

应用圆二色光谱研究交变应力对烟草细胞膜蛋白结构的影响*

蔡国友 侯玉霞¹ 丁晓岚³ 李 涛² 沈子威³ 席葆树

(清华大学工程力学系生物力学研究所; ¹ 中国农业大学应用化学系;

² 中国科学院力学所; ³ 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘 要 本文用圆二色光谱(CD)研究了交变应力对烟草细胞膜蛋白结构的影响. 采用本实验室研制的强声波发生装置来产生交变应力场, 研究了不同强度和频率的交变应力场作用后烟草细胞膜蛋白结构的变化. 研究结果表明: 细胞膜蛋白结构变化与应力的频率和强度密切相关, 一定频率和强度范围内的交变应力能使得烟草细胞膜蛋白的二级结构发生明显的变化, 表现为 螺旋的增加和 转角的减少. 这反映了细胞膜蛋白和磷脂相互作用的增强和细胞膜流动性的增加, 进而为细胞的生长和分裂提供有利的条件. 从细胞和分子水平研究交变应力对植物生长、发育的影响及其作用机制是一个很有意义的尝试.

关键词 交变应力; 膜蛋白结构; 烟草细胞; 圆二色光谱

0 引言

植物生长在自然界中, 会受到各种外界环境因素包括机械应力的刺激. 人们很早就认识到机械刺激会对植物生长和形态建成产生明显的影响. 例如: 攀援植物通过接触敏感的茎、叶柄、卷须、花柄和根来识别外界环境并沿着一定的路线伸展爬行; 某些植株受到敲击后茎变粗; 植物茎干受到摩擦后产生乙烯, 随后茎变短变粗; 根受到敲击后, 生长在几个小时内会受到阻碍. 一般来说, 机械振动能使茎变短变粗, 使得茎干抵抗振动的能力增强^{1,2}.

作为交变应力的一种特殊形式, 强声波对植物的生长也有明显的影响. 国内外很多科学家的研究表明: 一定强度的音乐刺激能明显的促进某些植物的生长和形态发育. 我们实验室的研究也得到了类似的结果³⁻⁵.

所有这些研究结果表明: 机械应力信号对植物的生长发育有一定的影响. 但直到目前为止, 关于应力信号作用的分子机制还不十分清楚.

我们实验室利用细胞和分子生物学的手段研究应力对植物生长和发育的作用, 试图从细胞和分子水平上揭示其作用机制, 已经取得了有意义的初步结果. 本文采用圆二色光谱研究交变应力对烟草细胞膜蛋白结构的影响, 以期对应力信号作用的特征和方式作出进一步的解释.

1 材料和方法

1.1 烟草细胞原生质体的提取

在直径 9cm 的培养皿中置 10mL 新配制的酶溶液 (1.2% 纤维素酶 R-10, 0.4% 离析酶 R-10, 0.4mol/L 蔗糖的简化 K₃M 溶液, pH5.5), 将无菌烟苗的平展幼叶撕去表皮, 切成 (0.5 × 1) cm² 小块, 叶背向下平铺酶溶液一层, 于 25℃ 下避光放置, 抽真空 3min, 轻轻摇动培养皿, 释放原生质体, 经 200 目尼龙沙网过滤, 转入离心管, 加 5mL 0.8mol/L 甘露醇溶液, 1000r/min 离心

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1999 - 10 - 25

3min,将上浮原生质体移入圆底离心管,逐滴加入2~3mL CPW13 清洗液,混匀后再加 CPW13 清洗液至 10~12mL,混匀,500r/min 离心 1min,尽量吸去上清液,再用 10~12mL CPW13 清洗液悬浮,4℃冰箱自然沉降,吸去大部分上清液,定容,混匀,原生质体密度约为 2×10^6 /mL.

1.2 交变应力对烟草细胞原生质体的作用

交变应力场采用北京希必实机电技术公司提供的强声波装置来实现.

取上述原生质体溶液,分为 10 组,分别用一定强度和频率的声波作用 1h. 对照组未经过任何声波处理.

