

隐藻藻蓝蛋白与类囊体膜的动态结合模型

徐伟, 梁源, 陈敏, 王宁

(烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 隐藻藻胆蛋白在类囊体腔中的存在状态始终存在争议, 为了深入了解这一问题, 作者以含有藻蓝蛋白(PC645)的蓝隐藻(*Chroomonas placoidea*)活体细胞及充分洗涤过的类囊体膜为材料, 测定其室温吸收光谱、荧光光谱以及 77K 低温荧光光谱, 并根据光谱数据分析了 PC 在类囊体腔中的存在状态。结果显示, 蓝隐藻的类囊体膜上始终紧密结合着一定量的 PC, 并且很可能是以 PC 的 β 亚基与膜相接触, 证实藻胆蛋白在类囊体腔中不是完全游离的, 与膜的接触也并非完全无倾向性排布; PC 既可将激发能传递给光系统(PS)II, 但也可传递给 PSI, 相较于叶绿素(Chl)a 和 Chl c, 在 PSI 长波荧光中 PC 的贡献更明显, 而 Chl c 吸收的光能, 更倾向于传递给 PSII 或者短波长 Chl a; 蓝隐藻细胞中表现出超比例的 PC 荧光发射, 说明除了结合在膜上的 PC 外, 有一部分 PC 是游离的, 其存在对于隐藻捕光功能来说可能是有冗余的; 游离的 PC 可与类囊体膜重新接触而恢复能量传递功能。根据实验结果以及前人的报道, 提出了隐藻藻胆蛋白与类囊体膜的结合是动态的观点, 并给出了相应的模型。

关键词: 蓝隐藻(*Chroomonas placoidea*); 藻蓝蛋白; 77K 荧光光谱; 能量传递; 动态结合模型
中图分类号: Q946.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2015)04-0021-09
doi: 10.11759/hyhx20140903001

在光合系统中捕光复合物(light-harvesting complex, LHC)的功能是负责吸收和传递光能, 并将激发能经特定的方式和途径传递给反应中心用于光合作用。绿色植物和杂色植物的 LHC 分别为脂溶性的叶绿素(Chl)a/b-蛋白复合物和 Chl a/c-蛋白复合物, 而红蓝植物为水溶性的藻胆蛋白, 可以确定它们均以不同的方式结合于叶绿体的类囊体膜上^[1]。但杂色植物隐藻却非常特殊, 除了膜上的 Chl a/c₂-蛋白复合物外, 还含有水溶性的藻胆蛋白。与红、蓝藻中的藻胆蛋白相比, 隐藻藻胆蛋白有许多特异之处: 只含有隐藻藻红蛋白(Cr-PE)或隐藻藻蓝蛋白(Cr-PC), 不含异藻蓝蛋白(APC); 通常以二聚体($\alpha_1\alpha_2\beta\beta$)形式存在, 而非三聚体或六聚体; 不形成藻胆体样结构等等。而最突出的差别是隐藻藻胆蛋白存在于类囊体腔内, 而不像藻胆体那样附着于类囊体膜外表面^[2-3]。但目前对于隐藻藻胆蛋白在膜腔内的存在状态, 以及与膜的关系却争议很大。主要有以下几种看法: (1)紧密结合在类囊体膜的内表面上^[4]; (2)一部分与膜结合, 其余游离或者散布在类囊体腔中^[5]; (3)以某种方式结合并横跨膜腔内部, 边缘与光合系统 II(PSII)接触并为其提供能量^[6]; (4)均匀地填充于类囊体腔中, 彼此之间以及与膜上 Chl-蛋白复合物之间没有倾向性的结合关系^[7-8]。

目前, 与研究较为透彻的红、蓝藻藻胆蛋白及藻胆体相比, 对隐藻藻胆蛋白的了解要少得多, 尤其是隐藻藻胆蛋白与膜上另一套捕光复合物 Chl a/c₂-蛋白复合物以及 PSI 和 PSII 反应中心之间的相互接触方式不明, 使能量传递机制更无法最终确定。作者以含有隐藻藻蓝蛋白 PC645 的蓝隐藻(*Chroomonas placoidea*)为材料, 根据室温和低温光谱测定和分析结果, 提出对这一问题的看法。

1 材料与方 法

1.1 蓝隐藻的培养及藻体细胞的收集

蓝隐藻在实验室采用 F/2 培养基自行培养, 温度 20~25℃, 持续通气、光照培养, 16W 日光灯, 光照强度约 2 000 lx。取培养至 4~5 d 达到对数生长期的培养液, 于 3 500 g 离心 10 min 收集藻体细胞, 用分离介质(pH7.2 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液, 含有 0.3 mol/L 的蔗糖, 0.1 mol/L NaCl 和 MgCl₂)洗涤两次。

收稿日期: 2014-09-03; 修回日期: 2014-09-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40976083)

作者简介: 徐伟(1990-), 男, 吉林九台人, 硕士研究生, 主要从事蓝隐藻藻蓝蛋白的研究, 电话: 15063839931, E-mail: sky_x1227@163.com; 陈敏, 通信作者, E-mail: chenmclm@163.com

