

一种分析叶绿体类囊体膜色素蛋白复合物的蓝绿温和胶电泳系统*

李贝贝¹⁾ 郭进魁¹⁾ 周 云¹⁾ 张珠珠¹⁾ 张立新^{1,2)} **

(¹⁾兰州大学生命科学学院, 兰州 730000; ²⁾中国科学院旱区寒区工程研究所, 兰州 730000)

摘要 采用蓝绿温和胶电泳系统可以非常有效地分离叶绿体蛋白质复合物, 包括 PS I, PS II, ATP 合酶, 细胞色素 b_6f 复合物, 捕光色素复合物和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶. 还结合 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳将叶绿体多亚基复合物的 50 多种蛋白质分开, 利用免疫印迹对蛋白质复合物进行了初步鉴定, 同时还应用蓝色温和胶电泳分析基质、基粒类囊体复合物的组成.

关键词 蓝绿温和胶电泳, 类囊体膜蛋白复合物, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 免疫印迹

学科分类号 Q946

叶绿体是高等真菌和植物细胞中特有的进行光合作用非常重要的细胞器, 它可以将光能转化为化学能, 固定 CO_2 . 这是一种由各种蛋白质复合物共同作用的过程, 这些复合物包括叶绿体基质的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 (RuBPase) 和与叶绿体类囊体膜结合的光系统 I (PS I), 光系统 II (PS II), ATP 合酶, 细胞色素 b_6f 复合物. 到目前为止, 利用生物化学和分子生物学的方法, 人们已经对叶绿体蛋白质进行了广泛的研究^[1].

温和胶电泳在研究叶绿体类囊体膜复合物的组成、生物发生中具有十分重要的作用, 可使叶绿体蛋白质复合物以近似天然的状态分离. 早期的温和电泳采用低浓度的 SDS 或/和非离子型去垢剂混合使用增溶类囊体膜, 只能将类囊体膜分成几条叶绿素结合蛋白 (CP) 带, 且在电泳时多数已遭破坏^[2,3]. 1991 年, Schagger 等^[4]为了研究哺乳动物和真菌线粒体中的蛋白质复合物, 建立了一种温和胶电泳系统, 并称之为 blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). 它可以真实地反映叶绿体蛋白质复合物的情况, 具有直观、高效、方便的优点和被广泛应用于同类蛋白质组研究中的潜质. 该温和胶电泳系统与其他温和胶系统最明显的区别就在于, 电泳之前, 考马斯亮蓝染液代替了阴极电极液, 从而使电泳和染色得以同时进行, 直观而快速地反映了电泳的结果^[4~6]. 在电泳时, 结合叶绿素的蛋白质复合物呈绿色, 而不含叶绿素的呈蓝色, 因此称之为蓝绿温和胶电泳. 我们以蓝绿温和胶电泳为工具, 首次在国内用于类囊体膜色素蛋白质复合物的研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

将豌豆种子于 1 g/L HgCl_2 中消毒 30 min 后, 用自来水冲洗 2 h, 水中浸泡 24 h. 在石英砂中培养 7 天, 培养间的光强为 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.2 类囊体的制备

取生长 7 天的豌豆叶片 10 g, 于 150 ml 含 330 mmol/L 山梨醇, 2 mmol/L EDTA-KOH, 1 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L Hepes-KOH, pH 7.7, 5 mmol/L 抗坏血酸的溶液中用组织捣碎机匀浆, 2 层白布过滤, 1 000 g 离心 2 min, 沉淀悬浮于 330 mmol/L 山梨醇, 50 mmol/L Hepes-KOH, pH 8.0, 1 mmol/L DTT 的溶液 (SH 缓冲液) 中, 将悬浮液置于 35%, 70% 的 Percoll 梯度上, 4 500 g 离心 5 min, 中层是完整叶绿体. 1 300 g 离心 2 min, 沉淀悬浮于 SH 缓冲液, 1 000 g 离心 2 min, 得到完整的叶绿体^[7]. 用含 50 mmol/L Hepes-KOH, pH 8.0, 1 mmol/L MgCl_2 的溶液将完整叶绿体涨破, 14 000 g 离心 5 min, 得到的沉淀为类囊体.

1.3 类囊体膜的分级分离

将类囊体浓度调至 Chl 0.4 g/L 后, 加入 0.5% 毛地黄皂甙, 冰浴中搅拌 30 min, 用含

* 教育部跨世纪优秀人才培养计划资助项目, 中国科学院百人计划资助项目和百篇优秀博士论文专项基金 (199924).

