

条斑紫菜类囊体膜蛋白质组双向电泳研究方法

周伟^{1,2,3}, 何林文¹, 陆勤勤³, 朱建一⁴, 高山^{1,2}, 杨睿灵⁵, 杨芳⁵, 王广策¹

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京, 100049; 3. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通, 226007; 4. 常熟理工学院 生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500; 5. 天津科技大学 海洋科学与工程学院 天津 300457)

摘要: 以蓝绿温和胶电泳为工具, 首次在国内用于条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)类囊体膜色素蛋白质复合物的研究。结果显示: (1)利用非离子型去污剂十二烷基麦芽糖苷(DM)增溶条斑紫菜类囊体膜, DM/Chla(w/w)15:1产生的效果较好, 在BN-PAGE胶中可以分离到较多较清晰的条带。(2)选取蔗糖密度层50%条带制备得到的类囊体膜样品进行第一向BN-PAGE和第二向SDS-Urea-PAGE电泳实验。第一向电泳分离出4个蛋白复合物, 对第二向电泳胶上的15个蛋白点切取做质谱鉴定, 检测到PS II 47ku, PS II 44ku, cytochrome f, PS II D2, PS II D1等蛋白。本实验证实了温和胶电泳与SDS电泳结合对于条斑紫菜这种原始红藻的类囊体膜研究方面应用的可行性。

关键词: 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*); 类囊体膜; 蓝绿温和胶电泳; SDS尿素电泳

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)03-0063-06

doi: 10.11759/hyxx20130131002

紫菜(*Porphyra*)是一类原始红藻, 属于红藻门(Rhodophyta)红藻纲(Rhodophyceae)红毛菜亚纲(Bangiophycidae)红毛菜目(Bangiales)红毛菜科(Bangiaceae)紫菜属(*Porphyra*)^[1]。紫菜是世界上最重要的栽培海藻之一, 目前我国的栽培物种包括长江以南的坛紫菜和长江以北的条斑紫菜, 其中条斑紫菜的产值最高。

长期以来, 对于光合作用研究主要集中在陆地高等植物, 对于藻类方面的研究也大多集中在遗传背景较清晰的海洋绿藻类等少数物种上, 关于红藻的光合作用研究报道较少。红藻的光合系统结构与高等植物大不相同, 例如, 红藻光系统II的捕光色素系统主要由附着在类囊体膜上的藻胆体构成^[2-3], 光合碳同化作用的关键酶 Rubisco 大小亚基编码基因均存在于叶绿体基因组中等^[4]。另外, 对于红藻的光合作用研究也一直缺少较好的模式材料。紫菜生活史周期短、便于室内培养、基因组小且减数分裂阶段形成四分子等特点使其成为藻类尤其是红藻光合作用的理想模式生物。

光合作用的基本反应都是在类囊体膜上进行, 这些反应是由存在于PS I、PS II、Cytb₆/f、ATPase这4个复合物上几百个蛋白完成的。这些蛋白除了负责把光能转化为电能外, 还有个别蛋白负责4个复合物的组装、固定与调节^[5]。处于不同进化层次上

的光合生物, 其光合膜上的色素蛋白质复合物结构、组成和功能并不完全相同。红藻属于最原始的真核藻类, 其光合作用进化地位处于蓝藻与高等植物之间的过渡类型, 类囊体膜并不形成垛叠的基粒结构^[6]。研究探寻条斑紫菜类囊体膜上的蛋白组成与功能将对了解掌握红藻的光合作用机制提供基础依据。

1991年, Schagger等^[7]为了研究哺乳动物和真菌线粒体中的蛋白质复合物, 建立了一种温和胶电泳系统, 并称之为blue-native polyacrylamidegel electrophoresis(BN-PAGE)。它可以真实地反映叶绿体蛋白质复合物的情况, 具有直观、高效、方便的优点和被广泛应用于同类蛋白质组研究中的潜质。该温和胶电泳系统与其他温和胶系统最明显的区别就在于, 电泳之前, 考马斯亮蓝染液代替了阴极电极液, 从而使电泳和染色得以同时进行, 直观而快速地反映了电泳的结果。在电泳时, 结合叶绿素的蛋白质复合

