

3 种褐藻色素 - 蛋白复合物的分离及光谱特性*

李爱芬¹ 陈敏¹ 周百成²

(¹ 烟台大学生物化学系 264005)

(² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 以非离子去污剂 DMG 增溶 3 种褐藻的类囊体膜, 经 SDS-PAGE 分离色素-蛋白质复合物, 并测定其光谱特性及表观分子量。结果表明, 3 种褐藻的电泳分离结果完全相同, 都分离到 6 条含色素的蛋白质复合物。从不同褐藻类囊体膜上得到的同一种复合物的吸收光谱和荧光发射光谱特性一致, 3 种褐藻的 PSI 复合物都有位于 715 nm 处的长波荧光发射峰。电泳方法测得 3 种褐藻同一种色素-蛋白质复合物的表观分子量相近。

关键词 PAGE, 色素-蛋白质复合物, 吸收光谱, 荧光发射光谱, 表观分子量

1977 年, Barrett 和 Anderson 首先采用 Triton X100 增溶褐藻辐射昆布 (*Ecklonia mdiata*), 通过蔗糖密度梯度离心得到 4 种色素-蛋白质复合物。Peyriere 等, 1984 年; Caron 等, 1985 年; Berkaloff 等, 1990 年; Douady 等, 1993 年用各种方法进行了分离和研究。但至今, 通过 PAGE 技术从褐藻类囊体膜上最多分离到 4 条色素-蛋白质复合物。关于褐藻 PSI 复合物在 77 K 低温条件下的长波荧光发射特征, 不同研究者报道的结果也存在差异。李爱芬等 1999 年已对褐藻叶状体、叶绿体和类囊体膜的低温荧光发射光谱进行了测定。结果表明, 褐藻缺少高等植物 PS I 表征的 730 nm 长波发射峰, 其长波荧光发射峰位于 710 ~ 720 nm 之间。为此, 选择 DMG 为增溶剂, 对 3 种褐藻的色素-蛋白质复合物进行了分离和研究, 旨在了解褐藻类囊体膜上色素-蛋白复合物的性质, 进一步确定褐藻 PS I 复合物的长波荧光发射峰的位置。

1 材料和方法

裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)、萱藻 (*Scytosiphon lomentarium*) 和海蒿子 (*Sargassum confusum*) 采自青岛太平角低潮带石沼。

叶绿体的制备按 Strbac 等 1994 年的方法进行^[2]。

类囊体膜的制备参考储钟稀等 1980 年的方法并稍加修改, 类囊体膜悬浮液为含 10% 甘油的 50 ml/mol/L 的 Tricine (pH 8.0) 溶液。

叶绿素含量的测定按 Jeffrey 等 1975 年的方法进行。

类囊体膜的增溶按李爱芬等 1998 年^①的方法进行。

凝胶电泳及表观分子量的测定按李爱芬 1998 年^①的方法进行。

原位光密度扫描 在室温下, 用日立 CS-910 型双波长薄层层析扫描仪对电泳后的凝胶柱直接进行原位光密度扫描, 扫描波长为 675 nm。

吸收光谱的测定 将电泳条带切下, 用岛津 UV3000 型紫外可见双波长双光束自动记录分光光度计测定室温吸收光谱, 狭缝宽度 2 nm, 扫描速度 200 nm/min。

* 国家九五攻关资助项目 963058 号。

承蒙中国科学院海洋研究所曾呈奎院士, 中国科学院植物研究所匡廷云院士和李良璧教授指导, 中国科学院植物研究所光合作用研究中心部分经费资助; 中国科学院植物研究所光合作用研究中心张群和冯丽洁同志协助光谱测定, 特此致谢。

本文使用缩写和符号: DMG, 癸基-N 甲基葡萄糖胺; PS I, 光系统 I; PS II, 光系统 II; LHC, 捕光色素-蛋白质复合物; PAGE, 聚丙烯酰胺凝胶电泳; Chl, 叶绿素; Gly, 甘氨酸; Tris, 三羟甲基甲烷; Acr, 丙烯酰胺; Bis, 甲叉双丙烯酰胺; FP, 游离色素; FCPC, 墨角藻黄素-叶绿素 a/c 蛋白质复合物

