

# 温度、光强和 pH 对条斑紫菜孢子体和配子体类囊体膜上光系统活性的影响

梁 军<sup>1,3</sup>, 张海霞<sup>1</sup>, Guenter Fritzschn<sup>2</sup>, Hartmut Michel<sup>2</sup>, 彭国宏<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. Max-Planck-Institute of Biophysics, Frankfurt am Main, Germany, D-60439; 3. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 光合作用研究中, 对于个体发育过程中类囊体膜蛋白结构和功能的变化所知甚少, 其中的一个限制因素是能否纯化得到大量高活性的稳定且均一的膜蛋白。作者以条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 2 个不同发育阶段(孢子体和配子体)作为研究对象, 分离得到了孢子体和配子体的类囊体膜, 在不同的温度、光强和 pH 下, 对其类囊体膜上的光系统活性进行了研究。结果表明, 孢子体和配子体的 PSI 活性均随温度和光强的升高而呈现一个先升高后降低的趋势, 在温度 18 °C, 光强为 2 320 lx 时具有最高的 PSI 活性。而孢子体和配子体的 PSII 活性随温度和光强的变化趋势不明显, 孢子体 PSII 活性在温度 18 °C, 光强为 2 320 lx 时最高, 配子体 PSII 活性在温度 13 °C, 光强为 2 800 lx 时最高。孢子体 PSI 在酸性条件下较活跃, 在 pH 5.4 时具有最高的 PSI 活性, 配子体 PSI 在碱性条件下较活跃, PSI 活性在 pH 10.4 时最高; 孢子体 PSII 活性随 pH 的升高呈现一个先升高后降低的趋势, 配子体 PSII 活性随 pH 变化趋势不明显, 但都在 pH 8.0 处活性最高。

**关键词:** 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*); 孢子体; 配子体; 类囊体膜; PSI; PSII

**中图分类号:** 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)09-0014-05

条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 是一种大型海洋红藻, 具有孢子体和配子体的异型世代交替生活史<sup>[1]</sup>。孢子体和配子体在形态和生长环境上各不相同, 但都能进行光合作用。许多工作研究了植物和藻类个体发育过程中光合作用生理特征方面的变化<sup>[2~4]</sup>, 但是对于个体发育过程中光合膜蛋白结构上变化的研究比较少。对条斑紫菜不同发育阶段光合作用的研究, 彭国宏等<sup>[5]</sup>发现条斑紫菜在个体发育过程中具有 2 种不同的藻胆体。潘洁等<sup>[6]</sup>研究表明, 条斑紫菜在个体发育过程中 2 个光系统间激发能的分配有所不同。在配子体阶段, PSII 吸收到的过多激发能够传递给 PSI; 而在孢子体阶段, PSII 收到的过多激发能没有传递给 PSI。这些工作促使人们进一步比较研究条斑紫菜孢子体和配子体类囊体膜蛋白的结构。为了研究类囊体膜蛋白的结构, 首先必须分离得到有活性的类囊体膜蛋白。作者首次研究了温度、光强和 pH 对条斑紫菜孢子体和配子体光合膜蛋白活性的影响, 建立了光合膜蛋白活性的检测方法, 可为下一步光合膜蛋白结构的比较研究提供了依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养和材料采集

#### 1.1.1 条斑紫菜孢子体的培养

条斑紫菜孢子体培养在 PES 海水培养基中<sup>[7]</sup>, 温度 18~21 °C, 光强为 50 lx, 光照培养箱通气培养, 2 周后收集。

#### 1.1.2 条斑紫菜配子体的采集

条斑紫菜配子体于 3 月中旬采自青岛海滨汇泉湾海域, 采集后用海水漂洗后悬挂阴干, 收集, 保存于 -20 °C 冰箱, 使用前 24 h 取出, 在 PES 海水培养基中静置恢复培养后用于实验。

### 1.2 离体类囊体膜的分离

收稿日期: 2004-06-28; 修回日期: 2004-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (B33023019, Max-Planck-Gesellschaft)

作者简介: 梁军(1979-), 男, 山东泰安人, 硕士, 海洋生物学专业, E-mail: liangfjun@yahoo.com; 彭国宏, 通讯作者, E-mail: ghpeng@ms.qdio.ac.cn

