

假根羽藻 Cyt  $b_6f$  蛋白复合体的分离与纯化\*李宾兴<sup>1</sup> 毛大璋<sup>1</sup> 高振洋<sup>2</sup> 李良璧<sup>1①</sup> 匡廷云<sup>1①</sup>

(1. 中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室 北京 100093;

2. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071)

**提要** 改进了以往分离纯化 Cyt  $b_6f$  的方法,进行了海洋绿藻——假根羽藻 (*Bryopsis corticulans*) Cyt  $b_6f$  蛋白复合体分离纯的研究。结果表明,该 Cyt  $b_6f$  制剂由 Cyt  $f$ 、Cyt  $b_6$ 、Rieske [Fe-s] 蛋白和亚基 IV 四种主要的多肽亚基以及少量的 Chl.  $a$  和类胡萝卜素组成。4 个多肽亚基的表观分子量分别为 34.8、24.0、18.7 及 16.7 kD, 该 Cyt  $b_6f$  制剂的 Cyt  $b_6/f$  比值接近 2.0, 其纯度值为 9.9 nmol Cyt  $f$ /mg, 其催化电子传递的活性 ( $C_{10}$ -PQH<sub>2</sub>→PC) 为 73 e/s。上述分析表明,假根羽藻 Cyt  $b_6f$  在组成、纯度和催化活性方面均与已报道的高等植物、淡水绿藻和光合细菌的 Cyt  $b_6f$  制剂相似。

**关键词** 海洋绿藻,假根羽藻,Cyt  $b_6f$ ,分离,纯化

**中图分类号** Q5

细胞色素  $b_6/f$  蛋白复合体 (Cyt  $b_6f$ ) 作为质体醌-质体蓝素氧化还原酶,在光合作用的电子传递及能量转化过程中扮演着重要的角色。它一方面介导光系统 II (PSII) 和光系统 I (PSI) 之间的线性电子传递和围绕 PSI 的循环电子传递,另一方面利用电子传递过程中释放出来的自由能将质子从类囊体膜的外侧跨膜传递到类囊体膜的内侧,形成跨膜的质子电化学梯度,为 ATP 的合成提供能量 (Cramer *et al.*, 1987; Hope, 1993)。此外,它还可以通过调控 LHCII 激酶的磷酸化,在调节 PSII 和 PSI 之间激发能分配中起作用 (Anderson, 1992)。

每个 Cyt  $b_6f$  单体分子由 4 个大亚基 (33/34—17 kD): 含有一个 c-型血红素的 Cyt  $f$ , 含有两个 b-型血红素的 Cyt  $b_6$ , Rieske [Fe-s] 蛋白 (含有一个 2Fe-2S 原子簇) 与亚基 IV 和 4 个小于 5 kD 的小亚基组成。四个大亚基中,前三个亚基的色基均为氧化还原中心,而亚基 IV 则被视为 PQ 的结合蛋白 (Li *et al.*, 1991)。另外,它还含有约 1 分子的

叶绿素  $a$  和 1 分子或低于 1 分子的类胡萝卜素。

自 Hurt 等 (1981) 首次分离纯化出有活性的 Cyt  $b_6f$  以来,人们已从许多不同来源的植物中分离纯化出了 Cyt  $b_6f$  制剂,例如,高等植物中的菠菜和豌豆 (Huang *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1983), 淡水绿藻中的莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 和斜生栅列藻 (*Scenedesmus obliquus*) (Wynn *et al.*, 1988), 以及蓝细菌中的钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*)、项圈藻 (*Anabaena variabilis*) 和集胞藻 (*Synechocystis* PCC6803) (Hauska, 2003)<sup>1)</sup>。迄今为止,尚未见到有关海洋绿藻 Cyt  $b_6f$  的报道。假根羽藻 (*Bryopsis corticula*) 是管藻目的多核单细胞海生绿藻,它生长在潮间带,细胞壁较薄,含有较多藻胶,在我国东南沿海分布较广,是一种分离、纯化类囊体膜蛋白复合体的比较理想的实验材料。因此,本研究中作者改进了以往分离纯化 Cyt  $b_6f$  的方法 (Yan *et al.*, 2001), 成功地从假根羽藻中分离纯化出了其类囊体膜的 Cyt  $b_6f$  提取物,并对该提取物的组成和生物活性进行了鉴定。

\* 国家自然科学基金资助项目,39890390 号和 30370347 号。李宾兴,博士研究生,E-mail: lbixing@yahoo.com

① 通讯作者,E-mail: lbli@ns.ibcas.ac.cn, kuangty@public.bta.net.cn

1) Hauska G, 2003. The isolation of functional cytochrome  $b_6f$  complex; from lucky encounter to rewarding experiences.

