

一种聚球藻属蓝藻类囊体膜上的 光系统II叶绿素蛋白复合体*

李桐柱 匡廷云

(中国科学院植物研究所, 北京)

提要 当蓝藻的类囊体膜在 SDS/叶绿素的重量比为 10:1、叶绿素的浓度为 0.5 mg/ml 的条件下增溶, 并用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离时, 共出现 7 条叶绿素带, 即 CP1a, CP1b, CP1c, CPI, CPa1, CPa2 和 Fc。CPa1 和 CPa2 的光谱性质相似, 其红区吸收峰位于 670 nm, 在 77K 的荧光发射峰则位于 684—685nm 处, 表明它们都属于光系统 II。分子量为 47kD 的 CPa1 为光系统 II 反应中心复合体, 分子量为 40kD 的 CPa2 为光系统 II 内周天线复合体。

光合作用是绿色植物特有的功能。在光合作用中, 光合膜上的叶绿素蛋白复合体利用光能使水裂解, 产生还原力, 从而还原 CO₂, 并放出氧气。该过程由两个光系统协作完成, 而其中的水裂解过程则与光系统 II 密切相关。在叶绿素蛋白的早期研究中, 工作主要集中在光系统 I 反应中心和光系统 II 的外周天线——捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体方面, 而有关光系统 II 反应中心复合体的研究, 则由于其本身的不稳定性及高等植物类囊体膜上具有占总叶绿素一半以上的捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体的干扰, 使分离工作遇到了很大的困难, 因而直到 1977 年才有人从一种黄绿色的玉米突变体中分离出一种不含叶绿素 b 的光系统 II 成分。因此, 建立适合光系统 II 反应中心特性的分离方法和选择合适的实验材料, 往往成为实验成败的关键。由于蓝藻不含捕光叶绿素 a/b 蛋白, 而作为外周天线的藻胆蛋白又溶于水, 因此在膜的制备过程中, 很容易将其除掉, 这样制备的蓝藻光合膜便排除了捕光色素的干扰, 于是成为研究光系统 II 反应中心复合体的理想材料。本文用我们自己改进的凝胶电泳系统和增溶方法从聚球藻中分离出两种属于光系统 II 的叶绿素 a 蛋白复合体, 并对其光谱特性和功能进行了鉴定与讨论。

一、材料和方法

1. 实验材料

实验所用蓝藻为聚球藻 *Synechococcus leopoliensis* 625 以 Allen 培养基在 33—39℃ 中通气培养。以日光灯为光源, 在光强为 3000lx 的条件下每天照光 10—12 小时, 7—10 天后收集藻体。

2. 光合膜的制备

用离心机在 2000 × g 离心 5—10 分钟沉淀藻体。将收集的藻体悬浮于等体积的

* 张国铮、王淑芝协助光谱测定, 特此志谢。
收稿日期: 1987年6月18日。

50 m mol Tricine-NaOH (pH 8.0) 悬浮液中,用 250CSF-74 型超声波发生器超声破壁处理 15—20 分钟。然后再加入等体积的悬浮液,用 Beckman L5-50B 型超速冰冻离心机在 $60000 \times g$ 离心沉淀 30 分钟。将沉淀重新悬浮,用 $85000 \times g$ 离心 40 分钟。这后一步骤需重复 1—2 次。最后将制备的膜悬浮在同一种悬浮液中,使叶绿素的浓度达到 1mg/ml 以上,并置于液氮中保存备用。

3. 样品增溶和电泳

在过去方法^[1]的基础上又做了改进。

(1) 分离胶组成: 8% 丙烯酰胺, 0.43 mol Tris-HCl (pH 9.35), 0.1% 过硫酸铵, 0.05% (v/v) TEMED。

(2) 浓缩胶组成: 4% 丙烯酰胺, 56 m mol Tris-H₂SO₄ (pH 6.14), 0.1% 过硫酸铵, 0.05% (v/v) TEMED。

(3) 丙烯酰胺组成: 丙烯酰胺与 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的重量比为 30:0.8。

