

二次电泳法分离管藻目绿藻 PSI 亚复合物研究*

陈敏¹ 李爱芬² 周百成³¹ 烟台大学生物化学系 烟台 264005)² 暨南大学生命科学技术学院水生生物中心 广州 510632)³ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 通过 PAGE 分离管藻目绿藻刺松藻和假根羽藻的 PSI 复合物 CPIa₁ 和 CPI, 二次电泳分析得到了多种亚复合物组分, 其中包括 PSI 捕光复合物 LHCl 和不含 LHCl 的核心复合物 CCl 等。该方法研究为进一步研究管藻目 PSI 复合物的结构打下了基础。

关键词 PSI, LHCl, CCl, PAGE, 管藻目绿藻

中图分类号 Q946 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)11-0038-05

早在 80 年代人们就发现, 管藻目绿藻的叶绿体和类囊体膜缺少作为高等植物 PSI 标志的 730 nm 长波荧光。说明其 PSI 的结构可能具有特异性, 因而为研究植物光合系统结构和进化提出了新的问题。这一问题的阐明有赖于对其 PSI 结构的分析和比较。但是由于分离技术等多方面的原因, 目前对管藻目绿藻 PSI 及其亚复合物结构了解甚少, 只有 Chu 等^[1] 报道, 采用蔗糖密度梯度离心方法分离出一种未定名松藻 (*Codium* sp.) 的 LHCl。为此, 本文采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 法, 通过二次电泳分析, 在不同条件下对管藻目绿藻刺松藻和假根羽藻的 PSI 及亚复合物进行了分离, 并对分离物的属性和光谱特性进行了研究, 以期研究管藻目绿藻 PSI 的结构特异性提供更多的依据。

1 材料与方法

1.1 叶绿体及类囊体膜制备

刺松藻 (*Codium fragile*) 和假根羽藻 (*Byropsis corticulans*) 采自青岛汇龙湾。将新鲜藻体用过滤海水洗净后, 去假根, 剪碎, 加入等体积的分离介质 (50 mmol/L PBS 缓冲液, pH 7.2, 含 0.4 mol/L 山梨醇、10 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L NaCl), 间歇匀浆约 1 min, 依照 Anderson 方法^[2] 制备叶绿体和类囊体膜。类囊体膜经过充分洗涤之后, 在 Beckman 离心机上 12 000 r/min 10 min 收集膜碎片, 然后重新悬浮在含 1 g/L 甘油的 50 mmol/L Tricine-NaOH 悬浮液中, pH 8.0, 调节叶绿素浓度至 1.0 g/L。于 -70 °C 冰箱贮存备用。

1.2 类囊体膜的增溶

增溶液为 0.3 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0, 含 1 g/L 甘油和 7.5 g/L SDS。以等体积与类囊体膜制剂混合后, 置冰浴中增溶 7~8 min。增溶后的溶液立即在 TGL-168 台式离心机或日立 Biofuge 28 RS 上 8 000 r/min 离心 10 min 后, 迅速将清液上样。

1.3 色素蛋白复合物的 PAGE 分离

类囊体膜上色素蛋白复合物的分离, 参照李桐柱等^[3] 方法稍加改进: 分离胶 (华美进口分装) 浓度为 10%; 假根羽藻分离时堆积胶 pH 为 6.8; 电泳管长 11 cm, 内径 6.5 mm, 上样量 60~80 μL/管。

1.4 PSI 复合物的再电泳分离

将首次电泳后的 CPIa₁ 色素蛋白复合物条带切下, 采用以下两种不同的方法处理: (1) 将凝胶切片直接上样, 每管 3~4 片, 电泳的条件和体系与复合物 PAGE 分离相同, 只在堆积胶中加入 5 mmol/L 的 Mg²⁺。(2) 凝胶切片置于 4 °C 冰箱中, 在含有 1 g/L DMG (癸基-N-甲基葡萄糖胺) 的悬浮液中 (pH 8.0) 浸泡 15~20 min, 然后采用与第一次电泳完全相同的条件进行再电泳。

