

一种用于色素蛋白分离的新凝胶系统*

杜林方 林宏辉 潘用华 梁厚果

(四川大学生物系, 成都 610064)

摘要 用混合去垢剂增溶低离子强度条件下的温和电泳方法, 对菠菜叶绿体类囊体膜和不同 PS II 制剂进行了色素蛋白复合体组成的分析, 并结合 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和吸收光谱对部分色素蛋白复合体进行了鉴定。此法简便、迅速、游离色素少。

关键词 温和电泳, 色素蛋白复合体, 凝胶电泳

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质复合体(CP)利用光能使水裂解, 产生还原力, 从而还原 CO_2 并放出氧气, 这是一个由两个光系统(PS)协作完成的过程^[1]。温和电泳在类囊体膜组成、构造和生物发生的研究中是一种十分有用的工具^[2]。它具有快速、真实、方便等特点, 可使叶绿素蛋白质复合物以近似天然的状态分离, 其上的叶绿素仍与原来的蛋白质非共价结合, 游离色素(FP)较少, 不需染色就可分辨 CP 带。由于胶条呈绿色带, 而称绿色胶技术^[3]。最初的温和电泳只能将类囊体膜分成几条 CP 带, 多数 CP 带遭破坏, FP 较多, 随着增溶和电泳条件的改进, 可分离的 CP 带增多, 最近 Peter 等人的 Deriphat-PAGE 系统和 Allen 等人的低离子强度绿色胶系统^[4,5], 具有较好的分离效果, 我们用了 Allen^[5]等人的方法, 首次在国内用于 PS II 核心复合物等叶绿素蛋白质复合物的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菠菜 (*Spinacia oleracea*) 购自市场; MES 为华美公司产品; 辛基葡萄糖苷 (octyl glucoside, OG), 癸基麦芽糖苷 (decyl maltoside, DM), SDS Triton X-100 和 SDS-PAGE 标准蛋白质均为 Sigma 公司产品; PMSF 为 E.

Merck 公司产品。其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 PS II 颗粒和具放氧活性的核心复合物的制备

100g 去叶柄的菠菜叶片于 300ml 含 0.3mol/L 蔗糖, 0.2mol/L NaCl 的 0.05mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中, 经组织捣碎机匀浆, 2 层白布过滤, 3000g 离心 5min, 沉淀悬浮于上述缓冲液中, 500g 离心 30s 弃沉淀, 上清液于 3000g 离心 5min, 得类囊体膜。用 Triton X-100 处理, 经差速离心^[6]由类囊体制得 PS II 颗粒。参照 Ghanotakis 等^[7]的方法, 在高浓度 NaCl 条件下用 OG 处理 PS II 颗粒, 离心分离得具放氧活性的 PS II 核心复合物。

1.3 温和电泳

1.3.1 凝胶制作 采用圆盘电泳, 浓缩胶长 0.5cm, 分离胶长 3.5cm, 胶浓度均为 8% (Acr : Bis = 100 : 1), 分离胶含 25mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L 甘氨酸、10%甘油, pH 8.3, 浓缩胶含 25mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L 甘氨酸、10%甘油, pH 6.3。聚合时加入 0.05% 过硫酸铵和 0.05% TEMED, 于室温下完成, 次日再进行电泳。

1.3.2 样品增溶 样品用 2mmol/L Tris-马来酸 (pH 7.0) (含 1mmol/L PMSF) 离心洗涤

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1994-06-15, 修回日期: 1994-10-28

2次,于35 000g离心5min,所得沉淀悬浮于增溶溶液(0.45% OG、0.45% DM、0.1% SDS、10%甘油和2mmol/L Tris-马来酸 pH 7.0),使(OG+DM):Chl(W/W)=20:1,于冰浴中避光温育30min,15 000g离心5min,取上清液立即上样进行电泳。

1.3.3 电泳 电极缓冲液含0.1% SDS、25mmol/L Tris、192mmol/L 甘氨酸(pH 8.3),于4℃、1.5mA/管避光条件下电泳45—60min,电泳结束后,直接照像,或作SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE 参常规方法^[8]进行。凝胶厚度1.5mm,分离胶及浓缩胶浓度分别为13.75%和5%,均含有6mol/L尿素,染色用考马斯亮蓝R-250。温和电泳后的胶条经样品处理液(5% SDS、2%巯基乙醇、10%甘油和50mmol/L Tris-HCl, pH 6.8)室温下处理1h,再进行SDS-PAGE。