From: [www.biologie.uni-regensburg.de/Botanik/Hauska/b6fgov.pdf](http://www.biologie.uni-regensburg.de/Botanik/Hauska/b6fgov.pdf)

收稿日期:2004-08-16,收修改稿日期:2006-06-04

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

假根羽藻于2001年9月采自青岛汇泉湾。分离纯化 Cyt  $b_6f$  使用的 $\beta$ -辛基葡萄糖苷( $\beta$ -OG)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、胆酸钠(SC)、癸基质体醌( $C_{10}$ -PQ<sub>2</sub>)等购自Sigma公司(USA)。

### 1.2 多肽组成分析

参照 Laemmili (1970) 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法进行。分离胶浓度为15%,浓缩胶浓度为4%。考马斯亮蓝G-250染色。电泳于室温条件下进行。

### 1.3 氧化还原差光谱的测定

Cyt  $b_6f$  的氧化还原差光谱分析,采用岛津UV-2550型双光束分光光度计测定。测定时用铁氰化钾[ $K_3Fe(CN)_6$ ]使 Cyt  $b_6f$  氧化,用抗坏血酸使 Cyt  $f$  还原,用连二亚硫酸钠使 Cyt  $b_6$  还原。样品中 Cyt  $f$  和 Cyt  $b_6$  的浓度通过测定其氧化还原差光谱确定,计算时 Cyt  $f$  和 Cyt  $b_6$  的消光系数分别采用  $18\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}_{(554-540\text{nm})}$  和  $20\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}_{(563-575\text{nm})}$  (Hurt *et al.*, 1981)。

### 1.4 质体蓝素的制备

质体蓝素(PC)按 Ellefson 等(1980)的方法从新鲜的菠菜叶中制备,菠菜购自香山市场。

### 1.5 电子传递活性的测定

Cyt  $b_6f$  催化电子传递活性的测定参照 Rich 等(1987)的方法进行。本实验中所测 Cyt  $b_6f$  的酶活性是指它催化电子供体  $C_{10}$ -PQH<sub>2</sub> 至电子受体  $PC-K_3Fe(CN)_6$  的电子传递速率。PC 和  $K_3Fe(CN)_6$  的消光系数分别为  $4.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}_{(595\text{nm})}$  和  $1.0\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}_{(420\text{nm})}$ 。

电子供体还原态癸基质体醌( $C_{10}$ -PQH<sub>2</sub>)的制备:在  $C_{10}$ -PQ<sub>2</sub> 乙醇溶液中加入少量硼氢化钾( $KBH_4$ ),然后用添加少量 HCl 使  $KBH_4$  降解并放氢的方法使  $C_{10}$ -PQ<sub>2</sub> 还原为  $C_{10}$ -PQH<sub>2</sub>。

电子受体溶液:由 50mmol/L Mes (pH 6.2), 2mmol/L EDTA, 5 $\mu\text{mol/L}$  PC 和 1mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  组成。

活性的测定:添加  $C_{10}$ -PQH<sub>2</sub> 到电子受体溶液中使其浓度达到 20 $\mu\text{mol/L}$ ,测定反应速度 1,添加 Cyt  $b_6f$  到电子受体-电子供体溶液使其浓度达到 20nmol/L,然后测反应速率 2。反应速率 2 减速率 1 即得 Cyt  $b_6f$  催化电子传递的速率。电子传递活性以  $K_3Fe(CN)_6$  在 420nm 处吸收的变化

来计算。

### 1.6 总蛋白测定

按 Lowry 等(1951)方法进行。

### 1.7 Cyt $b_6f$ 制剂中色素的反相 HPLC 分析及其吸收光谱的测定

Cyt  $b_6f$  中色素的抽提:将 Cyt  $b_6f$  样品置于 80% 的丙酮中超声波处理 2min,离心收集上清液,将沉淀再用上述方法抽提一次,合并上清液即为色素的完整抽提液。

反相 HPLC:色素的反相 HPLC 分析用 Discovery C-18 柱(Supwleco., 25 × 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ) 在 Waters 600HPLC 仪上进行。上样前用甲醇将柱子预平衡 10min,上样后,线性梯度洗脱 1min 到甲醇:正己烷 = 4:1(预混合好),然后用甲醇:正己烷 = 4:1(预混合好)洗脱 16min。上样 20 $\mu\text{l}$ ,洗脱速度 1ml/min,洗脱出的色素成分用 Water 996 光电二级管阵列检测器在 440nm 处进行检测。

洗脱出的色素成分的吸收光谱测定:在 Water 996 光电二级管阵列检测器连续检测的条件下,洗脱出的色素成分的吸收光谱用仪器的管理系统 Millennium 2010 在洗脱峰处给出。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cyt $b_6f$ 的分离纯化