1.5 叶绿素浓度及 Chl a/b 比值的测定

取叶绿体、类囊体膜以及电泳后充分抽提的样

* 国家 863 计划项目 2001 AA625040 号。

第一作者: 陈敏, 出生于 1966 年, 海洋生物学博士, 副教授。E-mail: chenmclm@163.net

收稿日期: 2002-10-18; 修回日期: 2003-03-28

品液 0.2 mL, 依 Arnon^[4]方法处理并计算叶绿素浓度及 Chl a/b 比值。

1.6 常温吸收光谱测定

叶绿体和类囊体膜悬浮液, 以及电泳后含有复合物的凝胶片, 都采用 UV-3000 双波长双光束分光光度计测定吸收光谱, 窄缝宽度为 2 nm。

1.7 低温荧光发射光谱、激发光谱测定

电泳后立即切下的凝胶片, 直接插入低温管中, 在液氮温度 (77K) 下, 采用 F-4500 荧光分光光度计测定低温荧光光谱, 窄缝宽度为 5 nm。

1.8 多肽组成分析

复合物条带于样品处理液中煮沸 10 min, 作为样品直接上样, 依 Laemmli^[5]方法进行多肽分析。

2 实验结果

2.1 PSI 复合物的 PAGE 分离

采用 SDS 或 DMG 增溶, 均可从刺松藻和假根羽藻藻囊体膜上分离到 11 种色素蛋白复合物, 其中 CPIa₁₋₃ 和 CPI 为 PSI 复合物, 绿色的 CPI 为 PSI 的中心复合物, 3 条黄褐色的 CPIa 复合物由 CCI 及 LHCI 构成。各复合物的性质在前文中已有报道^[6]。

2.2 PSI 色素蛋白亚复合物的分离

采用两种不同的方法将刺松藻和假根羽藻的最大的 PSI 复合物 CPIa₁ 和 PSI 中心复合物 CPI 进行了再分离, 所有亚复合物条带的分离情况列于表 1 中。

DMG 是一种温和的非离子性去污剂, 而 Mg²⁺的

表 1 PSI 色素蛋白复合物的二次电泳分离结果

Tab.1 Pigment-protein complexes of PSI separated by two steps of PAGE

复合物 分离方法	刺松藻 CPIa ₁		假根羽藻 CPIa ₁	
	Mg ²⁺ 堆积胶	DMG 处理	Mg ²⁺ 堆积胶	DMG 处理
亚复合物 条带	SCPIa-1 (黄绿色)	SCPIa-1' (黄绿色)	YCPIa-1 (黄绿色)	YCPIa-1' (黄绿色)
	SCPIa-2 (绿色)	SCPIa-2' (绿色)	YCPIa-2 (绿色)	YCPIa-2' (绿色)
	SCPIa-3 (浅褐色)		YCPIa-3 (浅褐色)	
		SCPIa-x (黄绿色)		YCPIa-x (黄绿色)
复合物 分离方法	刺松藻 CPI		假根羽藻 CPI	
	Mg ²⁺ 堆积胶	DMG 处理	Mg ²⁺ 堆积胶	DMG 处理
亚复合物 条带	SCPI-1 (绿色)		YCPI-1 (绿色)	
	SCPI-2 (绿色)	SCPI-2' (绿色)	YCPI-2 (绿色)	YCPI-2' (绿色)
		SCPI-3' (浅黄色)	YCPI-3 (浅褐色)	YCPI-3' (浅黄色)