(4) 凝胶制做: 在 1.3×6 cm 的凝胶管中加分离胶 7ml, 浓缩胶 1ml。

(5) 上下槽电极液成分: 上槽的为 0.1% SDS, 41 m mol Tris-硼酸 (pH 8.64), 下槽的为 0.43 mol Tris-HCl (pH 9.35)。

(6) 样品增溶: 在温度为 4°C 中, 光合膜在含有 13% 甘油和 0.5% SDS 的 0.3 mol Tris-HCl (pH 8.8) 溶液中, 按 SDS 同叶绿素的重量比为 10:1 的比例进行增溶, 时间 20—30 分钟。

(7) 电泳: 每管加增溶提取液 0.07—0.1 ml。电泳开始时电流为 7.5mA/支, 待样品全部进胶后加大到 10mA。在温度为 4°C 的条件下, 整个电泳过程约需 1.5—2.5 小时。

(8) 分子量测定: 用 Pharmacia 的低分子量混合标准蛋白定分子量。

4. 光谱测定

见参考文献[2]。

二、结 果

在对蓝藻类囊体膜的增溶中, 当我们将去污剂的浓度由原来的 1mg/ml 降低一倍, 并用改进的 SDS-PAGE 进行分离, 结果出现 7 条含叶绿素的带。按电泳迁移率的增加顺序, 它们依次是 CPIa, CPIb, CPIc, CPI, CPa1, CPa2 和 Fc (图 1); 其所含的叶绿素比例 CPIa-CPI 为 48.6%, CPa1 为 14.7%, CPa2 为 23.6%, Fc 为 13.1%。

1. 增溶条件和环境温度对分离结果的影响

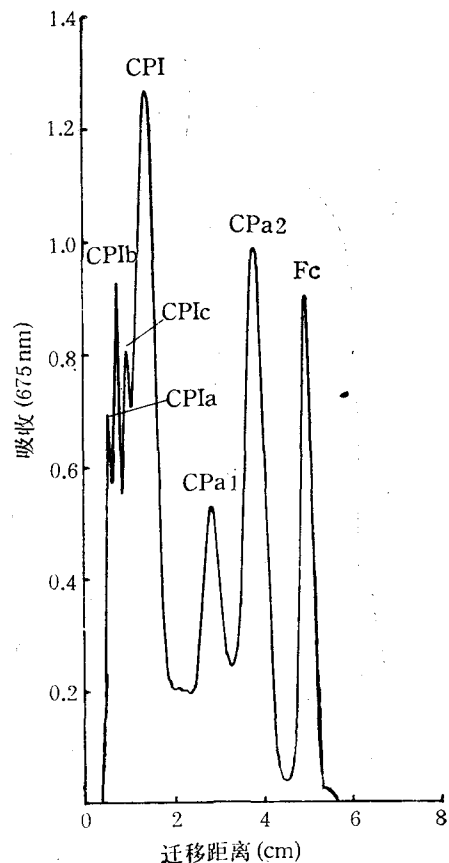


图 1 凝胶中叶绿素带在 675nm 的光密度扫描
Fig. 1 Photodensitometric scans of chlorophyll-containing bands in gel at 675 nm

与高浓度的 SDS 的增溶结果^[2]相比,最主要的差别是本试验在 CPI 带的下面分出了两个清楚的光系统 II 组分,即 CPa1 和 CPa2; 而用高浓度的 SDS 增溶则只能分出一个叶绿素含量仅有 4.2% 的 CPa 带, 游离色素的含量也由原来的 34.6% 下降到 13.1%。这主要是由于 CPa1 和 CPa2 对去污剂 SDS 特别敏感的缘故。在类囊体膜的增溶和电泳过程中,高浓度的 SDS 或环境温度稍高,都会引起 CPa1 和 CPa2 色素蛋白复合体上的叶绿素大量脱落,甚至导致这两条色带的完全消失,进而致使对这两个组分的分离工作归于失败。

