

研究报告

β -胡萝卜素, R-藻红蛋白对叶绿素 BLM 光电效应的影响

魏美德 柳正辉

(中国科学院感光化学研究所)

一切绿色植物进行光合作用的功能单位是细胞中的叶绿体^[1-3],叶绿体内散布在基质中垛叠成堆的片层的类囊体膜是最初的光量子转换发生场所,氧气的释放和 ATP 的合成也在这里进行^[2-4]。类囊体膜基本上是由类脂、糖脂、蛋白质和色素构成。类脂构成了双分子层的骨架,色素、蛋白质等有规则地在膜上排列着,这种有序的排列保证了光能转换的效率^[2-5]。

对于叶绿体中的所谓量子转换体,光反应中心色素蛋白复合物的结构、成分,叶绿素和其它辅助色素的相互关系正在进行着广泛研究^[6-9]。人工双分子类脂膜(Bilayer lipid membrane 简称 BLM)和脂质体为人工模拟光合作用,研究光合作用的机理,提供了极为有利的模型。

从菠菜萃取物配制成的含叶绿素的人工双分子层类脂膜(Chl-BLM),在 0.1 M 醋酸钾溶液中,在照光情况下已得到明显的光效果(跨膜电势差约 100 mV,在加入氧化-还原剂等情况下更可提高)。并获得了从可见到紫外的 Chl-BLM 光电作用光谱^[14]。

现公认,在叶绿体中普遍存在两个光系统,其中光系统 I(P_{700})的反应中心色素具有特殊状态,然而这种反应中心叶绿素 a 和叶绿素 b、类胡萝卜素及其它辅助色素的相互定位关系及其在光能转换,能量传递中的作用还不很清楚。

本实验用菠菜萃取物配制的含叶绿素的人工双分子层膜,并加入 β -胡萝卜素及一种 R-藻红蛋白模拟叶绿体类囊体膜做了一些光电转换效应的观察研究。试图寻找几种光合色素蛋白

之间能量传递的关系和效果。

一、材料和方法

1. BLM 形成液——氧化胆固醇溶液及菠菜叶绿体萃取物的制备方法均按 Tien 的方法^[10]。但萃取叶绿体时使用的离心速度较低(4000 转/分)。

2. 藻红蛋白(R-Phycoerythrin)是用我国青岛沿海生长的一种多管藻,将它用硫酸胺反复沉淀提取的一种 R-藻红蛋白为絮状固体,溶于水^[11]。

3. β -胡萝卜素成膜液为 β -胡萝卜素的氧化胆固醇溶液。色素浓度约为 1mg/ml。将 β -胡萝卜素与菠菜叶绿体成膜液混合时约为 1:1 (v/v)。

4. Zn-TPP(Zn(II)-meso-tetraphenylporphine)成膜液是将 Zn-TPP 溶于少量氯仿,然后再加入氧化胆固醇的正辛烷溶液配成。色素浓度约为 0.1%^[12]。

5. 电解质溶液为 0.1 M KAC,调至 pH=5。

光源为 500 W 氙灯,通过透镜系统会聚于 Teflon 杯的成膜小孔上。该处白光强度约 100 mW/cm²。测光电作用光谱时则加一台光栅单色仪,光谱范围从可见到紫外(750nm—250nm)。

