

98, 6(1)

1-7

热带亚热带植物学报 1998, 6(1):1-7  
Journal of Tropical and Subtropical Botany

1998/08/26X/006/001

1-86

## 蛋白质修饰剂对盐藻光合作用的影响

江月玲

林植芳<sup>v</sup> 彭长连

(广州师范学院生物系, 广州 510400) (中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

Q749.212

Q925.11

**摘要** 经蛋白质化学修饰剂 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)、丁二酮(BTD)和对-氯汞苯甲酸( $\rho$ CMB)处理的盐藻细胞光合速率下降, 0.17 mmol/L的 $\rho$ CMB和0.07 mmol/L的NBS可完全抑制光合放氧。在藻细胞的可见光(400-700 nm)区吸收光谱中, 三种修饰剂都降低了整个波段的吸收。在两个主要吸收峰中, 678 nm吸收值的下降略大于436 nm的下降。在紫外光谱区(200-300 nm),  $\rho$ CMB和BTD使原吸收峰(203 nm)值明显降低, NBS处理使吸收峰红移13 nm。细胞胀破后紫外光谱出现更显著变化, 峰位移至223 nm(BTD), 250 nm(NBS), 或至214-237 nm而呈一个宽的平台( $\rho$ CMB)。紫外差示吸收光谱显示210 nm的负峰; 随修饰剂浓度增大, 负差示峰可移到225 nm(NBS), 245.5 nm( $\rho$ CMB)和212 nm(BTD)。

**关键词** 盐藻; 蛋白质修饰剂; 光合作用; 吸收光谱

**分类号** Q175

EFFECTS OF PROTEIN MODIFIERS ON  
PHOTOSYNTHESIS IN *DUNALIELLA SALINA*

Jiang Yueling

(Department of Biology, Guangzhou Teachers College, Guangzhou 510400)

Lin Zhifang Peng Changlian

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

**Abstract** Three protein modifiers, butanedione (BTD), N-bromosuccinimide (NBS) and  $\rho$ -chloromercuribenzoic acid ( $\rho$ CMB), were used to treat cells of a green marine alga, *Dunaliella salina*. The photosynthetic oxygen evolution and absorption spectra were studied by oxygen electrode and spectrophotometer.

All of the used modifiers inhibited the photosynthetic rate of *Dunaliella salina* to a certain extent. The inhibition was 14.6% (BTD, 0.21 mmol/L), 21.4% (NBS, 0.02 mmol/L) and 39.7% ( $\rho$ CMB, 0.1 mmol/L), respectively. A complete loss of photosynthetic capacity was found in the presence of 0.17 mmol/L  $\rho$ CMB or 0.7 mmol/L NBS.

The absorbance in visible wavelength of 400-700 nm was reduced by three modifiers. The decrease of main absorption peak at 678 nm was slightly larger than that of another main peak at 436 nm. In ultraviolet spectra (200-300 nm) of *D. salina* cells, treatment of  $\rho$ CMB and BTD decreased the absorbance of the 203 nm peak, while NBS treatment induced a red shift of wavelength about 13 nm. After hypoosmotic shocking of cells, the

1996-10-16 收稿; 1997-09-22 修回

chemical modification of proteins resulted in much obvious changes in ultraviolet spectra patterns. UV spectrum showed a wide absorption plateau in the range of 214 nm to 237 nm when cells were treated with  $\rho$ CMB, but in the presence of BTD or NBS, red shifts from initial peak (203 nm) to 233 nm or to 250 nm, respectively, with declining peak height were observed.

A negative differential peak at 210 nm was displayed for modified cells in ultraviolet differential absorption spectra. It was further shifted to 225 nm (NBS), 245.5 nm ( $\rho$ CMB) and 212 nm (BTD), when the modifiers concentration increased to 5 mmol/L. The possible reason for the reduction of the photosynthetic rate by protein modifiers is discussed.