1.2 蓝隐藻类囊体膜的制备

在清洗后的藻体细胞中加入悬浮液(50 mmol/L, pH8.0 的 Tricine-NaOH)后,用 French Pressure Cell Press(美国 SLM Aminco)破碎细胞,相对压强为 6.897 MPa。破碎后的溶液在 1 000 g 离心 10 min 去除残余细胞及大颗粒,于 5 000 g 离心 10 min 收集类囊体膜。以悬浮液悬浮,小心搅拌,清洗 2~3 次,以除去膜中残留的游离 PC,直至离心上清液中不再有蓝色出现为止。加入含 50% 甘油的悬浮液,参照 Jeffrey 公式^[9]调整叶绿素浓度为 0.8~1.5 g/L,于-80℃ 冰箱冻存储存。以上所有操作在 4℃ 避光进行。

1.3 藻蓝蛋白 PC645 的制备

细胞破碎后的溶液离心收集去除类囊体膜后的上清液于 12 000 g 再次离心 10 min,上清液为含有 PC645 的粗提液。采用 50%饱和度硫酸铵沉淀去除叶绿素等组分,80%饱和度下得到 PC645 沉淀,12 000 g 离心 15 min 收集沉淀,加入少量 PBS 缓冲液溶解备用。经 Sephadex G-100 分子筛层析纯化,洗脱液为 50 μL/L 的 PBS 缓冲液得到初步纯化的 PC645。

1.4 室温吸收光谱测定

蓝隐藻藻体、类囊体膜用悬浮液适当稀释后,使用 TU-1900 双波长双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用)测定室温吸收光谱。

1.5 室温荧光光谱测定

加入悬浮液将蓝隐藻藻体、类囊体膜适当稀释,使用 LS55 荧光分光光度计(Perkin Elmer)测定室温荧光光谱。扫描速度 500 nm/min,激发和发射狭缝宽度 10.0 nm。

1.6 77K 荧光光谱测定

将蓝隐藻藻体或类囊体膜离心去除悬浮液后,加入含 60%甘油的悬浮液悬浮,或者于悬浮液中加入甘油至 60%(V/V),混匀后置于低温石英管中,用 LS55 荧光分光光度计在液氮温度下测定荧光光谱。扫描速度 500 nm/min,测定发射光谱时激发狭缝 15.0 nm,发射狭缝 10.0 nm;测定激发光谱时发射狭缝 20.0 nm,激发狭缝 10.0 nm。

1.7 SDS-PAGE

将低温保存的类囊体膜解冻后,用悬浮液清洗,去除游离的 PC 后,用悬浮液重新悬浮,调整叶绿素质量浓度 0.8 g/L。参照 Laemmli^[10]方法加入等体积

样品裂解液,于 37℃ 增溶 30 min,36 000 g 离心 10 min 去除膜碎片。上清液加入 80% 丙酮/乙醇(V/V)洗涤抽提脂类和叶绿素,三氟乙酸沉淀蛋白,40 000 g 离心 15 min 收集沉淀。沉淀及 PC 样品参照 Laemmli^[10]方法进行 SDS-PAGE,只是采用 10%~20%线性梯度胶分离。电泳结束后先用硫酸锌染色观察有荧光的条带并拍照,然后以 7% 冰乙酸脱色至背景透明后再用考马斯亮蓝染色,0.5 mol/L NaCl 脱色后拍照。

2 实验结果

2.1 吸收光谱

在蓝隐藻完整藻体细胞中(图 1),436(438)nm 和 677(679) nm 的吸收峰源自 Chl a;495 nm 处吸收峰来自类胡萝卜素;而 586、647 nm 两个吸收主峰和 1 个 626 nm 的肩峰都属于 PC(581、626 和 645 nm),为典型的 Cr-PC645 类型。463 nm 左右的吸收峰与 Chl c 的蓝区吸收有关,但其在红区吸收峰(630 nm 附近)被 PC645 的吸收所掩蔽。在活体细胞中,PC 吸收峰的高度超过 Chl a,表明 PC 在活体细胞中含量很高,是藻体内主要的捕光复合物。Chl c 在红区的吸收可由 PC 取代,但在蓝区的吸收比 Chl a 更靠近绿光区。这与隐藻多生长于以蓝绿光为主的深水环境相适应,大量的 PC 以及一定量的 Chl c 的存在,有利于藻体捕获水体弱光环境中的有效光能,以弥补 Chl a 吸收的不足^[11]。充分洗涤过的类囊体膜中(图 2)Chl a 红区吸收红移至 679 nm,在 580~650 nm 附近依然能看到属于 PC 的吸收峰存在(对应于导数光谱中的 690、634 和 650 nm 倒置峰),但与 Chl a 吸收相比,相对强度明显降低。这是由于叶绿体破碎后存在于类囊体腔中的 PC 大部分流失造成的。这种保留有藻胆蛋白

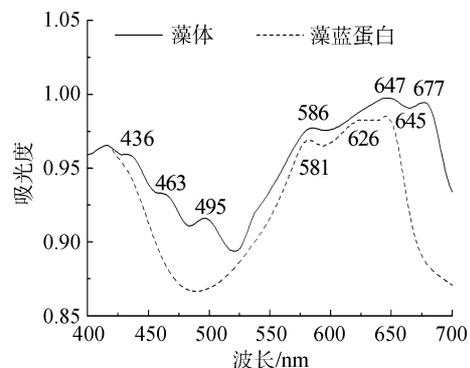


图 1 藻体和藻蓝蛋白室温吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of cells and PC645 at room temperature