收稿日期: 2013-05-25; 修回日期: 2013-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272664); 国家海洋局项目(201105023); 国家863科技计划项目(2012AA10A406); 江苏省科技支撑计划项目(BE2012420, BE2011375); 江苏省农业科技自主创新项目(Cx(12)2039); 江苏省三新工程项目(2011-2012, 2012-2013)

作者简介: 周伟(1982-), 女, 江苏南通人, 博士, 助研, 主要从事紫菜育种与生理生化研究, 电话: 0513-85228262, E-mail: crasszhou@yahoo.com.cn; 王广策, 通信作者, 男, 研究员, E-mail: gcwang@qdio.ac.cn

物呈绿色, 而不含叶绿素的呈蓝色, 因此称之为蓝绿温和胶电泳。作者以蓝绿温和胶电泳为工具, 首次在国内用于条斑紫菜类囊体膜色素蛋白质复合物的研究。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

条斑紫菜叶状体采自江苏南通栽培海区, 取回实验室后用消毒海水洗净, 阴干, 冻存于 -80°C 待用。

1.2 材料组织破碎

将叶状体放入高速组织捣碎机(上海标本模型厂)中, 加入预冷的类囊体膜提取缓冲液(50 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L MnCl_2 , 1 mmol/L MgCl_2 , 2 mmol/L NaNO_3 , 100 mmol/L Sucrose, 0.5 mmol/L K_2HPO_4 , pH7.8)^[8]。整个破碎过程在冰浴低光条件下进行。将叶状体尽量搅碎, 在显微镜下检查碎片大小小于 1 mm^2 。破碎后溶液经筛绢过滤, 去除细胞碎片, 滤液于 4°C 避光保存。

1.3 超声波破碎细胞

将滤液保持在低温避光条件下进行超声处理(JY92-II 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝), 超声条件输出功率 100 W, 工作时间 5 s, 间隙时间 15 s, 工作次数 300 次。

1.4 类囊体膜制备

将超声后样品进行超速离心 30000 rpm, 30 min, 4°C (Beckman Coulter, SW 32 Ti rotor), 所得沉淀即为类囊体膜粗制品。将沉淀保持在低温避光条件下, 加入不含蔗糖的类囊体膜提取缓冲液, 充分研磨后重新悬浮。再进行蔗糖密度梯度离心, 30000 r/min, 4 h, 4°C (Beckman Coulter, SW 32 Ti rotor), 不连续蔗糖密度梯度从下至上为 70%, 60%, 50%, 40%, 30%蔗糖浓度, 每个梯度加入蔗糖溶液体积分别为 2, 2, 2, 1, 1 mL。超离后吸出各条带, 加入 10 倍无蔗糖缓冲液超离 30 000r/min, 30 min, 4°C , 去除样品中的蔗糖。所得沉淀用无蔗糖缓冲液重悬, 分装后, 一部分用 Shimadzu UV-1800 分光光度计测定其吸收光谱, 其余冻存于 -80°C 待用。

1.5 Blue-native PAGE

BN-PAGE 参照 Nijtmans^[9]进行: 取冻存样品,

解冻后离心 8 000g, 15 min, 去上清。沉淀用增溶 buffer(1.5 mol/L aminocaproic acid, 50 mmol/L Bis-Tris/HCl pH=7.0)溶解后再加入 5% 十二烷基麦芽糖苷(dodecyl- β -maltoside, DM)或 1% Triton X-100 进行增溶。去污剂/Chla(w/w)为 5 : 1, 10 : 1, 15 : 1, 20 : 1, 冰浴 30 min~1h 后离心 8 000g, 10 min 去除未溶解的沉淀。上清加入 1 : 10(v/v)上样 buffer(750 mmol/L aminocaproic acid, 50 mmol/L Bis-Tris/HCl, pH 7.0 (4°C), 0.5 mmol/L EDTA, 5% Coomassie-blue G250)后即可上样。电泳缓冲液阴极 A: 50 mmol/L Tricine/15 mmol/L Bis-Tris/HCl, pH 7.0 (4°C)/0.02% (w/v) Coomassie-blue, 阴极 B: 50mmol/L Tricine/15 mmol/L Bis-Tris/HCl, pH 7.0 (4°C); 阳极: 50 mmol/L Bis-Tris/HCl, pH 7.0 (4°C)。电泳在 Bio-Rad 的 Mini-Protean III cell 装置中进行, 分离胶为 5%~13%梯度, 浓缩胶为 4%。凝胶大小为 $10\text{ cm}\times 8\text{ cm}\times 0.075\text{ cm}$ 。电泳在 4°C 进行, 初始条件为 50 V, 30min, 进入分离胶后为 120V, 当电泳前沿到达分离胶的一半时, 用阴极缓冲液 B 代替阴极缓冲液 A。当蓝色前沿到达凝胶底部时电泳结束。

