

甜菜碱稳定 PS II 放氧中心外周多肽机理*

侯彩霞 於新建 李 荣 徐春和 汤章城 沈允钢

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要 用不同理化因子处理 PS II 膜颗粒, 研究甜菜碱对它们释放放氧外周多肽的影响. 结果表明, 甜菜碱对高浓度 NaCl 以及 0.8 mol/L Tris(pH8.0) 处理引起的放氧外周多肽脱落具有保护作用. 而对三氯乙酸钠(TCA)和高温处理不具有保护能力. 用几种卤代乙酸钠处理 PS II 膜颗粒. 发现它们去除放氧外周多肽的能力依次是三氯乙酸钠(TCA) > 二氯乙酸钠(DCA) > 一碘乙酸钠(MIA) > 一溴乙酸钠(MBA) > 一氯乙酸钠(MCA). 卤代乙酸钠去除外周多肽的能力随分子疏水性增强而增大. 表明甜菜碱对于电解质引起的放氧外周多肽释放具有稳定作用, 而对疏水作用引起的外周多肽脱落可能不具有明显保护功能.

关键词 PS II 膜颗粒 放氧外周多肽 Tris 高温 卤代乙酸钠 甜菜碱

高等植物光合作用反应中心 II (PS II) 中突出于基粒片层膜外的 3 个外周多肽 17, 23 和 33ku, 对于放氧功能的维护起着重要作用. 由于位置上的特殊性, 它们成为光合机构中对理化因子最敏感的部位. 因此多种物理化学处理均可使放氧外周多肽洗脱^[1].

细胞相容性溶质不仅可以稳定可溶性蛋白的结构, 而且对膜及膜蛋白的结构也有显著的稳定作用^[2,3], 增强细胞对热、冷、盐等逆境的抵抗能力. Crowe 等^[4]的实验证实, 海藻糖、非还原糖以及其他多元醇类相容性物质可以影响脱水条件下膜脂的相变温度, 改变膜蛋白的构象状态, 稳定膜的结构与功能. Coughlan 和 Heber^[5]研究表明, 在冰冻处理过程中, 另一类细胞相容性物质, 偶极含氮化合物甜菜碱的浓度在 0.1 mol/L 以下时, 对类囊体膜的稳定作用优于蔗糖; 当浓度高于 0.1 mol/L 时, 二者的稳定能力则相反. 体内合成或外界加入甜菜碱可以显著提高 PS II 光合放氧的稳定性^[6].

我们建立了用三氯乙酸钠逐次去除 PS II 放氧外周多肽的新方法^[1], 随后报道了甜菜碱对不同处理引起 PS II 放氧外周多肽释放具有选择性保护作用^[7]. 本文试图通过甜菜碱对不同理化处理引起的放氧外周多肽脱落的保护作用, 阐明甜菜碱选择性保护功能的可能机理.

1 材料和方法

1.1 材料

采用市售的新鲜菠菜 (*Spinacia oleracea* L.)

1.2 方法

1.2.1 PS II 膜颗粒的制备 PS II 膜颗粒的提取见文献[7]. 提取的类囊体经 MN 缓冲液(15 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L Mes, pH6.0)悬浮后, 按 25 mg Triton/mg Chl 的终浓度在暗处逐滴加入 Triton X-100, 4℃ 下搅拌 30 min, 离心所得沉淀用含 20% 甘油的 MN 溶液悬浮, 叶绿素浓度为 5 mg/mL, 置液氮中保存备用.

1.2.2 PS II 膜颗粒处理 (1) 卤代乙酸盐处理. 分别用不同浓度的各种卤代乙酸钠(pH6.0~7.0)处理 PS II 膜颗粒(最终浓度为 0.5 mg Chl/mL), 4℃ 暗处理 30 min, 20 000 × g 离心 10 min, 所得沉淀经反复洗涤后悬浮. (2) 加热处理. 对含不同浓度甜菜碱的 PS II 膜颗粒悬浮液(0.5mgChl/mL)进行加热处理, 处理温度分别为 30, 40, 45, 50℃, 处理时间为 2min. (3) Tris 处理. 用 0.8mol/L Tris(pH8.0)和含不同浓度甜菜碱的 0.8 mol/L Tris (pH8.0)溶液分别处理 PS II 膜颗粒(终浓度 0.5 mgChl/mL), 4℃、暗处理 40 min. 用含 0.4 mol/L 蔗糖的 MN 溶液(SMN)洗涤 3 次, 离心收集沉淀并悬浮于 SMN 溶液中. (4) NaCl 处理同文献[7].