存在有利于捕光复合物从 PSI 复合物上解离。假根羽藻和刺松藻的 CPIa₁ 复合物, 在含 Mg²⁺ 的堆积胶中第二次电泳后的分离情况相似, 除了前沿的两条游离色素外, 各得到 3 条色素蛋白复合物的条带, 依迁移率由小到大分别称为 SCPIa-1 (黄绿色)、SCPIa-2 (鲜绿色)、SCPIa-3 (浅黄褐色) 和 YCPIa-1、YCPIa-2、YCPIa-3; 而经 1%DMG 浸泡处理后再电泳, 分离到与各自的 CPIa-1 和 CPIa-2 对应的 CPIa-1' (黄绿色) 和 CPIa-2' (鲜绿色) 两种条带, 第 3 条带 CPIa-x 的迁移速度比含 Mg²⁺ 堆积胶中的 CPIa-3 要快得多, 几乎接近游离色素。假根羽藻 CPI 样品在含有 Mg²⁺ 的电泳胶上也呈现 3 条与 CPIa₁ 中类似的色素蛋白条带, 依迁移率由小到大分别称为 YCPI-1 (绿色)、YCPI-2 (绿色) 和 YCPI-3 (浅黄褐色)。但是从刺松藻的 CPI 复合物只分离到 SCPI-1 (绿色) 和 SCPI-2 (绿色) 两个条带。刺松藻和假根羽藻 CPI 经 1%DMG 浸泡处理后, 各得到一条绿色的 CPI-2' 和一条浅黄

绿色的 CPI-3', 它们的颜色和迁移率分别与 CPI-2 和 CPI-3 相似。菠菜和软丝藻的 CPI 复合物再分离, 除了游离色素外, 都只能得到一条绿色的中心复合物条带 (结果未显示)。

2.3 PSI 色素蛋白亚复合物的鉴定

刺松藻和假根羽藻的 PSI 亚复合物 CPIa-1 和 CPIa-1' 呈黄绿色, 吸收光谱与各自的 CPIa 复合物相似 (图 1, 2), 只是 Chl b 在蓝区的吸收峰略有变化, 从 470 nm 移到 465 nm, 这可能与捕光复合物 LHCI 的脱离有关。但是 Chl a 在红区的吸收峰位与起始材料 CPIa₁ 相比没有发生变化, 仍然在 676 ~ 678 nm。此外与电泳之前的 CPIa₁ 复合物相比, Chl b 和类胡萝卜素的吸收峰均明显降低, Chl a/b 比值大约在 3.0 ~ 4.0。峰形类似于第一次电泳中的 CPIa₃。因此推测是未完全解离的 CPIa 复合物。

绿色的亚复合物 CPIa-2 和 CPIa-2' 应是从 CPIa₁ 中解离出来的中心复合物 CPI, 其常温吸收光

谱与 CPI 基本相似(图 1,2),但 Chl a/b 比值比 CPI 要高,在 6.5 ~ 7.8 左右。可能是由于二次电泳后 CPI

中 LHCI 的解离程度更大。

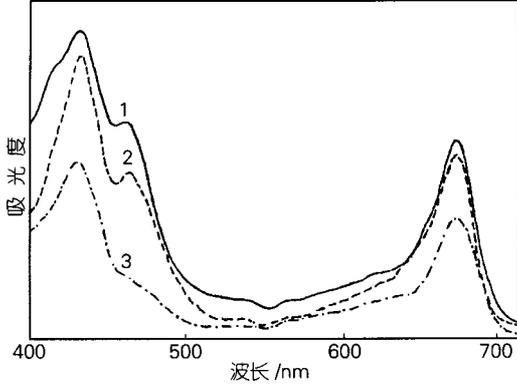


图 1 刺松藻 CPIa 亚复合物吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of subcomplexes resolved from CPIa complex of *C. fragile*

1. CPIa₁; 2. CPIa - 1; 3. CPIa - 2

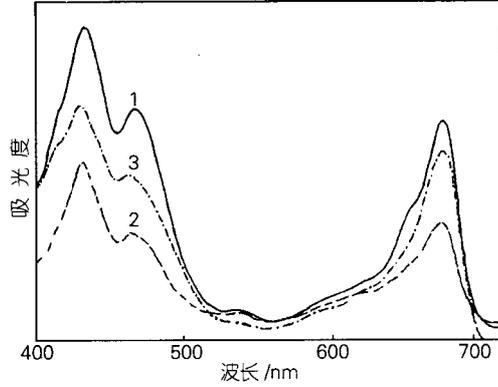


图 2 假根羽藻 CPIa 亚复合物吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra of subcomplexes resolved from CPIa complex of *B. corticularis*

