

## 去污剂 SDS 和 OGP 扰动后 光系统 II 的蛋白热稳定性研究

黄浩<sup>1</sup>, 李冬海<sup>1</sup>, 张秀芳<sup>1</sup>, 赵南明<sup>1</sup>, 匡廷云<sup>2</sup>, 公衍道<sup>1</sup>

(1. 清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084;

2. 中国科学院植物研究所光合研究中心, 北京 100093)

**摘要:** 对去污剂 SDS 和 OGP 扰动后的光系统 II (PS II) 的稳定性进行了分析研究。在不同的去污剂条件下, 对 PS II 进行了放氧活性和叶绿素荧光参数的测定, 并使用圆二色(CD)光谱和差式扫描量热法(DSC)进行了分析。实验表明 SDS 扰动导致 PS II 的放氧活性和叶绿素荧光参数  $F_v'/F_m'$  降低, 但对叶绿素激子相互作用影响很小。而 OGP 扰动对 PS II 的放氧活性和叶绿素荧光参数  $F_v'/F_m'$  影响不大, 但减弱了叶绿素激子相互作用。结果说明 SDS 对 PS II 的外周蛋白扰动显著, 而 OGP 主要对 PS II 的内在膜蛋白有扰动作用。结合 DSC 分析的结果, 说明 PS II 中外周蛋白受扰动会大大降低 PS II 整体的热稳定性, 而内在膜蛋白受扰动对 PS II 整体的热稳定性并没有明显的影响。

**关键词:** 光系统 II; Sodium dodecyl sulfate (SDS); n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OGP); 激子相互作用; 热变性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2003)01-0105-05

光系统 II (PS II) 存在于高等植物、藻类和蓝细菌的类囊体膜中, 是光合作用中一个重要的色素蛋白复合物。PS II 包含了大约 25 种不同的蛋白质, 其中约 20 种以上为内在膜蛋白。PS II 膜复合物由外周天线和核心复合物组成。PS II 核心复合物包括反应中心(D1/D2/Cyt b559)、核心天线叶绿素 *a* 结合蛋白(CP43 和 CP47)和位于类囊体膜腔侧的三个外周蛋白(33 ku、23 ku 和 17 ku)组成。外周天线包括捕光色素叶绿素 *a/b* 和捕光复合物 LHC II<sup>[1]</sup>。

热变性是研究蛋白结构和功能的常用手段之一。在光合作用研究当中, 热变性方法用于揭示水氧化过程和电子传递过程中所涉及蛋白质及其辅助因子的特性和结构。许多研究者利用热变性与叶绿素荧光相结合的方法, 对植物叶片、叶绿体和类囊体膜中 PS II 的电子转移机理和结构变化进行了详细分析<sup>[2-4]</sup>。研究 PS II 膜复合物热变性常用的方法还有差式扫描量热法(DSC)<sup>[5,6]</sup>、热胶分析<sup>[6]</sup>和傅立叶变换红外光谱(FT-IR)<sup>[7]</sup>。PS II 中不同蛋白质热致去折叠过程产生的 DSC 峰已经被指认, 相应的蛋白质构象变化已有报道。

在生物膜的研究中, 去污剂作为增溶剂对于膜

蛋白的分离和纯化是不可缺少的。许多去污剂能够与膜蛋白或膜脂形成胶束结构, 扰动了膜复合物的结构, 从而使膜蛋白发生去脂变性<sup>[8]</sup>。在 PS II 的提取和研究分析中, 由于研究目的的不同, 经常使用的去污剂有 SDS (sodium dodecyl sulfate)、OGP (n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) 和 Triton X-100 等。已经有人研究了不同去污剂对 PS II 反应中心活性的影响<sup>[9]</sup>。还有人研究了非离子型表面活性剂 Triton X-100 对 PS I 和 PS II 蛋白构象和功能的影响<sup>[10,11]</sup>。

SDS 是一种带电荷的离子型水溶性蛋白变性剂, 而 OGP 是一种不带电荷的非离子型膜蛋白变性剂, 它们对膜脂和膜蛋白的影响是不一致的。本文利用这两种去污剂对 PS II 作用方式的差异, 使用氧电极、叶绿素荧光仪、圆二色 (CD) 光谱和