1.2.3 SDS-PAGE 采用 Laemmli 系统, 分离胶浓度为 13.5%, 并含 6mol/L 尿素. 考马斯亮蓝 R250 染色, 岛津 UV-190 型凝胶扫描仪 595 nm 扫描. 以未处理样品为对照, 依据峰高计算各种条件下, PS II 膜颗粒 3 个外周多肽的相对保留量. 所得数据均重复 3 次以上.

1.2.4 卤代乙酸分子疏水性参数 $\log P_x$ 引自文献[8], 利用 $\log P_x = \log P_H + \pi^{[8]}$ 计算甜菜碱的疏水性参数, 式中 P_x , P_H 分别为衍生物(甜菜碱)及母体分子(乙酸)的相分配系数, π 为取代基团(三甲基氨)的疏水性参数.

1.2.5 卤代乙酸分子偶极矩的计算 采用 PCMODEL 分子模型程序中 MMX 分子力学计算方法计算.

2 结果

2.1 甜菜碱对三氯乙酸钠(TCA)处理引起 PS II 放氧外周多肽脱落的影响

文献[7]中报道了 TCA 处理时, 0.4 mol/L 甜菜碱对放氧外周多肽脱落的稳定能力并不比蔗糖具有优势. 我们用 1.2mol/L 甜菜碱缓冲系统(Bet/Mes)做同样处理, 仍以含 0.4mol/L 蔗糖缓冲系统(Suc/Mes)作参比. 图 1 显示, 与 0.4mol/L 甜菜碱处理时一样, 在 0.1mol/L TCA 处理下, 1.2mol/L 甜菜碱维持外周多肽的效果比蔗糖好. 当 TCA 浓度达 0.4mol/L 以上时, 甜菜碱对 17 及 23ku 多肽的稳定能力不及蔗糖; 0.6mol/L TCA 处理时, 1.2mol/L 甜菜碱对 33ku 的稳定能力与蔗糖相同.

2.2 甜菜碱对高温引起 PS II 放氧外周多肽脱落的影响

表 1 所示为不同温度处理下甜菜碱对外周多肽保留量的影响. 从表中可知, 外周多肽保留量在 30℃ 下可稳定保留在 PS II 膜颗粒上; 当温度高于 40℃, 特别是高于 45℃ 时, 3 个外周多肽的保留量显著降低. 在温度处理过程中, 甜菜碱对外周多肽的稳定作用与 0.4 mol/L 蔗糖相比没有显著差异, 提高甜菜碱浓度也不能增强其保护能力. 在 45℃ 以上高温处理时, 1.2mol/L 甜菜碱对外周多肽保留的稳定作用与 0.4mol/L 蔗糖、0.4mol/L 甜菜碱的作用相同.