1.2.1 条斑紫菜孢子体类囊体膜的分离

条斑紫菜孢子体细胞培养 2 周后收集,过滤除掉海水培养液后,将孢子体细胞用缓冲液清洗几次后,悬浮于 30 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)<sup>[8]</sup>。将孢子体悬液在冰浴的条件下进行超声波破碎(Branson sonifier 250),输出功率 40 W,工作时间 60 min。将超声波破碎之后的溶液于 4℃、10 000 r/min 离心 10 min(Eppendorf 台式冷冻离心机),离心结束后,弃去沉淀,取上清液于 4℃、45 000 r/min 离心 30 min(Beckman TL-100 台式超速冷冻离心机),离心结束后弃去上清液,用缓冲液溶解沉淀,液氮冷冻后,-70℃下保存。

1.2.2 条斑紫菜配子体离体类囊体膜的分离

条斑紫菜配子体从冰箱取出后,用 30 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0)清洗 2 次,挤干后液氮冻融,转入研钵中迅速捣碎研磨后,冰浴中超声波破碎(Ultrasonic Processor, Cole & Parmer, USA),功率 60 W,每次 3 min,共 30 次。超声波破碎后的溶液于 4℃、10 000 r/min 离心 15 min(J-14 转子,J2-HS centrifuge, Beckman, USA),离心结束后弃去沉淀,取上清液于 4℃、40 000 r/min 离心 1h(Ti-45 转子,L8-80 ultracentrifuge, Beckman, USA),离心结束后,弃去上清液,收集沉淀,并用缓冲液溶解沉淀,液氮冷冻后,-70℃冰箱保存。

1.3 离体类囊体膜上光系统活性测定

1.3.1 PSI 活性测定

PSI 的耗氧活性用 Clark 型氧电极测定(Hansatech CB1D electrode, Hansatech, UK)。甲基紫精(methyl viologen, MV)作为人工电子受体,人工电子供体是抗坏血酸钠(ascorbate, ASC)和 2,6-dichlorophenol-indophenol (DPIP)。活性测定过程中,含有 2.5~5.0 μg 叶绿素的一份 PSI 样品被加到测定液中。测定液:30 mmol/L Mes (pH 8.0), 3 mmol/L ASC-DPIP, 0.1 mmol/L MV, 6 mmol/L DCMU (dichlorophenyl dimethylures), 6 mmol/L 甲胺(methylamine),0.01 mmol/L KCN。最终体积为 1 mL<sup>[9]</sup>。

1.3.2 PSII 活性测定

PSII 的放氧活性用 Clark 型氧电极测定(Hansatech CB1D electrode, Hansatech, UK)。2,6-dichloro-p-benzoquinone (DCBQ)和铁氰化钾(K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>),作为人工电子受体,测定过程中的电子传递是从 H<sub>2</sub>O 到人工电子受体 DCBQ 和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>。活性测定过程中,含有 2.5 到 5.0 μg 叶绿素的一份 PSII 样品被加到测定液中。测定液:1 mmol/L DCBQ, 1 mmol/L

K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 25 mmol/L Mes(pH8.0), 10 mmol/L NaCl, 20 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mol/L glycine betaine 最终体积是 1 mL<sup>[10]</sup>。

2 结果和讨论

用氧电极测定了分离得到的孢子体和配子体类囊体膜上光系统的活性与温度、光强和 pH 的关系。图 1 可以看出,温度在 13~22℃测试范围内,PSI 活性呈现一个先升高后降低的趋势,在 18℃时孢子体和配子体类囊体膜上 PSI 的耗氧速率达到最高,分别为 570 μmol/(mg·h)和 406.13 μmol/(mg·h)。

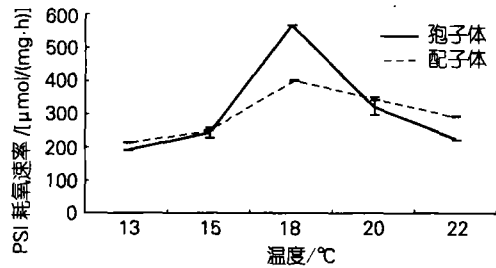


图 1 孢子体和配子体离体类囊体膜上 PSI 的耗氧活性与温度的关系

Fig.1 The relationship between PSI activity and temperature on the thylakoid membrane of the sporophyte and gametophyte