收稿日期: 2002-05-13

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (G1998010100) 和自然科学基金重大项目 (39890390)

作者简介: 黄浩, 1976 年生, 硕士生, 电话:(010)62784766,

E-mail: huanghao99@mails.tsinghua.edu.cn

通讯作者: 公衍道

DSC等方法对 PS II 进行了系统的研究, 将不同去污剂导致的 PS II 热稳定性的改变进行了对比, 在此基础上对 PS II 膜复合物的热稳定性有了进一步的认识。

## 1 材料和方法

### 1.1 PS II 膜复合物的制备和处理

PS II 膜复合物由新鲜菠菜中提取<sup>[12]</sup>。样品存放于 SMN 缓冲液中, 该缓冲液中包含 0.4 mol/L 蔗糖、40 mmol/L Mes-NaOH (pH6.0) 和 10 mmol/L 的 NaCl。

用去污剂 SDS 和 OGP 分别处理 PS II 颗粒 5 min, 去污剂浓度为 PS II 中叶绿素浓度的 10 倍 (质量比)。所有操作都在暗室中进行。

### 1.2 CD 光谱实验

所使用的 CD 极化光谱仪为 Jasco-715 型, 采用的扫描速率为 100 nm/min, 带宽为 2 nm, 响应时间为 1 s。所用比色杯光径 2 mm, 在红区波长范围 620~700 nm 进行了测量, 样品所含叶绿素浓度为 0.1 g/L。

### 1.3 DSC 测量

DSC 实验用 Setaram Micro DSC III 型差式扫描量热仪进行。升温速率为 1 K/min。样品所含叶绿素浓度为 2.5 g/L。

### 1.4 放氧活性测定

放氧活性在 25°C、饱和光照条件下在 SMN 缓冲液中进行测量, 放氧仪为 Hansatech 放氧仪。人工电子受体使用 phenyl-p-benzoquinone。样品所含叶绿素浓度为 0.02 g/L。

### 1.5 叶绿素荧光测定

用 Walz 公司的 PAM101 型叶绿素荧光仪在 25°C 下测定叶绿素荧光曲线, 饱和脉冲光源为 150 W 的氙灯。饱和脉冲光照时间 0.8 s。样品所含叶绿素浓度为 10 μg/ml。

## 2 结果

### 2.1 去污剂对 PS II 放氧活性和叶绿素荧光特性的影响

去污剂加入后 PS II 放氧活性变化和叶绿素荧光参数  $F_v'/F_m'$  变化如图 1 所示。 $F_o'$  表征 PS II 的固定荧光,  $F_m'$  表征 PS II 的最大荧光产量,  $F_v'$  表征 PS II 的可变荧光。这里用  $F_o'$ 、 $F_m'$  和  $F_v'$  代替了完

整叶绿体的荧光参数  $F_o$ 、 $F_m$  和  $F_v$ , 这是由于 PS II 中的电子传递链与叶片或叶绿体中的不完全一致, 缺少了细胞色素  $b_6/f$  和光系统 I (PS I)。 $F_v'/F_m'$  表征 PS II 有效光化学量子产量, 反映了开放的 PS II 反应中心原初光能捕获效率<sup>[13]</sup>, 它与叶绿体的光化学量子产量  $F_v/F_m$  非常接近, 从菠菜中提取的 PS II 膜复合物的  $F_v'/F_m'$  和菠菜叶绿体的  $F_v/F_m$  分别为 0.71 和 0.75, 这说明了 PS II 具有很高的光化学活性。如图 1 所示, SDS 使 PS II 的放氧活性基本丧失, 叶绿素荧光参数  $F_v'/F_m'$  趋于零; 而 OGP 对 PS II 的放氧活性影响不大, 对叶绿素荧光参数  $F_v'/F_m'$  基本没有影响。