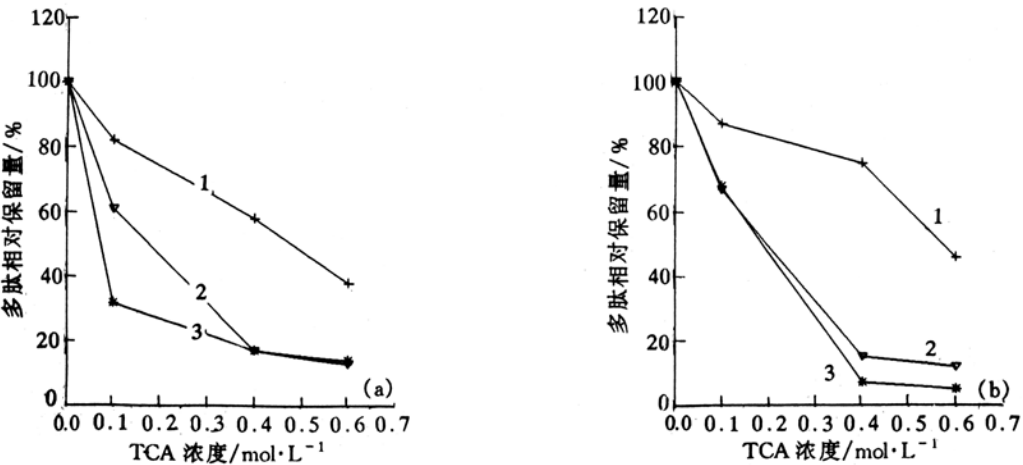


图 1 TCA 处理的 PSⅡ 外周多肽相对保留量
(a)Suc/Mes 系统, (b)Bet/Mes 系统. 1 为 33ku, 2 为 23ku, 3 为 17ku 多肽

表 1 不同温度处理下外周多肽相对保留量(%)

不同温度处理/℃	0.4 mol/L 蔗糖			0.4 mol/L 甜菜碱			1.2 mol/L 甜菜碱		
	17 ku	23 ku	33 ku	17 ku	23 ku	33 ku	17 ku	23 ku	33 ku
4(对照)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30	100	99	100	100	100	100	100	97	100
40	47±5	80±6	68±10	29±4	70±8	58±9	57±5	80±7	90±7
45	31±7	61±7	17±3	22±5	50±10	21±4	22±3	70±4	19±3
50	23±5	59±2	17±3	24±4	49±9	16±3	24±3	52±6	16±3

2.3 甜菜碱对 NaCl 处理引起放氧外周多肽脱落的影响^[7]

高浓度 NaCl 处理是常用的洗脱放氧外周多肽的方法. 在 0.4mol/L Bet/Mes 或 0.4 mol/L Suc/Mes 系统中, 经不同浓度 NaCl 处理后, 外周多肽保留量见图 2. 随着 NaCl 浓度的升高, 在两种系统中, 17, 23ku 多肽的解离程度都逐渐增大, 保留量降低. 与蔗糖系统相比, 甜菜碱对外周多肽产生明显的稳定作用. 17ku 多肽在 3 个外周多肽中解离性能最大, 0.4mol/L 蔗糖与甜菜碱都不能表现出对它有较强的稳定作用. 但二者对 23ku 多肽稳定性的影响显著不同. 在 0.4mol/L 甜菜碱系统中, 经 0.4, 0.8, 1.0mol/L NaCl 处理后, 23ku 多肽保留量依次是 93%, 72%, 52%, 是蔗糖系统中的 1.26, 1.87, 2.75 倍. 由于 1.0mol/L NaCl 处理不影响 33ku 多肽的稳定性, 故在两系统中没有差异.

2.4 甜菜碱对 Tris 处理引起放氧外周多肽脱落的影响

0.8mol/L Tris 处理 PSⅡ 膜颗粒也可使外周多肽释放, 处理后分别有 63%, 57% 和 49% 的 17, 23 和 33ku 外周多肽被释放(表 2). 而在含不同浓度甜菜碱的 Tris 溶液中处理, 外周多肽的保留量明显增加. 随着甜菜碱浓度的增高, 3 个外周多肽的保留量都相应增加. 当甜菜碱浓度达到 1.2mol/L 时, 17 和 23ku 外周多肽的释放量降低至 37% 和 47%, 33ku 多肽已不受 Tris 处理的影响而完全保留.

