

去污剂对裙带菜色素-蛋白质复合物电泳分离效果及其性质的影响*

李爱芬 陈 敏 周百成

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于 1998 年 3 月在青岛市太平角采集裙带菜孢子体,通过破碎、离心制备类囊体膜。用去污剂 SDS、DOC、DMG 和 DIG 增溶裙带菜类囊体膜,经 PAGE 分离色素-蛋白质复合物,并测定其光谱特性。结果表明,电泳分离效果与所用的去污剂的种类有关。去污剂不同,分离到的同一类型复合物的吸收光谱有差异,捕光色素-蛋白质复合物的数目、种类及吸收光谱明显不同。电泳中产生的游离色素的多少也随去污剂种类而异。在 4 种去污剂中,以 DMG 和 DIG 增溶的效果最好,经 SDS-PAGE 分出 6 种色素-蛋白质复合物,游离色素较少。

关键词 裙带菜,去污剂,凝胶电泳,色素-蛋白质复合物,吸收光谱,荧光光谱

中图分类号 Q947

1977 年,Barrett 和 Anderson 首先用非离子去污剂 Triton X-100 增溶褐藻辐射昆布 (*Ecklonia radiata*),通过蔗糖密度梯度离心得到 4 种色素-蛋白质复合物(Barrett *et al.*, 1977)。20 年来,不同研究者已用各种方法对其进行了分离和研究,但到目前为止,从褐藻的类囊体膜上分离到色素-蛋白质复合物只有 3—5 种,其中通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术最多分离到 4 条色素-蛋白质复合物(Peyriere *et al.*, 1984)。与高等植物相比,不仅分离的色素-蛋白质复合物种类少,而且不同研究者分离的色素-蛋白质复合物数目和种类也不同。有关褐藻光合作用特性的研究,在国内只有光合作用与光强关系的研究报道(曾呈奎等,1981)。由此可见,至今褐藻的色素-蛋白质复合物分离技术还不很完善。为此,作者用去污剂十二烷基硫酸钠(SDS)、脱氧胆酸盐(DOC)、癸基-N-甲基葡萄糖胺(DMG)和毛地黄皂苷(DIG)作增溶剂,旨在分析不同增溶剂对裙带菜色素-蛋白质复合物分离效果及性质的影响,以期为进一步完善褐藻的色素-蛋白质复合物分离纯化技术提供依据。

1 材料与方 法

1.1 裙带菜(*Undaria pinnatifida*)

1998 年 3 月采自青岛市太平角低潮带石沼。

1.2 叶绿体的制备

按 Strbac 等(1994)的方法进行。

* 国家“九五”攻关资助项目,96-C01-05-01 号。李爱芬,女,出生于 1963 年 12 月,博士,副教授,现工作单位:烟台大学生化系,邮编:264005, E-mail: lafhm@sea.ytu.edu.cn

收稿日期:1999-06-22, 收修改稿日期:2000-04-08

1.3 类囊体膜制备

参考储钟稀等(1980)方法并稍加修改,类囊体膜悬浮液为含 10% 甘油的 50mmol/L 的 Tricine-NaOH (pH= 8.0), -70℃ 冰箱存放备用。

1.4 叶绿素(Chl)含量的测定

按 Jeffrey 等(1975)的方法进行。

1.5 类囊体膜的增溶

将类囊体膜与一定浓度的去污剂混匀,使 SDS: Chl 为 10: 1, DOC: Chl 为 60: 1, DMG: Chl 为 20: 1, DIG: Chl 为 50: 1 (W/W), 4℃ 冰箱内 SDS 增溶 10min, 其他去污剂增溶 2—3h, 以上为本实验的最佳增溶条件。

1.6 凝胶电泳

对 Laemmli 的 SDS-PAGE (Caron *et al.*, 1987) 进行了修改。凝胶由分离胶和浓缩胶组成。浓缩胶含有 4% 的丙烯酰胺 (Acr), Acr 与甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 之比为 30: 0.8, 缓冲液为 250mmol/L 的 Tris-HCl (pH= 6.8)。分离胶含有 10% 丙烯酸胺, Acr: Bis= 30: 0.8, 缓冲液为 50mmol/L Tris-HCl (pH= 8.5)。电极缓冲液为 25mmol/L Tris-甘氨酸 (pH= 8.7), 其中上槽含 0.05% SDS。电泳在 4℃ 条件下进行。