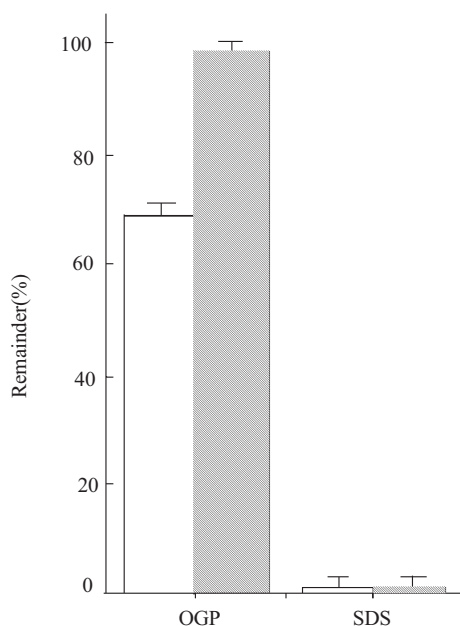
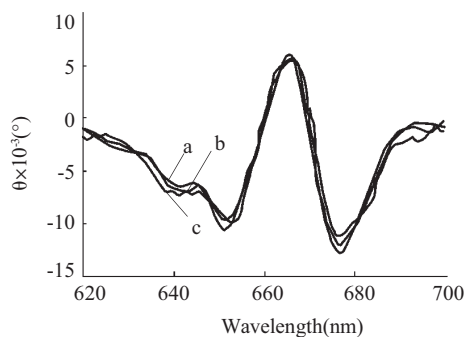


Fig.1 Effect of SDS and OGP on the oxygen-evolving activity and chlorophyll fluorescence parameter  $F_v'/F_m'$  of PS II membrane. □ O<sub>2</sub>-evolving activity; ■  $F_v'/F_m'$

### 2.2 去污剂对 PS II 可见区 CD 光谱的影响

PS II 的红区 CD 光谱在 652 nm(-)、664 nm (+) 和 677 nm(-) 分别存在三个特征峰。652 nm 处的负峰被指认为叶绿素  $b$ , 664 nm 和 677 nm 处的双峰被指认为叶绿素  $a$ <sup>[14,15]</sup>。能够灵敏地反映叶绿素分子的激子相互作用。加入 SDS 和 OGP 前后 PS II 的 CD 光谱如图 2 所示。加入 SDS 后, 664 nm 和 677 nm 处的双峰无明显变化, 说明 SDS 对 PS II 中叶绿素的激子相互作用无显著影响; 可是, 在 SDS 处理后, 652 nm 处峰的 CD 信号轻微增强, 这可能是 LHC II 的聚集状态发生变化所引起的, 而与叶绿素激子相互作用无关<sup>[16]</sup>。加入 OGP 后, 红区的 CD 光谱叶绿素  $a$  的在 677nm 处

峰的幅度有所下降, 这说明 OGP 导致激子相互作用减弱。

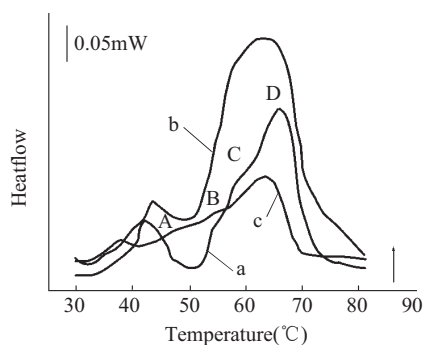


**Fig.2** Effect of SDS and OGP on the CD spectra in the red region of PS II membrane.

a: PS II; b: PS II+OGP; c: PS II+SDS

### 2.3 去污剂对 PS II 的 DSC 曲线的影响

加入去污剂前后 PS II 的 DSC 曲线如图 3 所示。PS II 膜复合物的 DSC 曲线存在四个特征峰, 它们分别出现在 42、54、59 和 66°C, 标记为 A、B、C 和 D 峰。此结果与 Thompson 等<sup>[56]</sup>的报道相似。根据 Thompson 等的实验结果, A 峰反映了放氧复合物的热变性, B 峰对应 CP43 蛋白的热变性, C 峰对应 CP47 蛋白和 D1/D2/Cyt b559 的蛋白质变性, 而 D 峰则是对应了 LHC 复合物的蛋白质变性。添加 SDS 之后, PS II 膜复合物的各个吸收峰明显前移。添加 OGP 之后, PS II 复合物的 A 峰变化不大, 而 B 峰、C 峰和 D 峰则合并为一个