**Key words** *Dunaliella salina*; Protein modifier; Photosynthesis; Absorption spectrum

许多蛋白质的化学修饰剂常被用于研究酶类活性部位的氨基酸残基组分。这些化学修饰剂的作用在于能专一地对酶结构中的某一功能基团进行共价修饰,影响酶的活性及其动力学反应过程<sup>[1]</sup>。经修饰的蛋白质与酶的吸收光谱和荧光光谱往往发生了不同程度的变化,反映了其分子构象的变动。过去的这些工作常以高纯度的单一的酶蛋白为研究对象,而细胞和生物活体中皆由具复杂结构与生理功能的多种蛋白体系组成。一种蛋白质修饰剂的导入可能将对多种蛋白质中有关功能基团进行修饰,从而引起机体内重要生理特性的变化,然而目前对此知之甚少。

单细胞盐藻是一种海生绿藻,其细胞外只覆盖着一层富含糖蛋白和神经氨酸的可塑性甚强的外膜<sup>[2]</sup>,没有细胞壁,细胞内有一个很大的杯状叶绿体,光合放氧速率较高<sup>[3,4]</sup>,蛋白质含量占干重的30%<sup>[5]</sup>。因此它是一种探讨蛋白质修饰与细胞光合功能关系的较理想的材料。本文以盐藻为对象,研究了儿种蛋白质化学修饰剂对盐藻的光合速率及吸收光谱特性的影响,为阐明具有多酶体系和复杂蛋白结构的完整细胞的蛋白构象和光合功能的关系等提供一些依据。

## 1 材料与方 法

盐藻 *Dunaliella salina* 1009 由华南植物研究所生理室提供。藻细胞在含 2 mol/L NaCl 的 ASP 培养基中, 25 ℃, 200  $\mu$ mol  $m^{-2}s^{-1}$  光下培养 25 d。试验前将藻液于 800  $\times$ g 离心 10 min, 收集藻细胞重悬浮于 2 mol/L NaCl 待用。

参照彭长连等以前的方法用氧电极法测定光合放氧速率<sup>[6]</sup>。反应液含 2 mol/L NaCl, 10 mmol/L  $NaHCO_3$ , 50 mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.5。测定时控制温度 25 ℃ 及光合作用饱和光强 400  $\mu$ mol  $m^{-2}s^{-1}$ 。试验共用三种蛋白质化学修饰剂, 即精氨酸残基修饰剂丁二酮 (BTD, butanedione), 色氨酸和酪氨酸残基修饰剂 N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS, N-bromosuccinimide) 和巯基修饰剂对-氯汞苯甲酸 ( $\rho$ CMB,  $\rho$ -chloromercuribenzoic acid)。修饰剂加入藻细胞液中 10 min 后, 作光合放氧速率测定, 30 min 后作吸收光谱测定。部分试验还加胰蛋白酶 (Trypsin) 作比较。修饰剂和胰蛋白酶浓度见实验结果中各图。吸收光谱 (200-300 nm 及 300-700 nm) 和紫外差示吸收光谱 (200-300 nm) 以 Beckman Du-7 HS 分光光度计作自记扫描。参照林植芳<sup>[6]</sup>的方法。吸收光谱测定时以修饰剂为空白对照, 消去修饰剂自身的吸收。差

示吸收光谱测定用双杯法,以含缓冲液和修饰剂各一杯(皿)相联作为参比,而样品光束中含相联的一杯盐藻加修饰剂和一杯修饰剂溶液。每个测定的盐藻浓度相同,相当于含叶绿素 20  $\mu\text{g}$ 。