1.7 原位光密度扫描

在室温下,用日立 CS-910 型双波长薄层层析扫描仪对电泳后的凝胶柱直接进行原位光密度扫描,扫描波长为 675nm。

1.8 吸收光谱的测定

将电泳条带切下,用岛津 UV-3000 型紫外可见双波长双光束自动记录分光光度计测定室温吸收光谱。狭缝宽度为 2nm, 扫描速度为 200nm/min。

1.9 荧光发射光谱的测定

将电泳条带切下,在低温(77K)下用日立 F-4500 型荧光分光光度计测定。狭缝宽度为 5nm, 扫描速度为 240nm/min。

2 结果

2.1 去污剂对电泳分离效果的影响

裙带菜类囊体膜在 4℃ 条件下用不同去污剂增溶,经 PAGE 分离到的色素-蛋白质复合物如表 1。这里需要说明,由于褐藻的色素-蛋白质复合物电泳条带尚未定名,在本文中 PSI 代表光系统 I 的色素-蛋白质复合物,PSII 代表光系统 II 的色素-蛋白质复合物,LHC 代表捕光色素-蛋白质复合物。不同去污剂增溶后都能分离到 PSI、PSII 和

表 1 不同去污剂增溶后的电泳结果比较

Tab. 1 The comparison of the PAGE results solubilized by different detergents

去污剂	去污剂/叶绿素		电泳结果				
	素(W/W)	增溶时间	电泳条带	复合物数目与种类			游离色素带
				PSI	PSII	LHC	
SDS	10: 1	10min	5	1	1	2	1
DOC	60: 1	2—3h	10	1	1	4	4
DMG	20: 1	2—3h	7	2	1	3	1
DIG	50: 1	2—3h	7	2	1	3	1

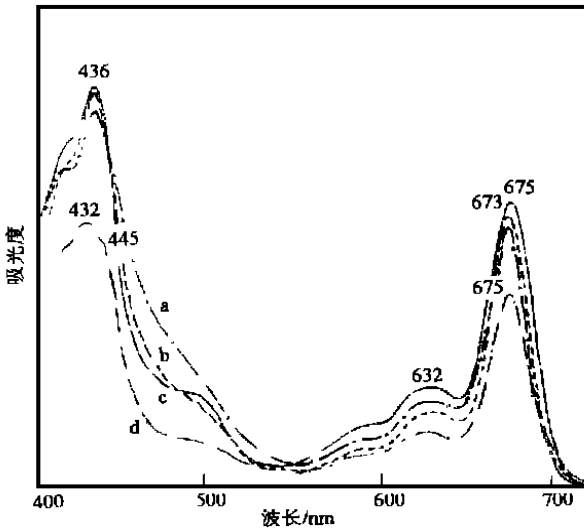


图 1 不同去污剂增溶的 PSI 复合物吸收光谱(室温)

Fig. 1 Absorption spectra of PSI complexes solubilized by different detergents (at room temperature)
a. DMG; b. SDS; c. DIG; d. DOC

436nm, DOC 增溶后吸收峰的位于 432nm。不同去污剂增溶后的 PSI 复合物在红区的吸收峰也有差别,例如 SDS 和 DIG 的吸收峰位于 673nm,DOC 和 DMG 的吸收峰位于 675nm。其中 DOC 增溶的 PSI 复合物在蓝区还有 445nm 肩峰,来源于叶绿素 c 。4 种去污剂增溶后,PSI 复合物在红区的 632nm 吸收峰来源于叶绿素 c ,在 490nm 左右的吸收是来自 PSI 复合物上的 β 胡萝卜素。在 77K 荧光发射光谱方面,不同去污剂增溶后的 PSI 复合物的特性也表现出一定差异(图 2)。这些复合物都有 2 个荧光发射峰,分别位于 675—680nm 和 715nm 处。但不同去污剂增溶后,PSI 复合物的短波荧光发射峰有差别。例如 SDS 增溶的荧光发射峰位于 677nm,DMG 的位于 676nm,DOC 的位于 675nm,DIG 的位于 680nm。从图 2 看出,去污剂对长波荧光发射峰位没有影响,都在 715nm 处。但不同去污剂在峰高上有区别,它们从大到小的顺序依次为 DMG > DOC > DIG > SDS。