1.5 吸收光谱测定

用岛津UV-240测定胶条中色素蛋白的室温吸收光谱。

2 结 果

2.1 类囊体膜色素蛋白组成

采用本绿色胶电泳系统,可以将类囊体膜分离出14条以上的绿色带(图1),而只有很少

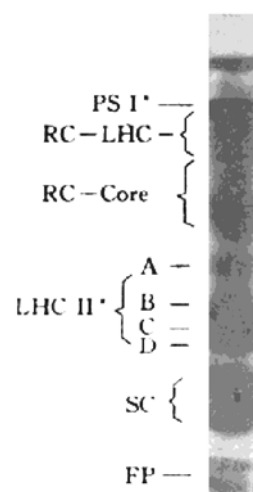


图1 类囊体膜色素蛋白组成分析

未染色,上样量50μg Chl.

的游离色素(少于1%)。我们采用OG/DM/SDS增溶,不同于Allen等^[5]的OG/DM/LDS,可获得相同的效果。已知PS I和PS II均由反应中心(RC)组分和捕光天线(LHC)组分组成。在低离子强度条件下进行温和电泳,有利于检测到PS I和PS II的异质性,如在RC-LHC区有多种PS I-LHC I和PS II-LHC II复合物;在RC-Core区有一系列不含天线的反应中心核心复合物;而LHC II以三聚体(LHC II*)形式存在,至少有4条不同的LHC II*复合物(LHC II* A-D)。在SC(小的复合物)区有CP47和CP43复合物、CP29、CP26和CP24复合物。FP区为橙黄色,主要为类胡萝卜素。

2.2 不同PS II制剂的色素蛋白组成

和PS I相比,PS II反应中心组分的色素蛋白的稳定性较差,电泳分离时常失去色素^[9]。为了考察新方法的有效性,我们对不同PS II制剂进行了色素蛋白组成分析。制备的三种PS II制剂依次是PS II颗粒、PS II盐洗PS II颗粒和

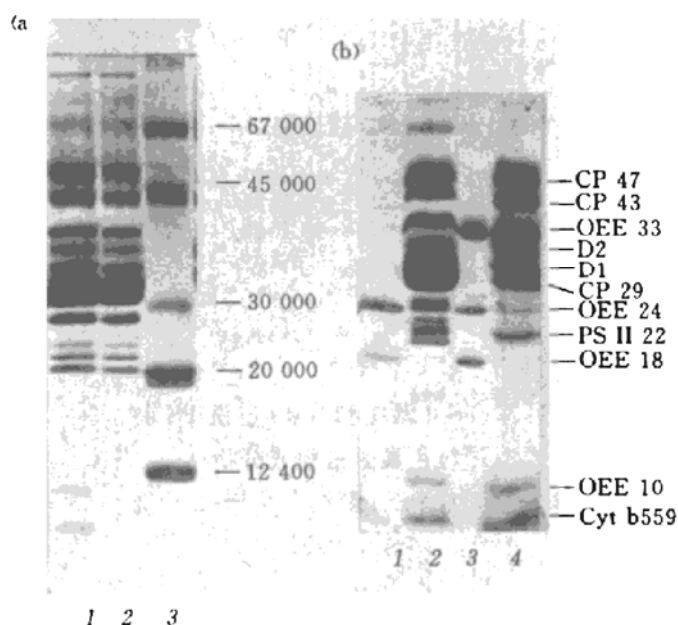


图2 SDS-PAGE 分析不同PS II制剂的多肽组成

(a) 1, 2: PS II 颗粒; 3: 蛋白质分子量标准; (b) 1: NaCl 盐洗的上清液; 2: NaCl 盐洗的 PS II 颗粒; 3: 三种水溶性蛋白(OEE33, OEE24, OEE18); 4: 具放氧活性的PS II核心复合物,考马斯亮蓝R-250染色。