## 2 试验结果

### 2.1 化学修饰剂对盐藻光合放氧速率的影响

三种化学修饰剂(NBS,  $\rho\text{CMB}$  和 BTD)皆能对盐藻的光合放氧速率产生抑制作用,低浓度下,0.21 mmol/L 的 BTD 抑制光合放氧速率14.6%,0.02 mmol/L 的 NBS 抑制 21.4%,而 0.1 mmol/L 的  $\rho\text{CMB}$  抑制 39.7%。抑制效应随修饰剂浓度增高而加剧。从三种修饰剂所用浓度及其对盐藻光合速率的抑制%看来(图1),NBS 的抑制作用最强,BTD 较弱, $\rho\text{CMB}$  的作用居中。0.17 mmol/L 的  $\rho\text{CMB}$  和 0.07 mmol/L 的 NBS 即能完全抑制盐藻的光合放氧,而 0.42 mmol/L 的 BTD 只抑制 25%的放氧速率。可见盐藻蛋白质中色氨酸和酪氨酸残基的被修饰,可明显降低盐藻的光合功能。

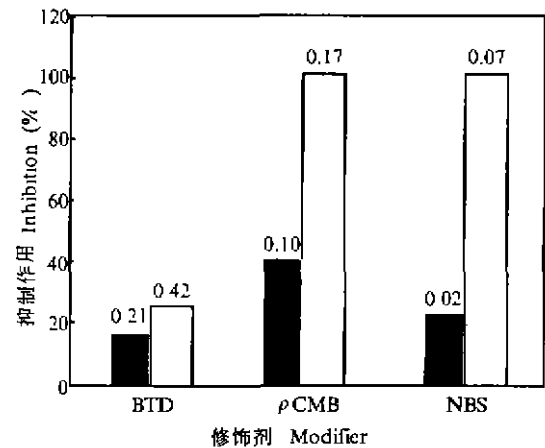


图1 蛋白质修饰剂对盐藻光合作用速率的抑制  
Fig. 1 The inhibition of protein modifiers on photosynthetic rate in *Dunaliella salina*  
图中数字为修饰剂浓度 mmol/L  
The number above each column is the concentration (mmol/L) of modifiers

### 2.2 化学修饰剂对盐藻吸收光谱的影响

在300-700 nm波段中,盐藻细胞显示436 nm、678 nm的吸收峰和478 nm的吸收肩,这与French报告*Euglena*细胞水悬液具675 nm和436 nm吸收<sup>[7]</sup>相似。 $\rho\text{CMB}$  (0.17 mmol/L)和BTD (0.21 mmol/L)减弱盐藻的光吸收,但对整个波谱形状没有影响(图2B)。然而,BTD使678 nm的吸收下降6.5%、436 nm下降10%,因而提高了436 nm/678 nm吸收比值。在胰蛋白酶的作用下,吸收光谱的三个高值点皆明显下降,且436 nm峰变宽(图2A)。

盐藻的紫外吸收光谱(200-300 nm)只有一个单峰203 nm。 $\rho\text{CMB}$ 作用后,203 nm吸收下降,260 nm呈现低谷,280 nm的吸收略有回升。BTB也使203 nm吸收降低且峰形加宽。NBS(0.02 mmol/L)对紫外区的吸收有显著的影响,原峰位向长波方向漂移13 nm,出现于216 nm处,且近280 nm也有较高的吸收(图3)。与图2的长波区吸收相比,短波区吸收光谱的变化较明显,尤以NBS的作用效应较大。这表明盐藻的紫外吸收光谱特性受到了蛋白质化学修饰剂的干扰。图3还可见,胰蛋白酶对盐藻内蛋白质的降解作用,也导致紫外吸收峰红移到223 nm,峰值下降,且在240-260 nm区间也有较高的吸收。

如果将盐藻细胞放于蒸馏水中低渗胀破,使细胞内含物流出,再与上述的蛋白质修饰剂反应,结果引起紫外吸收光谱更为显著的变化(图4)。胀破藻对照的吸收峰出现于212 nm,BTD作用后的紫外峰移至223 nm处,NBS修饰后的吸收峰红移到250 nm,与对照相差38 nm,峰