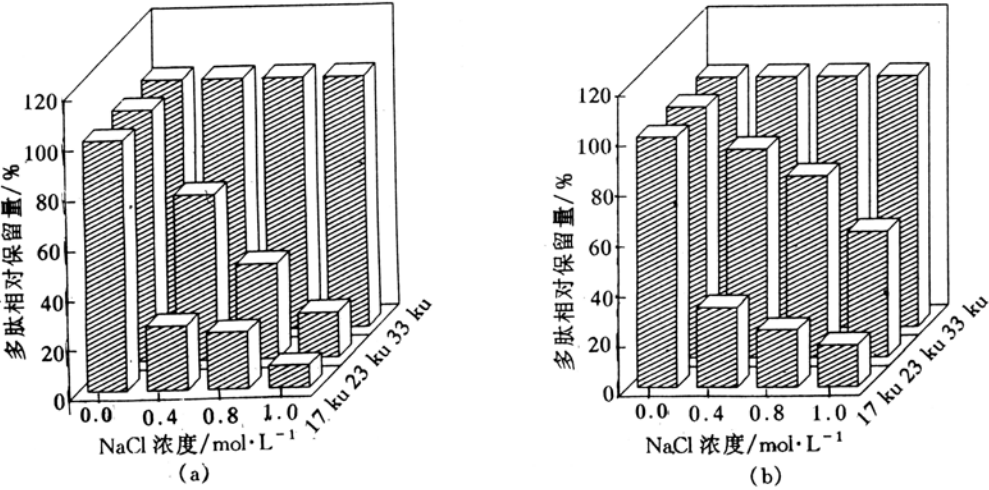


图 2 0.4mol/L 蔗糖和甜菜碱对外周多肽的稳定作用
(a)0.4mol/L 蔗糖/Mes 处理系统, (b)0.4mol/L 甜菜碱/Mes 处理系统

表 2 甜菜碱对 Tris 处理后外周多肽保留量的影响 (%)

组号	不同浓度处理	17 ku	23 ku	33 ku
	对照	100	100	100
(1)	0.8 mol/L Tris	37 ± 4	43 ± 3	51 ± 6
(2)	(1) + 0.4 mol/L Bet	38 ± 5	43 ± 6	63 ± 7
(3)	(1) + 0.8 mol/L Bet	47 ± 2	43 ± 6	66 ± 7
(4)	(1) + 1.2 mol/L Bet	63 ± 4	53 ± 4	100

2.5 不同卤素对一卤乙酸钠引起放氧外周多肽脱落的影响

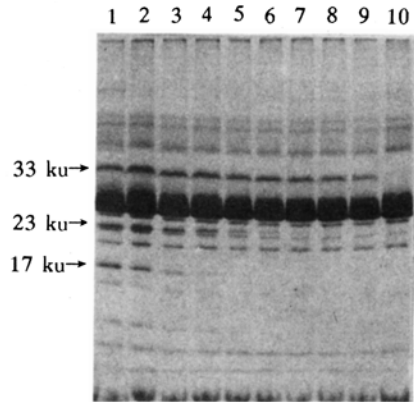


图 3 经一氯乙酸钠处理 PSⅡ膜颗粒后
放氧外周多肽保留量的变化
1 为对照, 2~10 为依次是 0.1, 0.2, 0.4, 0.6,
0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0mol/L MCA 处理

除了已经发现的 TCA 外, 进一步的实验结果表明, 用其他卤代乙酸钠处理 PSⅡ膜颗粒, 均可引起 3 个外周多肽部分或全部释放. 图 3 是不同浓度的一氯乙酸钠 (MCA) 处理后, 外周多肽保留量的变化. 随着 MCA 浓度的升高, 17ku 多肽的保留量首先发生改变, 在 MCA 浓度为 0.4mol/L 时, 17ku 的保留量为对照的 14%; 23ku 多肽在 1.2mol/L 的 MCA 处理时尚有 17% 的残留; 当 MCA 浓度增为 2.0mol/L 时仍没能使 33ku 完全脱落.

为了研究不同卤代乙酸钠与引起 3 个外周多肽依次脱落的关系或规律, 我们选用不同卤素的一卤乙酸钠: 一碘乙酸钠 (MIA)、一溴乙酸钠 (MBA)、一氯乙酸钠 (MCA) 分别处理 PSⅡ膜颗粒, 把引起 3 个外周多肽脱落达 90% 的浓度定为临界浓度. 将它们洗脱外周多肽

的能力与它们的疏水性参数、分子偶极矩以及 pK 值作比较。

表 3 为不同卤素的一卤乙酸钠洗脱外周多肽的临界浓度及理化参数。一卤乙酸钠洗脱外周多肽的能力依次为 MIA>MBA>MCA, 比较其理化参数可知, 它们解离外周多肽的能力随分子疏水性和 pK 值的增加而增强。

