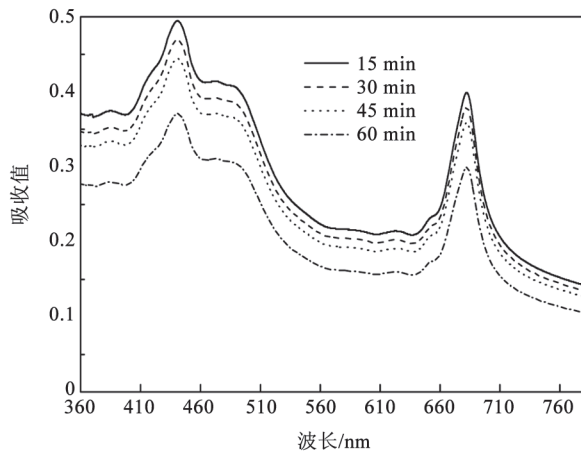


图3 2 mmol·L⁻¹ GuHCl不同处理时间对类囊体膜吸收光谱的影响

Fig.3 Effect of 2 mmol·L⁻¹ GuHCl with different treatment time on absorption spectra of thylakoid

是处理60 min后,但峰位基本没有变化。这说明,随着GuHCl处理时间的延长,类囊体膜的捕光能力下降;峰位没有变化,这说明类囊体膜对较低浓度(2 mmol·L⁻¹) GuHCl处理时间梯度表现出的耐受性比在GuHCl浓度梯度处理下强。

4 GuHCl不同处理时间对类囊体膜荧光发射光谱的影响

从图4可以看出,2 mmol·L⁻¹ GuHCl浓度下,随着处理时间的延长,685 nm的荧光发射峰降低,尤

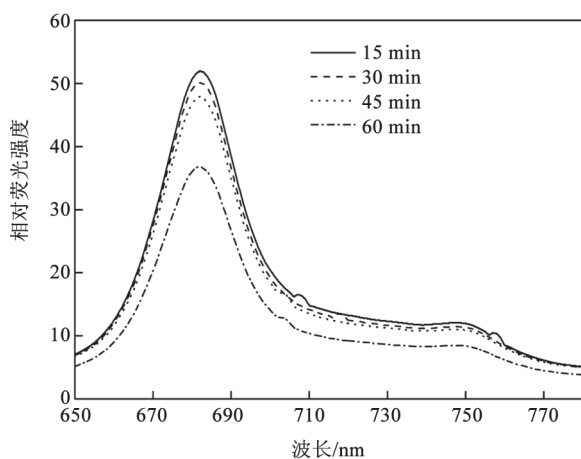


图4 2 mmol·L⁻¹ GuHCl不同处理时间对类囊体膜室温荧光发射光谱的影响

Fig.4 Effect of 2 mmol·L⁻¹ GuHCl with different treatment time on fluorescence emission spectra at room temperature of thylakoid

其是60 min后,但发射峰位基本没有变化,这与吸收光谱反映的结果一致。这说明,类囊体膜对较低浓度(2 mmol·L⁻¹) GuHCl处理时间梯度表现出的耐受性比在GuHCl浓度梯度处理下强。

讨 论

本文的研究结果表明,毕氏海蓬子类囊体膜对GuHCl浓度变化敏感,随着GuHCl浓度的增高,类囊体膜的吸收光谱降低,并且红区最大吸收峰发生蓝移,这表明Chl a的生色团和微环境发生了变化,GuHCl处理破坏了类囊体膜蛋白的结构。GuHCl处理后,PSII荧光发射峰685 nm明显降低,685 nm表示了内周天线CP43、CP47和PSII反应中心色素之间达到单线激发态平衡的荧光(Andri-zhiyevskaya等2005),其明显降低可能与GuHCl破坏CP43和CP47的Chl a微环境有关,这与Qu等(2006)在单独提纯的菠菜CP43和CP47中的研究结果一致。他们的结果还表明,GuHCl对单独提纯的CP47中Chl a的影响要比CP43大,产生这种差别的原因与在盐酸胍作用下,CP43的脱辅基蛋白比CP47的脱辅基蛋白对Chl a有更大的保护作用有关。