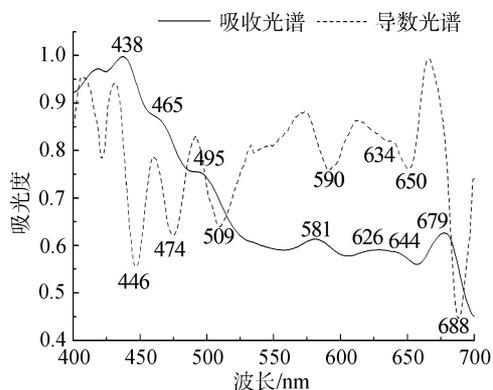


图2 类囊体膜室温吸收及其导数光谱

Fig.2 Absorption and derivative spectra of thylakoids at room temperature

的类囊体膜样品,在以往的报道中都未有提及。只是这部分PC的存在状态,单纯通过吸收光谱不能确定,可能与膜结合,但也可能处于游离状态与类囊体膜片共存。

2.2 藻体室温荧光光谱

如图3A藻体的室温发射光谱中,当给予435 nm(对应Chl a的吸收)、460 nm(对应Chl c的吸收)激发发光时,均只发射源于PSII的Chl a的686~687 nm附近荧光,没有640 nm附近源于Chl c的荧光发射,说明活体状态下Chl c吸收的能量几乎100%传递给Chl a。Chl c作为辅助色素通常与Chl a及膜上蛋白结合,组装形成Chl a/c-捕光蛋白复合物,围绕于反应中心外部,上述结果说明,膜上脂溶性的Chl-蛋白复合物与反应中心之间的能量传递效率是极高的。当给予580 nm(对应于蓝隐藻PC吸收)的激发光时,在686 nm产生一个属于Chl a的荧光发射。说明PC吸收的能量可以传递给Chl a。尽管Chl a在580 nm附近也有一小部分吸收,但580 nm激发光所产生的Chl a荧光发射强度远远高于435 nm激发光(相对荧光强度之比可达1.5~1.8倍),表明这部分Chl a荧光发射主要来自于PC的激发而非Chl a。此外,580 nm光激发下还产生1个662~667 nm的源自PC的特征荧光峰,其相对荧光强度接近甚至超过Chl a的发射峰($F_{667}/F_{686}=1.05\sim 1.2$),说明藻体内的PC可以把吸收的能量传递给Chl a,但在测定时的激发光强度下,也有超过半数的激发能以剩余荧光形式发射掉了。由于藻胆蛋白是在没有足够用受体的情况下才会以发射荧光的方式消耗激发能,而据报道隐藻藻胆蛋白与Chl a之间的能量传递效率很高,可达98%~99%^[7],因此活体细胞中发射这部分660~667 nm

剩余荧光的PC应该以某种方式中断了与光合系统之间的能量传递关系。

激发光谱反映的是荧光物质在不同波长的激发光照射下,对所产生的发射波长的荧光强度的贡献,往往与该物质的吸收光谱中的峰形变化一致,可以反映色基之间的能量偶联情况^[12]。如图3B所示,在700 nm发射波长下,藻体细胞的激发光谱与吸收光谱很相似,在蓝区436、458和495 nm(导数光谱447、473和502 nm)处可看到小的源自于Chl a、Chl c和类胡萝卜素的激发峰,只有导数处理后的结果中可看到位于679 nm的Chl a红区激发峰,说明Chl c及类胡萝卜素和Chl a之间存在能量偶联,只是对该荧光贡献较小。活体细胞激发谱中,最强的582 nm和646 nm(导数光谱592和662,631 nm对应于625 nm吸收肩峰)的激发峰显然源自PC,说明藻体内对700 nm长波荧光发射贡献比例最高的是PC。在520~550 nm(导数光谱529 nm和543 nm)的变化,据报道与PC内部偶联的色基对相互作用有关^[13-14]。

2.3 藻体77K荧光光谱

室温下通常只能观测到属于PSII的荧光,PSI在室温下不产生显著的荧光峰^[15],因而采用77K液氮低温条件测定,以区分PSI和PSII的差别。活体细胞77K低温荧光发射谱与室温相比,峰形、峰位和相对强度都有所变化(图3C),其谱峰十分特别,表现在以下几个方面:(1)当给予435 nm和460 nm激发光时,发射主峰在属于Chl a的694~696 nm附近,与高等植物和绿藻相似,是源自于PSII内周天线的典型发射峰^[16]。此结果与以往对隐藻的报道不同,含有PC的蓝隐藻*Chroomonas* CCMP270以及含有PE的*Rhodomonas* CS24的活体细胞在77K低温下属于PSII的荧光峰都在683或者686 nm处,这一现象被认为是由于隐藻PSII光合系统特异而导致的^[7, 17],但作者的测定结果说明,不同种属的隐藻,其PSII的荧光特性可能是多样化的。在这两种激发波长下,700 nm以上的长波发射基本看不到,说明Chl a和Chl c激发后的能量似乎更倾向于传递给PSII或者短波长Chl a。但Chl c激发后只产生Chl a的荧光,说明77K低温没有影响Chl c向Chl a之间的能量传递效率。

(2)当给予580 nm对应于蓝隐藻PC的激发光时,除了产生695 nm源自PSII的荧光发射之外,还产生720~725 nm荧光,该荧光发射被认为源于PSI^[18-19]。此结果与Mimuro等^[16]报道的不同隐藻的