预实验结果表明,按照从菠菜类囊体膜中分离纯化 Cyt  $b_6f$  的方法(Yan *et al.*, 2001)不能有效地从假根羽藻的类囊体膜中纯化出该蛋白复合物。绝大部分的 Cyt  $b_6f$  已于最后一步硫酸铵沉淀析出,最终仅得到极少量的 Cyt  $b_6f$  制剂,且其纯度很低。为此,作者调整了 Cyt  $b_6f$  的粗制品透析后硫酸铵沉淀的饱和度,将透析后 38%—45% 饱和度的硫酸铵沉淀物确定为需要收集的 Cyt  $b_6f$  组分。调整后的分离纯化步骤得到了大量的 Cyt  $b_6f$  制剂,但 SDS-PAGE 分析显示,除 4 种主要的多肽外,还含有微量的 40—60kD 的杂蛋白。为更好的去除杂蛋白,参照 Huang 等(1994)及 Hurt 等(1981)的方法,在原流程的基础上,增加一次用 2mol/L NaBr 的洗膜过程,收到了理想的效果(图 1)。用此改进的方法,获得了高纯度、高活性的假根羽藻 Cyt  $b_6f$ ,且有很好的重复性。具体的分离纯化流程如图 2 所示,整个分离纯化过程均在弱光 4 $^{\circ}\text{C}$  下完成。分离纯化过程中的具体数据见表 1。

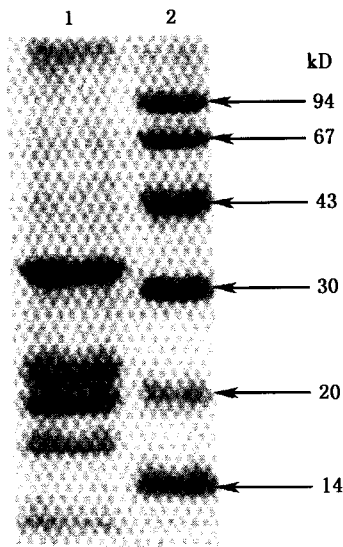


图1 假根羽藻 Cyt  $b_6f$  制剂 15% SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 15% SDS-PAGE of preparation for Cyt  $b_6f$  from *Bryopsis corticulans*

1. 纯化的假根羽藻 Cyt  $b_6f$  蛋白复合体; 2. 标准蛋白

通常用样品中 Cyt  $f$  的含量与蛋白含量的比值来估算 Cyt  $b_6f$  的纯度。Cyt  $b_6f$  单体的分子量约为 100—104kD, 因此, 当其纯度为 100% 时, 样品中 Cyt  $f$  的含量为 9.6—10nmol Cyt  $f$ /mg。表 1 结果表明, 38%—45% 的硫酸沉淀后, Cyt  $f$  的含量为 9.9nmol Cyt  $f$ /mg, 说明用此改进方法获得的 Cyt  $b_6f$  的纯度已很高。Cyt  $b_6f$  制剂的产率为 19.50% (表 1)。

## 2.2 Cyt $b_6f$ 的特征分析

**2.2.1 Cyt  $b_6f$  制剂的多肽组成分析** 图 1 为纯化的假根羽藻 Cyt  $b_6f$  样品的 SDS-PAGE 图谱。从中可以看出, 按照迁移率增大的顺序依次是 Cyt  $f$ 、Cyt  $b_6$ 、Rieske-FeS 蛋白及亚基 IV, 表观分子量分别为 34.8kD、24.0kD、18.7kD 及 16.7kD。从电泳图谱 (图 1) 还可以看出, 该假根羽藻 Cyt  $b_6f$  具有较高的纯度。由于在每个 Cyt  $b_6f$  蛋白复合体的  $b_6$  亚基上结合有两个 b-型的血红素 (Heme  $b_{6H}$  和 Heme  $b_{6L}$ ),  $f$  亚基上结合有一个 c-型

表 1 Cyt  $b_6f$  的纯度及产率在纯化过程中的变化

Tab. 1 Variation in purity and yield of Cyt  $b_6f$  during purification

Cyt $b_6f$ 的制备	Cyt $f$ (nmol)	Cyt $b_6$ (nmol)	Cyt $b_6$ /Cyt $f$	蛋白质 (mg)	Cyt $f$ /蛋白质 (mg)	相关产率 (%)
30000g 离心后	171.00	434.70	2.54	79.23	2.16	100.00
40000g 离心后	102.13	253.65	2.48	12.76	8.00	59.70
38%—45% 硫酸沉淀	33.32	67.60	2.02	3.37	9.90	19.50