此外,从图3、4可看出,毕氏海蓬子类囊体膜对低浓度GuHCl处理时间的延长表现出的耐受性比浓度梯度变化强。盐酸胍与蛋白质是通过多氢键发生作用的,现在认为GuHCl对蛋白质的变性作用与GuHCl引起蛋白质侧链疏水性的降低有关,单独的GuHCl很难像去垢剂那样将膜蛋白从类囊体膜上溶脱出来。但GuHCl会破坏类囊膜的结构,与光合蛋白发生相互作用,这从光谱发生变化的结果也可以看出。GuHCl作用于蛋白后,蛋白的侧链疏水性降低,其水溶性增大,破坏了蛋白内部的相互作用(Bhuyan 2002; Tiffany和Krimm 1973),而GuHCl浓度的增高对蛋白影响要比低浓度(2 mmol·L⁻¹)处理时间的延长更大一些,蛋白会发生明显的变性过程(焦铭等2003;刘稳等1999)。

参考文献

- 陈伟, 阳振乐, 李良璧, 匡延云(2005). Triton X-100对70 °C处理后光系统I颗粒耗氧速率的影响. 植物生理与分子生物学报, 31 (3): 298-304
- 焦铭, 梁毅, 李洪涛, 王曦(2003). 脲和盐酸胍诱导过氧化氢酶去折叠的研究. 化学学报, 61 (9): 1362-1368
- 黄浩, 李冬海, 张秀芳, 赵南明, 匡廷云, 公衍道(2003). 去污剂SDS

- 和OGP扰动后光系统II的蛋白热稳定性研究. 生物物理学报, 19 (1): 105~108
- 刘稳, 方靖, 高培基(1999). 豆壳过氧化物酶的盐酸胍变性与化学修饰研究. 中国生物化学与分子生物学报, 15 (5): 802~807
- 曲元刚, 陈华, 秦晓春, 汪力, 李良璧, 匡廷云(2007). 盐酸胍诱导CP43和CP47变性的太赫兹时域光谱技术研究. 中国科学C辑: 生命科学, 37 (3): 347~351
- 周峰(2007). 光合膜蛋白晶体的结构与功能. 生命的化学, 27 (5): 370~372
- Andrizhiyevskaya EG, Chojnicka A, Bautista JA, Diner BA, van Grondelle R, Dekker JP (2005). Origin of the F685 and F695 fluorescence in photosystem II. *Photosynth Res*, 84 (1-3): 173~180
- Bhuyan AK (2002). Protein stabilization by urea and guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, 41 (45): 13386~13394
- le Maire M, Champeil P, Moller JV (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta*, 1508 (1-2): 86~111
- Tiffany ML, Krimm S (1973). Extended conformations of polypeptides and proteins in urea and guanidine hydrochloride. *Biopolymers*, 12 (3): 575~587
- Qu YG, Gong YD, Guo SK, Li LB, Kuang TY (2006). Structural characteristics of extra-membrane domains and guanidine hydrochloride-induced denaturation of photosystem 2 core antenna complexes CP43 and CP47. *Photosynthetica*, 44 (3): 447~453
- Wang RL, Hua C, Zhou F, Zhou QC (2009). Effects of NaCl stress on photochemical activity and thylakoid membrane polypeptide composition of a salt-tolerant and a salt-sensitive rice cultivar. *Photosynthetica*, 47 (1): 125~127
- Zhou F, Liu S, Hu ZH, Kuang TY, Paulsen H, Yang C (2009). Effect of monogalactosyldiacylglycerol on the interaction between photosystem II core complex and its antenna complexes in liposomes of thylakoid lipids. *Photosynth Res*, 99 (3): 185~193