具放氧活性的 PS II 核心复合物, 它们的多肽组成如图 2 所示。

图 3 为 PS II 颗粒和 NaCl 盐洗 PS II 颗粒的温和电泳结果, 可分离出数条叶绿素蛋白质复合物带, 依次为: 核心复合物 (CC II)、反应中心 47 000-D1-D2-Cyt b559 复合物 (CP47+CC II RC)、捕光叶绿素 a/b 蛋白质复合物三聚体 (LHC II^{*})、反应中心内周天线复合物 (CP47/CP43)、次要捕光叶绿素 a/b 蛋白质复合物 (CP29 和 CP26/CP24), 以及 1 条游离色素带。已知 1mol/L NaCl 盐洗可除去 PS II 颗粒中的分子量为 18 000 和 24 000 两种不含色素的水溶性蛋白 (OEE18, OEE24)^[10] (见图 2), 我们的结果表明盐洗对色素蛋白的分离没有多大影响。

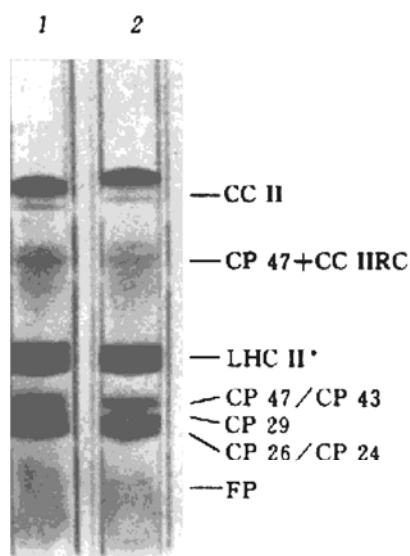


图 3 PS II 颗粒和 NaCl 盐洗 PS II 颗粒色素蛋白组成分析

未染色, 1: PS II 颗粒; 2: PS II 盐洗 PS II 颗粒。

用此法分离, 具放氧活性的 PS II 核心复合物中除无 CP26/CP24 和仅存微量 LHC II^{*} 外, 主要有 CP47/CP43 带和 CP29/D1/D2 带 (图 4)。显然 FP 较少, 表明分离方法不会对色素蛋白产生破坏作用。部分色素带的吸收光谱 (图 5) 显示: LHC II^{*} 在 650nm 具属 Chl b 的吸收

肩峰; 呈蓝绿色的 CP47/CP43 检测不出 Chl b 所特有的 650nm 和 460nm 吸收峰; FP 在 430—480nm 有吸收, 在 670nm 无吸收, 表明含类胡萝卜素而无 Chl a, 进一步证实了方法的有效性。

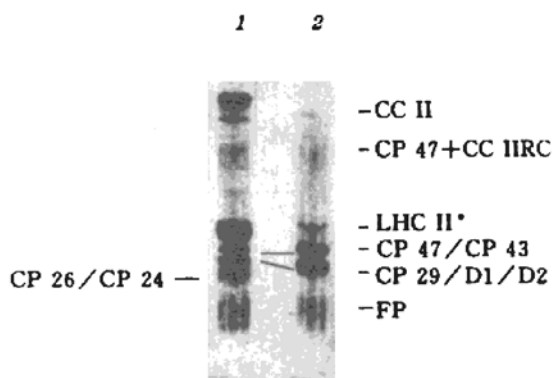


图 4 PS II 颗粒和放氧的 PS II 核心复合物色素蛋白组成

未染色, 1: PS II 颗粒; 2: 核心复合物。

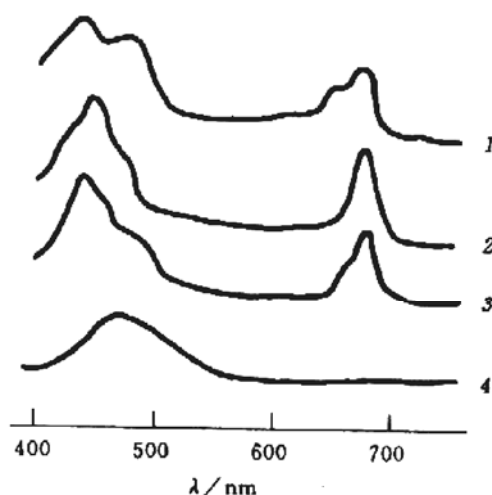


图 5 部分色素蛋白复合物及游离色素的吸收光谱

1: LHC II^{*}; 2: CP47/CP43; 3: CP29/D1/D2; 4: FP。

温和电泳后再作 SDS-PAGE 的双向电泳, 可以很好的鉴定色素蛋白复合物的多肽组成^[4,5]。图 6 结果表明, 我们对各色素蛋白复合物多肽组成的分析是正确的。