**Fig.3** DSC curves of PS II membrane after and before SDS and OGP perturbations. a: PS II; b: PS II+OGP; c: PS II+SDS

## 3 讨 论

圆二色光谱 (CD) 能够非常灵敏地反映叶绿素的激子相互作用, 由此提供与色素结合的 PS II

膜蛋白的构象和功能的信息<sup>[14,15]</sup>。实验结果显示 SDS 对 PS II 膜复合物的红区圆二色光谱没有明显的影响, 说明 PS II 叶绿素间的激子相互作用没有发生明显变化。在 PS II 中, 由于叶绿素是与膜蛋白通过非共价键相结合的<sup>[17]</sup>, 所以叶绿素的状态反映了 PS II 膜蛋白结构的变化情况。因此, PS II 经过 SDS 处理后叶绿素间的激子相互作用没有发生明显变化的结果, 提示 PS II 中相关的膜蛋白结构可能没有受到明显的影响。但是, 根据放氧活性的研究结果, SDS 却导致 PS II 膜蛋白复合物的放氧活性几乎完全丧失。据报道, PS II 中外周蛋白与水氧化中心的锰簇密切相关<sup>[18]</sup>, 所以我们推测 SDS 的处理诱导 PS II 中外周蛋白的结构发生明显变化, 从而导致 PS II 的锰簇稳定性受到极大的影响, 最终导致 PS II 放氧活性丧失。与 SDS 相反, 实验结果表明 OGP 的处理形成了对 PS II 内在膜蛋白结构的扰动, 从而影响了叶绿素激子相互作用; 而对 PS II 的放氧活性影响不大。这暗示着 OGP 主要影响 PS II 的内在膜蛋白结构, 而对外周蛋白的影响不大。

据报道, 经过 SDS 的处理, PS II 的反应中心复合物 (PS II-RC) 中原初电子供体 P680 的活性在短时间内将完全丧失, 而经过 OGP 处理后 P680 仍将保持部分活性<sup>[9]</sup>。这与本文 PS II 叶绿素荧光的实验结果是基本一致的。PS II 的叶绿素荧光参数  $F_v'/F_m'$  表征 PS II 反应中心的光能转化效率, 当其值为零的时候, 意味着其光能转化效率完全丧失。经过 SDS 的处理, PS II 的叶绿素荧光参数  $F_v'/F_m'$  约为零, 而 OGP 处理后则基本保持不变。作为一种温和的去污剂, OGP 能够使 PS II-RC 丧失相当部分的活性, 这个实验现象是出人意料的。而在 OGP 处理 PS II 的实验中, 我们估计是由于 PS II 的完整性对反应中心的保护作用, 使得 OGP 对 P680 的影响减弱, 从而使反应中心保持了原有的活性, 叶绿素荧光参数  $F_v'/F_m'$  保持不变。SDS 之所以导致叶绿素荧光参数  $F_v'/F_m'$  基本为零, 可能是因为量 PS II 的外周蛋白被 SDS 扰动所引起的。

DSC 的研究结果表明, SDS 处理后 PS II 的热稳定性明显降低, 而 OGP 处理后的 PS II 的热稳定性没有明显改变, 只是 B 峰、C 峰 (CP47 和反应中心的热变性峰) 和 D 峰 (捕光色素蛋白复合物的热变性峰) 融合为一个

稳定性没有明显的影响。由于 OGP 会诱导 LHC II 和放氧核心复合物 (OECC) 的分离, 所以 B、C 和 D 峰的融合也表明, 捕光色素蛋白复合物脱离放氧核心复合物之后, 捕光色素蛋白复合物在热变性过程中的协同性降低。

## 4 结 语

(1) SDS 主要扰动 PS II 的可溶性外周蛋白, 对在膜蛋白的影响较小; 而 OGP 则主要使 PS II 的内在膜蛋白受到扰动, 对水溶性蛋白的影响较小。