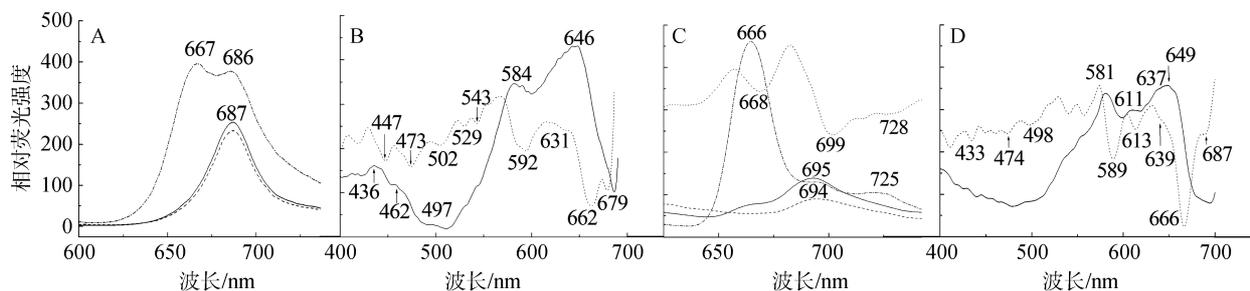


图3 藻体细胞室温(A, B)和 77K(C, D)荧光发射(A, C), 激发(B, D)及其导数光谱

Fig. 3 Fluorescence emission (A, C), excitation (B, D) and derivative spectra of cells at room temperature (A, B) and 77 K (C, D) A, C. 激发波长 435nm(—), 460nm(-----), 580nm(—●—), 580nm 激发的导数光谱(·····); B. 发射波长 700nm(—), 导数光谱(·····); D. 发射波长 720nm(—), 导数光谱(·····)
A, C. Excitation wavelength 435nm(—), 460nm(-----), 580nm(—●—), derivative spectra at 580nm(·····); B. Em = 700nm(—), derivative spectra(·····); D. Em= 720nm(—), derivative spectra(·····)

活体细胞中 PSI 的 77K 特征荧光发射峰通常位于 715~730 nm 相一致。说明蓝隐藻完整藻体细胞中的 PC 可将激发能同时传递给 PSII 和 PSI 反应中心附近的 Chl a。藻体中对 700 nm 以上长波荧光的贡献主要来自于 PC, 说明 PC 将相当一部分激发能传递给了长波 Chl a。

(3) 580 nm 光激发后的发射主峰位于 666 nm, 是属于 PC 的特征发射峰, 该荧光峰来自 PSI 和 PSII 的 Chl a 的发射峰高的多(F666/F695 平均可达 5.0, F666/F725=6.0), 而相对荧光发射强度是 Chl a 激发时的 4~5 倍。与室温荧光发射光谱相比较, 属于 PC 的发射比例大幅度增加。蓝隐藻细胞中这种发射超高比例藻胆蛋白荧光的现象与某些隐藻相似^[7, 17], 但与蓝藻或红藻相比则显得特异^[20-21]。其原因可能是由于低温导致了 PC 与膜相关的能量传递途径阻碍, 致使 PC 激发后的大部分激发能没有传递下去, 表现为 666 nm 发射强度相对 Chl a 的发射强度大幅

度升高。由于低温条件下阻碍的是活体细胞内的生物过程或者动态过程, 而光物理和光化学过程仍可进行。推测生理条件下 PC 与膜组分之间的能量传递可能借助了某些低温下可被阻断的动态相互作用, 而红、蓝藻藻胆体因为是附着在光合膜上的, 因而受低温的影响相对要小。

PC 激发对长波荧光的贡献, 在发射波长为 720 nm 时藻体细胞 77K 激发光谱(图 3D)中体现得更为明显。此时, 在 440~470 nm 之间属于 Chl a 和 Chl c 的激发峰几乎不可见, 只在导数处理的谱峰中可以看到 687nm 处对应于长波 Chl a 的激发贡献。主要的激发峰在 580~650 nm, 激发峰形与 PC645 的吸收谱图很相似(图 1)。而 77K 下 PC 的激发光谱更精细, 呈现 581、611、632 和 649 nm 多个 PC 的激发峰, 在导数处理后更为明显。对于隐藻 PC645 吸收光谱中 3 个典型的吸收谱峰与藻胆色素基之间的对应关系一直存在争议, 但最近的一些报道倾向于认为,

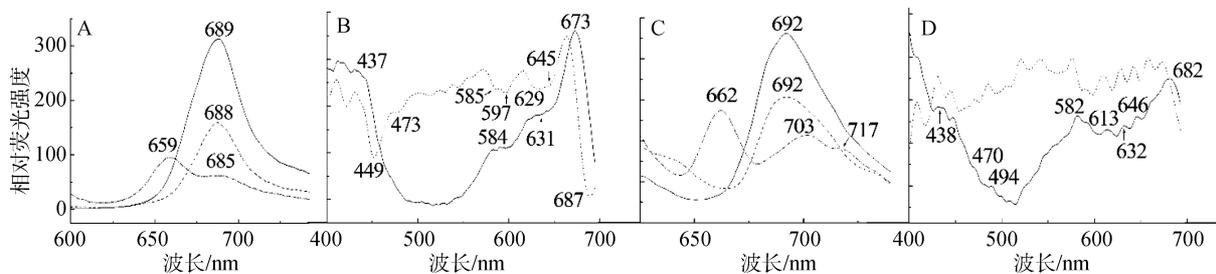


图4 类囊体膜在室温(A, B)和 77K(C, D)下的荧光发射(A, C), 激发(A, C)及导数光谱

Fig.4 Fluorescence emission (A, C), excitation (B, D) and derivative spectra of thylakoid membrane at room temperature(A, B) and 77 K (C, D) A, C. 激发波长 435nm(—), 460nm(-----), 580nm(—●—); B. 发射波长 700nm(—), 导数光谱(·····); D. 发射波长 720nm(—), 导数光谱(·····)
A, C. Ex= 435nm(—), 460nm(-----), 580nm(—●—); B. Em = 700nm(—), derivative spectra(·····); D. Em= 720nm(—), derivative spectra(·····)