** 通讯联系人.

Tel: 0931-4967216, E-mail: zhanglx@ns.lzb.ac.cn

收稿日期: 2002-12-24, 接受日期: 2003-02-27

5 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L Hepes KOH , pH 8.0, 10 mmol/L NaF 的溶液将它稀释 10 倍, 4 000 g 离心 5 min, 弃去沉淀后将上清于 10 000 g 离心 10 min, 产生的沉淀即为基粒类囊体膜。而上清于 40 000 g 离心 30 min 后, 得到的上清 100 000 g 离心 90 min, 所得的沉淀为基质类囊体膜^[6]。

1.4 蓝绿温和胶电泳

1.4.1 凝胶制作: 凝胶于室温下, 利用梯度混合仪灌制完成, 次日再进行电泳, 分离胶是 5%~13.5% 的梯度, 浓缩胶浓度为 4%^[3]。配制方法见表 1。

Table 1 Solution for the preparation of 5%~13.5% gradient blue native gel

	Stacking (4%)	Separation (5%)	Separation (13.5%)
480 g/L acrylamide and 15 g/L bisacrylamide	0.807 ml	0.707 ml	1.91 ml
150 mmol/L BisTris, 1.5 mol/L 6-amino-caproic acid, pH 7.0	3.33 ml	2.33 ml	2.33 ml
750 g/L glycerol	0	0.47 ml	1.870 ml
H_2O	5.733 ml	3.427 ml	0.823 ml
TEMED	20 μl	7.0 μl	7.0 μl
50 g/L APS	100 μl	40.0 μl	40.0 μl
Total	10 ml	10 ml	10 ml

1.4.2 样品增溶: 类囊体用含 25 mmol/L BisTris HCl , 20% 甘油的溶液洗涤, 于 14 000 g 下离心 5 min, 沉淀悬浮于含不同去垢剂浓度的增溶溶液中, 混匀后于 14 000 g 离心 10 min, 往上清液中加入 1% Serva G 后混匀, 即可进行电泳。基粒、基

质类囊体膜用不同浓度去垢剂增溶后加入 1% 的 Serva G 即可。

1.4.3 电泳: 电极缓冲液为含 50 mmol/L Tricine, 15 mmol/L BisTris, pH 7.0 的阴极缓冲液和含 50 mmol/L BisTris HCl , pH 7.0 的阳极缓冲液。电泳在 4℃ 下进行。

1.5 SDS-脲-聚丙烯酰胺凝胶电泳

将经蓝绿温和胶分离的类囊体膜复合物胶条切下, 经样品处理液 (8 mol/L 尿素, 5% SDS, 20% 甘油, 10% 巯基乙醇, 50 mmol/L Tris HCl , pH 6.8) 室温下处理 30 min, 进行第二向电泳, 即 SDS 脲 聚丙烯酰胺凝胶电泳。室温下进行, 恒流为 25 mA。

1.6 免疫印迹

在第二向 SDS 脲 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 分离的蛋白质按照 Sambrook 等^[8]的方法电转移到硝酸纤维素膜, 硝酸纤维素膜用 5% 脱脂奶粉, 10 mmol/L Tris HCl , pH 7.5, 150 mmol/L NaCl 和 0.05% Tween 20 封闭 1 h, 加入一抗反应过夜。在和连接碱性磷酸酶的二抗反应 1 h 后, 加入底物 NBT 和 BCIP 反应至显色合适为止。D1, LIIC II, PsaA/B, RubisCO 的抗体分别来源于 Dr. Satoh, Dr. Staehelin, Dr. Gray 和 Dr. Muto。

2 结 果

2.1 用蓝绿温和胶电泳分析豌豆类囊体蛋白复合物

从图 1 可看出, 在本温和凝胶系统中尝试不同去垢剂对类囊体膜增溶和蓝绿温和胶电泳分离的效

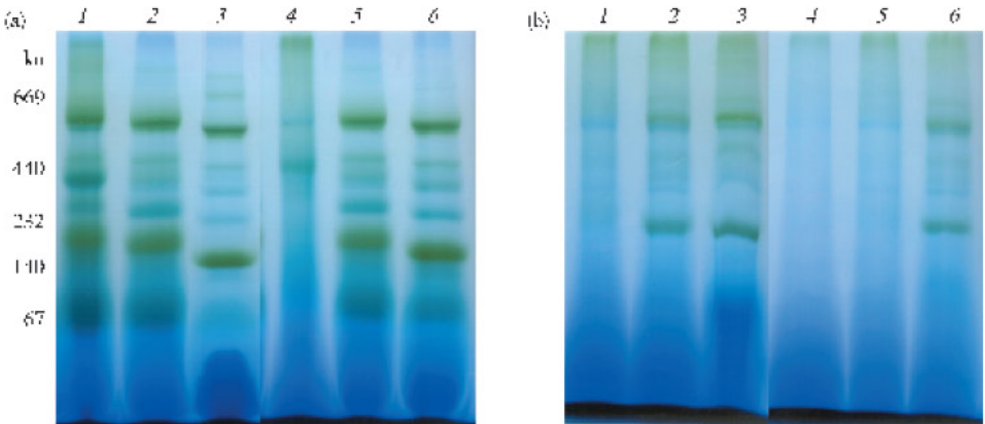


Fig. 1 Blue-native gel electrophoresis analysis of pea thylakoid membrane protein complexes

(a) Thylakoid membranes were solubilized by 0.5% (1), 1% (2) and 2% (3) DM in the presence of Chl 0.5 g/L, and 0.5% (4), 1% (5) and 2% (6) DM in the presence of Chl 1 g/L. (b) Thylakoid membranes were solubilized by 0.5% (1), 1% (2) and 2% (3) digitonin in the presence of Chl 0.5 g/L, and 0.5% (4), 1% (5) and 2% (6) digitonin in the presence of Chl 1 g/L.