1.6 SDS-Urea-PAGE 第二向电泳

将第一向电泳凝胶用处理液(6 mmol/L Urea, 5% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 50 mmol/L Tris/HCl, pH 7.0, 20% glycerin)室温下平衡 1h, 去离子水清洗 3 次。将各复合物条带分别切下, 插入上样孔后进行第二向电泳。电泳方法与常规 SDS 电泳基本相同。12% 分离胶和 5% 浓缩胶中均含有 6 mol/L 尿素。电泳在 Bio-Rad 的 Protean II xi 装置中进行, 凝胶大小为 $20\text{ cm}\times 20\text{ cm}\times 0.1\text{ cm}$ 。电泳后凝胶用考马斯亮蓝 R250 进行染色。

1.7 质谱检测

将第二向电泳凝胶上的点切下后, 送至天津生物芯片技术有限责任公司进行质谱检测。具体步骤为将电泳染色后凝胶中的蛋白质点切成 $1\sim 2\text{ mm}^2$ 大小, 清洗几次后用含 50%乙腈, 25 mmol/L NH_4HCO_3 (100 μL , pH8.0)溶液浸泡胶块, 振荡 20 min 后弃去溶液, 重复 3 次至胶块中蓝色褪尽。蒸馏水洗涤 1 次。加入乙腈脱水, 胶块变白, 然后室温抽干。脱水胶块加入胰蛋白酶溶液(10 mg/L Trypsin, 50 mmol NH_4HCO_3 , pH8.0)再水化, 37°C 保温过夜。酶解胶块加 40 μL 5%TFA 于 40°C 保温 1 h, 吸出上清, 加入 40 μL 5% TFA, 50% 乙腈于 37°C 保温 1 h, 小心吸出上清, 抽真空干燥, 4°C 保存待用。用 ABI 4700 质谱

仪分析, 数据在 NCBI 非冗余(nr)、Swissprot 数据库进行了检索。

2 结果

2.1 类囊体膜的分离

样品经蔗糖密度梯度离心, 分成 3 条明显的绿色条带, 分别位于 40%, 50%, 60%蔗糖密度层(图 1)。位于离心管上端 30%蔗糖密度层的色素带为游离色素和藻红蛋白, 其他较大的细胞碎片均沉于离心管底部。对所得 3 条绿色条带进行可见光吸收光谱测定, 得到类囊体膜上蛋白的特征吸收峰(图 2)。434~438 nm和680 nm左右为叶绿素 a 的特征吸收峰, 488 nm 左右和 627 nm 左右处为辅助色素吸收峰, 其中 488 nm 为类胡萝卜素, 627 nm 处可能是藻蓝蛋白, 418 nm 为脱镁叶绿素 a 吸收峰。所得 3 条类囊体膜条带的吸收光谱基本一致。

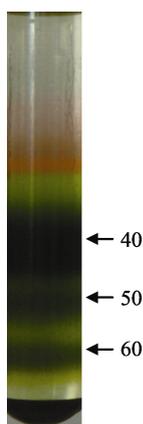


图 1 蔗糖密度梯度离心分离类囊体膜

Fig.1 Thylakoid membranes isolated by sucrose density gradients

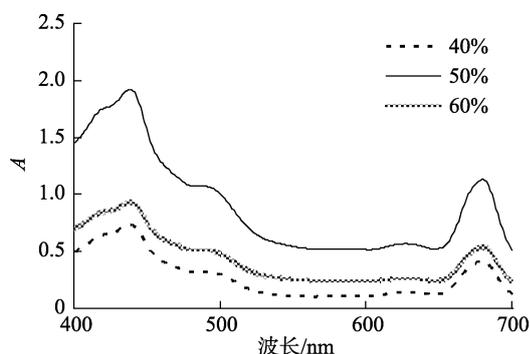


图 2 40%、50%和 60%蔗糖密度层类囊体膜可见光吸收光谱

Fig. 2 Visible absorption spectra of thylakoid membranes located at 40%, 50% and 60% sucrose layers