PC645 所含有的色素吸收区域为: DBV(二氢胆绿素) \leftrightarrow 580~585 nm, MBV(中胆绿素) \leftrightarrow 610~622nm, PCB(藻蓝胆素) \leftrightarrow 630~640 nm, PCB(β 82) \leftrightarrow 645~650 nm, 位于 β 亚基82位Cys上的PCB为最低能量色素^[22-23]。因此上述4个激发峰应该分别对应于DBV(581 nm)、MBV(611 nm)、PCB(632 nm)和PCB β 82(649 nm)。

2.4 类囊体膜室温荧光光谱

叶绿体破碎之后制备的类囊体膜在室温条件下以435和460 nm作为激发光照射时,都只产生在688~689 nm附近的来自PSII的Chl a发射峰(图4A),说明在分离得到的类囊体膜上Chl a和Chl c依然保持着良好的天然状态,吸收的光能均可有效的传递给Chl a。若以580 nm光激发时,同样在685~686 nm附近产生源于Chl a的荧光,但相对于藻体细胞,由于PC的流失,相对荧光强度低于435 nm激发(相对强度比值为0.2~0.3),甚至低于Chl c激发时的荧光(相对强度比值为0.7~0.8)。除此之外,在659~660 nm处(比活体状态蓝移约5~6 nm)仍可看到有1个属于PC的发射峰,与Chl a峰的比值 $F_{660}/F_{685}=1.4\sim 1.6$ 。说明经过充分洗涤的类囊体膜中仍有和Chl-蛋白特异结合的PC。

在700 nm发射波长下的室温激发光谱(图4B)显示,在去除大部分PC的类囊体膜中,Chl a对此长波荧光的贡献相对突出,除了红区435 nm激发峰外,在673 nm的蓝区激发峰成为主峰;但460 nm附近原属于Chl c激发峰几乎消失,表明此时Chl c对此长波荧光的贡献微乎其微;而583, 632, 642 nm的激发峰明显与PC有关,进一步说明在样品中存在的PC是与类囊体膜以良好的状态结合着的,且PC和Chl a之间依然保持着能量传递关系。

2.5 类囊体膜77K荧光光谱

在图4C类囊体膜的77K荧光发射光谱中,与活体细胞相似,在435 nm和460 nm的激发光照射下,主要可使Chl a和Chl c激发,此时类囊体膜的荧光发射主峰均为源自PSII内周天线Chl a的692 nm荧光(比活体状态蓝移约3~4 nm);但在700~730 nm区域还呈现不明显的肩峰区,这一部分发射波长长于PSI的反应中心叶绿素P700,因而一般认为来自PSI,说明类囊体膜中Chl a和Chl c激发后都可将能量传递给PSI。有报道认为,隐藻PSI也有属于自己的Chl a/c₂捕光复合物LHCI存在^[24-25],因此,光谱中这一部分激发能可能来自LHCI中的Chl a和Chl c,但是

显然份额较少。此外,当给予类囊体膜580 nm的激发光时,类囊体膜除了呈现比藻体时强度低的多的662 nm发射峰外,还呈现出源自PSI的703、717 nm的长波Chl a的荧光峰(比藻体蓝移7~8 nm),再次说明PC和两个光合系统的Chl a间均存在能量传递关系,并且向长波Chl a传递的份额比Chl c更高。

图4D类囊体膜的77K激发光谱中也显示,发射波长为720 nm时,对这一长波荧光产生贡献的主要是Chl a(431~448 nm、682 nm)和PC(580~646 nm),Chl c(470 nm)以及类胡萝卜素(494 nm)的激发不明显。而77K下PC的激发光谱更精细,除了581和649 nm峰之外,还呈现582、613、632和646 nm处多个PC藻胆素色素的激发峰。

可见,尽管类囊体膜制备过程中,包裹在类囊体腔中的PC不可避免会流失,但在实验条件下所得的膜片上依然存在一定比例的PC,并且其上结合的Chl-蛋白复合物以及PC的色素之间的能量传递关系仍与活体细胞状态相似。

2.6 类囊体膜多肽 SDS-PAGE

充分洗涤后的类囊体膜多肽分析结果见图5。多肽的分布呈现一定的规律:即主要分布在20~22 ku(捕光复合物)、28~35 ku(反应中心)、45 ku附近(PSII内周天线)和66 ku附近(PSI核心)4个区域附近^[25](图5b)。结果经锌染后在紫外光下观察(图5c),发现在考染图谱中丰度最高的20 ku多肽附近有一条粉红色荧光条带,与PC的 β 亚基迁移率相当(图5d)。由于类囊体膜样品在多肽组成分析之前经过丙酮/乙醇处理,与蛋白质非共价结合的叶绿素和类胡萝卜素被去除,只有与蛋白质共价结合的藻胆素可被保留,因此PAGE图谱中呈现粉红色荧光的蛋白带只能属于含藻胆素的藻胆蛋白亚基,说明类囊体膜样品中确有PC存在。并且由于膜样品在电泳前经过深度洗涤,因此图谱中观察到的多肽组分(包括PC)都应是附着或者结合于膜上的。多肽分析结果还显示,PC645的 β 亚基总能被检测到,而 α 亚基则只有在银染条件下偶尔可以见到(结果未显示),尽管 α 亚基可能因为分子量小而容易流失,但这一结果暗示了PC645的 β 亚基似乎与膜结合更为紧密。既然目前的研究倾向于认为,PC645产生末端发射的基团(662 nm荧光发色团)是位于 β 亚基的PCB β 82,激发能在PC645内部传递后最终到达PCB β 82,后者再将能量传递给位于膜上的Chl a^[22-23]。因此,从功能上来说,PC645的 β 亚基应是与膜上叶绿素相互作用的位点,