1. CPIa₁; 2. CPIa - 1; 3. CPIa - 1'

在刺松藻和假根羽藻的 CPI - 1、CPI - 2 和 CPI - 2' 中只含有 Chl a, 其吸收峰位于 434 ~ 438 nm 和 676 ~ 678 nm, 与再分离之前的 CPI 相比, 基本没有变化。它们的光谱中几乎看不到 Chl b 的吸收(图 3、4、5), 尤其是经 DMG 处理后的 CPI - 2' 中, 连同 480 ~ 500 nm 附近的类胡萝卜素的吸收都明显降低。多肽

组成分析表明, 它们主要含有 66 ku 和 56 ku 多肽, CPI 中原有的 24 ~ 28 ku LHCI 多肽都已检测不出来(图 6)。因此可以判定, 这些复合物应是纯净的 PSI 核心复合物 CCI。

亚复合物 CPIa - 3 和 CPI - 3 的吸收光谱显示, 两者都含有大量的 Chl b 和少量管藻黄素等类胡萝卜

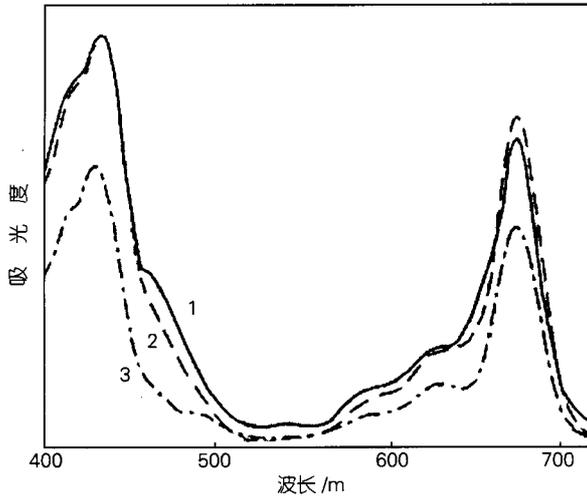


图 3 刺松藻 CPI 亚复合物吸收光谱

Fig.3 Absorption spectra of subcomplexes resolved from CPI complex of *C. fragile*

1. CPI; 2. CPI - 1; 3. CPI - 2

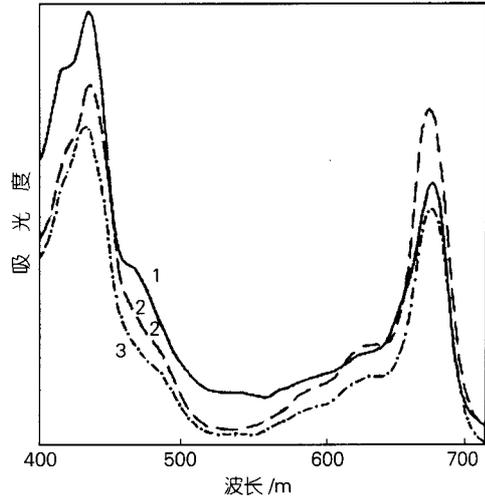


图 4 假根羽藻 CPI 亚复合物吸收光谱

Fig.4 Absorption spectra of subcomplexes resolved from CPI complex of *B. corticularis*

