

• 研究简报 •

十二烷基硫酸钠诱导 *Rhodobacter azotoformans* 外周捕光复合体 LH2
B800 细菌叶绿素特异性解离董彦敏^a 崔小华^a 杨素萍^{*,a,b} 岳慧英^b 赵春贵^{*,a,b}
焦念志^c 曲音波^d^(a) 山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室 生命科学与技术学院 太原 030006)^(b) 华侨大学生物工程与技术系 厦门 361021)^(c) 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门 361005)^(d) 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 采用吸收光谱法研究了十二烷基硫酸钠(SDS)诱导 *Rhodobacter azotoformans* 外周捕光复合体 LH2 细菌叶绿素(bacteriochlorophylls, BChls)的解离行为和规律. 结果表明: 室温下, 在 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中, 低浓度 SDS 只诱导 LH2 中 B800 细菌叶绿素解离生成游离 BChls, 而 B850 不受影响; 当浓度达到 0.08% (w/V) 时, 能特异性地诱导 B800 缺失, 其缺失过程和游离 BChls 的生成过程均符合单指数模型, 且二者的速率常数近似相等. 高浓度 SDS 能同时诱导 B800 和 B850 解离生成游离 BChls, 其中 B800 可发生缺失, 而 B850 则不完全解离, 解离过程均符合单指数模型; B800 对 SDS 更敏感, 其解离速率常数约是 B850 的 4 倍, 游离 BChls 生成速率常数明显低于 B800 解离速率常数, 而与 B850 解离速率常数相接近.

关键词 LH2; SDS; 细菌叶绿素; *Rhodobacter azotoformans*

Specific Release of Bacteriochlorophylls B800 of LH2 from *Rhodobacter azotoformans* Induced by Sodium Dodecyl SulfateDong, Yanmin^a Cui, Xiaohua^a Yang, Suping^{*,a,b} Yue, Huiying^b
Zhao, Chungui^{*,a,b} Jiao, Nianzhi^c Qu, Yinbo^d^(a) Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006)^(b) Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021)^(c) State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005)^(d) State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract The release behaviors of bacteriochlorophylls of peripheral light-harvesting complex LH2 from *Rhodobacter azotoformans* induced by sodium dodecyl sulfate (SDS) were investigated using absorption spectroscopy. The results indicated that bacteriochlorophylls of B800 band are released from their binding sites and transformed into free bacteriochlorophylls by incubating LH2 sample in 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0) buffer containing SDS of low concentration at room temperature. However, the bacteriochlorophylls of B850 band are not released. The dynamics of B800 release and free BChl formation induced by 0.08% (w/V) SDS can be well fitted by the monoexponential model. The rate constant of B800 release is

* E-mail: yangsuping@sxu.edu.cn; yangsuping@hqu.edu.cn; Tel.: 0086-0592-6166178.

Received August 4, 2009; revised November 18, 2009; accepted February 3, 2010.

国家自然科学基金(No. 30970068)、国家科技基础条件平台建设(No. 2005DKA21209)、厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室高级访问学者基金(No. MELRS0907)和山西省回国留学人员科研(No. 200713)资助项目.

nearly equal to that of free BChls formation. The release of both B800 and B850 of LH2 can be induced by high concentration SDS, simultaneously. The bacteriochlorophylls of B800 band can be completely transformed into free BChls, but not for B850. Although both of their release processes show monoexponential models in 1% SDS solution, the release rate constant of B850 is remarkably lower than that of B800 and close to that of free BChls formation.