用一对小型甘汞电极插于膜两侧内、外池溶液中,与一台静电计联接,可直接读出膜电势(见图 1)。

BLM 形成池为有机玻璃制成,入射光窗口为光学玻璃(作紫外光照时为石英玻璃窗口)。Teflon 杯及外池容积为 10ml。

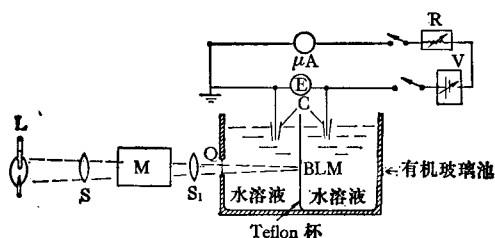


图 1

L: 光源, E: 静电计, S, S_1 : 透镜; M: (单色仪)或滤色片
C: 甘汞电极, Q: 光学玻璃或石英窗, V: 外加电源器

二、实 验

1. Chl-BLM 的光电效应

用自制菠菜离体叶绿体的氧化胆固醇成膜液涂于 Teflon 杯小孔上成膜。溶液为 0.1M KAC 缓冲液 pH = 5。当膜变黑后加入 0.2 ml 0.1 M FeCl_3 于内池; 0.2 ml 0.1 M 抗坏血酸于外池, 使其最终浓度约为 $2 \times 10^{-3} \text{M}$ 。待十分钟后, 均在开路位置测膜的暗电势 ($E_{\text{暗}}$), 然后照光, 读出光生电动势 ($E_{\text{光}}$)。 $E_{\text{暗}}$ 与 $E_{\text{光}}$ 之差值为 ΔE , 即色素之光效应。本实验 ΔE 略小于 100 mV, 暗膜电阻是 $10^{-8} \Omega \cdot \text{cm}^2$ 左右。

2. Chl-BLM 中加入 β -胡萝卜素的影响

(1) 在与 Chl-BLM 同样的条件下 (0.1 M KAC 缓冲液, 加入少量抗坏血酸和 FeCl_3)。单纯的 β -胡萝卜素氧化胆固醇膜, 光效应极其微弱 $\Delta E \sim 3.4 \text{mV}$ 。

(2) 陈放半月余 (避光 0°C 左右) 菠菜叶绿体萃取物成膜液, 所形成之 Chl-BLM 之光效应已大大减弱 (ΔE 在十几毫伏范围内)。当加入 β -胡萝卜素与 Chl 混合 (1:1, v/v)。所形成的 Chl- β -Caroten-BLM。在以上条件的光效应高于两种色素膜光效应之和。

光效应 次数	Chl-BLM $\Delta E(\text{mV})$	Chl + β -Caroten-BLM $\Delta E(\text{mV})$
1	8	29
2	16	52

以上数据至少经过 2—3 次的重复。

3. R-藻红蛋白对叶绿素膜光电效应的影响

(1) 在含有 0.5 mM FeCl_3 和 0.5 mM FeCl_2 的 0.1 MKAC 缓冲液中做氧化胆固醇膜, 膜形成后在外池加入少量抗坏血酸、内池追加 FeCl_3 使内池 Fe^{+3} 离子浓度为原来的 10 倍。然后再加入藻红蛋白 (相当于干燥的藻红蛋白 0.1mg/ml)。待廿分钟后测量光效应, 所获得之光效应极微。

(2) 与以上条件相同, 但成膜液换为菠菜叶绿体萃取物膜 (见图 2)。

当单纯的 Chl-BLM 光效应 (ΔE) 仅为 7—10 mV 之间时, 在内池加入藻红蛋白后的光效应 (ΔE) 上升到 40—56 mV。

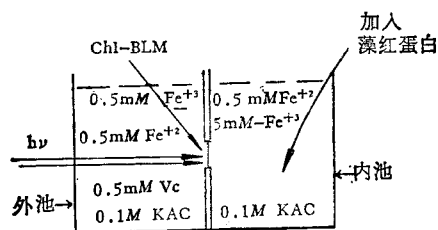


图 2 使 Chl-BLM 之光效应增强

4. 在 Zn-TPP 氧化胆固醇膜中加入 β -胡萝卜素和藻红蛋白的光电效应

(1) Zn-TPP-BLM 在 0.01 M KCl 溶液中形成, 待膜黑后外池加入 0.3 ml EDTA, 内池加入 0.3 ml FeCl_3 (0.1M), 十分钟后在开路条件下测其暗电势, 然后照光, 测其光电势。其差值为

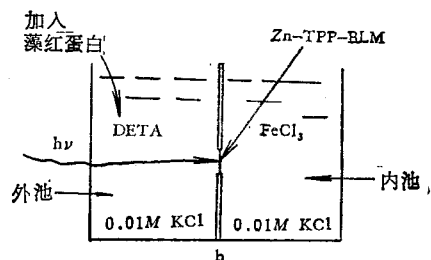
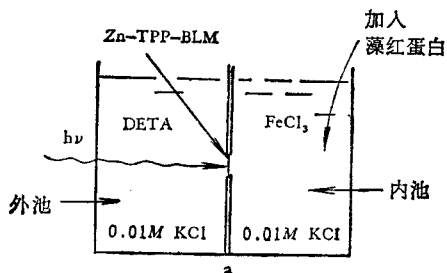


图 3 使 Zn-TPP 膜光效应减弱

光生电动势。

(2) 在 Zn-TPP 成膜液中以 1:1 (v/v) 加入 β -胡萝卜素氧化胆固醇溶液, 在与上面相同条件下测 β -胡萝卜素混合膜的光电效应。结果光效应明显增高。