光强为 2 320lx, 叶绿素浓度为 15 μg/mL  
light intensity 2 320 lx, concentration of Chlorophyll 15 μg/mL

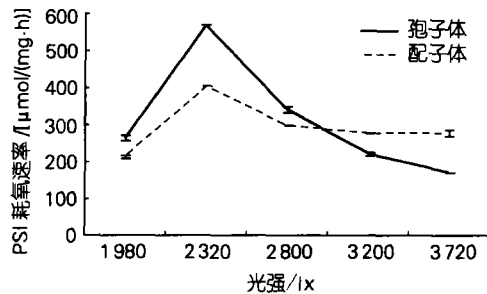


图 2 孢子体和配子体离体类囊体膜上 PSI 的活性与光强的关系

Fig.2 The relationship between PSI activity and light intensity on the thylakoid membrane of the sporophyte and gametophyte

温度为 18℃, 叶绿素浓度为 15 μg/mL  
temperature 18℃, concentration of Chlorophyll 15 μg/mL

由图2可知,光强在1 980~3 730 lx 测试范围内,PSI 活性也呈现一个先升高后降低的趋势,当光强为2 320 lx 时孢子体和配子体类囊体膜上PSI 的耗氧速率达到最高,分别为570  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 和406.13  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。

孢子体和配子体离体类囊体膜上PSII 的活性随温度的变化关系(图3)显示,孢子体离体类囊体膜上PSII 在18 $^{\circ}\text{C}$  时其放氧速率为470.25  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ,高于15 $^{\circ}\text{C}$  和20 $^{\circ}\text{C}$  的放氧速率;相同条件下配子体离体类囊体膜上PSII 的活性随温度升高出现降低的趋势,最高放氧速率为614.25  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ,此时温度为13 $^{\circ}\text{C}$ 。

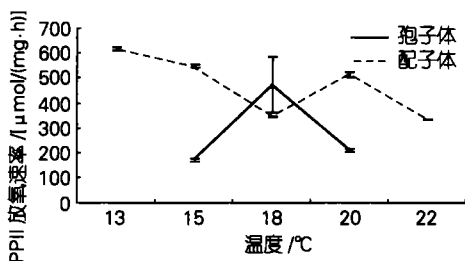


图3 孢子体和配子体离体类囊体膜上PSII 的活性与温度的关系

Fig. 3 The relationship between PSII activity and temperature on the thylakoid membrane of the sporophyte and gametophyte

光强为2 320 lx,叶绿素浓度为15  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
light intensity 2 320 lx, concentration of Chlorophyll 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$

图4 表明,孢子体离体类囊体膜上PSII 活性当光强达到2 320 lx 时其放氧速率为499.95  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ,光强为2 800 lx 时放氧速率下降到最低点,以后随着光

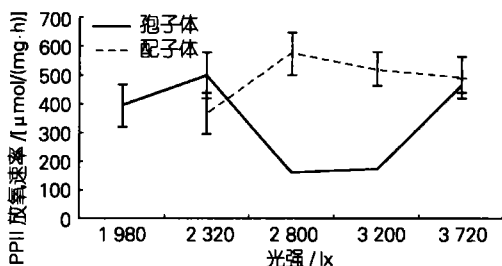


图4 孢子体和配子体离体类囊体膜上PSII 的活性与光强的关系

Fig. 4 The relationship between PSI activity and light intensity on the thylakoid membrane of the sporophyte and gametophyte

温度为18 $^{\circ}\text{C}$ ,叶绿素浓度为15  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
temperature 18  $^{\circ}\text{C}$ , concentration of Chlorophyll 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$

强的继续增大,放氧速率回升,这可能是孢子体类囊体膜对光强的一种诱导适应,也可能是类囊体膜的均一状态差别所致,这有待进一步对测试条件等作详细研究。配子体离体类囊体膜上PSII 活性相对较平稳,光强2 800 lx 时其放氧速率最大,可以达到573.3  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。