的血红素 (Heme  $f$ ), 因此, 一个完整的 Cyt  $b_6f$  中 Cyt  $b_6$  与 Cyt  $f$  的比值应为 2:1, 此比值也常被用来鉴定 Cyt  $b_6f$  制剂的完整性。图 3 为 Cyt  $b_6f$  的氧化还原差光谱, 从中可以看出, 源于 Cyt  $b_6$  的 564nm 处的最大吸收峰与源于的 Cyt  $f$  的 554nm 处的最大吸收峰之比等于 2.02, 表明在分离纯化的过程中 Cyt  $b_6$  或 Cyt  $f$  均没有丢失。

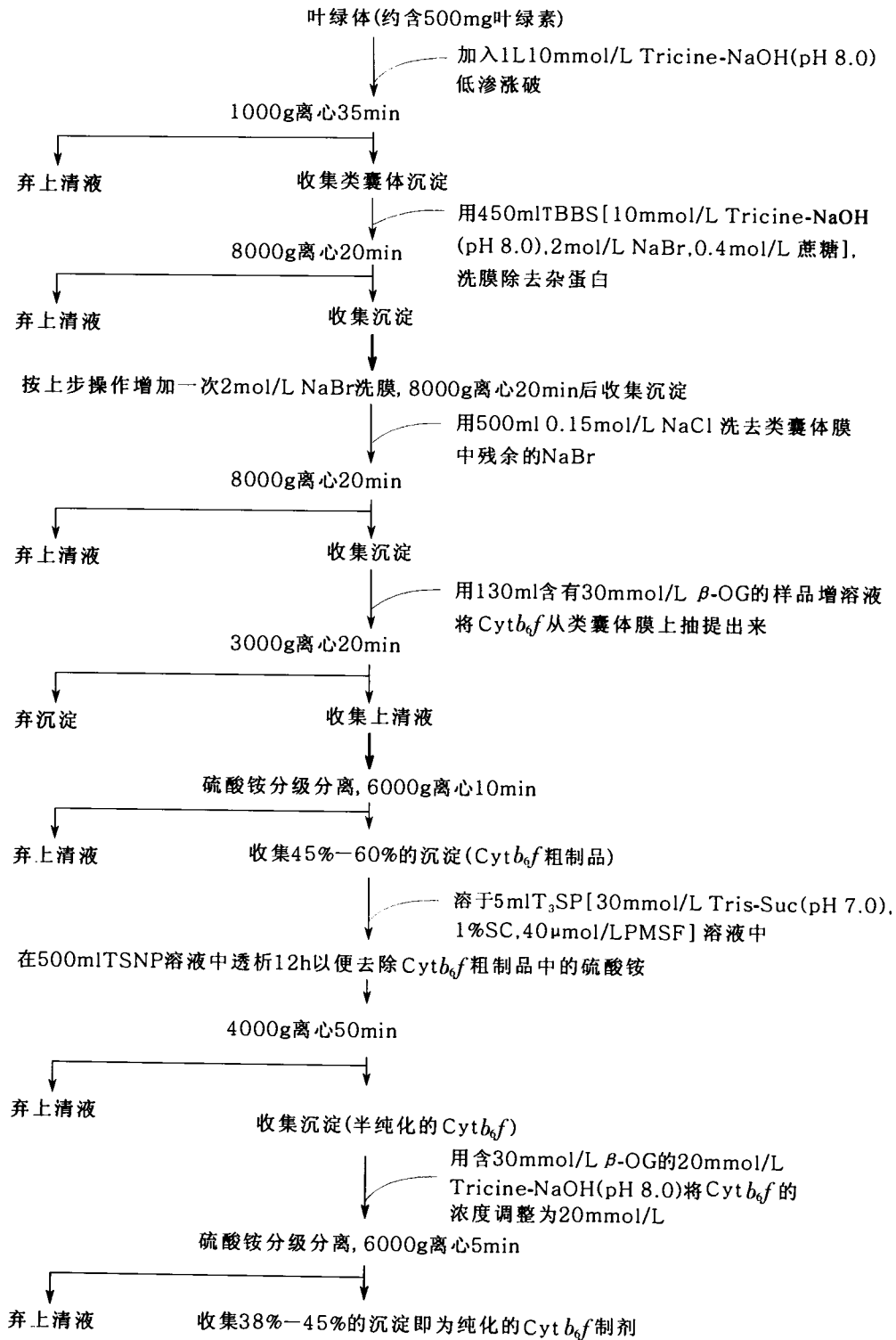
**2.2.2 Cyt  $b_6f$  制剂的色素组成** 图 4 是用 80% 丙酮从假根羽藻 Cyt  $b_6f$  制剂中抽提出的色素的反相 HPLC 图谱, 从中可以看出, 在此图谱上有 3 个主要的洗脱峰 (分别在 9.54min, 14.07min 和 14.38min)。其中 9.54min 洗脱出来的色素的吸收峰峰位在 431.6nm 和 664.4nm (叶绿素  $a$  的特征峰), 所以此色素为叶绿素  $a$ 。其前的两个小洗脱峰也是叶绿素  $a$  (吸收图谱未示出)。在 14.07min 洗脱出的色素吸收峰的峰位分别为