1.3 圆二色光谱法检测烟草细胞膜蛋白结构变化

利用清华大学生物系生物膜与膜生物工程国家重点实验室圆二色光谱分析仪,型号:CD J-500C.

取上述实验组和对照组的原生质体溶液,用 CPW13 溶液稀释到,取 1mL 加入到 1mm 样品杯中,放入圆二色光谱分析仪,在室温、扫描速度 200nm/min、采样 4 次、波长范围 200~250nm 条件下记录圆二色光谱,通过曲线拟和分析烟草细胞膜蛋白二级结构各成分的变化.

2 实验结果

2.1 烟草细胞原生质体圆二色光谱

取未经过声波处理和经过 400Hz、100dB 声波处理 1h 的烟草细胞原生质体,用 CPW13 溶液稀释 10^5 mL,测量其圆二色光谱,结果如图 1 所示.

烟草细胞原生质体的圆二色光谱反映了细胞膜蛋白的二级结构. 结果表明:经过 400Hz、100dB 的声波处理后的烟草细胞原生质体,细胞

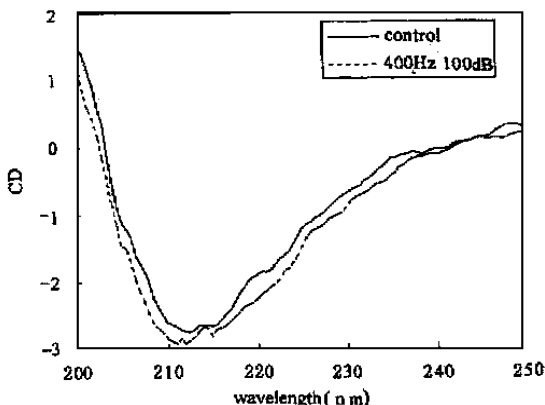


图 1 烟草细胞原生质体的圆二色光谱

Fig. 1 The CD spectra of tobacco protoplast

膜蛋白的结构发生了明显的变化. 其在 213nm 和 215nm 的负峰发生了左移,且峰形发生了明显的变化,反映出细胞膜蛋白构象的变化⁶.

2.2 一定强度下不同频率的交变应力场对烟草细胞膜蛋白结构的影响

声波强度固定为 100dB,频率分别选用 400Hz、800Hz 和 4000Hz,作用 1h. 结果如表 1 所示.

表 1 一定强度(100dB)不同频率交变应力作用下(1h)烟草细胞膜蛋白结构的变化

频率(Hz) \ 结构	对照值	400Hz	800Hz	4000Hz
螺旋	41.3	61.1	54.6	40.7
转角	58.7	38.9	45.4	59.3

从中可以看出,不同频率的声波对膜蛋白的二级结构均产生不同程度的影响,随着频率的降低,结构变化明显. 表现为螺旋的增加和转角的减少.

2.3 一定频率不同强度交变应力对烟草细胞膜蛋白结构的影响

固定声波频率为 400Hz,强度分别为 90dB、100dB 和 110dB,作用 1h. 结果如表 2 所示.

表 2 一定频率(400Hz)不同强度交变应力作用下(1h)烟草细胞膜蛋白结构的变化

强度(dB) \ 结构	对照值	90dB	100dB	110dB
螺旋	41.3	56.0	61.1	42.6
转角	58.7	44.0	38.9	57.4

结果表明:声波强度对细胞膜蛋白结构的变化也有重要的影响. 在一定范围内其影响随声波强度的增加而增强,但强度过大时其影响有回落的趋势.