孢子体和配子体离体类囊体膜上PSI 和PSII 的活性在pH5.4~10.4 范围内的变化见图5 和图6。分离得到的孢子体离体类囊体膜PSI 在酸性条件下较活跃,pH 5.4 时的耗氧速率为242.4  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ;与此相反,配子体离体类囊体膜上PSI 在碱性条件下较活跃,其耗氧速率在pH 10.4 时为219.68  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。

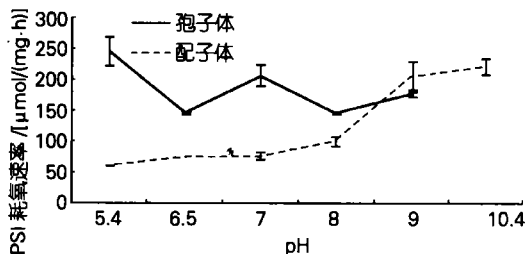


图5 孢子体和配子体离体类囊体膜上PSI 的活性与pH 的关系

Fig. 5 The relationship between PSI activity and pH on the thylakoid membrane of the sporophyte and gametophyte

温度为15 $^{\circ}\text{C}$ ,光强2 320 lx,叶绿素浓度为15  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
temperature 15  $^{\circ}\text{C}$ , light intensity 2 320 lx, concentration of Chlorophyll 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$

由图6 可知,分离所得到的条斑紫菜孢子体离体

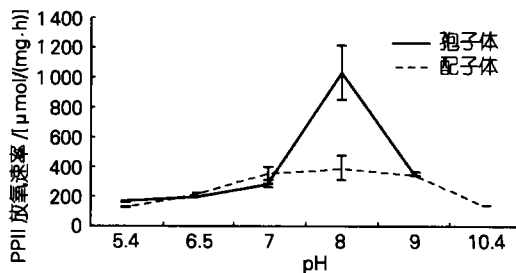


图6 孢子体和配子体离体类囊体膜上PSII 的活性与pH 的关系

Fig. 6 The relationship between PSII activity and pH on the thylakoid membrane of the sporophyte and gametophyte

温度为15 $^{\circ}\text{C}$ ,光强为2 320 lx,叶绿素浓度为15  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
temperature 15  $^{\circ}\text{C}$ , light intensity 2 320 lx, concentration of Chlorophyll 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$

## 研究报告 *REPORTS*

类囊体膜上 PSII 放氧速率在 pH 8.0 时为  $1\ 037.78\ \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。配子体离体类囊膜 PSII 活性随 pH 变化关系不明显,其放氧速率在 pH 8.0 时为  $394.2\ \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ,略高于其它 pH 条件下的放氧速率。

条斑紫菜孢子体和配子体类囊体膜上光系统活性均随温度和光强的变化而变化,但变化趋势略有不同,这可能与它们不同的生长环境有关。条斑紫菜孢子体多生长在海底贝壳中,而配子体则多生长在海边岩礁上<sup>[1]</sup>,由于生长环境的不同可能造成了二者对光强和温度条件的不同的适应性反应,从而导致了光系统活性的差异。Prakash<sup>[11]</sup>等报道,*Cucumis sativus* 子叶衰老过程中捕光天线组成、与反应中心的结合状态、叶绿素分子的比例等均发生变化。由此推测,不同温度、光强和 pH 下条斑紫菜孢子体和配子体的光系统活性的不同,也可能由于二者光系统蛋白复合物上的亚基和叶绿素分子的组成差异所致,这有待于证明。研究温度、光强和 pH 对条斑紫菜孢子体和配子体类囊体膜上光系统活性的影响,是检测条斑紫菜光合膜蛋白活性的前提,也是下一步纯化有活性的光合膜蛋白的基础,从而为光合膜蛋白结构的比较研究提供了依据。