443.2nm 和 471.4nm; 14.38min 洗脱出的色素分子, 除在 438.4nm 和 465.6nm 有两个主要的吸收峰外, 还在 330.2nm 处有一个较弱的吸收峰。从吸收峰的形状可以判断, 在 14.07min 和 14.38min 洗脱出的色素应为类胡萝卜素分子。

**2.2.3 催化电子传递的活性** 以  $C_{10}$ -PQH<sub>2</sub> 为电子供体, 菠菜的 PC 为电子受体, 参照 Rich 等 (1986) 及 Pierre 等 (1995) 的方法, 用光谱法对 Cyt  $b_6f$  催化电子传递的活性进行了测定。结果表明 (图 5), 1 分子的 Cyt  $b_6f$  每秒可以催化 73 个电子发生转移 (73e/s)。

## 3 讨论

本研究结果表明, 用于从菠菜类囊体膜中分离纯化 Cyt  $b_6f$  的方法不适合假根羽藻 Cyt  $b_6f$  的提取, 这可能与假根羽藻中藻胶含量较高、膜表面的其他蛋白组分较复杂有关。据此, 作者对菠

图2 假根羽藻 Cyt  $b_6f$  蛋白复合体分离纯化流程示意图Fig. 2 Purification procedures of *Bryopsis corticulans* Cyt  $b_6f$  complex

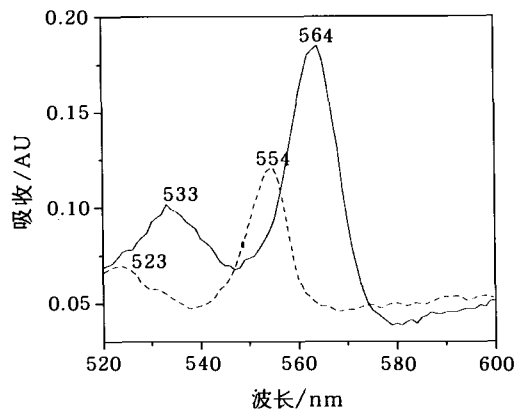
图3 Cyt  $b_6f$  制剂的氧化还原差光谱

Fig. 3 The redox difference in spectra of Cyt  $b_6f$  preparation  
——为连二亚硫酸钠还原-抗坏血酸还原的差异吸收光谱;  
----为抗坏血酸还原-铁氰化钾氧化的差异吸收光谱

菜 Cyt  $b_6f$  分离纯化流程中硫酸铵沉淀的饱和度进行了调整,为去除 40—60kD 的杂蛋白,在原流程的基础上,增加了一次用 2mol/L NaBr 的洗膜过程。结果表明,这种改进取得了较好的效果(图 1),所得 Cyt  $b_6f$  制剂的纯度达到了 9.9nmol Cyt  $f$ /mg,其纯度接近 100%。然而用改进后的流程纯化假根羽藻 Cyt  $b_6f$  时,Cyt  $b_6f$  的产率却仅有 19.5%,与已报道的 Cyt  $b_6f$  产率相比,下降了 1.5—2 倍(Pierre *et al*, 1995; Doyle *et al*, 1985),这可能是由于对分离纯化流程中硫酸铵沉淀饱和度的调整或进一步 NaBr 洗膜去除杂蛋白造成的。

本 Cyt  $b_6f$  制剂的 4 个大亚基的表观分子量由大到小依次为 34.8kD、24kD、18.7kD 及 16.7kD。相近条件下的电泳结果表明,C. *reinha-*