值明显降低, 而  $\rho$ CMB 则诱致了 214–237 nm 的一个宽而平的高峰。这些加剧的变化, 可能是细胞胀破使其内含物中的蛋白质更易于和化学修饰剂相互作用之故。

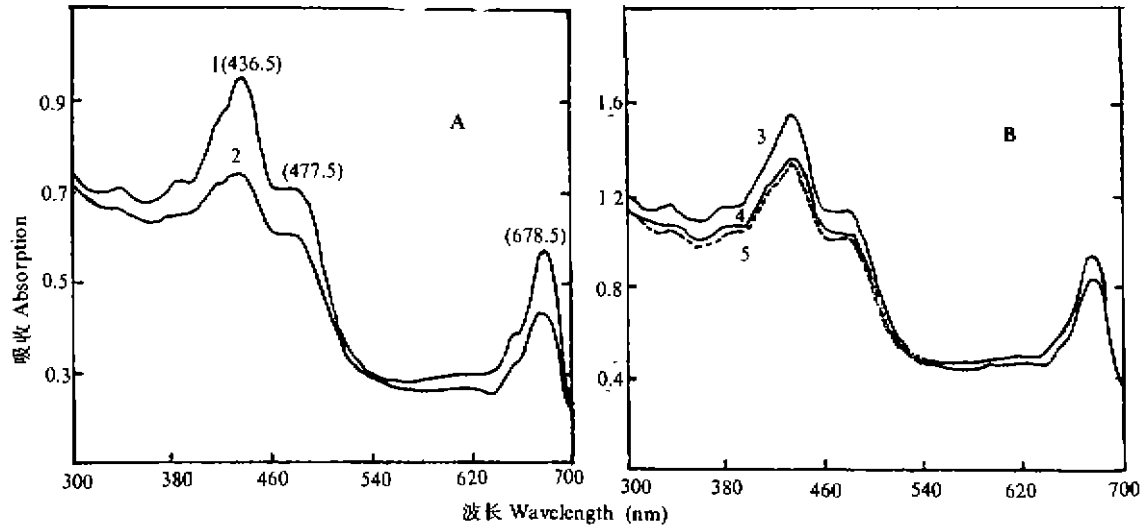


图2 蛋白质修饰剂和胰蛋白酶对盐藻吸收光谱的影响

Fig. 2 Effects of protein modifiers and trypsin on absorption spectra of *Dunaliella salina*  
1,3 对照 Control, 2 Trypsin(100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); 4.  $\rho$ CMB(0.17 mmol/L). 5. BTD(0.21 mmol/L)

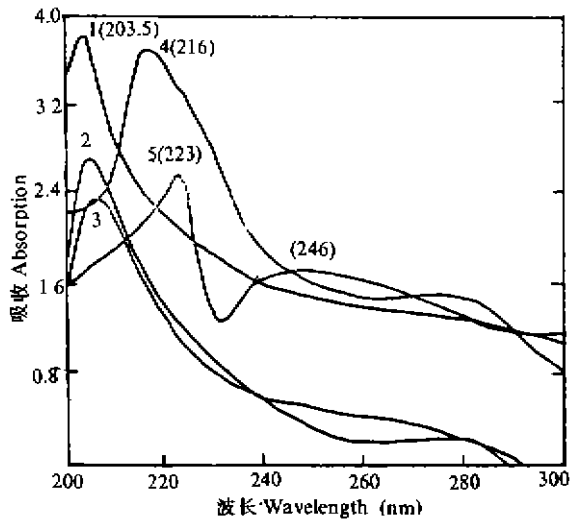


图3 蛋白质修饰剂和胰蛋白酶对盐藻紫外吸收光谱的影响

Fig. 3 Effects of protein modifiers and trypsin on ultraviolet absorption spectra of *Dunaliella salina*

1. 对照 Control, 2.  $\rho$ CMB (0.17 mmol/L);
3. BTD (0.21 mmol/L), 4. NBS (0.02 mmol/L),
5. Trypsin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