2.3 去污剂对 PSII 复合物的影响

经过 4 种去污剂增溶后,分离到的 PSII 复

LHC 组分,但增溶所用去污剂不同,电泳分离得到的色素-蛋白质复合物的条带数目和种类也不同,游离色素的含量与去污剂的种类直接相关。例如 SDS 增溶后,电泳得到 4 条色素-蛋白质复合物带,1 条游离色素带。DMG 和 DIG 增溶后得到 6 条色素-蛋白质复合物带,1 条游离色素带。DOC 增溶后的电泳条带数目为 10 条,但游离色素量很大,电泳凝胶中出现 4 条不同颜色的游离色素带。

2.2 去污剂对 PSI 复合物的影响

采用 4 种去污剂增溶,经 PAGE 都分离到 PSI 复合物,但 PSI 复合物的光谱特性存在一定差异(图 1、表 2)。在吸收光谱方面,用 SDS、DMG 和 DIG 增溶后,分离的 PSI 复合物叶绿素 a 在蓝区的吸收峰位于 432—

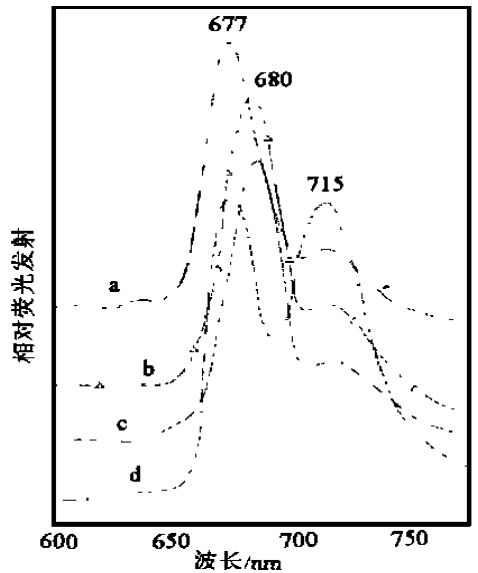


图 2 不同去污剂增溶的 PSI 复合物荧光发射光谱(77K)

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of PSI complexes solubilized by different detergents at 77K
a. SDS; b. DIG; c. DMG; d. DOC

合物在 77K 的荧光发射峰位于 683—685nm 之间(表 2)。但这些复合物的吸收光谱差异较大(图 3)。例如 DMG 和 DIG 增溶得到的 PSII 复合物在 500—550nm 之间有墨角藻黄素的吸收,480nm(肩峰)是紫堇黄素的吸收。除 SDS 增溶的 PSII 复合物以外,其他都有 445nm 肩峰,来源于叶绿素 *c*。这些 PSII 复合物的叶绿素 *a* 在红区吸收峰差别不大,位于 670—672nm;在蓝区的吸收峰存在一定差异,例如 DOC 增溶的位于 427nm,DMG 的位于 430nm,SDS 的位于 432nm,DIG 的位于 433nm。去污剂不影响叶绿素 *c* 在红区的吸收,它们都位于 632nm。

2.4 去污剂对捕光色素-蛋白复合物的影响

在实验中,捕光色素-蛋白复合物对去污剂最敏感。采用不同去污剂增溶,得到的捕

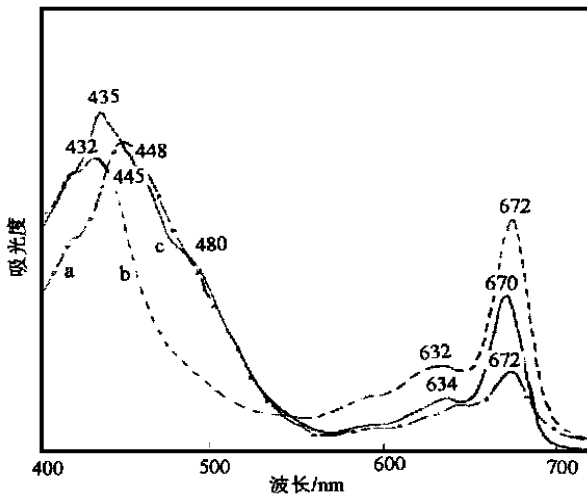


图 4 DMG 和 DIG 增溶的捕光色素-蛋白复合物吸收光谱(室温)