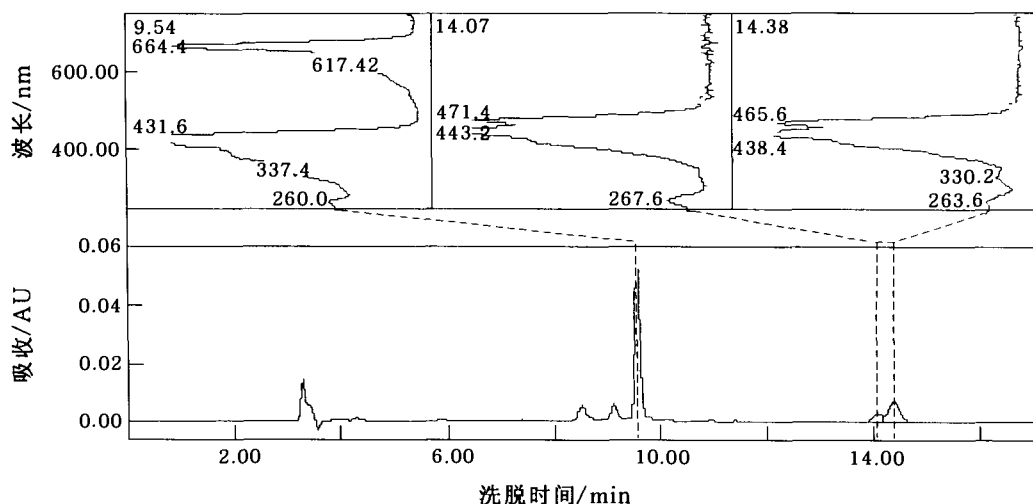
图4 假根羽藻 Cyt  $b_6f$  制剂中色素的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatogram of pigments extracted from *Bryopsis corticulans* Cyt  $b_6f$  preparation

*rdtii* 及 *S. obliquus* Cyt  $b_6f$  制剂的 4 个亚基的表观分子量分别为 35kD、23kD、19kD、16kD 及 35kD、23kD、20kD、16kD (Black *et al*, 1987); 菠菜的表观分子量为 33kD、23kD、20kD、17kD (Huang *et al*, 1994); *M. laminosus* 的表观分子量为 33kD、24kD、21kD、18kD; *Synechosystis* PCC6803 的表观分子量为 38kD、24kD、19kD、15kD (Roegner *et al*, 1990)。由此可以看出,假根羽藻 Cyt  $b_6f$  的表观分子量与 *C. reinhardtii* 和 *S. obliquus* 的表观分子量更为接近。在早期的研究中,Cyt  $b_6f$  中的色素分子被认为是污染,近来的研究表明,它们为 Cyt

$b_6f$  的天然成分,每分子纯化的 Cyt  $b_6f$  制剂中含有约 1—1.5 分子的叶绿素 *a* 和 1 分子或低于 1 分子的  $\beta$ -胡萝卜素 (Pierre *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1999; Yan *et al*, 2001), Cyt  $b_6f$  的晶体结构研究表明,每个 Cyt  $b_6f$  单体分子中含有 1 分子的叶绿素 *a* 和 1 分子的  $\beta$ -胡萝卜素 (Kurisu *et al*, 2003; Stroebel *et al*, 2003)。反相 HPLC 分析表明,假根羽藻 Cyt  $b_6f$  制剂中同样含有叶绿素 *a* 及类胡萝卜素分子。在目前已纯化出的 Cyt  $b_6f$  制剂中,除蓝细菌 *Synechosystis* PCC6803 的 Cyt  $b_6f$  含有的类胡萝卜素为  $\beta$ -胡萝卜素-4 酮外 (Boronowsky *et al*,

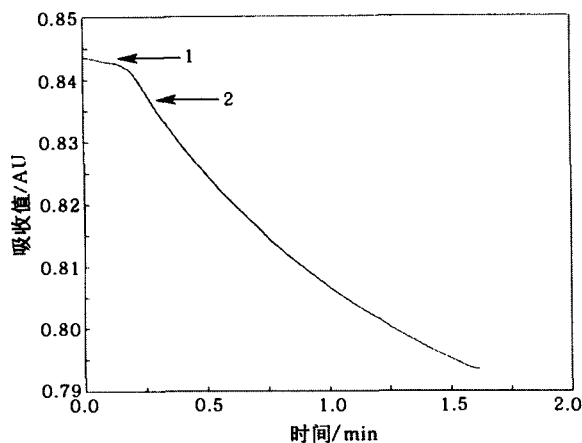


图5 Cyt  $b_6f$ 的电子传递活性

Fig. 5 Electron transfer activity of Cyt  $b_6f$  preparation

1. PC + C<sub>10</sub>PQH<sub>2</sub> + K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>;

2. PC + C<sub>10</sub>PQH<sub>2</sub> + K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> + Cyt  $b_6f$

2001),其它 Cyt  $b_6f$ 中的类胡萝卜素均为  $\beta$ -胡萝卜素(Zhang *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2001),并且它们多具有 9-cis 的构型(Yan *et al.*, 2001)。 $\beta$ -胡萝卜素-4 酮的吸收峰位于 458nm, 9-cis- $\beta$ -胡萝卜素的主要吸收峰位于 444nm 和 471nm, 与本制剂中 14.07min 和 14.38min 洗脱出的类胡萝卜素的吸收峰峰位(443.2, 471.4nm; 438.4, 465.6nm)有较大的差别。由此可见,假根羽藻 Cyt  $b_6f$ 中的类胡萝卜素可能是另一种类的类胡萝卜素分子。对比分析结果表明,提取的类胡萝卜素的吸收谱与报道的  $\alpha$ -胡萝卜素的吸收谱较为接近。