2.2 去污剂的选择

实验选用 40%蔗糖层分离到的类囊体膜进行去污剂的筛选。尝试选用了两种不同的去污剂 Triton X-100 和 DM 对类囊体膜增溶, 以比较蓝绿温和胶电泳分离的效果, 结果显示, 确定 DM/Chla(w/w)15 : 1 产生的效果较好, 在 BN-PAGE 胶中可以分离到较多较清晰的条带。相比较而言, 用 Triton X-100 增溶类囊体膜时, 只有少数膜蛋白复合物被分离, 条带较少, 显示增溶效果不充分(图 3, 图 4)。



图 3 Triton X-100 和 DM 增溶类囊体膜 BN-PAGE 电泳图

Fig.3 BN-PAGE analysis of thylakoid membranes solubilized by Triton X-100 and DM

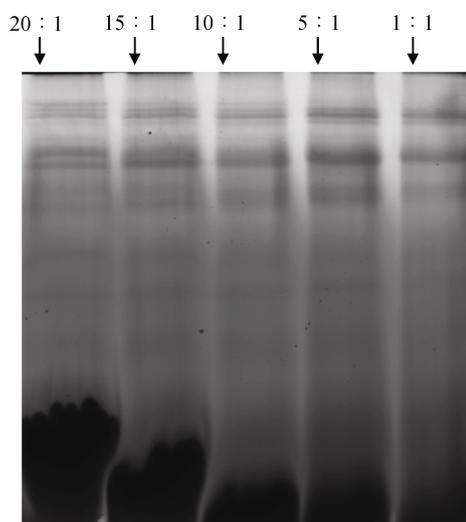


图 4 不同浓度 DM 增溶类囊体膜 BN-PAGE 电泳

Fig.4 BN-PAGE analysis of thylakoid membranes solubilized by different concentrations of DM

2.3 双向电泳

选取蔗糖密度层 50%条带制备得到的类囊体膜样品进行第一向 BN-PAGE 和第二向 SDS-Urea-

PAGE 电泳实验。如图 5, 第一向电泳得到 4 条清晰的条带, 既分离出 4 个蛋白复合物。为了进一步分析类囊体膜蛋白复合物的组成, 将这 4 条带切下再做第二向电泳, 在此条件下, 复合物各蛋白质亚基解离, 依据各自分子质量不同而分离。如图 6, 在第二向电泳中, 各蛋白质复合物的各个亚基可以被清晰地分开。为了确定各个亚基的性质, 我们将第二向电泳胶上的 15 个蛋白点切取做质谱鉴定。其中 7 个点有结果, 其余 8 个点未与数据库中蛋白序列比对上。质谱结果 5: PS 47ku, 6: PS 44ku, 7: cytochrome f, 8: PS D2, 9: PS D1, 13: PS D2, 14: PS D1 另外, 1、2、3、4、10、11、12、15 号点未检出。