① 李爱芬. 1998, 中国科学院海洋研究所博士论文。

收稿日期: 1998-12-07; 修回日期: 1999-02-13

荧光发射光谱的测定 将电泳条带切下,在 77 K 低温下用日立 F4500 型荧光分光光度计测定,狭缝宽度 5 nm,扫描速度 240 nm/min。

2 结果

2.1 色素-蛋白复合物的分离

裙带菜、萱藻和海蒿子的类囊体膜在 4 °C 条件下,用 DMG 增溶的上清液经 SDS-PAGE 都分离到 7 条含色素的带,电泳凝胶柱原位光密度扫描见图 1。按电泳迁移率由小到大,条带颜色依次为绿、鲜绿、浅绿、桔黄、黄绿、棕黄和桔红。根据其光谱特性及表观分子量大小,按 Anderson 1978 年的命名系统,以上条带分别为 CP I a、CP I、CPa、LHC₁、LHC₂、LHC₃ 和 FP。与 Alberte 等 1981 年和 Peyrière 等 1984 年的电泳分离结果相比,其分辨率提高了 1.5~2 倍。首次通过 PAGE 分离技术得到 PS II 组分 CPa。

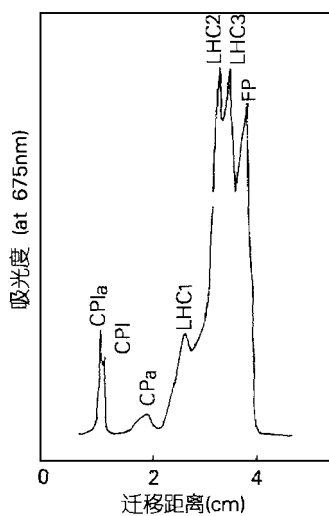


图 1 褐藻电泳凝胶柱原位光密度扫描

Fig.1 Photodensitometric scans (at 675 nm) of pigment containing bands in gel from brown algae

2.2 色素-蛋白复合物的表观分子量

采用平板电泳法测定裙带菜、海蒿子和萱藻的色素-蛋白复合物的表观分子量,结果见表 1。3 种褐藻同一种复合物的表观分子量相近。CP I a 和 CP I 的表观分子量比件小南等 1991 年报道的假根羽藻 (*Brnopsis corticularis*) 的小,CPa 的表观分子量与高等

表 1 褐藻色素-蛋白质复合物的表观分子量 (kD)

Tab.1 The apparent molecular weights of pigment protein complexes from brown algae

复合物	裙带菜	萱藻	海蒿子
CPIa	115	105	114
CPI	93	90	95
CPa	48	48	50
LHC ₁	34	32	32
LHC ₂	28	27	28
LHC ₃	22	23	23

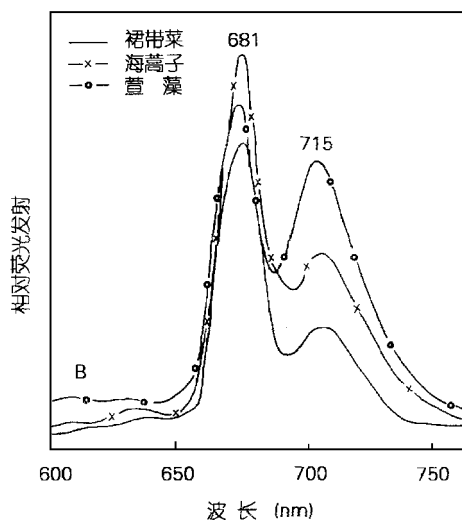
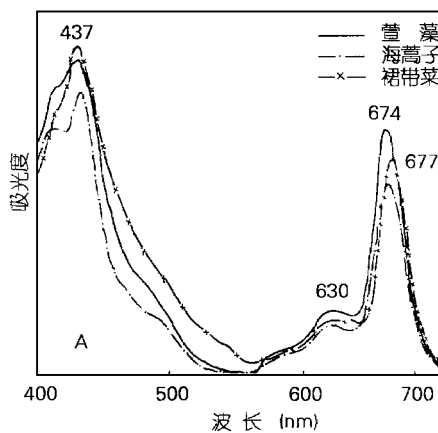


图 2 褐藻 CPIa 的吸收光谱 (A) 和荧光发射光谱 (B)

Fig.2 Absorption spectra at room temperature and fluorescence emission spectra at 77 K of CPIa

植物、绿藻和黄藻虎尾藻 (*Pleurochlois meiningeris*) 的大小一致,约 50 kD。LHC 的表观分子量比高等植物、

绿藻的小得多,同虎尾藻 30 kD 的 LHC 相似。

2.3 色素-蛋白复合物的光谱特性

2.3.1 PSI 复合物

3 种褐藻 CP I a 的吸收光谱和荧光发射光谱的特性基本一致(图 2)。CP I a 的吸收光谱有 437~438 nm 和 674~677 nm 两个主吸收峰,说明主要含有叶绿素 a。在红光区 630 nm 的吸收属于叶绿素 c。490 nm 肩峰来自 CP I a 上的 β -胡萝卜素。裙带菜在 500~550 nm 有明显的墨角藻黄素的吸收。在 77 K 低温条件下,3 种褐藻 CP I a 都有两个荧光发射峰,分别位于 681 nm 和 715 nm。