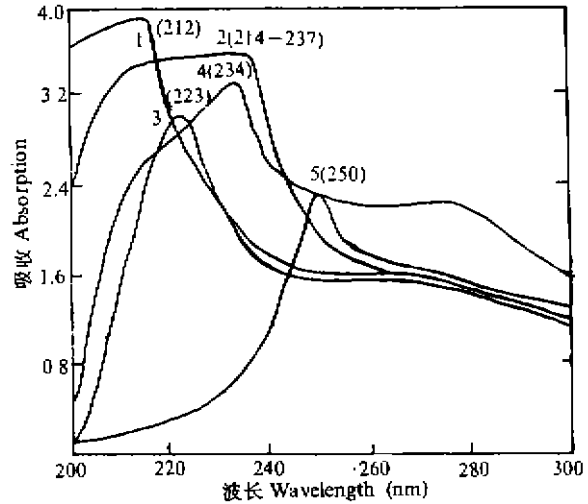


图4 蛋白质修饰剂和胰蛋白酶对盐藻胀破细胞紫外吸收光谱的影响

Fig. 4 Effects of protein modifiers and trypsin on ultraviolet absorption spectra in hypotonic shock cells of *Dunaliella salina*

1. 对照 Control; 2.  $\rho$ CMB (0.17 mmol/L);
3. BTD (0.21 mmol/L); 4. Trypsin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ );
5. NBS (0.02 mmol/L)

### 2.3 化学修饰剂对盐藻紫外差示吸收光谱的影响

图5是经修饰的盐藻细胞紫外差示吸收光谱,可见三种修饰剂 $\rho$ CMB, NBS和BTD在浓度较低时(图5中的曲线2,3,5),紫外差示吸收光谱中皆有一个在210 nm附近的负峰,以NBS处理的负峰最为明显。修饰剂浓度增高至各为5 mmol/L,负差示峰间出现差别。BTD处理者红移仅2 nm, NBS修饰的负差示峰从210.5 nm移至225 nm,  $\rho$ CMB修饰的则漂移到245.5 nm,其效应甚至大于NBS。修饰剂之间在相同的较高浓度(5 mmol/L)以及不同的低浓度下(0.07 mmol/L或0.2 mmol/L)所出现差示吸收光谱变化上的差异,可能与盐藻的蛋白质组成,结构特性及其与修饰剂接触的程度有关。较高的修饰剂浓度引起紫外差示光谱较深刻的变动,推测是在较高浓度下可结合于多种蛋白质的相应氨基酸残基,引起其构象或结构较强烈变化的一种综合效应。

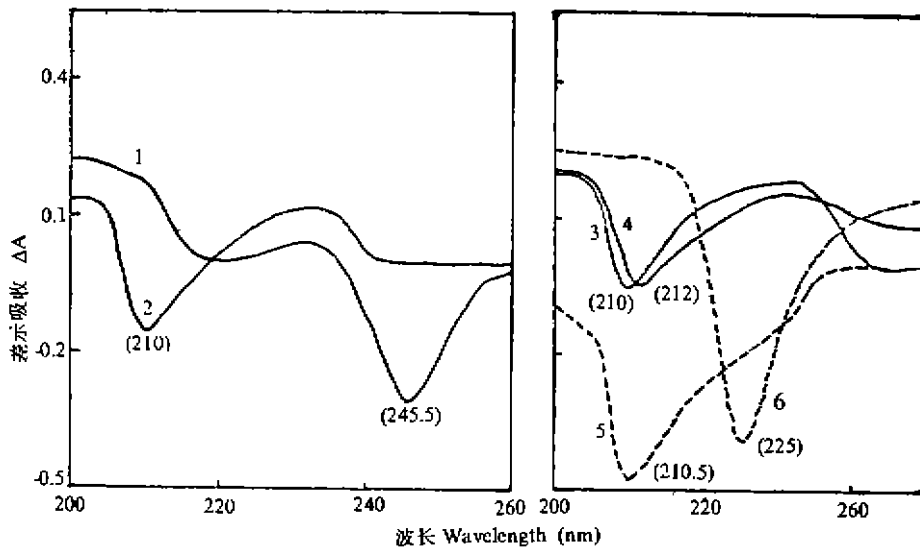


图5 蛋白质修饰剂处理的盐藻细胞的紫外差示光谱

Fig. 5 Ultraviolet differential spectra of *Dunaliella salina* cells treated by protein modifiers