本文中纯化的 Cyt  $b_6f$ 催化电子传递的活性为 73e/s(图5),该速率比 Wynn 等(1988)报道的淡水绿藻 Cyt  $b_6f$ 的活性高出 2—10 倍,和 Huang 等(1994)、Black 等(1987)及作者测定的菠菜 Cyt  $b_6f$ 的活性相近。这说明作者纯化的假根羽藻叶绿体 Cyt  $b_6f$ 不仅具有高的纯度,而且还具有较高的活性,是进行 Cyt  $b_6f$ 结构与功能研究的理想样品。

**致谢** 中国科学院海洋研究所王广策研究员在材料采集工作中给予热情帮助,谨致谢忱。

### 参 考 文 献

Anderson J M, 1992. Cytochrome  $b_6f$  complex: Dynamic molecular organization function and acclimation. *Photosynth Res*, 34:341—357  
Black M T, Widger W R, Cramer W A, 1987. Large-scale pur-

ification of active cytochrome  $b_6f$  complex from spinach chloroplasts. *Arch Biochem. Biophys*, 252:655—661

Boronowsky U, Wenk S O, Schneider D *et al.*, 2001. Isolation of membrane protein subunits in their native state: evidence for selective binding of chlorophyll and carotenoid to the  $b_6$  subunit of the cytochrome  $b_6f$  complex. *Biochim Biophys Acta*, 1506:55—66

Cramer W A, Black M T, Widger W R *et al.*, 1987. Structure and function of photosynthetic cytochrome  $b-c_1$  and  $b_6f$  complex. In: Barber J ed. *The light reactions*. Amsterdam: Elsevier science publishers, 447—493

Doyle M F, Yu C A, 1985. Preparation and reconstitution of a phospholipids deficient cytochrome  $b_6f$  complex from spinach chloroplasts. *BBRC*, 131:700—706

Ellefson W L, Ulrich E A, Krogmann D W, 1980. Plastocyanin. *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, INC. 69:223—228

Hope A B, 1993. The chloroplast cytochrome  $b_6f$  complex: A critical focus on function. *Biochim Biophys Acta*, 1143: 1—22

Huang D, Everly R M, Cheng R H *et al.*, 1994. Characterization of the chloroplast cytochrome  $b_6f$  complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry*, 33:4401—4409

Hurt E, Hauska G, 1981. A cytochrome  $f/b_6$  complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from *Spinach* chloroplasts. *Eur J Biochem*, 117:591—599

Kurusu G, Zhang H M, Smith J L *et al.*, 2003. Structure of the Cytochrome  $b_6f$  complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*, 302:1009—1014

Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680—685

Li L B, Zou Y P, Yu L *et al.*, 1991. The catalytic rule of subunit IV of the cytochrome  $b_6f$  complex from spinach chloroplast. *Biochim Biophys Acta*, 1057:215—222

Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.*, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265—275

Pierre Y, Breyton C, Cramer D *et al.*, 1995. Purification and Characterization of the Cytochrome  $b_6f$  complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 270:29342—29349

Phillips A L, Gray J, 1983. Isolation and characterization of a cytochrome  $b-f$  complex from pea chloroplasts. *Eur J Biochem*, 137:553—560

Rich P R, Heathcote P, Moss D A, 1987. Kinetic studies of electron transfer in a hybrid system constructed from the

- cytochrome  $b_6f$  complex and photosystem I. *Biochim. Biophys Acta*, 892:138—151
- Pierre Y, Breyton C, Lemoine Y *et al*, 1997. On the presence and role of a molecule of chlorophyll *a* in the cytochrome  $b_6f$ . *J Biol Chem*, 272:21901—21908
- Roegner M, Nixon P J, Diner B A, 1990. Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem*, 265:6189—6196
- Stroebel D, Choquet Y, Popot J L *et al*, 2003. An atypical haem in the cytochrome  $b_6f$  complex. *Nature*, 426:413—418
- Wynn R M, Bertsch J, Bruce B D *et al*, 1988. Green algal cytochrome  $b_6f$  complexes: isolation and characterization from *Dunaliella salina*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*. *Biochim Biophys Acta*, 935:115—122
- Yan J-SH, Liu Y-L, Mao D-ZH *et al*, 2001. The presence of 9-cis- $\beta$ -carotene in cytochrome  $b_6f$  complex from spinach. *Biochim Biophys Acta*, 1506:182—188
- Zhang H M, Huang D R, Cramer W A, 1999. Stoichiometrically bound  $\beta$ -carotene in the cytochrome  $b_6f$  complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. *J Biol Chem*, 274:1581—1587