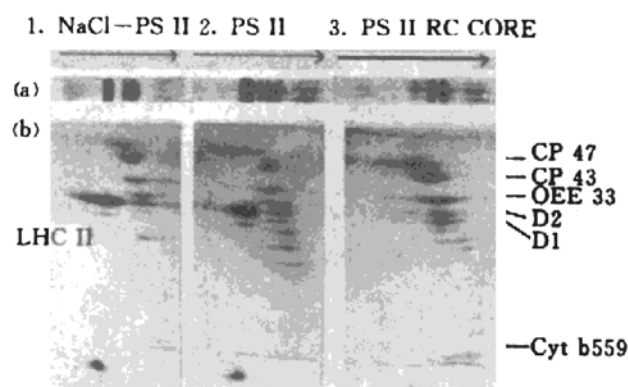


图6 双向电泳分析不同PS II制剂的多肽组成
(a) 温和电泳, 不染色, 第一向, 箭头表示电泳方向。(b) SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 第二向, 1: NaCl 盐洗PS II颗粒; 2: PS II颗粒; 3: 具放氧活性的PS II核心复合物。

3 讨 论

电泳方法用于色素蛋白质复合物的分离时, 具有省时、消耗试剂少等优点。自1978年Anderson等人改进了SDS-PAGE技术, 并从菠菜类囊体膜上分离出7条含叶绿素的区带以来, 电泳分离方法已得到不断的改进和完善^[4]。由于离子型去垢剂SDS增溶时, 可破坏蛋白质之间或色素与蛋白质之间的非共价结合, 常使叶绿素游离(占叶绿素总量的10%—30%); 随后, 非离子型去垢剂OG被用于增溶, 则色素蛋白复合物的稳定性增加, CP29才得以被分离^[9]; 利用OG和少量SDS增溶, 凝胶中不含SDS, 则可检测到CP24的存在和多种LHC I-PS I复合物^[11]。用Deriphat替代电极缓冲液中的SDS, 不用浓缩胶的低离子强度下的Deriphat-PAGE, 电泳时间由以往的4—18h缩短至40min, 则游离色素降至3%, 可检测到11条色素蛋白质复合物^[3]。

本文采用葡萄糖苷和麦芽糖苷的混和液增溶, 利于色素蛋白在电泳分离时的稳定, 适量SDS的存在利于检测到不同的LHC II*三聚体。由于凝胶中含10%甘油而无SDS有利于色素蛋白的稳定, 低离子强度可有高的电压/电流比值, 对分离有用, 但不能太低, 否则起不到

缓冲作用。因此, 此凝胶系统的分辨力比以往方法更高, 分离时游离色素量少且无叶绿素, 可以检测到PS I和PS II的异质性。它不仅可用于PS II反应中心色素蛋白的研究, 还可用于高等植物变异和藻类突变体的分析和鉴定, 用于植物个体发育研究^[5]。

和超速离心、柱层析等^[12,13]分离单一组分的色素蛋白复合物的方法相比, 本凝胶系统可同时分离多种色素蛋白复合物, 并具有快速、简便等优点, 分离过程也是鉴定过程。最近, 我们用此方法分析光抑制处理的PS II核心复合物的色素蛋白质复合物的变化情况, 结果令人满意(另文发表), 表明此凝胶系统可用于PS II反应中心的构造研究。