1. CPI; 2. CPI - 1; 3. CPI - 2

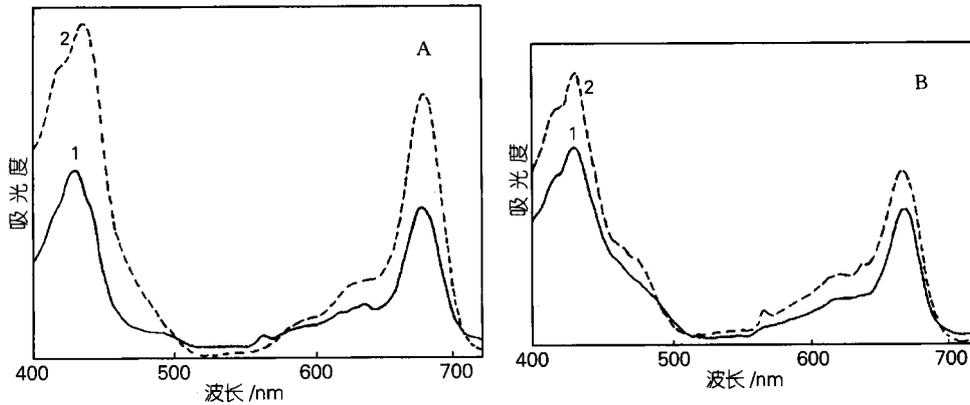


图 5 DMG处理的刺松藻和假根羽藻 CPI 亚复合物吸收光谱
 Fig.5 Absorption spectra of sub-complexes resolved from CPI complex of *C. fragile* and *B. corticulans* treated by DMG
 (A) 1. SCPI-2'; 2. YCPI-2'; (B) 1. SCPI-3'; 2. YCPI-3'

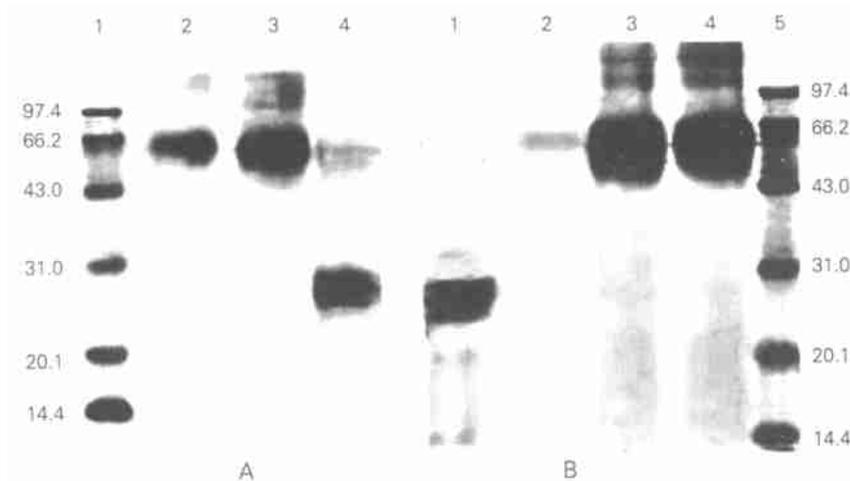


图 6 CPI 亚复合物多肽分析图谱
 Fig.6 Peptides analysis of subcomplexes resolved from CPI complex
 (A) 刺松藻: 1. 标准蛋白; 2. CPI-1; 3. CPI-2; 4. LHCI (B) 假根羽藻: 1. LHCI; 2. FP; 3. CPI-2; 4. CPI-1; 5. Marker
 (A) *C. fragile*: 1. Marker; 2. CPI-1; 3. CPI-2; 4. LHCI (B) *B. corticulans*: 1. LHCI; 2. FP; 3. CPI-2; 4. CPI-1; 5. Marker

素 (图 7), 是特殊的管藻黄素 - Chl a/ b - 蛋白复合物。由于它们分别来自 PSI 复合物 CPIa 和 CPI, 因此判断它们是 PSI 的捕光复合物 LHCI。同样, 假根羽藻 YCPIa - 3 的吸收光谱中叶绿素的最大吸收峰分别在 434, 440, 475, 655 和 671 nm, 而 YCPI - 3 在 440, 475, 656 和 672nm, Chla/ b 比值分别为 1.28 和 1.21, 含 27.5 ku, 26 ku × 2 及 24 ku 4 种多肽 (图 6)。

将刺松藻 CPI 采用 DMG 浸泡处理后电泳, 分离出的 SCPI - 3' 的颜色为浅黄色, 迁移率大于绿色的 SCPI - 2', 因而推测也是 LHCI 成分, 但是它的吸收光谱与分离出的其它 LHCI 条带不同。由于刺松藻的