Fig. 4 Absorption spectra of light-harvesting complexes solubilized by DMG and DIG (at room temperature)
a. LHC₁; b. LHC₂; c. LHC₃

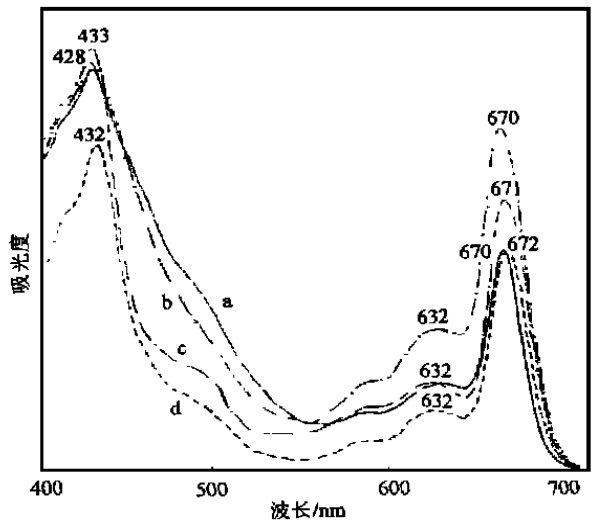


图 3 不同去污剂增溶的 PSII 复合物吸收光谱(室温)

Fig. 3 Absorption spectra of PSII complexes solubilized by different detergents (at room temperature)
a. DMG; b. DIG; c. DOC; d. SDS

光色素-蛋白复合物条带数目和种类明显不同(表 1、表 2)。SDS 增溶得到 2 条捕光色素-蛋白复合物,颜色为黄绿色,其吸收光谱中 432nm 和 670nm 吸收峰来源于叶绿素 *a*, 445nm(肩峰)和 632nm 吸收峰属于叶绿素 *c*。DOC 增溶后经电泳得到 4 个捕光色素-蛋白复合物带,颜色均为黄绿色,它们的吸收光谱特性一致,都有来源于叶绿素 *a* 的 432nm 和 672nm 吸收,445nm(肩峰)和 632nm 吸收峰来源于叶绿素 *c*。DMG 和 DIG 增溶得到 3 个捕光色素-蛋白质复合物带,颜色分别为桔黄色、褐色和黄绿色,这 3 个捕光色素-蛋白复合物的吸收光谱差异很大(图 4)。黄绿色条带吸收光谱分别与 DOC 和 SDS 增溶的捕光色素-蛋白质复合物基本一致。桔黄色条带在红区 672nm 的吸收来源于叶绿素 *a*, 叶绿素 *a* 在蓝区没有明

显的吸收峰, 448nm 和 636nm 的吸收属于叶绿素 c , 在 500—550nm 间的吸收来自墨角藻黄素, 480nm(肩峰)是紫堇黄素的吸收。褐色捕光色素- 蛋白复合物的叶绿素 a 吸收峰位于 435nm 和 670nm 处, 叶绿素 c 的吸收峰位于 450nm(肩峰)和 640nm, 480nm(肩峰)和 500—550nm 的吸收分别来自紫堇黄素和墨角藻黄素。

表 2 去污剂对裙带菜色素- 蛋白质复合物特征的影响

Tab. 2 The effect of detergents on properties of pigment-protein complexes from *Undaria pinnatifida*