Keywords LH2; SDS; bacteriochlorophylls; *Rhodobacter azotoformans*

在不产氧光合细菌光合机构中, 外周捕光复合体(peripheral light-harvesting complex, LH2)是由 α, β 跨膜脱辅基蛋白、细菌叶绿素(BChls)和类胡萝卜素(Car)组成的超分子体系, 具有捕光和传递光能的作用. 特别是LH2晶体结构的解析, 为深入研究LH2捕光和光能传递的分子机制提供了良好的平台^[1-3]. 从LH2模式生物*Rhodospseudomonas acidophila*晶体结构分析^[1]: 在 α/β 异二聚体内部和异二聚体之间, 相邻B850 BChls(B850)分子间的距离分别为9.5和8.8 Å, 这使B850分子间存在强电子耦合作用, 把激发态能级劈裂为18个激子带, 其中高能激子带可以延伸至B800 BChls(B800)吸收带, 从而受到B800干扰, 因此需要脱除B800以便更清楚地观察B850激子带的超快动力学特性^[4]. 此外, 目前普遍认为LH2中B800→B850的能量传递符合Förster激子转移理论, 但由于B800和B850光谱重叠很难验证. 因此, 首先需要对LH2细菌叶绿素进行修饰、置换或者缺失重构以解决光谱重叠问题^[5]. 由于LH2结构具有多样性^[6], 采用不同方法对来自不同物种LH2色素进行解离和修饰的研究已有很多报道, 如: 增大压力^[7]、降低温度^[8]和定点突变^[9,10], 部分改善了B800和B850光谱重叠的程度, 但尚不彻底; 高温^[11]和强酸^[12]能引起B800和B850解离或缺失, 但无特异性; 十二烷基硫酸锂使*Rhodospseudomonas sphaeroides* LH2 B800特异性解离^[13], 但解离不完全; 去垢剂TBG10在弱酸环境能使*Rhodobacter sphaeroides*^[14]和*Rhodospseudomonas acidophila*^[15] LH2 B800特异性缺失, 但操作较为复杂. 十二烷基硫酸钠(SDS)作为一种阴离子表面活性剂, 在蛋白结构和功能研究中应用广泛^[16]. 鉴于此, 本文以固氮红细菌(*Rhodobacter azotoformans*)LH2为材料, 采用光谱法研究了SDS诱导LH2细菌叶绿素解离的行为和规律. 低浓度SDS, 不引起B850解离, 仅诱导LH2 B800解离和缺失. 可作为一种更简便的特异脱除B800的新方法, 为建立LH2 B800缺失模型和能量传递机制研究奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Rhodobacter azotoformans 134K20菌株, 16S rDNA序列 Genbank 登录号 EU883587, 本实验室分离鉴定保存. 十二烷基二甲基胺氧化物(LDAO)为Fluka公司; DEAE-32为Whatman公司; 十二烷基硫酸钠(SDS)为Sigma公司, 其它试剂均为国产分析纯.

1.2 LH2样品制备

培养基配制和培养条件参见文献^[17]. LH2分离纯化及纯度鉴定参照文献^[18]. 脱除LDAO按照参考文献^[19], 在4℃黑暗条件下用pH 8.0 10 mmol/L Tris-HCl缓冲液对样品透析72 h, 期间更换8次透析液, 收集样品进行光谱检测.

1.3 样品处理

室温, 以pH 8.0 10 mmol/L Tris-HCl为缓冲液, 将新鲜配制的SDS(w/v)溶液与LH2溶液混合均匀, 进行光谱检测.

1.4 吸收光谱检测

在U-2010紫外可见分光光度计(Hitachi)上, 使用光程为1 mm石英比色杯, 于250~1000 nm波长范围内进行光谱扫描, 或选择多波长测定不同时刻的吸光度, 恒温循环水浴(Polyscience)控制温度为(25±0.2)℃.