2. CPa1 和 CPa2 的光谱特性

CPa1 和 CPa2 在室温下的吸收光谱相似(图 2)。它们在蓝区的吸收峰位于 434—435nm, 而在红区的吸收峰位于 670nm 处,这是由叶绿素的吸收引起的。另外,在 460—500 nm 处的吸收肩表明它们都含类胡萝卜素,这跟高等植物和藻类中 CPa 的吸收光谱相似^[1,3,10]。

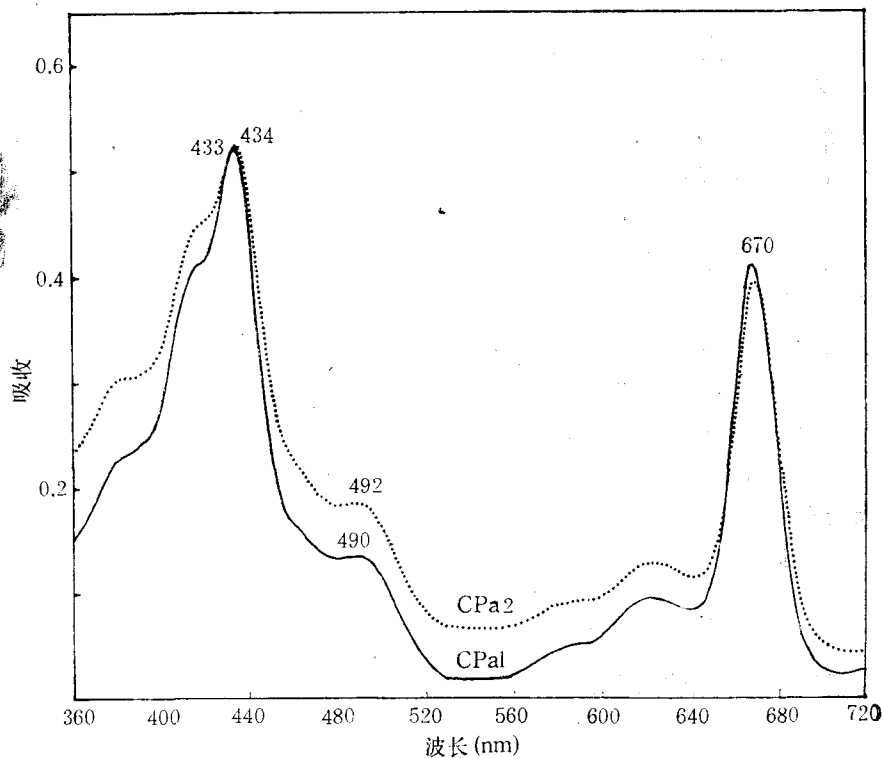


图 2 CPa1 和 CPa2 的吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra of CPa1 and CPa2

低温荧光光谱可以提供各种不同色素性质方面的,以及吸收和荧光分子之间能量传递方面的信息。在低温下,蓝藻类囊体膜在 685nm 和 695 nm 的两个荧光发射带与光系统 II 有关。CPa1 和 CPa2 都有极高的荧光量子产额,在液氮温度下它们的荧光发射光谱极其相似,其发射峰分别位于 685 和 684nm 处(图 3),表明二者都属于光系统 II。