(3) 先形成 Zn-TPP-BLM, 然后在膜的一侧溶液中加入藻红蛋白, 结果观察到在内池(加入 Fe^{+3} 的一侧)加藻红蛋白, Zn-TPP 膜的光效应有所减弱, 在外池(加入 EDTA 的一侧), 加藻红蛋白光效应增加(见图 3、4)。

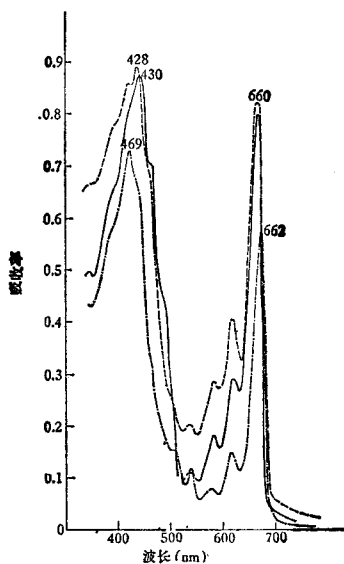


图 4 使 Zn-TPP 膜的光效应增加

三、讨 论

从以上实验结果看到, 在抗坏血酸/Chl-BLM/ Fe^{+3} 体系内, 即在 0.1 MKAC 缓冲溶液内形成叶绿体萃取物的双分子层膜分开两个水相, 并加入电子给体和电子受体, 然后在照光的情况下, 可以获得明显的光效应。但与 Tien^[14,15] 的结果比较, 本实验的结果偏低。可能因为提取菠菜叶绿体时离心速度较低, 所用成膜溶液为单一的氧化胆固醇正辛烷溶液及其他测量因素的不同而造成。

Donald S. Berns^[13] 认为在类脂成膜液中若分别含有叶绿素、 β -胡萝卜素或叶黄素, 那么几乎没有可观察到的光敏性, 在叶绿体萃取物或 BLM 中必需含有一定浓度的叶绿素和 β -胡

萝卜素才会有明显的光敏性能。从本实验结果看, 含有一定浓度的纯叶绿素 a 的氧化胆固醇溶液形成的 BLM 还是有一定的光效应, 但随成膜液存放时间的延长, 很快就丧失了产生光效应的能力。而叶绿体萃取物形成液所成之 Chl-BLM 膜有较好的光效应, 保持时间也相对长些。单纯含有 β -胡萝卜素的 BLM 也几乎无光效应, 与叶绿素混合而形成的膜的光效应明显增加, 即使是对存放时间较长, 光效应已微弱的叶绿体萃取物液, 在加入一定量的 β -胡萝卜素后, 光效应也几乎提高三倍。

这说明叶绿素 a 和 β -胡萝卜素确实是叶绿体中主要的功能色素。 β -胡萝卜素在叶绿体的类囊体膜中起到光能传递的作用, 也即通过 β -胡萝卜素结构中所含有的共轭双键促进了内部电子的转移, 有利于叶绿素受激后的电荷分离, 因而大大提高了跨膜光生电动势, 光电流也必然增涨。进一步证实, 电子在膜内部的运动是光合作用的基本过程, 光合膜中含有的类胡萝卜素起了传递电子的特殊作用。

可将叶绿体萃取物的 BLM 看作有机半导体和液晶^[13,14]。叶绿素分子吸收光能成为受激状态, 包含着电子-空穴对, 在没有电子传导物质, 如 β -胡萝卜素和膜两侧的电子给体和受体情况下, 受激态叶绿素所包含的电子-空穴对不能有利地进行分离, 故而在外电路上看不到响应。而当存在一定量 β -胡萝卜素时, 能在膜中起到传递电子的作用, 加之膜极薄, 在膜两侧又存在电子给体和电子受体, 那么在两个膜/水界面处一边给出电子, 一边接受电子, 这就形成了跨膜电子传递, 在外电路上可获得明显的光生电动势。 β -胡萝卜素对 Zn-TPP 膜的作用也类似。

R-藻红蛋白实际上是一种色素蛋白复合体, 属藻胆蛋白类^[3,11]。是多管藻的功能色素。Chang-Hwei Chen 和 Donald S. Berns^[16,17] 对藻兰素及其它一些色素的研究认为, 一些藻色素蛋白, 如 C-藻兰素 (C-phycoerythrin)、别藻兰素 (Allophycocyanin)、R-藻红素 (R-phycoerythrin) 等无论是在类囊体膜的内侧或外侧都能提高跨膜