CP I 是 PSI 的核心复合物,裙带菜、萱藻和海蒿子的 CP I 的吸收光谱十分相似,叶绿素 a 为主要色素,其吸收峰在 438 nm 和 677 nm,没有墨角藻黄素(图 3)。3 种褐藻 CP I 的荧光发射峰与 CP I a 的相同,但两个发射峰的相对高度逆转,CP I 的 715 nm 峰明显高于 681 nm。

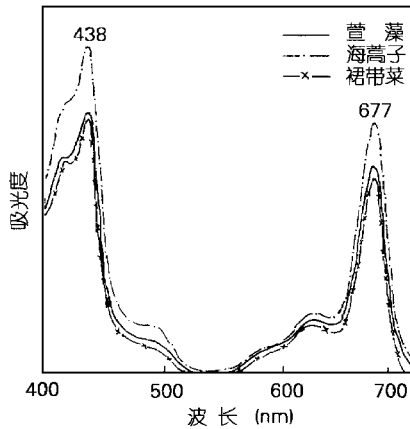


图 3 褐藻 CP I 的吸收光谱

Fig.3 Absorption spectra at room temperature of CP I

2.3.2 PS II 复合物

图 4 所示 3 种褐藻 CPa 的吸收光谱和荧光发射光谱。它们的吸收光谱特性相似,叶绿素 a 在蓝光区的吸收峰位于 430~431 nm,在红光区的吸收峰位于 670~671 nm。630 nm 的吸收峰和 445 nm 不明显的肩峰说明有叶绿素 c。490 nm 处的吸收来自 CPa 的 β -胡萝卜素。CPa 低温荧光发射峰只有一个,裙带菜位于 683 nm,萱藻和海蒿子都位于 682 nm。这个结果与 Douady 等 1993 年报道的糖海带 (*Laminaria sacchari-*

na) 的 PS II 复合物的荧光发射光谱一致。

2.3.3 捕光色素-蛋白质复合物

3 种褐藻的类囊体膜经 SDS-PAGE 都分离到 3 种 LHC,从吸收光谱(图 4A)可见,这些 LHC 除含有叶绿

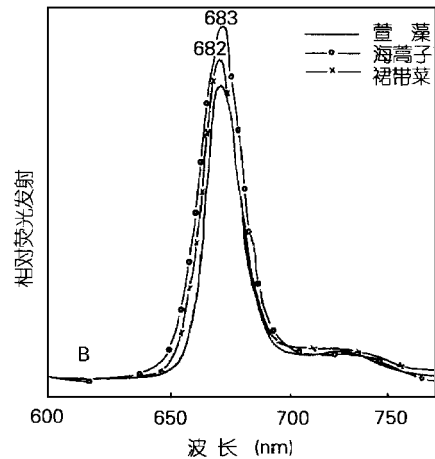
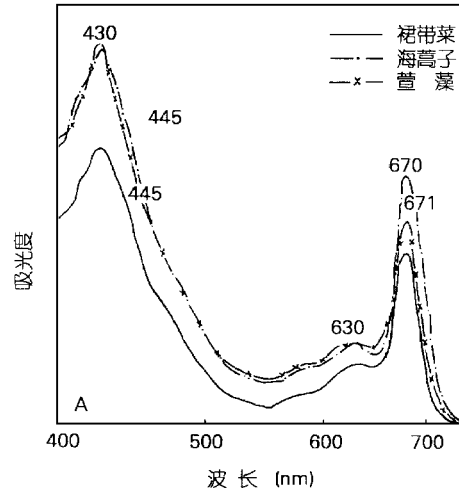


图 4 褐藻 CPa 的吸收光谱(A)和荧光发射光谱(B)

Fig.4 Absorption spectra at room temperature and fluorescence emission spectra at 77 K of CPa

素 a 外,都含有叶绿素 c,其红光吸收峰位于 632~634 nm,在蓝光区有一个明显的 445 nm 肩峰。LHG 和 LHG 与 LHG 不同,还含有墨角藻黄素,表现在吸收光谱中 500~550 nm 之间的吸收明显增加。LHG 和 LHG 与 Katoh 等 1990 年和 Passequet 等 1991 年报道的捕光色素-蛋白质复合物的光谱特性相同,是褐藻的墨角藻黄素-叶绿素 a/c 蛋白质复合物 (FCPC)。LHG 是只含有叶绿素 a 和 c 的捕光色素-蛋白质复