2 结果与分析

2.1 不同SDS浓度对LH2吸收光谱的影响

在室温下, pH 8.0 10 mmol/L Tris-HCl缓冲液中, *Rhodobacter azotoformans* LH2与不同浓度SDS作用3 h, 其吸收光谱和BChls Q_y带吸光度随SDS浓度的变化分别见图1和图2. 在浓度0%~0.08%范围内, SDS随着浓度增加, LH2中类胡萝卜素在422, 450, 475和510 nm处的特征吸收峰均发生增色效应和蓝移; 位于798 nm处的B800 Q_y带吸光度逐渐下降, 而位于850 nm B850 Q_y带吸光度和峰位均未发生明显变化, 与此同时, 约在775 nm处出现游离BChls Q_y带特征吸收峰, 且吸光度

逐渐增加达到平衡. 当 SDS 浓度在 0.08%~10% 范围内, B850 Q_y 带吸收峰强度开始下降, 达到 1% 后吸收峰强度不再继续降低, 但吸收峰没有消失, 峰位没有明显位移 (更大浓度 SDS 图中未显示). 结果表明: 低浓度 SDS (0.08%), 会破坏 B800 与蛋白质之间结合作用力, 使其从复合物中脱落出来, 成为游离 BChls, 但对 B850 没有明显影响. 高浓度 SDS 才能削弱 B850 与蛋白质间的结合作用, 引起 B850 部分解离.

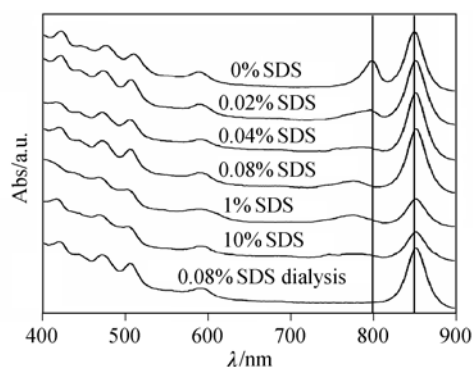


图 1 SDS 对 LH2 吸收光谱的影响

Figure 1 Effects of SDS on the absorption spectra

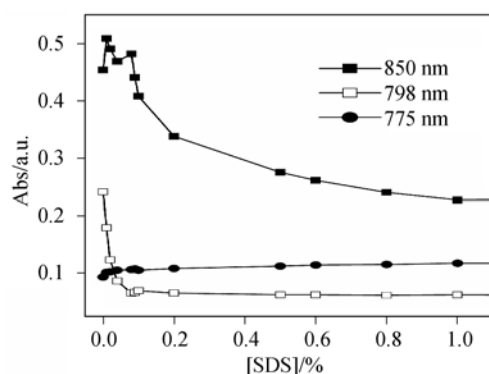


图 2 LH2 细菌叶绿素 Q_y 带吸光度随 SDS 浓度的变化曲线

Figure 2 Curves of Q_y absorbance band of BChls in LH2 with SDS concentration at pH 8.0 and 25 °C

低浓度 SDS 能特异性诱导 B800 解离, 并产生游离 BChls Q_y 带吸收峰, 对 B800 吸收峰的观察有干扰. 那么究竟能否诱导 B800 缺失? 因此, 将含有 0.08% SDS LH2 溶液对 0.08% SDS 缓冲液于 4 °C 冰箱中搅拌透析 24 h, 吸收光谱见图 1. 透析 LH2 样品仍具有 B850 Q_y 带吸收峰, 而游离 BChls 和 B800 Q_y 带吸收峰均消失, 表明 0.08% SDS 能够特异诱导 LH2 B800 缺失.

色素缺失和组装对于 LH2 结构与功能关系的研究有重要作用. Bandilla 等^[14]报道了表面活性剂 TBG10 脱除 *Rhodobacter sphaeroides* LH2 中 B800 的方法, 其特点是将 LH2 从稳定的 pH 8 调至酸性 (pH 5) 条件下, 与 TBG 作用 1 h, 可完全脱除 B800, 然后再调至 LH2 稳定

的 pH 8. 该方法操作过程需反复调整体系 pH, 离开了 LH2 稳定的 pH, 对样品影响较大. 与该法相比, 本研究在 LH2 稳定的 pH 8 条件下, 选择 0.08% SDS 与 LH2 作用, 即完全脱除 LH2 B800, 而不影响 B850, 解离后通过层析或直接用含有该浓度 SDS 缓冲液透析即可获得纯化的 B800 缺失的 LH2, 操作相对简单易行. 由于不同浓度 SDS 能够导致 B800 和 B850 解离不同, 经 0.08% SDS 处理可获得仅含 B850 的 LH2, 对于 LH2 B800 重构具有重要意义, 因此分别选择 0.08% 和 1.0% SDS 进一步研究了 SDS 对 LH2 BChl 解离动力学.