电势差。Gantt et al.^[15a,18] 还提出过红藻藻胆蛋白体的模型,示意几种藻蛋白环绕类囊体膜的情形。

我们从多管藻中提出的藻红素是水溶性的色素蛋白复合体,吸收峰在 566 nm, 539 nm, 495 nm 正好弥补了叶绿素不能吸收绿光之不足。在实验中也确实观察到在以氙灯为光源的模拟太阳光的照射下,在 Chl-BLM 体系中膜的一侧加入 R-藻红蛋白、R-藻红蛋白则吸附于 Chl-BLM 的表面(界面),在照光时,也起到采集光能并有效地传给叶绿素的作用。实际上即观察到 Chl-BLM 在有 R-藻红蛋白存在下,跨膜光生电动势的增涨。

对卟啉类染料,吸收光均在短波区(近紫),存在 R-藻红蛋白时也同样影响染料膜的光电势,只是加入在膜的还原侧或氧化侧不同时,电流方向有所改变,使光生电动势有所增涨或因相互抵消而有所减弱。这也说明色素蛋白参与光效应电子传递是有方向性的,这与色素的结构和与色素相结合的蛋白质的性质均有关,还有待进一步研究。

本工作得到田心棣教授的指导特此致谢。

参 考 文 献

[1] 上海植物生理研究所,北京植物研究所编著《光合作用

研究进展》科学出版社 1976 年。

- [2] 匡廷云等:《化学通报》1978 年,第 6 期,第 321 页。
- [3] Richard, P. F. Gregory.: *Biochemistry of Photosynthesis*, 2nd. Ed., 1977.
- [4] Tien, H. T.: *Brookhaven Symp. in Biology*, **28**, 105, 1977.
- [5] 梅镇安:《化学通报》1979 年,第 3 期,第 197 页。
- [6] Mueller, P. et al.: *Nature*, **194**, 979, 1962.
- [7] Strauss, G. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **17**, 425, 1973.
- [8] Calvin, M.: *Photochem. Photobiol.*, **23**, 424, 1976.
- [9] Cherry, R. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **40**, 19, 1969.
- [10] Tien, H. T.: *Bilayer Lipid Membranes (BLM) Theory and Practice*, Marcel Dekker Inc. New York, p 483, p 546, 1974.
- [11] 马金石等:《科学通报》1981 年,第 4 期,第 240 页。
- [12] 魏美德等:《太阳能学报》,1981 年,第 2 期,第 146 页。
- [13] Berns, D. S.: *Photochem. Photobiol.*, **24**, 117, 1976.
- [14] Lope, J. R. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **597**, 433, 1980.
- [15] *Topics in Photosynthesis*, **3**, edited by J. Barber 1979, (a) Chapter 2, p. 45; (b) Chapter 4, p. 115,
- [16] Ilani, A. et al.: *J. Membrane Biol.*, **8**, 333, 1972.
- [17] Chang-Hwei Chen et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 3407, 1975.
- [18] Gantt, E. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **430**, 375, 1976.

[本文于 1980 年 12 月 2 日收到]

支原体膜蛋白的溶解及酶活性的研究

陈建文 蒋以文 黄 芬

(中国科学院生物物理研究所)

生物膜主要由蛋白质和类脂组成。蛋白质和类脂在不同的支原体膜上比例各异。如莱氏衣原体膜上蛋白质为 57%,类脂为 32%。鸡败血症支原体膜上蛋白质占 80%,类脂占 19%。蛋白质(包括酶)在膜上起着重要作用。膜蛋白分为外周蛋白与内部蛋白。一般外周蛋白用中等强度缓冲液或 EDTA 可将它们全部或部分抽提下来。而内部蛋白在膜上与磷脂主要以疏

水相互作用,用去污剂或有机溶剂处理才能将膜蛋白溶解下来,但这样常使膜蛋白变性导致酶的失活。

有效地将膜蛋白溶解下来,而又不改变它的性质是研究膜蛋白的结构与功能,探讨膜蛋白与类脂相互作用的关键的一步。在莱氏衣原体膜上蛋白质大约 85—90% 是疏水蛋白。1971 年以来 Kazin^[1] 等曾用各种去污剂溶解莱氏衣