1.  $\rho$ CMB 5 mmol/L; 2.  $\rho$ CMB 0.2 mmol/L; 3. BTD 0.2 mmol/L;  
4. BTD 5 mmol/L; 5. NBS 0.07 mmol/L; 6. NBS 5 mmol/L

## 3 讨论

对盐藻细胞蛋白质的半胱氨酸残基,精氨酸残基和色氨酸、酪氨酸残基的化学修饰,明显地抑制了盐藻的光合作用(图1),表明这些氨基酸残基是制约盐藻光合活力的因子。盐藻细胞可见光谱与叶绿素提取液的吸收光谱(未表示)相近,表明其吸收光谱主要与光合色素的吸光特性有关。通常660-670 nm和430 nm是叶绿素a的吸收峰,450-490 nm是包括叶绿素b和类胡萝卜素的吸收峰。经修饰的盐藻在678 nm和436 nm吸收降低以及436 nm/678 nm吸收值升高,说明光合色素尤其是叶绿素a含量有所下降。然而,可见光谱受修饰剂影响的程度不如紫外光谱和光合放氧速率,即光合色素数量的轻度下降不是修饰剂抑制光合作用的主要原

因。林植芳等近期用叶绿素荧光技术的研究表明,化学修饰剂 NBS,  $\rho$ CMB, BTD 和 DEPC (Diethylpyrocarbonate) 可使菠菜的 PS II 失活,显著降低原初光化学效率  $F_v/F_m$ 、光化学猝灭系数  $q_P$  和光合电子传递的量子效率  $\Phi_{PS II}^{80}$ 。因此,推测文中的修饰剂抑制盐藻的光合作用也可能与抑制光合作用中能量的转移、分配和利用以及部分失活 PS II 有关。

光系统反应中心,光合膜色素蛋白复合体和光合作用碳代谢酶类的组成中皆含有重要的氨基酸残基,如精氨酸、色氨酸和巯基等<sup>[9,10]</sup>,对维持光合器结构的稳定性和功能具有重要的作用。从本文中蛋白质修饰剂对盐藻光合作用的抑制效应以及对吸收光谱的改变程度看来(图 1-3),三种修饰剂相比,NBS 的抑制效果最为显著,意味着蛋白质和酶类中的色氨酸与酪氨酸残基对盐藻细胞光合功能的正常运行可能起着更重要的作用。光合器功能取决于叶绿体结构的完整性。张正东等曾以胰蛋白酶作为结构修饰剂研究其对叶绿体膜结构和功能的影响,发现胰蛋白酶可钝化 PS II 氧化侧和还原剂的电子传递,50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  的胰蛋白酶抑制 DCIP 的光还原近 50%<sup>[11]</sup>。本文中胰蛋白酶引起盐藻的完整或胀破细胞在可见光区吸收的下降和紫外光区吸收波长的红移及吸收峰值降低,其变化趋势与用三种蛋白质修饰剂(NBS, BTD 和  $\rho$ CMB)的效应近似,这从一个侧面反映了这些修饰剂对光合作用的抑制与影响叶绿体中功能蛋白正常的结构或构象有关。