合物,与 Alberte 等 1981 年和 Katoh 等 1991 年分离的叶绿素 a/c 蛋白质复合物相同。在 77 K 低温荧光发射光谱方面, FCPC 的荧光发射主峰位于 674 ~ 679 nm, 在 647 nm 处有一个较小的荧光发射峰, 说明 FCPC 中叶绿素 c 吸收的光能没有完全传递给叶绿素 a, 而以叶绿素 c 本身的荧光泄漏。LHG 只有一个位于 682 ~ 683 nm 的荧光发射峰, 没有 647 nm 荧光发射峰, 说明该复合物中叶绿素 c 吸收的光能可完全传递给叶绿素 a (图 4B)。因此, 褐藻裙带菜、萱藻和海蒿子的捕光色素-蛋白复合物都是由这两种复合物组成。

3 讨论

以非离子去污剂 DMG 为增溶剂, 通过 PAGE 从 3 种不同褐藻的类囊体膜上都分离到 6 条色素-蛋白复合物, 包括 PS I、PS II 和 LHC 组分。根据测定结果, 3 种褐藻 PS I 复合物都缺少高等植物和大多数绿藻 PS I 复合物的 730 nm 的长波荧光发射峰, 它们的长波荧光发射峰都位于 715 nm。这个结果与作者测定的褐藻叶状体、叶绿体和类囊体膜的荧光发射光谱中没有 730 nm 荧光峰相吻合^[1], 与其他杂色藻如硅藻三角褐枝藻 (*Phaeodactylum tricostatum*) 和黄藻虎尾藻的结果相同。

高等植物 730 nm 长波荧光发射峰是 PS I 的重要表征。近 20 年来, 在褐藻 PS I 复合物荧光发射光

谱的研究报道中, 都没有观察到 730 nm 荧光发射峰。不同研究者报道的 PS I 复合物的荧光发射峰虽有差异, 但都位于 715 ~ 728 nm 之间, 而且早期报道的 PS I 复合物的荧光发射峰波长偏长, 一般位于 720 ~ 728 nm。一个实验室对同一种藻类的研究结果不一致。例如: 锯齿形墨角藻, 曾报道其荧光发射峰位于 727 nm, 720 nm 或 726 nm。1990 年, Berkaloff 等在论文中叙述为 720 nm, 但从光谱图中看, 糖海带实际上应为 715 nm。作者系统地测定和比较了褐藻的叶状体、叶绿体、类囊体膜和 PS I 复合物的 77 K 荧光发射光谱, 都没有观察到 730 nm 荧光峰, 说明这种现象不可能是实验过程中出现的假象, 而是褐藻本身的固有特性。

高等植物 PS I 复合物的长波荧光发射峰的发射来源已经确定, 它是由 LHCI 上的 21 kD 多肽上的叶绿素 a 发出的荧光^[3]。褐藻 PS I 复合物 715 nm 长波荧光发射峰的发射来源。

参考文献

- 1 李爱芬, 陈敏等。植物学通报, 1999, 3
- 2 Strbac, D., Rodrigues, M. A. et al. . *Planta*, 1994, 195: 138 ~ 141
- 3 Thornber, J. P., Cogdell, R. J. et al. . Greenwich, In: Barber, J. (ed.) *Advances in Molecular and Cell Biology*. CT: JAI Press. 1994, 55 ~ 118

SEPARATION AND CHARACTERISTICS OF PIGMENT-PROTEIN COMPLEXES FROM THREE BROWN ALGAE

LI Ai-fen¹ CHEN Mn¹ ZHOU Bai-cheng²

(¹ Department of Biochemistry, Yantai University 264005)

(² Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao, 266071)

Received: Dec., 7, 1998

Key Words: PAGE, Dye-protein complex, Absorption spectra, Fluorescence emission spectra, Apparent molecular weight

Abstract

Pigment-protein complexes were separated by PAGE from the thylakoid membranes of three brown algae solubilized by

DMG, their spectra and apparent molecular weights were determined. Six kinds of pigment-protein complexes were obtained. The results of PAGE separation of three algae were the same. The absorption and fluorescence emission spectra of the same kind complex resolved from different brown algae show no difference. PS I complexes from three algae have same long wavelength fluorescence emission peak at 715 nm. The apparent molecular weights of complexes from different algae are similar by means of gel electrophoresis.

(本文编辑 :张培新)