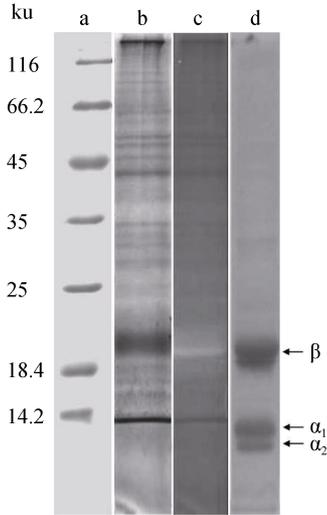


图 5 类囊体膜多肽以及 PC 亚基 SDS-PAGE 图谱

Fig.5 The SDS-PAGE profiles of thylakoid membrane peptides and PC subunits

a. 标准蛋白(ku); b.类囊体膜锌染后紫外光下结果; c.类囊体膜考染后自然光下结果; d.PC 考染自然光下结果
 a. standards(ku); b.thylakoid stained by Coomassie brilliant blue under natural light;c.thylakoid stained by ZnSO₄ under ultraviolet ray; d.PC stained by Coomassie brilliant blue under natural light

因此结构上由 β 亚基与膜相接触, 这一结果以往未有报道, 但作者认为应该是合理的。

3 讨论与结论

目前对隐藻藻胆蛋白的了解远不及红、蓝藻藻胆蛋白透彻, 而隐藻藻胆蛋白的研究又大多以游离的异二聚体或者更小的单体本身为对象^[22-24, 26-28], 对于异二聚体之间的相互作用, 以及作为隐藻主要的捕光复合物与类囊体膜上 Chl-蛋白之间的接触机制却了解有限, 甚至于是否有结构上的接触都还众说纷纭, 存在争议。

一方面, Wit 等^[7]提出的隐藻光合膜结构模型, 是现有模型中最新的, 他们认为隐藻藻胆蛋白的 $\alpha_1\alpha_2\beta$ 异二聚体形式是稳定的生理结构形式, 似乎不倾向于形成高度的聚合状态; 藻胆蛋白异二聚体高密度均匀地填充于类囊体腔中, 彼此之间以及与膜上 Chl-蛋白复合物之间都没有倾向性的结合; 二聚体蛋白可在不相互接触、也不与膜接触的情况下以 Förster 共振方式直接将吸收的能量在彼此之间传递, 并最终传递给位于类囊体膜上的 Chl a。由于按照此模型计算, 藻胆蛋白与膜上能量的传递效率比活体状态低得多, 因此 Doust 等^[8]认为, 离体状态的藻胆蛋白其光谱学测定结果可能不能代表活体状态

下的准确情况。因此也说明处于游离状态的隐藻藻胆蛋白似乎不是完全的天然状态。

另一方面, Lichtlé 等^[25]曾经报道分到一种活性的 PE-叶黄素-PSII 复合物组分; 而作者在前期的实验中则分离到一种特殊的 PC-Chl a/c₂-蛋白复合物, 并且该复合物中 PC 吸收的能量可直接传递给复合物内的 Chl a, 无需经由 Chl c₂的介导^[29]。这些结果直接说明, 隐藻藻胆蛋白在结构上是与膜上的 PSII 或者 Chl a/c-蛋白复合物直接相连的, 并且在功能上存在能量传递关系。

此外, 曾有活体细胞的荧光动力学研究显示, 隐藻 *Cryptomonas ovata* 细胞也存在不是很典型的光诱导的状态转变过程, 在 PSII 过激发时, 会导致 PE 与 Chl a/c₂以及 PSII 核心的偶联中断, 从而改变藻胆蛋白向 PSII 能量传递比率, 并且认为这是 PSII 的一种光保护机制^[30]。隐藻类囊体膜虽然没有基粒结构, 但也有一定的垛叠^[3], PSI 和 PSII 的分布也是区域化的, 因此其激发能在两个光系统之间的再分配以及光保护的实现, 可能有赖于藻胆蛋白与膜之间关系的某种动态变化。由于藻胆蛋白在类囊体腔内是密集存在的^[7-8], 因此总有一部分藻胆蛋白不能接触到类囊体膜的内表面。所以实现解除偶联的方式有两种可能: 一是藻胆蛋白为结合状态的, 此时可通过某种结构或构象变化而与受体叶绿素解除偶联^[30-31], 比如一部分与类囊体膜的脱离; 另一种可能是在藻体细胞的天然状态下就以游离状态存在, 此时可能表现为 PSI 或 PSII 附近藻胆蛋白区域化的聚集程度的变化。