表 3 不同卤素相同卤素数卤代乙酸钠的性质比较

	临界浓度			$\log P_x$	分子偶极矩	pK
	17 ku	23 ku	33 ku			
MCA	0.50	1.40	— ^{a)}	0.32	3.30	2.86
MBA	0.20	0.08	1.50	0.64	3.10	2.90
MIA	0.20	0.60	1.20	0.84	— ^{b)}	3.18

a)实验条件下未测到下限

b)空缺

2.6 不同氯代数对氯代乙酸钠引起外周多肽脱落的影响

用不同取代数的氯代乙酸钠：一氯乙酸钠(MCA)、二氯乙酸钠(DCA)以及三氯乙酸钠(TCA)做同样处理, 它们洗脱外周多肽的临界浓度及理化参数见表 4。由表中可以看出, 各种氯代乙酸钠洗脱 3 个外周多肽的能力依次是 TCA>DCA>MCA。随着氯代数目的增加, 各种氯代乙酸钠分子的疏水性增大, 分子偶极矩与 pK 值减小, 解离外周多肽的能力增强。

表 4 同一卤素不同氯代数卤代乙酸钠的性质比较

	临界浓度			$\log P_x$	分子偶极矩	pK
	17 ku	23 ku	33 ku			
MCA	0.50	1.40	— ^{a)}	0.32	3.30	2.86
DCA	0.15	0.50	1.00	1.33	2.50	1.29
TCA	0.10	0.40	0.60	1.54	2.10	0.67

a)实验条件下未测到其下限

3 讨论

多种理化因子都可引起外周多肽的释放。从影响蛋白质相互作用的角度来看, 我们所用理化因子的作用方式大致可归为两类: 以疏水作用(如卤代乙酸盐)或离子相互作用(如 NaCl)影响外周多肽的稳定。许多实验都证实甜菜碱对高浓度 NaCl 引起的放氧外周多肽脱落具有很好的保护作用^[6,9]。我们发现, 随着盐浓度的增加, 甜菜碱稳定 23ku 多肽的能力比蔗糖显著增强(图 2)。Ricket 等^[10]曾对一级胺类化合物抑制光合放氧进行研究, 指出高离子强度是胺类化合物抑制放氧的原因之一, 这种处理可引起 17, 23ku 多肽的脱落。我们的研究结果显示, 甜菜碱对 0.8mol/L Tris(pH8.0)处理引起的外周多肽脱落具有明显的保护作用, 表明高浓度 Tris 处理引起外周多肽释放的机制可能与 NaCl 等离子化合物相似, 以离子键影响外周多肽的稳定。这进一步证实涉及电解质引起的蛋白质稳定性改变方面, 甜菜碱是有效的稳定剂^[9]。

与对 NaCl, Tris 处理的效应不同, 甜菜碱对 TCA 及温度处理引起放氧外周多肽不具有明显稳定能力, 即使甜菜碱浓度达到 1.2mol/L, 其效果也与 0.4mol/L 蔗糖相似。所以 TCA 与温度处理引起外周多肽脱落机制有一定共性, 与离子键影响不同。

同 TCA 一样,本研究中所用的其他卤代乙酸盐处理 PS II 膜颗粒也可引起放氧外周多肽部分或全部脱落. 综合表 3 与表 4,将不同卤代乙酸钠按照其释放 3 个外周多肽能力的强弱排列并与它们的理化参数比较(表 5),我们发现卤代乙酸钠引起 3 个外周多肽释放的能力与它们的疏水性最密切,随分子疏水性参数 $\log P_x$ 的增大,洗脱外周多肽能力增强. 卤代乙酸盐的这种作用与它们的解离能力(pK 值)无关. 分子偶极矩大小反映分子极性的大小. 从表 5 看,卤代乙酸盐分子的偶极矩减小,即分子极性减小,洗脱外周多肽的能力则趋于增强. 这表明卤代乙酸盐对放氧外周多肽的作用不属于静电或极性相互作用类型,疏水作用强弱很可能是影响卤代乙酸盐释放放氧外周多肽能力的关键.