**致谢:**非常感谢与马普生物物理所 Gregor Madej 有意义的讨论,同时感谢 Verena Linhard 的技术协助。

### 参考文献:

- [1] 曾呈奎,张德瑞. 紫菜的研究 I. 甘紫菜的生活史[J]. 植物学报,1954,3(3):287-302.
- [2] 曾呈奎,张德瑞. 温度因子对不同种类紫菜的壳孢子形成和放散的影响的比较研究[J]. 植物学报,1963,11(3):261-271.
- [3] 刘力,高尚德. 失水干燥对紫菜光合作用、呼吸作用及生长的影响[J]. 水产学报,1987,9(3):233-239.
- [4] Luning K. Critical levels of light and temperature regulatory the gametogenesis of three Laminaria species[J]. *J Phycol*,1980,16:1 015-1 021.
- [5] 彭国宏,施定基,潘洁,等. 条斑紫菜两种藻胆体与类囊体膜体外重组的光谱分析[J]. 科学通报,1998,43(10):1 061-1 065.
- [6] 潘洁,施定基,陈建新,等. 紫菜两个光系统间激发能分配研究对光合进化的启示[J]. 科学通报,2000,45(12):1 276-1 279.
- [7] Provasoli L. Culture and collection of algae[K]. Japanese Society of Plant Physiologists,1986,63-75.
- [8] Mangels D, Kruij J, Berry S, et al. Photosystem I from the unusual cyanobacterium *Gloeobacter violaceus*[J]. *Photosynthesis Research*, 2002, 72: 307-319.
- [9] Goran S, Barbara B P. Photosynthetic electron transport in cell-free extracts of diverse phytoplankton[J]. *J Phycol*, 1985,21:453-457.
- [10] Said E, Bertil A, James B. Isolation of a highly active PSII-LHCII supercomplex from thylakoid membranes by a direct method[J]. *FEBS Lett*, 1999, 446:23-26.
- [11] Prakash J S S, Baig M A, Bhagwat AS, et al. Characterisation of senescence-induced changes in light harvesting complex II and photosystem I complex of thylakoids of *Cucumis sativus* cotyledons: age induced association of LHCII with photosystem I[J]. *J Plant Physiology*, 2003, 160(2): 175-184.

## Impact of light intensity, temperature and pH on the activities of the membrane bound PSI and PSII of sporophytes and gametophytes in *Porphyra yezoensis*

LIANG Jun<sup>1,3</sup>, ZHANG Hai-xia<sup>1</sup>, Guenter Fritzscht<sup>2</sup>, Hartmut Michel<sup>2</sup>, PENG Guo-hong<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Max-Planck-Institute of Biophysics, Frankfurt am Main 60439, Germany; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Jun. ,28,2004

**Key words:** *Porphyra yezoensis*; sporophytes; gametophytes; thylakoid membranes; PSI; PSII

**Abstract:** Knowledge about the structural and functional alterations of thylakoid membrane proteins during ontogenesis is very few due to limited availability of pure, stable and homogenous thylakoid proteins with high activity. In this report, thylakoid membranes were isolated from the sporophyte and gametophyte cells of red alga *Porphyra yezoensis*. PSI activity in these membrane preparations was first measured by electron transfer from ascorbate/ dichlorophenol-indophenol (ASC-DPIP) to methyl viologen (mv); PSII activity was analysed by electron transfer from H<sub>2</sub>O to 1,4-benzoquinone, with an oxygen electrode ( Hansatech). The results showed that PSI from both sporophytes and gametophytes had the highest activity at a temperature of 18 °C and light intensity of 2 320 lx, it was 579 and 406 μmol/(mg. h), respectively. No obvious changes in the PSII activities within the same range of temperature and light intensity. A slightly high activity of PSII from sporophytes was detected at 18 °C and 2 320 lx, where oxygen evolution was 499 μmol/(mg. h), while the relatively higher activity of PSII from gametophyte was 573 μmol/(mg. h), obtained at 13 °C and 2 800 lx. The activities of PSI and PSII were also measured in the pH range from 5.4 to 10.4. In comparison with gametophytes, the PSI from sporophytes was more active at lower pH, with the highest activity at pH 5.4, that of gametophytes was at pH 10.4. On the other hand, the activity of PSII from sporophytes was significantly higher at pH 8.0, and oxygen evolution reached 1 038 μmol/(mg. h). However, the activity of PSII from gametophytes showed no significant change in the same conditions, the activity was 394 μmol/(mg. h). These observations imply that the composition of subunits and organization of chlorophylls might be different between PSI and PSII protein complexes in sporophytes and gametophytes of *Porphyra*.

(本文编辑:张培新)