3 讨论与结论

3.1 烟草细胞原生质体的圆二色光谱主要反映了细胞膜蛋白的结构

为进一步确认烟草细胞原生质体的圆二色光谱主要反映的是细胞膜蛋白的二级结构. 我们提取了烟草细胞原生质膜,检测其圆二色光谱. 结果发现:原生质体和原生质膜的圆二色光谱在我们所检测的波长范围内(200~250nm)是基

本重合的,而且二级结构的分析也基本一致。由此我们认为烟草细胞原生质体的圆二色光谱主要反映了细胞膜蛋白的二级结构。

3.2 交变应力对烟草细胞膜蛋白结构的影响与其频率和强度有密切的关系

烟草细胞膜蛋白二级结构的变化随声波频率的降低而增强,表现为螺旋的增加和转角的减少。

对一定频率的声波(400Hz),在一定强度范围内随强度的增加二级结构的变化增强。但强度过高,二级结构的变化有回落的趋势。烟草细胞对声波的感应有一定的范围。强度过高(>110dB)的应力刺激对于细胞来说已不是一种常规意义的信号刺激,而是一种机械性的损伤。

3.3 交变应力促进植物细胞生长的机理

很多研究表明:应力刺激对植物的生长、发育以及各种生理活动都有明显的影响。我们实验室利用400Hz的强声波处理水稻种子,发现发芽速度明显高于对照组,且其幼苗根系发达。但

关于应力作用的机理人们还所知甚少。

从细胞和分子生物学角度研究应力的生物学效应无疑是揭示应力作用机理一个较好的途径。我们的实验结果表明:一定频率和强度的交变应力刺激后,植物细胞膜蛋白的结构发生了明显的变化,表现为螺旋的增加和转角的减少。植物细胞膜主要由磷脂双层、镶嵌蛋白及支撑于膜内侧的膜骨架蛋白组成。膜蛋白(骨架蛋白、受体、酶、抗原等)的二级结构中的螺旋伸入到磷脂双层中,其螺旋外侧的疏水基团与脂双层疏水区的烃链形成疏水键,二级结构中的折叠和转角多铺于膜表面与磷脂形成疏水和静电作用。膜脂分子及蛋白分子的相互作用及分子结构的变化影响和调节着整体膜的流动性。细胞膜蛋白中螺旋的增加和转角的减少反映了膜脂和膜蛋白分子相互作用的增强、膜流动性的增加和细胞生理活动的旺盛。交变应力作用引起细胞膜流动性的增强是其促进植物生长的原因之一。

参考文献

- 1 孙大业,郭艳林,马力耕. 细胞信号转导(第二版). 北京:科学出版社,1998:260~265
- 2 孙克利等. 交变应力作用下烟草愈伤组织细胞热力学相行为的研究. 生物物理学报,1999,15(3):579~583
- 3 沈子威等. 应用傅里叶红外光谱研究强声波作用下植物细胞壁蛋白质二级结构的变化. 光子学报,1999,28(7):600~602
- 4 Bram J, Davis R W. Rain, wind, and touch induced expression of calmodulin-related genes in Arabidopsis. Cell, 1990, 60(2): 357~364
- 5 Roberts K. Potential awareness of plants. Nature, 1992, 360(1):14~15
- 6 Kyusung Park, et al. Differentiation between transmembrane helices and peripheral helices by the deconvolution of circular dichroism spectra of membrane proteins. Protein science, 1992, 1(4):1032~1049

THE EFFECT OF ALTERNATIVE STRESS ON THE MEMBRANE PROTEIN CONFORMATIONS OF TOBACCO CELLS BY CIRCULAR DICHROISM

Cai Guoyou, Hou Yuxia¹, Ding Xiaolan³, Li Tao², Shen Ziwei³, Xi Baoshu

*Department of Engineering Mechanics, Tsinghua University;*¹ *Department of Applied Chemistry,*

*Agriculture University of China;*² *Institute of Mechanics, Academy of China;*

³Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084

Received date: 1999 - 10 - 25

Abstract In this paper, the effect of alternative stress on cultured tobacco protoplasts was studied by Circular Dichroism spectra (CD). The field of alternative stress was generated through a strong sound field system set up in our lab. We found that the effects of stress on cells depend greatly on the intensity and frequency of stress. In a certain range of intensity and frequency, the stress makes significant changes on membrane protein conformations. It causes an increase in α -helix and a decrease in β -turn. The membrane protein conformation changes denote the increased interaction between membrane protein and lipids and the increased fluidity of membrane, and thus make the cell to grow and divide faster and easier. The enhancement of cell membrane fluidity might be one of the mechanisms of the promotion of plant growth by alternative stress.