由于活体细胞中色素之间的能量传递过程非常复杂, 且实验结论多有不同。因此, 本实验改换思路, 同时制备了充分洗涤但证实仍然结合有藻胆蛋白的类囊体膜为材料, 得到的实验结果说明: (1)蓝隐藻的类囊体膜上始终紧密的结合着一定量的 PC, 这样的类囊体膜样品在以往报道中均没有提及, 这一点充分说明 PC 不应是完全游离于膜腔内的; (2)SDS-PAGE 显示, 深度洗涤过的类囊体膜上结合的主要是 PC645 的 β 亚基, 因此 PC645 有可能借助 β 亚基与膜接触, 这一发现为近年来 PC645 内部能量传递最终发射基团位于 β 亚基而非 α 亚基的观点提供了直接的证据^[22-23, 26], 同时说明 PC 与膜结合时并非完全没有倾向性; (3)PC 既可将激发能传递给 PSII, 但也可传递给 PSI, 说明 PC 与膜上两个光合系统之间都有功能上的关联, 这结果与近年来的活体细胞时间

分辨动力学研究一致^[17, 22]; (4)相较于 Chl a 和 Chl c, PC 在 PSI 长波荧光中的贡献更大, 而 Chl c 吸收的光能, 更倾向于传递给 PSII 或者短波长 Chl a; (5)蓝隐藻细胞中表现出超比例的 PC 荧光发射, 说明 PC 在类囊体腔内应该有一部分是与膜不关联而游离存在的, 处于游离状态下的 PC 吸收的光能主要以发射自身荧光而耗散掉, 没有将激发能全部传递给反应中心。

根据以上各方面的实验结果, 作者提出隐藻藻胆蛋白在叶绿体中可能的存在和能量传递模式: 隐藻叶绿体内可能存在超过光合功能需要的藻胆蛋白, 与其生长的深水中特定的弱光环境相适应; 藻胆蛋白在类囊体腔中与膜的结合状态有可能是动态的, 一部分为膜结合型, 另一部分为游离状态(Morisset 等^[32]曾报道 PC645 可以形成不同的两种晶型), 处于结合状态的藻胆蛋白参与光能向反应中心的传递, 而游离状态的藻胆蛋白对于捕光功能来说可能暂时是冗余的, 而当需要的时候, 游离的藻胆蛋白还可与类囊体膜内表面重新结合或聚集; 藻胆蛋白与膜的结合部位包括 PSI 和 PSII 的定位区, 与 PSII 的接触和能量传递可能通过 LHCII 中的 Chl a/c 蛋白复合物介导, 但能量是直接传递给 Chl a 而不经过 Chl c 的中转, Chl c 和藻胆蛋白向反应中心供能时各自遵循不同的能量传递路径; 而藻胆蛋白在与 PSI 的接触中, 则更多地以某种方式与含有长波 Chl a 的组分相互作用; 藻胆蛋白可借助与膜的结合和脱离的动态方式, 以类似于高等植物的移动天线 LHCII 的原理, 调节激发能在光合系统之间的传递比例, 或者实现对反应中心的光保护。

参考文献:

- [1] Watanabe M, Ikeuchi M. Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex[J]. *Photosynth Res*, 2013, 116(2-3): 265-276.
- [2] Glazer A N, Wedemayer G J. Cryptomonad biliproteins-an evolutionary perspective[J]. *Photosynth Res*, 1995, 46(1-2): 93-105.
- [3] Gantt E, Edwards M R, Provasoli L. Chl oroplast structure of the Cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces[J]. *J Cell Biol*, 1971, 48(2): 280-290.
- [4] Ludwig M, Gibbs S P. Localization of phycoerythrin at the luminal surface of the thylakoid membrane in *Rhodomonas lens*[J]. *J Cell Biol*, 1989, 108(3): 875-884.
- [5] Lichtlé C, McKay R M L, Gibbs S P. Immunogold localization of photosystem I and photosystem II light-harvesting complexes in cryptomonad thylakoids[J]. *Biology of the Cell*, 1992, 74(0): 187-194.
- [6] Ingram K, Hiller R G. Isolation and characterization of a major Chl orophyll a/c₂ light-harvesting protein from a *Chroomonas* species (Cryptophyceae)[J]. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics*, 1983, 722(2): 310-319.
- [7] van der Weij-De Wit C D, Doust A B, van Stokkum I H, et al. How energy funnels from the phycoerythrin antenna complex to photosystem I and photosystem II in cryptophyte *Rhodomonas* CS24 cells[J]. *J Phys Chem B*, 2006, 110(49): 25066-25073.
- [8] Doust A B, Wilk K E, Curmi P M G, et al. The photophysics of cryptophyte light-harvesting[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2006, 184(1-2): 1-17.
- [9] Jeffrey S, Humphrey G. New spectrophotometric equations for determining Chl orophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton[J]. *Biochem Physiol Pflanzen*, 1975, 167: 191-194.
- [10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [11] Green B R, Parson W W. Advances in photosynthesis and respiration Volume13: Light-harvesting antennas in photosynthesis[M]. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2003: 1-28.
- [12] 丘冠英, 彭银祥. 生物物理学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000: 137-138.
- [13] Maccoll R, Williams E C, Eisele L E, et al. Chromophore topography and exciton splitting in phycocyanin 645[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(21): 6418-6423.
- [14] Maccoll R, Eisele L E, Marrone J. Fluorescence polarization studies on four biliproteins and a bilin model for phycoerythrin 545[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1412(3): 230-239.
- [15] van der Weij-De Wit C D, Ihalainen J A, van Grondelle R, et al. Excitation energy transfer in native and unstacked thylakoid membranes studied by low temperature and ultrafast fluorescence spectroscopy[J].