表 5 卤代乙酸钠释放放氧外周多肽的能力及性质比较

解离能力	MCA<	MBA<	MIA<	DCA<	TCA
疏水性参数($\log P_x$)	0.32	0.64	0.84	1.33	1.54
分子偶极矩	3.30	3.10	— ^{a)}	2.50	2.10
pK 值	2.86	2.90	3.18	1.29	0.63

a)空缺

卤代乙酸钠可能是以分子的形式作用于 PS II 膜颗粒,通过影响外周多肽间的疏水作用引起多肽释放;高温处理主要影响维护生物大分子稳定的疏水作用^[11]. 甜菜碱对 TCA 以及高温引起的放氧外周多肽释放均不具有保护作用(图 1,表 1),暗示甜菜碱对于由疏水作用引起的外周多肽释放可能不具有稳定能力.

与其他相容性分子一样,甜菜碱结合在蛋白质表面可增强蛋白质分子的水化程度,维持蛋白质结构的稳定^[12]. 甜菜碱在蛋白质表面的结合是受其分子疏水性影响的. 由于甜菜碱分子含 3 个甲基基团,可能易于在外周多肽表面、特别是那些具有较大疏水表面的多肽上结合. 当 PS II 膜颗粒受中等强度的盐如 NaCl 等处理时,甜菜碱的存在可能减缓了盐对放氧外周多肽结构及多肽间相互作用的影响. 而当卤代乙酸钠处理时,由于甜菜碱分子疏水性远比卤代乙酸钠分子的小(计算甜菜碱疏水性参数 $\log P_x < -0.66$),因而卤代乙酸钠分子更易于结合到外周多肽表面,造成甜菜碱对卤代乙酸钠引起的外周多肽脱落不具有保护作用. 而对那些表面极性较高,更易与离子结合的蛋白,在高浓度盐条件下,甜菜碱也不能表现出明显的稳定作用,这可能可以解释 0.4mol/L 甜菜碱对 17ku 多肽稳定能力较弱的原因.

参 考 文 献

1 Xu C, Li Y, Shen Y. The sequential release of three extrinsic polypeptides in the PS II particles by high concentrations of trichloroacetate. naturwissenschaft, 1995, 82: 477~478

2 William W P, Gounaris K. Stabilization of PS II -mediated electron transport in oxygenevolving PS II core preparations by the addition of compatible co-solutes. Biochim Biophys Acta, 1992, 1 100: 92~97

3 Homann P H. Stabilization of the water oxidizing polypeptide assembly on photosystem II membranes by osmolytes and other solutes. Photosyn Res, 1992, 33: 29~36

4 Crowe J H, Hoekstra F A, Crowe L M. Anhydrobiosis. Ann Rev Physiol, 1992, 54: 579~599

5 Coughlan S J, Heber U. The role of glycinebetaine in the protection of spinach thylakoids against freezing stress. Planta, 1982, 156: 62~69

6 Papageorgiou G C, Murata N. The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the

- oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosyn Res*, 1995, 44: 243~252
- 7 侯彩霞, 徐春和, 汤章城, 等. 甜菜碱对 PS II 放氧中心结构的选择性保护. *科学通报*, 1997, 42(17): 1 857~1 859
 - 8 Hansch C, Leo A. *Substituent Constant for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. NY: John Wiley and Sons, 1979. 174~176
 - 9 Manetas Y. A re-examination of NaCl effects on phosphoenol pyruvate carboxylase at high (physiological) enzyme concentrations. *Physiol Plant*, 1990, 78: 225~229
 - 10 Ricket K W, Sears J, Beck W F, et al. Mechanism of irreversible inhibition of O₂ evolution in photosystem II by Tris (hydroxymethyl) aminomethane. *Biochem*, 1991, 30: 7 888~7 894
 - 11 Mckersie B D, Leshem Y. *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1994. 181~217
 - 12 Schobert . Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *J Theor Biol*, 1977, 68: 17~26