2.2 低浓度 SDS 诱导 B800 解离动力学

在室温, 以 pH 8.0 10 mmol/L Tris-HCl 为缓冲液, 在 0.08% SDS 溶液中, 随着时间延长, B850 Q_y 带特征吸收峰没有发生明显变化, 而 B800 Q_y 带吸光度逐渐下降, 游离 BChls Q_y 带吸光度不断升高, 约 180 min 达到平衡, 见图 3 和图 4. 经动力学方程拟合, B800 和游离 BChls Q_y 带吸光度变化的动力学方程分别为 $A = 0.104e^{-0.014t} + 0.073$ ($R^2 = 0.9924$) 和 $A = 0.114 - 0.046e^{-0.009t}$ ($R^2 = 0.9990$), 其速率常数分别为 0.014 和 0.009. 结果表明: 在该实验条件下, 0.08% SDS 与 LH2 作用 3 h, 能将 B800 解离为游离 BChls, 特异性地脱除 *Rhodobacter azotoformans* LH2 中 B800, 而不影响 B850. B800 解离过程和游离 BChls 生成过程均较好地符合单指数模型, 解离和生成的速率常数近似相等.

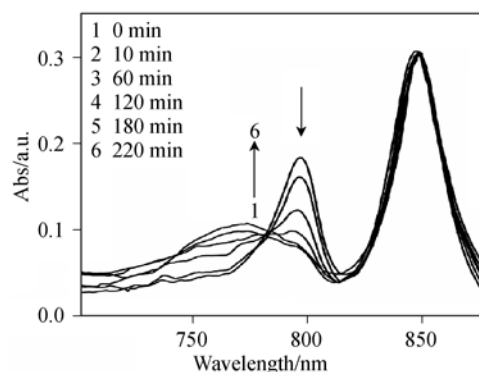


图 3 在 0.08% SDS 溶液中 LH2 吸收光谱随时间的变化

Figure 3 NIR absorption spectra of LH2 under 0.08% SDS solution at different time (at pH 8.0 and 25 °C)

2.3 高浓度 SDS 诱导 B800 和 B850 解离动力学

在室温, 以 pH 8.0 10 mmol/L Tris-HCl 为缓冲液, 在 1.0% SDS 溶液中, 随时间延长, B800 Q_y 带逐渐下降并消失, B850 Q_y 带逐渐下降至平衡, 但不消失, 在 775 nm 处呈现游离 BChls Q_y 带吸收峰, 且强度逐渐升高至平衡, 如图 5 和图 6 所示. B800, B850 和游离 BChls 的动力学方程、速率常数及解离时间, 见表 1. SDS 诱导

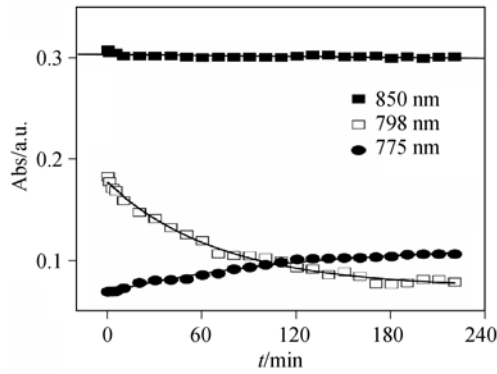


图4 0.08% SDS 溶液中 LH2 BChls Q_y 带吸光度随时间的变化曲线

Figure 4 Curves of Q_y absorbance band of BChls in LH2 under 0.08% SDS solution with time