CPI 复合物中只含有 24 ~ 25 ku 和 28 ku 两种多肽, 我们推测该复合物可能是由这两个多肽组成的, 多肽组成有待测定。

3 讨论

高等植物 PSI 是核心复合物 CCI 和外周天线 (捕光复合物) LHCI 构成的, 由于 LHCI 的剥离程度不同, 因此在电泳过程中可以形成分子量不同的 PSI 复合物。本文尝试采用二次电泳的方法, 在不同的分离条件下, 将首次电泳得到的刺松藻和假根羽藻最大的 PSI 复合物 CPIa1 和中心复合物 CPI 进行再电泳, 无论

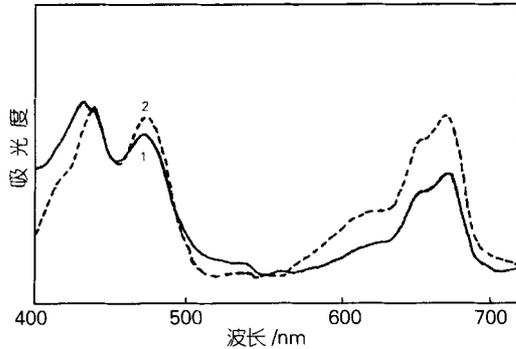


图7 假根羽藻 LHCI 吸收光谱
Fig.7 Absorption spectra of LHCI complex from *B. corticulans*
1. YCPIa - 3; 2. YCPI - 3

采用 DMG 处理还是在堆积胶中加入 Mg^{2+} , 都分离到了 LHCI 亚复合物 (SCPIa - 3、SCPIa - x、SCPI - 3' 和 YCPIa - 3、YCPIa - x、YCPI - 3、YCPI - 3'), 和不含 LHCI 的 PSI 核心复合物 CCI(SCPI - 2、SCPI - 2'、YCPI - 2 和 YCPI - 2'). 从吸收光谱来看, 分离物基本保持了天然状态。因此, 该方法的研究为进一步研究管藻目绿藻 PSI 复合物的结构打下了基础。

致谢: 本文部分工作是在中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室和中国科学院植物研

究所光合作用研究中心完成, 并得到中国科学院植物研究所匡廷云院士和李良璧先生的具体指导。张群和冯丽洁老师在实验结果测定方面给予了热情帮助。在此深表感谢。

参考文献

- 1 Chu Z X, Anderson J M. Isolation and characterization of a siphonaxanthin - chlorophyll a/ b - protein complex of photosystem I from a *Codium* species (Siphonales). *Biochim Biophys Acta*, 1985, 806:154 - 160
- 2 Anderson J M. Chlorophyll - protein complexes of a *Codium* species, including a light - harvesting siphonaxanthin - chlorophyll a/ b protein complexes, an evolutionary relic of some Chlorophyta. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 724:370 - 380
- 3 李桐柱, 林世青. 一个高分辨率的凝胶电泳系统及其从蓝藻中分离的叶绿素蛋白复合体. *植物学报*, 1995, 37: 34 - 40
- 4 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1 - 15
- 5 Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227:680 - 685
- 6 陈敏, 李爱芬, 周百成. 管藻目绿藻叶绿素蛋白复合物特性及比较研究. *植物学报*, 2000, 42(10): 1 019 - 1 025

ISOLATION OF PSI SUBCOMPLEXES FROM SIPHONOUS MARINE GREEN ALGAE BY TWO STEPS OF PAGE

CHEN Mn¹ LI Ai - Fen² ZHOU Bai - Cheng³

(¹ Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai, 264005)

(² The Center of Hydrobiology, Institute of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, 510632)

(³ Institute of Oceanology the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Oct., 18, 2002

Key Words: PSI, LHCI, CCI, PAGE, Siphonous green alga

Abstract

When PSI complexes CPIa₁ and CPI were extracted from siphonous green algae (*Codium fragile* and *Brnopsis corticulans*) by two steps of PAGE method, many components of PSI sub - complexes were obtained. It exhibited the spectrum of light - harvesting complex LHCI and core complex CCI of PSI. This method built a foundation for further structural study on PSI of siphonous green algae.

(本文编辑: 张培新)