从紫外吸收光谱与紫外差示光谱的研究通常可获得生物大分子结构与功能关系的有意义信息。紫外光谱中的远紫外区(185-245 nm)是肽键的吸收峰,与蛋白质的肽链构象相关;近紫外区(240-320 nm)的吸收则主要是蛋白质侧链上的芳香氨基酸残基所贡献<sup>[12]</sup>。盐藻细胞经三种化学修饰剂作用,主要的变化皆发生于远紫外区,出现了峰位红移和峰值下降现象(图 3,4)。NBS 氧化色氨酸生成氧化吲哚,引起 250 nm 吸收增大, $\rho$ CMB 修饰蛋白质的巯基形成巯醇基在 250-255 nm 有吸收<sup>[11]</sup>。Okunuki 也曾指出,蛋白质在 245 nm 的吸收峰是由于 -SH 的解离<sup>[13]</sup>。我们观察到紫外吸收峰 250 nm 及紫外差示光谱的负 245.5 nm 吸收峰分别出现于 NBS 修饰的胀破盐藻细胞或高浓度  $\rho$ CMB 修饰的藻细胞中(图 4,5)。这与两种修饰剂对蛋白质中相应氨基残基修饰的结果相符。这些结果可见,修饰剂的作用除了专一地修饰相应的氨基酸残基,还可非专一性地改变蛋白质肽链的构象,从而降低了光合作用能力。Nagnuson 等以另一种巯基的修饰剂 NEM(N-乙基马来酰亚胺)处理菠菜叶绿体,发现 NEM 可与偶联因子 CF1 的  $\gamma$  亚单位上的 -SH 基结合而抑制光合磷酸化<sup>[14]</sup>。这也许是盐藻光合作用受  $\rho$ CMB 影响的原因之一。

## 参考文献

- 1 杨寿钧,钱世钧,孟广震.氨基酸残基的化学修饰.张树政,孟广震,何忠效主编.酶学研究技术.北京:科学出版社,1987,289-322
- 2 Grinzburg M. *Dunaliella*, a green alga adapted to salt. *Adv Bot Res*, 1987, 14:93-183
- 3 Ben-Amotz A, Avron M. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for product of commercial interest. In: Cresswell R C et al. eds. *Algal Biotechnology*. Longman, 1989, 92-114
- 4 彭长连,林植芳,孙谷畴等.两种盐藻光合作用特性的比较.海洋与湖沼,1994,25(6):606-611
- 5 Cortinas T I, Silva H J, Ertola R J. Photosynthetic production of *Dunaliella* biomass from natural salt water and carbon dioxide. *J Chem Tech Biotech*, 1984, 34B:291-295

- 6 林植芳. 活性氧对盐藻光合作用和吸收光谱的影响. 中国科学院华南植物研究所集刊, 第 10 集, 北京: 科学出版社, 1995, 73-80
- 7 French C S. Action spectra and optical properties of cellular pigments. In: Withrow R B ed. *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*. American Association for the Advancement of Science, Washington D C, 1959, 15-40
- 8 林植芳, 李晓萍, 林桂珠等. 蛋白质修饰剂、变性剂和活性氧对菠菜叶片光系统 II 光失活的影响. 热带亚热带植物学报, 1997, 5(1):59-64
- 9 汤小仪, 施教耐. 色氨酸残基在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化功能中的作用. 植物生理学报, 1988, 14(1):88-93
- 10 Kaiser W M. Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta*, 1979, 145:377-382
- 11 张正东, 李良壁, 谭克辉等. 以蛋白酶作为结构修饰剂的叶绿体膜结构和功能的分析. 植物学报, 1980, 22(1):49-55
- 12 杨寿钧. 紫外差示光谱. 张树政, 孟广震, 何忠效主编. 酶学研究技术. 北京: 科学出版社, 1987, 338-346
- 13 Okunuki K. Denaturation and inactivation of enzyme proteins. *Adv Enzymol*, 1965, 23:66-68
- 14 Ragnuson R P, McCarty R E. Influence of adenine nucleotides on the inhibition of photophosphorylation in spinach chloroplasts by N-ethylmaleimide. *J Biol Chem*, 1975, 250:2593-2598