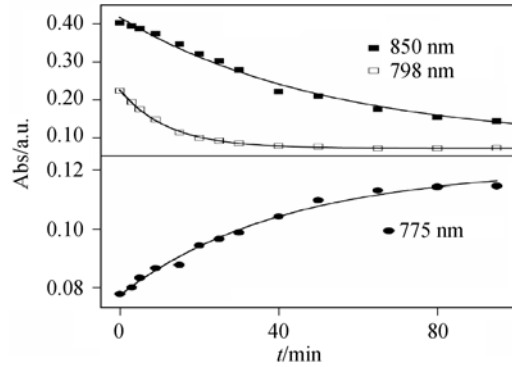


图6 1% SDS 溶液中 LH2 BChls Q_y 带吸光度随时间的变化曲线

Figure 6 Curves of Q_y absorbance band of BChls in LH2 under 1% SDS solution with time

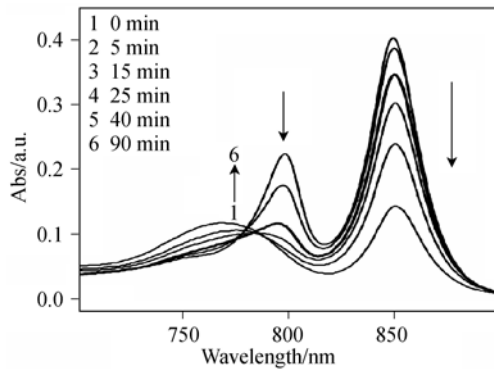


图5 在 1% SDS 溶液中 LH2 吸收光谱随时间的变化

Figure 5 NIR absorption spectra of LH2 under 1% SDS solution at different time (at pH 8.0 and 25 °C)

B800 和 B850 的解离过程和游离 BChls 的生成过程均良好地符合单指数模型. B800 的解离明显快于 B850, 其解离速率常数约为 B850 的 4 倍. 结果表明: 高浓度 SDS 能够使 *Rhodobacter azotoformans* LH2 中 B800 和 B850 同时解离, 且 B800 解离速率更快, 很快即完成, 整个解

离过程游离 BChls 生成的表观速率常数由 B850 决定. 因此表现出游离 BChls 生成的表观速率常数明显低于 B800 解离速率常数, 而与 B850 解离速率常数相接近的现象.

3 结论

在室温 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中, SDS 诱导 *Rhodobacter azotoformans* LH2 B800 和 B850 解离形成游离 BChls, 但不同 SDS 浓度对 B800 和 B850 解离行为不同. 低浓度 SDS, 仅特异诱导 B800 解离, 高 SDS 浓度 (>0.08%)能诱导 B800 和 B850 同时解离, 但不能诱导 B850 完全解离. 处于 LH2 环状结构不同微环境中的 B800 和 B850 对 SDS 的解离能力不同, 相对于 B850, B800 对 SDS 更为敏感, 易于从 LH2 中解离下来, 其解离速度更快. 在含有 0.08% SDS 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中, 室温 3 h, B800 完全解离, 为构建简单易行的 *Rhodobacter azotoformans* LH2 B800 缺失模型以及深入开展 LH2 结构与功能研究奠定基础.

表1 1% SDS 诱导 LH2 BChls 解离过程的拟合方程和速率常数(k)

Table 1 Fitting equations and rate constants of release of BChls in LH2 complexes induced by 1% SDS

Wavelength/nm	k/min ⁻¹	Equation	R ²	Lifetime/min
850	0.019	$A=0.328e^{-0.019t}+0.089$	0.98952	40.84
798	0.082	$A=0.154e^{-0.082t}+0.071$	0.99894	12.31
775	0.024	$A=0.121-0.043e^{-0.024t}$	0.99036	—