去污剂	去污剂/叶绿素(W/W)	吸收峰(nm)					荧光发射峰(77K)(nm)		
		PSI	PSII	LHC ₁	LHC ₂	LHC ₃	PSI	PSII	LHC
SDS	10 1	435	432		432	432	677	683	675
		490*	490*		445*	445*	715		
		632	632		630	632			
		673	672		671	672			
DOC	60 1	432	438			432	675	683	676
		445*	445*			445*	715		
		490	490*			632			
		632	632			672			
		675	671						
DMG	20 1	436	430	448	435	432	676	685	676
		490*	445*	480*	450*	445*	715		
		632	480*	500—550*	480*	632			
		675	500—550*	636	550—550*	672			
			632	672	640				
			670		670				
DIG	50 1	436	433	432	432	430	680	683	674
		490*	445*	450*	445*	445*	715		
		632	480*	480*	480*	632			
		673	500—550*	500—550*	500—550*	672			
			632		632				
	670		672						

注: * 为肩峰

3 讨论

3.1 根据本文的实验结果, 4 种去污剂对褐藻裙带菜类囊体膜上色素及色素- 蛋白质复合物的影响是不同的。PSI 和 PSII 复合物对去污剂的增溶相对较稳定, 4 种去污剂增溶都可分离到 PSI 和 PSII 复合物。捕光色素- 蛋白质复合物对去污剂的增溶敏感, 不同去污剂增溶后的结果差异明显。

Barrett 等(1977)报道褐藻的捕光色素- 蛋白复合物与大多数绿藻和高等植物不同, 为墨角藻黄素- 叶绿素 a/c - 蛋白质复合物(即 FCPC)。以后的研究证实, FCPC 在其他褐藻中(Berkaloff *et al*, 1981, 1990; Caron *et al*, 1988; Passaquet *et al*, 1991; Douady *et al*, 1994) 普遍存在。作者以 SDS 和 DOC 为增溶剂, 电泳中分别得到 2 条和 4 条捕光色素- 蛋白复合物带, 这些复合物的吸收光谱特性一致, 只有叶绿素 a 和 c 的吸收峰, 与 Al-

berte 等(1981)报道的通过 PAGE 分离糖海带(*Laminaria saccharinia*)的捕光叶绿素 *a/c* - 蛋白质复合物相同。电泳中没有分离到 FCPC 的原因是由于去污剂的影响所致,即 SDS 和 DOC 破坏了捕光色素-蛋白质复合物中墨角藻黄素与蛋白质的结合,使其游离于电泳凝胶柱中。SDS 和 DOC 增溶后电泳产生大量含墨角藻黄素的游离色素也充分说明这一点。Kato 等(1990)用温和去污剂(octyl sucrose)增溶褐藻幅叶藻(*Petalonia fasciata*),通过蔗糖密度梯度离心分离 FCPC,同时也得到了黄绿色叶绿素 *a/c* - 蛋白质复合物,他们认为叶绿素 *a/c* - 蛋白质复合物是 FCPC 的解离产物。DMG 和 DIG 都是非离子去污剂,它们对色素及色素-蛋白质复合物的影响较小。经过 DMG 和 DIG 增溶后,电泳都得到 3 条捕光色素-蛋白复合物带,它们的吸收光谱明显不同。根据其光谱特性,迁移距离最大的黄绿色条带(LHC₃)为叶绿素 *a/c* - 蛋白质复合物。迁移距离最小的桔黄色条带(LHC₁)的吸收光谱与 Passequet 等(1991)报道的锯齿形墨角藻(*Fucus serratus*)捕光色素-蛋白质复合物相同,是 FCPC。中间的褐色条带(LHC₂)的吸收光谱与 LHC₁ 的基本相似,也是 FCPC。

3.2 高等植物 PSI 复合物在 77K 条件下有 730nm 长波荧光发射峰(Kuang *et al*, 1984)。本文分离的褐藻 PSI 复合物缺少 730nm 的长波荧光发射峰,其长波荧光发射峰位于 715nm 处。此结果与某些褐藻的 PSI 复合物的长波荧光发射峰也有所不同。例如圆锥顶孢藻(*Acrocarpia paniculata*) (Barrett *et al*, 1980a)的位于 728nm。而锯齿形墨角藻,同一个实验室的不同研究人员得出的结果也不同, Berkloff 等(1981)报道位于 728nm; Peyriere 等(1984)报道位于 720nm; Caron 等(1985)报道为 726nm; Berkloff 等(1990)在图中位于 715nm,而文字报道是 720nm。裙带菜 715nm 长波荧光发射与其他杂色藻如硅藻三角褐枝藻(*Phaeodactylum tricornutum*) (Caron *et al*, 1987)和黄藻肋胞藻(*Pleurchloris meiringensis*) (Wilhelm *et al*, 1988)的结果相同。关于不同去污剂增溶的 PSI 复合物长波荧光发射峰峰高的不同,以及褐藻 PSI 复合物长波荧光发射峰的蓝移变化,还需进一步研究。