- Photosynth Res, 2007, 93(1-3): 173-182.
- [16] Mimuro M, Tamai N, Murakami A. Multiple pathways of excitation energy flow in the photosynthetic pigment system of a cryptophyte, *Cryptomonas* sp. (CR-1)[J]. Phycological Research, 1998, 46(3): 155-164.
- [17] van der Weij-De W C, Doust A B, van Stokkum I H M, et al. Phycocyanin sensitizes both photosystem I and photosystem II in cryptophyte *Chroomonas* CCMP270 cells[J]. Biophys J, 2008, 94(6): 2423-2433.
- [18] Wientjes E, van Stokkum I H, van Amerongen H, et al. Excitation-energy transfer dynamics of higher plant photosystem I light-harvesting complexes[J]. Biophys J, 2011, 100(5): 1372-1380.
- [19] Kuang T Y, Argyroudi-Akoyunoglou J H, Nakatani H Y, et al. The origin of the long-wavelength fluorescence emission band (77 degrees K) from photosystem I[J]. Arch Biochem Biophys, 1984, 235(2): 618-627.
- [20] Mcconnell M D, Koop R, Vasil'Ev S, et al. Regulation of the distribution of Chl orophyll and phycobilin-absorbed excitation energy in cyanobacteria. A structure-based model for the light state transition[J]. Plant Physiol, 2002, 130(3): 1201-1212.
- [21] Joshua S, Mullineaux C W. Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria[J]. Plant Physiol, 2004, 135(4): 2112-2119.
- [22] Marin A, Doust A B, Scholes G D, et al. Flow of excitation energy in the cryptophyte light-harvesting antenna phycocyanin 645[J]. Biophys J, 2011, 101(4): 1004-1013.
- [23] MacColl R, Williams E C, Eisele L E, et al. Chromophore topography and exciton splitting in phycocyanin 645[J]. Biochemistry, 1994, 33(21): 6418-6423.
- [24] Janssen J, Rhiel E. Evidence of monomeric photosystem I complexes and phosphorylation of Chl orophyll a/c-binding polypeptides in *Chroomonas* sp. strain LT (Cryptophyceae) [J]. Int Microbiol, 2008, 11(3): 171-178.
- [25] Lichtlé C, Duval J C, Lemoine Y. Comparative biochemical, functional and ultrastructural studies of photosystem particles from a Cryptophyceae: *Cryptomonas rufescens*; isolation of an active phycoerythrin particle[J]. Biochim Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics, 1987, 894(1): 76-90.
- [26] Novoderezhkin V I, Doust A B, Curutchet C, et al. Excitation dynamics in phycoerythrin 545: modeling of steady-state spectra and transient absorption with modified redfield theory[J]. Biophys J, 2010, 99(2): 344-352.
- [27] Collini E, Wong C Y, Wilk K E, et al. Coherently wired light-harvesting in photosynthetic marine algae at ambient temperature [J]. Nature, 2010, 463: 644-647.
- [28] Huo P F, Coker D F. Theoretical study of coherent excitation energy transfer in cryptophyte phycocyanin 645 at physiological temperature [J]. J Phys Chem Lett, 2011(5): 825-833.
- [29] Chen M, Li S H, Sun L. A novel phycocyanin-Chl a/c₂-protein complex isolated from Chl oroplasts of *Chroomonas placoides*[J]. Chinese Chemical Letters, 2007, 18: 1374-1378.
- [30] Synder U K, Biggins J. Excitation-energy redistribution in the cryptomonad alga *Cryptomonas ovata* [J]. Biochim Biophys Acta - Bioenergetics, 1987, 892: 48-55.
- [31] Bruce D, Biggins J, Steiner T. Excitation energy transfer in the cryptophytes. Fluorescence excitation spectra and picosecond time-resolved emission spectra of intact algae at 77K [J]. Photochem Photobiol, 1986, 44(4): 425-554.
- [32] Morisset W, Wehrmeyer W, Schirmer T, et al. Crystallization and preliminary x-ray diffraction data of the cryptomonad biliprotein phycocyanin-645 from a *Chroomonas* spec[J]. Archives of Microbiology, 1984, 140(2-3): 202-205.

The dynamic combination model of cryptomonad phycocyanin and thylakoid

XU Wei, LIANG Yuan, CHEN Min, WANG Ning

(Institute of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Sep., 3, 2014

Key words: *Chroomonas placoidea*; phycocyanin; 77 K fluorescence spectrum; energy transfer; dynamic combination model

Abstract: The existential states of cryptomonad phycobiliproteins in thylakoidal lumen have always been controversial. In order to elucidate this question further, the absorption spectra as well as fluorescence spectra (at both room temperature and 77 K) of intact cells and thylakoids of *Chroomonas placoidea* containing phycocyanin (PC) were determined in this paper. The existential states of PC within thylakoid lumen are discussed according to the data from spectral analysis. The results show that a portion of PC tightly combined to the thylakoid membrane at any time (possibly attached with its β subunit), suggesting that the cryptomonad phycobiliproteins are neither fully isolated across the thylakoid lumen, nor completely have no preference in contacting with thylakoid, and PC functionally transfers excited energy to both photosystem (PS) I and PSII, and contributes more to the long-wavelength of fluorescence from PSI compared to Chlorophyll (Chl) a and Chl c, while Chl c prefers to transfer excited energy to PSII or short-wavelength of Chl a. The observation of ultrahigh ratio of fluorescence emitted by PC in intact cells indicates the existence of free PC, which may be redundant for light-harvesting. These freely existed PC may associate with thylakoid and revive their light-harvesting function in due time. Considering the results above and those from previous studies, we raise such a point of view that the combination between cryptomonad phycobiliproteins and thylakoid are dynamic, and a corresponding model is described here.

(本文编辑: 谭雪静)