References

- McDermott, G.; Prince, S. M.; Freer, A. A.; Hawthornthwalte-Lawless, A. M.; Papiz, M. Z.; Cogdell, R. J.; Isaacs, N. W. *Nature* **1995**, *374*, 517.
- Koepke, J.; Hu, X.; Muenke, C.; Schulten, K.; Michel, H. *Structure* **1996**, *4*, 581.
- Papiz, M. Z.; Prince, S. M.; Howard, T.; Cogdell, R. J.; Isaacs, N. W. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1523.
- Liu, W. M.; Zhu, R. Y.; Xia, C. A.; Liu, Y.; Xu, C. H.; Qian, S. X. *Chin. Phys. Lett.* **2003**, *20*, 2148.
- Herek, J. L.; Fraser, N. J.; Pullerits, T.; Martinsson, P.; Polivka, T.; Scheer, H.; Cogdell, R. J.; Sundström, V.

- Biophys. J.* **2000**, *78*, 2590.
- 6 Yang, S.-P.; Yue, H.-Y.; Cui, X.-H.; Guo, S.; Zhao, L.; Zhao, J.-Y.; Zhao, C.-G.; Qu, Y.-B. *Acta Microbiol. Sinica* **2009**, *49*, 17 (in Chinese).
(杨素萍, 岳慧英, 崔小华, 郭爽, 赵丽, 赵江艳, 赵春贵, 曲音波, 微生物学报, **2009**, *49*, 17.)
- 7 Wu, H. M.; Ratsep, M.; Jankowiak, R.; Cogdell, R. J.; Small, G. J. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 7641.
- 8 Pullerits, T.; Hess, S.; Herek, J. L.; Sundström, V. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10560.
- 9 Fowler, G. J. S.; Hess, S.; Pullerits, T.; Sundström, V.; Hunter, C. N. *Biochemistry* **1997**, *36*, 11282.
- 10 Fowler, G. J. S.; Visschers, R. W.; Grief, G. G.; Van, G. R.; Hunter, C. N. *Nature* **1992**, *366*, 848.
- 11 Feng, J.; Li, X.-F.; Liu, Y. *Chin. Sci. Bull.* **2007**, *52*, 163 (in Chinese).
(冯娟, 李雪峰, 刘渊, 科学通报, **2007**, *52*, 163.)
- 12 Feng, J.; Li, X.-F.; Liu, Y. *Sci. China, Ser. C: Life Sci.* **2008**, *51*, 760.
- 13 Clayton, R. K.; Clayton, B. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 5583.
- 14 Bandilla, M.; Ucker, B.; Ram, M.; Simonin, I.; Gelhaye, E.; Medermott, G.; Cogdell, R. J.; Scheer, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1364*, 390.
- 15 Fraser, N. J.; Dominy, P. J.; Ucker, B.; Simonin, I.; Scheer, H.; Cogdell, R. J. *Biochemistry* **1999**, *38*, 9684.
- 16 Zhang, W.-C.; Dai, X.-H.; Zhao, Y.; Gao, P.-J.; Lu, X.-M. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 669 (in Chinese).
(张为灿, 戴旭慧, 赵越, 高培基, 卢雪梅, 化学学报, **2008**, *66*, 669.)
- 17 Yang, S.-P.; Zhao, C.-G.; Qu, Y.-B.; Qian, X.-M. *Acta Microbiol. Sinica* **2003**, *43*, 257 (in Chinese).
(杨素萍, 赵春贵, 曲音波, 钱新民, 微生物学报, **2003**, *43*, 257.)
- 18 Liu, Y.; Zhang, W.; Wu, Y.-Q.; Xu, C.-H. *Sci. China, Ser. C: Life Sci.* **2003**, *33*, 385 (in Chinese).
(刘源, 张伟, 吴永强, 徐春和, 中国科学, **2003**, *33*, 385.)
- 19 Zarate, O. I.; Picorel, R. *Photosynth. Res.* **1994**, *41*, 339.

(A0908041 Qin, X.)