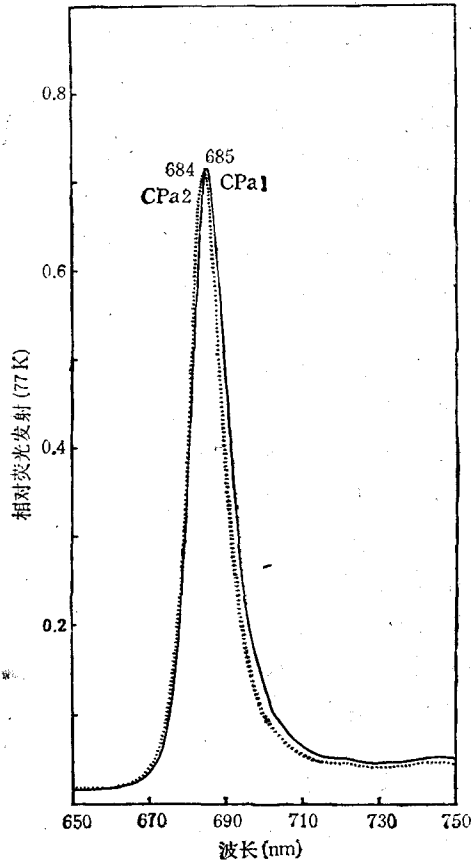


图3 CPa1 和 CPa2 在 77K 的
荧光发射光谱

Fig. 3 Fluorescence emission spectra
of CPa1 and CPa2 at 77 K

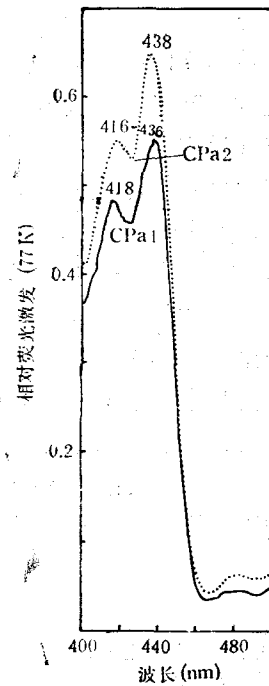


图4 CPa1 和 CPa2 在 77K 的
荧光激发光谱

Fig. 4 Fluorescence excitation spectra
of CPa1 and CPa2 at 77 K

CPa1 和 CPa2 在 77K 的荧光激发光谱也很相似(图 4), 它们在 436—438nm 处均有一个主要的荧光激发峰;此外,在 416—418 nm 处也都有一个稍低的峰。由此可知 CPa1 和 CPa2 在 685nm 处的荧光发射能量主要来自叶绿素 a。另外,在 470—500nm 处的弱峰表明,类胡萝卜素吸收的光量子对增进这两个组分的荧光发射仅有微弱的作用。CPa1 和 CPa2 的上述荧光特性亦跟高等植物和藻类的 CPa 相同^[1-3]。至于它们在光系统 II 中的作用,一般认为分子量为 47kD 的 CPa1 是光系统 II 反应中心复合体,而分子量为 40kD 的 CPa2 是光系统 II 的内周天线复合体^[5,8]。

三、讨 论

1977 年, Hayden 和 Hopkins 第一次鉴定了一种从突变种玉米类囊体膜中分离出的称做复合体 IV 的叶绿素 a 蛋白复合体,并且认为该复合体相当于光系统 II^[7]。在其后的研究中,一般也就把 CPa 看成是光系统 II 反应中心复合体^[2,3]。然而,后来的研究发现,属于光系统 II 的叶绿素 a 蛋白复合体有两种,即现在我们所说的 CPa1 和 CPa2^[6,8]。前面所

分离的复合体 IV 或 CPa 到底是 CPa1 还是 CPa2 弄不清楚。至于这两种复合体之间的关系以及它们在光系统 II 中的作用,有人认为是 CPa1 可能是 CPa2 的寡聚体形式^[11]。直到 1983 年 Camm 和 Green 才用一种新的比较温和的非离子去垢剂——辛基吡喃葡萄糖苷增溶菠菜类囊体膜,并用蔗糖密度梯度离心法从中分离出有活性的 CPa1 和 CPa2; 根据光还原活性的测定结果,推测 CPa1 可能是光系统 II 反应中心复合体, CPa2 可能是其内周天线复合体^[9]。差不多在同时, Nakatani 和 Arntzen 也用同一种去垢剂增溶菠菜类囊体膜,并用 LDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳从中分离出在液氮温度下其荧光发射峰位于 695nm 处的 CPa1 和发射峰位于 685nm 处的 CPa2^[8],从而进一步证实了已为早先所预料的光系统 II 反应中心复合体^[4,9]。

与高等植物不同,在蓝藻中作捕获光能的光系统 II 外周天线不是捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体,而是藻胆蛋白,但在蓝藻中却存在着相当于高等植物光系统 II 反应中心复合体的 CPa1 和内周天线的 CPa2。它们的光谱特性相同,分子量也相近。因此在蓝藻的光系统 II 中光能的传递方向应当是藻胆蛋白 → PS-II 内周天线复合体 CPa2 → PS-II 反应中心复合体 CPa1,并在反应中心完成其光能转化。