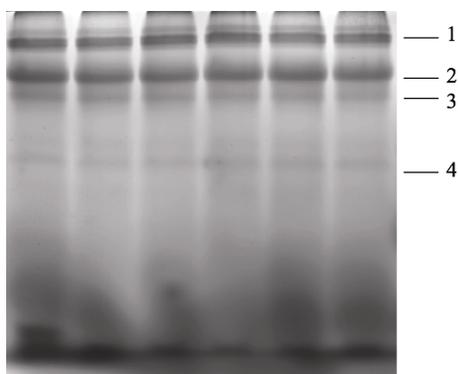


图 5 BN-PAGE 分离类囊体膜蛋白复合物

Fig.5 BN-PAGE analysis of protein complexes in thylakoid membrane

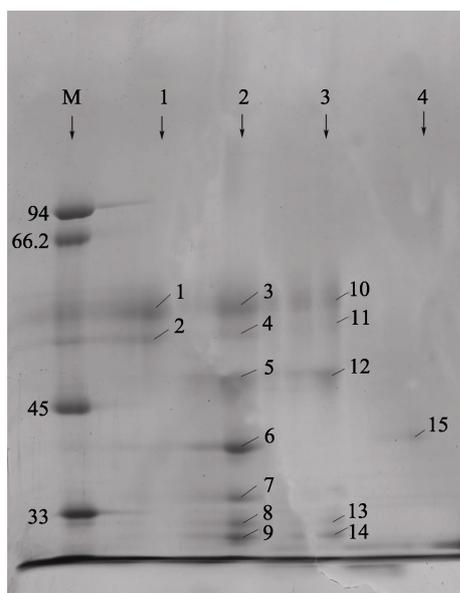


图 6 双向电泳分析类囊体膜蛋白组成

Fig. 6 Two-dimensional analysis of protein composition of thylakoid membrane

3 讨论

以等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)为第一向的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE), 是目前最常用来分离蛋白质的技术。但一些分子质量较大的蛋白质(大于 200 ku), 偏酸偏碱的蛋白质以及疏水性较强的膜蛋白的分离, 采用 2D-PAGE 往往不能得到理想的结果^[10]。BN-PAGE 改进了第一向电泳, 使样品保持复合物的活性在非变性条件下分离。这一技术的难点首先在于去污剂的选择与用量。去污剂太少复合物不容易从膜上分离出来, 去污剂太强则会导致复合物的降解。本实验采用了非离子型去污剂十二烷基麦芽糖苷 dodecylmaltoside(DM), 这是一种温和去污剂, 能打断脂质间连接, 而不破坏蛋白质复合物的完整性。其次在电泳过程中以考马斯亮蓝 G250 代替 SDS 使蛋白质复合物带负电荷。因为 SDS 作为离子载体同时也会是很强的去污剂, 不仅会解离蛋白质复合物, 还会使蛋白彻底变性。考马斯亮蓝 G250 则不会使蛋白变性, 而且在电泳的同时进行染色, 含叶绿素的蛋白质复合物如 PS, PS 条带呈绿色, 不含叶绿素的蛋白质复合物条带呈蓝色。另外第二向 SDS-PAGE 中加入了尿素, 提高了蛋白的溶解效率。然而最终分离到的蛋白点还是不多, 原因可能与第二向电泳前的胶处理不充分有关, 这方面技术还有待改进。

陈熙等^[11]研究水稻类囊体膜蛋白分离出 8 个叶绿素蛋白复合物。Kantzilakis^[12] 研究单细胞绿藻 *Scenedesmus obliquus* 也分离出 8 个叶绿素蛋白复合物。Kügler^[13]用 BN-PAGE 从菠菜的叶绿体中分离到 6 个叶绿素蛋白复合物。本实验结果只有 4 个叶绿素蛋白复合物。高等植物的 PS 捕光色素复合物是 Lhc1 至 Lhc6 其中由 Lhcb1 和 Lhcb2 组成的三聚体是 PS II 主要的外周天线复合物^[14]。而红藻的主要捕光天线复合物是藻胆体, 其附着在类囊体膜的外表面上, 通过锚定蛋白与类囊体的光合膜相联。本实验中, 制备类囊体膜样品采用的研磨, 超声方法使得藻胆体从类囊体膜上脱落下来, 并发生解离, 因此电泳条带结果不呈现捕光天线复合物的蛋白成分, 与高等植物相比条带较少。

此外, 第二向电泳结果的质谱分析, 也只检测到 PS 有关的蛋白和细胞色素 b₆f 连接蛋白等, 而关于 PS I 的蛋白均没有检测出来。原因是分离到的 PS I 蛋白浓度较低, 损失也较多, 其蛋白量低于质

谱检测要求, 导致没有成功检出。

温和胶电泳在研究叶绿体类囊体膜复合物的组成、生物发生中具有十分重要的作用, 可使叶绿体蛋白质复合物以近似天然的状态分离。高等植物的叶绿体类囊体膜的研究已广泛应用这一技术, 并成功分离出多个蛋白复合物。对于条斑紫菜这种原始红藻的类囊体膜研究, 尚属于起步阶段, 本实验证实了温和胶电泳与 SDS 电泳结合在这方面应用的可行性。