1980年, Barrett 和 Thorne 首先报道圆锥顶孢藻的 PSII 组分,其荧光发射峰位于 694nm (Barrett *et al*, 1980b)。本文分离的裙带菜 PSII 复合物在 77K 的荧光发射峰位于 683—685nm,该结果与糖海带的 PSII 复合物的荧光特性相似(Douady *et al*, 1993)。

3.3 褐藻类囊体膜色素-蛋白质复合物的深入研究有赖于分离技术的改进和完善。根据实验结果,作者认为影响褐藻色素-蛋白质复合物分离技术的关键是增溶过程中去污剂的选择和使用问题。DMG 和 DIG 增溶后,电泳中游离色素较少,而且分离出的色素-蛋白质复合物多达 6 种。因此,在这 4 种去污剂中,DMG 和 DIG 是增溶裙带菜类藻体膜的理想去污剂。

致谢 本论文是在中国科学院植物研究所完成的,在工作中得到了中国科学院海洋研究所曾呈奎院士、中国科学院植物研究所匡廷云院士和李良璧先生的指导,张群、冯丽洁同志协助进行各种光谱测定,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 储钟稀, 许春辉, 毛大璋等, 1980. 植物叶绿素-蛋白质复合物的研究 I. 阳生植物向日葵、阴生植物一叶兰的叶绿素-蛋白质复合物. 植物生理学报, 6: 164—172
- 曾呈奎, 潘忠正, 周百成, 1981. 底栖海藻比较光合作用研究 II. 潮间带褐藻的光合作用与光强的关系. 海洋与湖沼, 12(3): 254—259
- Alberte R S, Friedman A L, Gustafson D L, 1981. Light-harvesting systems of brown algae and diatoms: Isolation and characterization of chlorophyll *a/c* and chlorophyll *a/c* fucoxanthin pigment-protein complexes. Biochim Biophys Acta, 635: 304—316
- Barrett J, Anderson J M, 1977. Thylakoid membrane fragments with different chlorophyll *a*, chlorophyll *c* and fucoxanthin compositions isolated from the brown seaweed *Ecklonia radiata*. Plant Sci Lett, 9: 275—283
- Barrett J, Anderson J M, 1980a. The P700- chlorophyll *a*-protein complex and major light-harvesting complexes of *Acrecarpia paniculata* and other brown seaweeds. Biochim Biophys Acta, 590: 309—323
- Barrett J, Thorne S W, 1980b. Isolation of a F694 chlorophyll *a*-protein complex with low fluorescence yield from brown alga. FEBS Lett, 120: 24—28
- Berkaloff C, Duval J C, Jupin H, 1981. Spectroscopic studies of isolated pigment protein complexes of some brown algae thylakoids. Photosynthesis III. In: George Akoyunogloued. Balaban International Science Services. Philadelphia, 485—494
- Berkaloff C, Caron L, Rousseau B, 1990. Subunit organization of PSI particle from brown algae and diatoms: polypeptide and pigment analysis. Photosyn Res, 23: 181—193
- Caron L, Dubacq J P, Berkaloff C *et al*, 1985. Subchloroplast fractions from the brown alga *Fucus serratus*: Phosphatidylglycerol Contents. Plant Cell Physiol, 26: 131—139
- Caron L, Brown J, 1987. Chlorophyll-carotenoid protein complexes from the diatom, *Phaeodactylum tricorutum*: Spectrophotometric, pigment and polypeptide analyses. Plant Cell Physiol, 28: 775—785
- Caron L, Remy R, Berkaloff C, 1988. Polypeptide composition of light-harvesting complexes from some brown algae and diatoms. FEBS Lett, 229: 11—15
- Douady D, Rousseau B, Berkaloff C, 1993. Isolation and characterization of PSII core complexes from a brown alga *Laminaria saccharina*. FEBS Lett, 324: 22—26
- Douady D, Rousseau B, Caron L, 1994. Fucoxanthin-chlorophyll *a/c* light-harvesting complexes of *Laminaria saccharina*: Partial amino acid sequences and arrangement in thylakoid membrane. Biochemistry, 33: 3165—3170
- Jeffrey S, Humphrey G, 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochim Physiol Pflanzen, 167: 191—194
- Katoh T, Ehara T, 1990. Supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll protein complexes isolated from a brown alga, *Petalonia fasciata*. Electron microscopic studies. Plant Cell Physiol, 31: 439—447
- Kuang T Y, Argyroudi-Akoyunoglou J H, Nakatani H Y *et al*, 1984. The origin of the long wavelength fluorescence emission band (77K) from photosystem I. Arch Biochem Biophys, 235: 618—627
- Passaquet C, Thomas J C, Caron L *et al*, 1991. Light-harvesting complexes of brown algae. Biochemical and immunological relationships. FEBS Lett, 280: 21—26
- Peyriere M, Caron L, Jupin H, 1984. Pigment complexes and energy transfer in brown algae. Photosynthetica, 18: 184—191
- Strbac D, Rodrigues M A, Santos C P *et al*, 1994. Chloroplast isolation from *Laminaria digitata* (Phaeophyceae): A reproducible methodology yielding photosynthetically active chloroplasts. Planta, 195: 138—141
- Wilhelm C, Buchel C, Rousseau B, 1988. The molecular organization of chlorophyll protein complexes in the Xanthophyceae alga *Pleurochloris meiringensis*. Biochem Biophys Acta, 934: 220—226