## ISOLATION AND PURIFICATION OF CYT $b_6f$ COMPLEX FROM *BRYOPSIS CORTICULANS*

LI Bin-Xing<sup>1</sup>, MAO Da-Zhang<sup>1</sup>, GAO Zhen-Pan<sup>2</sup>, LI Liang-Bi<sup>1</sup>①, KUANG Ting-Yun<sup>1</sup>①

(1. Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093;

2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology,

Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** As a plastoquinol-plastocyanin oxidoreductase, cytochrome  $b_6f$  complex plays an important role in electron transfer and energy transduction in photosynthesis. It mediates the linear electron flow between PSII and PSI, catalyzes the cyclic electron flow around PSI, and sets up a transmembrane proton electrochemical potential to support energy to form ATP. In addition, cytochrome  $b_6f$  complex is also involved in the regulation of balanced light excitation energy distribution between photosystems since its redox states governs the activation of LHClI kinase. It consists of four major subunits (Cyt *f*, Cyt *b*, Rieske iron-sulfur protein, and subunit IV) and four small subunits (pet G, L, M, and N). Besides, about one chlorophyll *a* molecule and one or less than one carotenoid molecule have been found in each cytochrome  $b_6f$  monomer. The cytochrome  $b_6f$  complex has been purified from higher plants, freshwater green algae and cyanobacteria. However, no case has been reported of this complex from marine green alga. In this work, the cytochrome  $b_6f$  complex was purified from a marine green alga—*Bryopsis corticulans* successfully by an improved method, its composition and activity were studied in this paper.

According to the purification of spinach  $b_6f$  complex, Cyt  $b_6f$  was not isolated from *Bryopsis corticulans* thylakoid. It was shown that most of the  $b_6f$  complex has gone before last ammonium sulfate fractionations. To solve this problem, ammonium sulfate concentration was adjusted. Although this modification was proved to be useful, some 40—60kD extrinsic proteins still existed. To effectively remove these extrinsic proteins, 2mol/L NaBr membrane washing was repeated after that the extrinsic proteins were removed successfully shown by SDS-PAGE. This modified purification procedures for *Bryopsis corticulans*  $b_6f$  complex are: Chloroplasts were isolated from 2kg pre-chilled fresh *Bryopsis corticulans* as regular way. After osmotically broken, the chloroplasts were resuspended in 2mol/L NaBr, 10mmol/L Tricine-NaOH (pH 8.0), 0.4mol sucrose and the concentration of chloroplasts was diluted to 1mg/ml, then centrifuged at 8000g for 20min. This step (2mol/L

NaBr membrane washing) was repeated. Cytochrome  $b_6f$  extraction was carried out as regular way. The crude  $b_6f$  complex then precipitated by raising ammonium sulfate concentration from 45%—60% and was resuspended in 30mmol/L Tris-suc (pH 7.0), containing 1% sodium cholate. After dialyzed for 12h against 30mmol/L Tris-suc (pH 7.0), 25mmol/L sucrose, 10mmol/L NaCl and 40  $\mu$ mol/L PMSF, the protein solution was centrifuged at 40000g for 5min. the cytochrome  $b_6f$  pellet was resuspended to about 20  $\mu$ mol/L Cyt  $f$  in 20mmol Tricine-NaOH (pH 8.0), containing 30mmol/L  $\beta$ -OG and 0.5% sodium cholate and was subjected to further ammonium sulfate fractionations. Precipitate formed in fractions from 38%—45% was the end product of purified cytochrome  $b_6f$ . All the tests were performed at 4 $^{\circ}$ C under dim light.

Using this improved method, a pure and active Cyt  $b_6f$  was purified from marine green alga *Bryopsis corticulus*. It was shown that the purity of this complex neared 100% (9.9nmol cyt  $f$ /mg) and its activity was 73e/s( $C_{10}PQH_2 \rightarrow PC$ ). Molecular masses of the four major polypeptides were 34.8kD, 24kD, 18.7kD, and 16.7kD. The ratio of Cyt  $b_6$  to Cyt  $f$  was 2.02:1. Besides Chl.  $a$ , there are two kinds of carotenoids in this complex and their intensity peaks were around 443.2 and 471.4nm, 438.4 and 465.6nm, respectively. They were different from the carotenoids reported in  $b_6f$  complex and their absorption spectra were similar to those of  $\alpha$ -carotene. Ongoing investigation is in progress.

**Key words** Marine green alga, *Bryopsis corticulus*, Cyt  $b_6f$  complex, Isolation, Purification