本试验对分离蓝藻光系统 II 组分的增溶条件和分离方法进行了探索,使所分出的光系统 II 组分的比例大大超过前人,并对其光谱特性做了较全面的鉴定。但其中的 CPa1 在液氮温度下并不发出 695nm 的荧光,这可能是作用强烈的 SDS 改变了 CPa1 复合体上叶绿素的原有状态的结果。因此改用更温和的去垢剂是势在必行的。

参 考 文 献

- [1] 李桐柱,郝迺斌,姜世庆等,1980. 叶绿体膜的结构与功能 IV. 小麦叶绿体囊状体膜的叶绿素蛋白复合体. 植物学报 22:390—394.
- [2] 李桐柱,孙谷畴,郝迺斌等,1982. 从蓝藻 *Anabaena cylindrica* 囊状体膜分离的叶绿素蛋白复合体. 植物生理学报 8(3):205—221.
- [3] Anderson, J. M., 1978. Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. Spectral characterization of six complexes resolved by an improved electrophoretic procedure. *FEBS Letters* 92: 227—233.
- [4] Butler, W. L., 1979. Tripartite and bipartite models of the photochemical apparatus of photosynthesis. In CIBA Foundation Symp. 61, Chlorophyll Organization and Energy Transfer in Photosynthesis. J. & A. CHURCHILL Ltd, pp. 237—252.
- [5] Delepelaire, P. and Nam-Hai Chua, 1979. Lithium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4°C: Characterizations of two additional chlorophyll a-protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(1): 111—115.
- [6] Green, B. R. and E. L. Camm, 1984. Evidence that CP47 (CPa1) is the reaction center of photosystem II. In *Advances in Photosynthesis Research* Vol. II. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, pp. 95—98.
- [7] Hayden, D. B. and W. G. Hopkins., 1977. A second distinct chlorophyll-protein complex in maize mesophyll chloroplasts. *Can. J. Bot.* 55: 2525—2529.
- [8] Nakatani, H. Y., C. J. Arntzen and Y. Inoue, 1984. Characterization of the photosystem II reaction center polypeptide (CP47). In *Advances in Photosynthesis Research* Vol. II. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, pp. 99—102.
- [9] Rijgersberg, C. P., A. Melis, J. Amesz and J. A. Swager, 1979. Quenching of chlorophyll fluorescence and photochemical activity of chloroplasts at low temperature. In CIBA Foundation Symp. 61, Chlorophyll Organization and Energy Transfer in Photosynthesis. J. & A. CHURCHILL Ltd, pp. 305—318.
- [10] Reinman, S. and J. P. Thornber, 1979. The electrophoretic isolation and partial characterization of three chlorophyll-protein complexes from blue-green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 547: 188—197.
- [11] Stewart, A. C., 1980. The chlorophyll-protein complexes of a thermophilic blue-green algae. *FEBS Letters* 114: 67—72.

**PHOTOSYSTEM II CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEXES
OF THYLAKOID MEMBRANES FROM BLUE-GREEN
ALGA, *SYNECHOCOCCUS LEOPOLIENSIS* 625**

Li Tongzhu and Kuang Tingyun

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing*)

ABSTRACT

Seven chlorophyll-containing zones resolved from *Synechococcus leopoliensis* 625 thylakoid membranes were solubilized by SDS in a final SDS/Chl weight ratio 10:1 and Chl concentration at 0.5 mg/ml, and subjected to SDS-PAGE. The zones in order of increasing mobility were designated as CPIa, CPIb, CPIc, CPI, CPa1, CPa2 and Fe.

The spectral properties of CPa1 and CPa2 were very similar. They had the same absorption maxima in the red region at 670 nm. At 77 K the fluorescence emission spectra of CPa1 and CPa2 were also very similar, both having maxima at 684—685 nm, indicating they belonged to photosystem II. CPa1 with M. W. of 47 kD is reaction center complex of photosystem II and CPa2 with M. W. of 40 kD is internal antenna complexes of photosystem II.