(2) PS II 中外周蛋白受扰动会大大降低 PS II 整体的热稳定性, 而内在膜蛋白受扰动对 PS II 整体的热稳定性并没有明显的影响。

### 参考文献:

- [1] Wollman FA, Minai L, Nechushtai R. The biogenesis and assembly of photosynthesis proteins in thylakoid membranes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999,1411:21~85.
- [2] Yamane Y, Kashino Y, Koike H, et al. Effects of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics and the denaturation process[J]. *Photosynth Res*, 1998,57:51~59.
- [3] Prospisil P, Skotnica J, Naus J. Low and high temperature dependence of minimum  $F_0$  and maximum  $F_m$  chlorophyll fluorescence in vivo[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998,1363: 95~99.
- [4] Elshintinawy F. Changes in fast chlorophyll-a fluorescence transient in heat-treated *Chlamydomonas reinhardtii* thylakoid membranes [J]. *Journal of the University of Kuwait-Science*, 1995,22:67~75.
- [5] Thompson LK, Sturtevant JM, Brudvig GW. Differential scanning calorimetric studies of photosystem II: evidence for a structural role for cytochrome b559 in the oxygen-evolving complex[J]. *Biochemistry*, 1986,25:6161~6169.
- [6] Thompson LK, Blaylock R, Sturtevant JM, et al. Molecular basis of the heat denaturation of photosystem II [J]. *Biochemistry*, 1989,28:6686~6695.
- [7] Shi H, Xiong L, Yang KY, et al. Protein secondary structure and conformational changes of photosystem II during heat denaturation studied by Fourier transform-infrared spectroscopy[J]. *J Mol Struct*, 1998,446:137~147.
- [8] le Maire M, Champeil P, Moller JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000,1508:86~111.
- [9] Gall B, Scheer H. Stabilization of photosystem II reaction centers: influence of bile salt detergents and low pH [J]. *FEBS Lett*, 1998,431:161~166.
- [10] Ruan X, Wei J, Xu Q, et al. Comparison of the effects of Triton X-100 treatment on the protein secondary structure of photosystem II and photosystem II studied by FT-IR spectroscopy[J]. *J Mol Struct*, 2000,525:97~106.
- [11] Wang JS, Shan JX, Xu Q, et al. Spectroscopic study of trypsin, urea and Triton X-100-induced denaturation of the chlorophyll-binding protein CP43 [J]. *J Photoch Photobio B*, 2000,58:136~142.
- [12] Kuwabara T, Murata N. Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts [J]. *Plant Cell Physiol*, 1982,23:533~539.
- [13] Schreiber U, Hormann H, Neubauer C, et al. Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1995,22:209~220.
- [14] van Grondelle R. Excitation energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1985,811:147~195.
- [15] van Grondelle R, Dekker JP, Gillbro T, et al. Energy transfer and trapping in photosynthesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994,1187:1~65.
- [16] Virginijus B, László M, Gyöző G. Size dependency of circular dichroism in macroaggregates of photosynthetic pigment-protein complexes [J]. *Biochemistry*, 1994,33:10837~10841.
- [17] Markwell JP, Thornber JP, Boggs RT. Higher plant chloroplasts: evidence that all of the chloroplast exists as chlorophyll-protein complexes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979,76: 1233~1235.
- [18] Wollman FA, Minai L, Nechushtai R. The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999,1411:21~85.

## THERMAL DENATURATION OF SDS- AND OGP-PERTURBED PHOTOSYSTEM II MEMBRANE

HUANG Hao<sup>1</sup>, LI Dong-hai<sup>1</sup>, ZHANG Xiu-fang<sup>1</sup>, ZHAO Nan-ming<sup>1</sup>, KUANG Ting-yun<sup>2</sup>, GONG Yan-dao<sup>1</sup>

(1. Department of Biological Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Photosynthesis Research Center, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract:** Thermal denaturation of SDS- and OGP-perturbed photosystem II membrane was studied using oxygen electrode, variable fluorescence, circular dichroism (CD) spectroscopy and differential scanning calorimetry (DSC). The oxygen-evolving activity and chlorophyll fluorescence parameter  $F_v'/F_m'$  of PS II rapidly decreased after the detergent SDS treatment, while the excitonic interaction between chlorophyll molecules showed no obvious changes. The OGP treatment on PS II decreased the excitonic interaction between chlorophyll molecules and had slight effect on the oxygen-evolving activity and chlorophyll fluorescence parameter  $F_v'/F_m'$ . The results suggest SDS perturbation can primarily affect the extrinsic proteins and OGP mainly influences the integral membrane proteins of photosystem II. Combined with DSC analysis, the results indicate that the effect of perturbed extrinsic proteins on the thermal stability of photosystem II is different from that of the disturbed integral membrane proteins.

**Key Words:** Photosystem II; Sodium dodecyl sulfate (SDS); n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OGP); The excitonic interaction; Thermal denaturation