Key words Alternative stress; Membrane protein conformation; Tobacco cells; Circular Dichroism



Cai Guoyou was born in 1973. He received B. E. degree from University of Sci. & Tech. Beijing in 1996 and M. S. degree in Biophysics from Tsinghua University in 1999. He is a researcher of Institute of Biomedical Engineering, Tsinghua University. Areas of research: cell signal transduction and calcium; chemotherapy and anti-cancer drugs; the effect of stress on plant growth; protein conformation by CD, FT-IR and Raman spectroscopy.

显著增加,使得具有 THz 带宽的超短电脉冲信号沿传输线传输毫米量级的距离后就产生明显的畸变,初始电脉冲越窄,因带宽的增宽使得脉冲波形的畸变更严重. 减薄衬底厚度可提高最低阶纵向

模 TE_1 模的截止频率,减小 L T-GaAs 衬底共面微带传输线的模式色散,同时还可抑制衬底内辐射衰减,有利于提高 L T-GaAs 衬底共面微带传输线对亚皮秒超短电脉冲的传输性能.

参考文献

- 1 Grischkowsky D R, Ketchen M B, Chi C C, et al. Capacitance free generation and detection of subpicosecond electrical pulses on coplanar transmission lines. *IEEE J QE*, 1988, 24(2): 221 ~ 225
- 2 Smith F W, Le H Q, Diadiuk V, et al. Picosecond GaAs-based photoconductive optoelectronic detectors. *Appl Phys Lett*, 1989, 54(10): 890 ~ 892
- 3 Frankel M Y, Whitaker J F, Mourou G A. High-voltage picosecond photoconductor switch based on low-temperature-grown GaAs. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 1990, 37(5): 2493 ~ 2508
- 4 Frankel M Y, Gupta S, Valdmanis J A, et al. Terahertz attenuation and dispersion characteristics of coplanar transmission lines. *IEEE transactions on MTT*, 1991, 39(6): 910 ~ 916
- 5 Yu J S, Horng S F, Chi C C. Well-above bandgap transient photoreflectance characterization of low-temperature grown GaAs. *Jpn J Appl Phys (Pt 1)*, 1998, 37(2): 554 ~ 559
- 6 Hasnain G, Dienes A, Whinnery J R. Dispersion of picosecond pulses on coplanar transmission lines. *IEEE Transactions on MTT*, 1986, 34(6): 738 ~ 741
- 7 Grischkowsky D R, Duling I N, Chen J C, et al. Electromagnetic shock waves from transmission lines. *Phys Rev Letts*, 1987, 59(15): 1663 ~ 1666
- 8 Rutledge D B, Neikirk D P and Kasilingham D P, in: *Infrared and Millimeter Waves*, vol. 10, pp. , Button K J, Ed. New York: Academic, 1983: 59 ~ 63

PROPAGATION OF ULTRASHORT ELECTRICAL PULSES ON COPLANAR STRIPLINES

Guo Bing, Wen Jinhui, Zhang Haichao, Lin Weizhu

State Key Laboratory of Ultrafast Laser Spectroscopy, Department of Physics, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China

Received date: 1999 - 09 - 28

Abstract Based on the dispersion and attenuation data obtained from the semiempirical dispersion formula for coplanar transmission lines, the propagation of ultrashort electrical pulses along coplanar striplines on L T-GaAs have been stimulated in the time domain by the fast Fourier transform numerically in this paper. It has been shown that the modal dispersion and Cerenkov electromagnetic radiation in the substrate at the terahertz regime dominate the evolution of the pulses propagating in the coplanar striplines, and the shorter pulses will experience the more serious distortion that can be greatly reduced by using a superstrate of the same substrate.

Keywords L T-GaAs; Ultrashort electrical pulses; Coplanar stripline



Guo Bing was born in 1967. He received his B. S. degree in materials sciences from Zhejiang University in 1991. Now he is working on his Ph. D. degree in femtosecond laser and ultrafast phenomena at the Department of Physics of Zhongshan University.