参考文献:

- [1] 郑宝福. 中国海藻志 第二卷 红藻门 第一册 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [2] 王广策, 邓田, 曾呈奎. 藻胆蛋白的研究(I) [J]. 海洋科学, 2000, 24(2): 22-25.
- [3] 王广策, 邓田, 曾呈奎. 藻胆蛋白的研究(II) [J]. 海洋科学, 2000, 24(3): 19- 22.
- [4] Ga H S Y, Han G C, Kazuhiro K, et al. Phylogeny of family *Scytosiphonaceae* (Phaeophyta) from Korea based on sequences of plastid-encoded Rubisco spacer region[J]. *Algae*, 2001 (16): 145-150.
- [5] Hippler M, Klein J, Fink A, et al. Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *The Plant Journal* , 2001, 28(5): 595-606.
- [6] Gardian Z, Bumba L, Schrofel A, et al. Organisation of photosystem I and photosystem II in red alga *Cyanidium caldarium*: encounter of cyanobacterial and higher plant concepts[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767(6): 725-731.
- [7] Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form[J]. *Anal Biochem*, 1991, 199 (2): 223- 231.
- [8] Strbac D, Rodrigues M A, Pdos S C, et al. Chloroplast isolation from *Laminaria digitata* (Phaeophyceae): A reproducible methodology yielding photosynthetically active chloroplasts[J]. *Planta*, 1994, 195:138-141.
- [9] Nijimans L G J, Henderson N S, Holt I J. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes[J]. *Methods*, 2006, 26: 327-334.
- [10] Eubel H, Braun H P, Millar A H. Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions[J]. *Plant Methods*, 2005, 1:11.
- [11] 陈熙, 崔香菊, Zhao Y X, 等 . 低叶绿素 b 水稻突变体类囊体膜的比较蛋白质组学[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(7): 653-659.
- [12] Kantzilakis K, Aivaliotis M, Kotakis C, et al. A comparative approach towards thylakoid membrane proteome analysis of unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1768: 2271-2279.
- [13] Kügler M, Jansch L, Krufft V, et al. Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) [J]. *Photosynthesis Research*, 1997, 53:35-44.
- [14] Janson S. The light-harvesting chlorophyll a/b- binding proteins[J] . *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1184: 1- 19.

Two-dimensional electrophoresis of thylakoid membrane proteome in *Porphyra yezoensis*

Zhou Wei^{1, 2, 3}, He Lin-wen¹, Lu Qin-qin³, Zhu Jian-yi⁴, Gao Shan^{1, 2}, Yang Rui-ling⁵, Yang Fang⁵, Wang Guang-ce¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Marine Fisheries Institute of Jiangsu, Nantong 226007, China; 4. Department of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China; 5. College of Marine Science & Engineering, Tianjin University Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Received: May, 25, 2013

Key words: *Porphyra yezoensis*; thylakoid membrane; BN-PAGE; SDS-Urea-PAGE

Abstract: The blue-native polyacrylamide gel electrophoresis was used for the first time in investigation of thylakoid membrane proteome of *Porphyra yezoensis*. The results showed that: (1) dodecyl- β -maltoside was a suitable detergent for the solubilization and stabilization of super-complexes of thylakoid membrane proteins. The detergent/Chla ratio of 15 : 1 gave the best solubilizing effect and a series of clear protein bands were obtained using BN-PAGE assay; (2) The sample collected at 50% sucrose was separated by BN-PAGE in the first dimension and then SDS-Urea-PAGE in the second dimension. Four protein complexes were separated by 1-D BN-PAGE gels. 15 protein dots separated by 2-D SDS-Urea-PAGE were analyzed by MALDI-TOF MS and a series of proteins including PS , 47ku, PS , 44ku, cytochrome f, PS D2, PS and D1 were confirmed. These data demonstrated that combination of BN-PAGE with SDS-Urea-PAGE can be well used in study of thylakoid membrane proteome of *P. yezoensis*.

(本文编辑: 梁德海)