参 考 文 献

- 1 Anderson J M. *Mol Cell Biochem*, 1982; **46**: 161
- 2 Thornber J P. *Encl Plant Physiol New Series*, 1986; **19**: 98
- 3 Thornber J P, Morishige D T, Anandan S *et al.* In: Scheer H ed. *Chlorophylls*. Florida: CRC Press, 1991: 549
- 4 Peter G F, Thornber J P. In: Rogers L J ed. *Methods in plant biochemistry*, vol. 5: amino acids. San Diego: Academic Press, 1991; **5**: 194
- 5 Allen K D, Staehelin L A. *Anal Biochem*, 1991; **194**: 214
- 6 Kuwabara T, Murata N. *Plant Cell Physiol*, 1982; **23**: 533
- 7 Ghanotakis D F, Demetriou D M, Yocum C F. *Biochim Biophys Acta*, 1987; **891**: 15
- 8 Laemmli U K. *Nature*, 1970; **227**: 680
- 9 Camm E L, Green B R. *Plant Physiol*, 1980; **66**: 428
- 10 Miyao M, Murata N. *FEBS Lett*, 1984; **168**: 118
- 11 Dunahay T G, Staehelin L A. *Plant Physiol*, 1985; **78**: 606
- 12 王 俊, 梁厚果, 杜林方等. *中国科学 (B辑)*, 1991; (5): 479
- 13 唐晓松, 杜林方, 匡廷云. *植物生理学报*, 1992; (18): 8

A New Gel System for Separation of Pigment-Protein Complexes. Du Linfang, Lin Honghui, Pan Yonghua, Liang Houguo (*Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064, China*).

Abstract The chlorophyll-protein complexes of thylakoids and those of various PS II preparations were analyzed by a low ionic strength native "green gel" system after solubilization by a mixture of detergents, with very little release of free pigment. The subunit composition and absorption spectra of some chloro-

phyll-protein complexes were studied also. This new native green gel system is simple and rapid, with release of very little free pigment.

Key words mild electrophoresis, chlorophyll-protein complexes

基体辅助激光解吸电离质谱法及其应用*

杨伯宇 朱大模 张玉奎

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 大连 116011)

摘要 基体辅助激光解吸电离质谱是近几年才发展起来的一种新技术, 它在生命科学研究中具有广阔的应用前景. 对基体辅助激光解吸电离质谱技术的基本原理, 运用基体辅助激光解吸电离质谱法研究蛋白质分子量的测定, 蛋白质混合物的分离鉴定以及用基体辅助激光解吸电离质谱技术进行超快速的蛋白质序列分析和 DNA 序列分析的可行性和存在的问题作了介绍和讨论.

关键词 基体辅助激光解吸电离质谱, 分子量测定, 分离鉴定

基体辅助激光解吸电离质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry) 技术是 80 年代末期才发展起来的一种新技术, 它由日本科学家 Tanaka 等^[1]和德国科学家 Karas 及 Hillenkamp^[2]几乎在同一时间提出. Tanaka 的方法是把钴粉, 甘油等物质和蛋白质分子混合在一起, 用激光解吸电离质谱法测到了 1×10^5 以上的蛋白质分子量, 但由于对这一方法的机理认识不清, 以及灵敏度的限制, 这一方法没有得到进一步的发展. 德国科学家 Karas 和 Hillenkamp 提出的方法是用烟酸 (nicotinic acid) 作为基体来测定蛋白质分子量的, 并对这一方法的机理进行了合理的分析, 灵敏度、信噪比等方面也明显优于日本人提出的方法. 因此, 这一学科近几年的发展基本上是以德国人的方法为基础的. 我国也在这方面开展了研究工作, 中山大学赵善楷教授等^[3]已研制成激光解吸电离飞行时间质谱仪, 中国科学院大连化学物理研究所进行了大量的

应用研究^[4]. 基体辅助激光解吸电离质谱法具有以下一些特点:

a. 使用脉冲激光作为电离手段, 由于激光和样品之间的作用时间短、区域小、温度低, 所以避免了生物大分子的热分解.

b. 使用了基体辅助电离技术, 即使用样品不共振吸收的激光波长, 首先用激光将基体分子电离, 同时将生物大分子气化, 在气相中基体分子将质子转移到生物大分子上, 使其带电荷, 从而进行质谱分析. 这一技术保证了生物大分子不被激光打碎, 只产生准分子离子.

c. 具有分离和鉴定的双重功能, 可用于混合物的分析.

d. 测量精度高, 使用内标法, 分子量测定精度可达 0.01%.

e. 操作简单, 需要样品量少, 分析时间短, 5—10min 即可完成一项分析.

* 辽宁省科学技术委员会博士科研启动基金资助项目.

收稿日期: 1994-06-15, 修回日期: 1994-09-02