EFFECT OF DETERGENTS ON ELECTROPHORETIC SEPARATION AND PROPERTIES OF PIGMENT-PROTEIN COMPLEXES FROM A BROWN ALGA *UNDARIA PINNATIFIDA*

LI Ai-Fen, CHEN Min, ZHOU Bai-Cheng

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The thylakoid membranes isolated from a brown alga *Undaria pinnatifida* were solubilized by detergents sodium dodecyl sulfate (SDS), deoxycholate (DOC), decanoyl-N-methylglucamide (DMG) and digitonin (DIG) at different concentrations (SDS: Chl = 10:1, DOC: Chl = 60:1, DMG: Chl = 20:1, DIG: Chl = 50:1). The pigment-protein complexes were separated by the SDS-PAGE, and their spectrum characteristics were determined. The results of PAGE separation varied with detergents. DOC solubilization yielded 10 pigment-containing bands and resulted in a large number of free pigments. SDS solubilization yielded only 5 pigment-containing bands and lots of free pigment were produced. Comparing with SDS and DOC, DMG and DIG solubilization resulted in 7 pigment-containing bands and only a little free pigment. When thylakoid membranes were solubilized by different kinds of detergents and separated by SDS-PAGE, the same pigment-protein complexes had different absorption and fluorescence emission spectra. The absorption maxima of chlorophyll *a* in PSI complexes were different in blue and red lights, and its short-wavelength fluorescence emission maxima at 77K also varied with detergent. PSII complexes treated with DMG or DIG had absorption of fucoxanthin. The light-harvesting pigment-protein complexes (LHC) were also different in number, type and absorption spectrum. Two Chl *a/b*-protein complexes were resolved by SDS and four by DOC, but no fucoxanthin-Chl *a/b*-protein complexes (FCPC) were separated by SDS or DOC. DMG or DIG solubilization can yield three types of LHC, of which were two FCPC and one Chl *a/b*-protein complexes. According to the PAGE results, the best separation was obtained by using DMG or DIG, in which 6 pigment-protein complexes were resolved and a little free pigment were produced.

Key words *Undaria pinnatifida*, Detergent, SDS-PAGE, Pigment-protein complexes, Absorption spectra, Fluorescence emissions spectra