果。在凝胶电泳过程中,不需染色即可显现出蓝色和绿色两种颜色的条带,含有叶绿素的蛋白复合物在该胶中是绿色条带,不含叶绿素的是蓝色条带^[5]。我们采用不同浓度的十二烷基麦芽糖苷(DM)和毛地黄皂甙,以两种不同的叶绿素初始浓度的类囊体进行增溶。采用BN-PAGE可以将豌豆类囊体蛋白分离出若干条主要条带,分子质量从不足 100 ku 到 600 ku 不等。结果发现以 Chl 0.5 g/L 为初始浓度 1% DM 处理产生的效果最好,可以将 RuBP 羧化酶和细胞色素 b_6f 复合物释放出来,产生 6 条清晰的条带(图 1a)。相比较而言,用毛地黄皂甙增溶类囊体膜时,只有少数的膜蛋白复合物被分离,这可能是由于类囊体膜蛋白复合物部分被增溶造成的(图 1b)。

2.2 类囊体复合物组成分析和复合物的鉴定

为了进一步分析类囊体蛋白质复合物的组成,将蓝绿温和胶电泳后再作 SDS-脲-聚丙烯酰胺凝胶双向电泳。在此条件下,复合物各蛋白质亚基解离,依据各自的分子质量不同而分离。用 1% DM,以 Chl 0.5 g/L 为初始浓度增溶的样品的 BN 胶条,在第二向电泳中,各蛋白质复合物的各个亚基可以被清楚地分开(图 2b)。为了确定类囊体蛋白质复合物在 BN 胶中的位置,将 SDS-脲-聚丙烯酰胺凝胶电泳胶板上的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,用 RuBP 羧化酶大亚基、LHC II、PS I 反应中心、D1 的抗体进行免疫印迹分析。PS I 的分子质量为 540 ku,在蓝绿温和胶上呈深绿色,PS I 反应中心蛋白是 PsaA/B。免疫印迹结果分析表明分子质量和蛋白质组成与文献 [1] 报道的相一致,主要由约 80 ku 的 PsaA 和 PsaB, 21~25 ku 的 LHC I 和若干小于 20 ku 的低分子质量蛋白质组成。在本实验中检测到分子质量为 450 ku 的 PS I 复合物,与 540 ku 的 PS I 复合物相比较,发现该 PS I 复合物缺少 LHC I 及若干蛋白质。RuBP 羧化酶在蓝绿温和胶中的分子质量大约为 430 ku,呈蓝色,即不含叶绿素,在第二向中可以被分为 2 种蛋白质,分子质量分别是 53 ku 和 13 ku。第一向电泳中最多的绿色蛋白质条带是 LHC II,它的分子质量大约为 180 ku。D1 免疫印迹检测到分子质量为 260 ku 和 230 ku 的 PS II 蛋白复合物,结合第二向 SDS-脲-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明:260 ku 是 PS II 蛋白复合物,即含有 CP47、CP43、

D2 和 D1 等蛋白质;而分子质量为 230 ku 的是 CP43 缺失的 PS II 蛋白复合物。

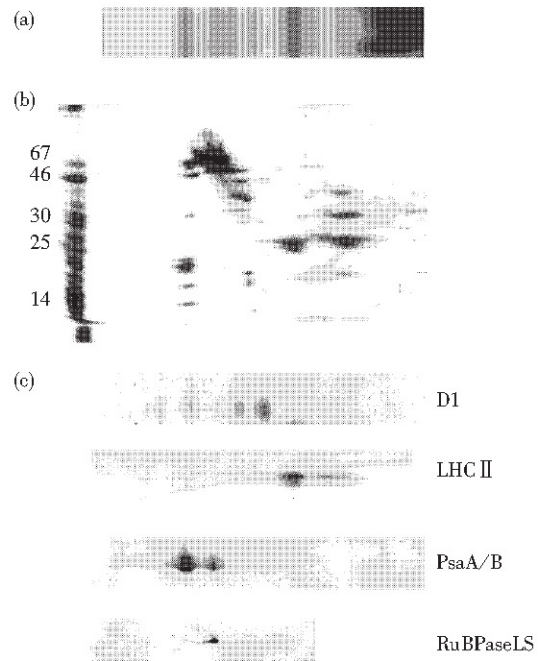


Fig. 2 Two dimensional analysis of protein composition of thylakoid membrane pigment protein complex separated by blue native gel electrophoresis and immunoblotting identification

A lane of a blue-native gel (a) was cut out and transferred horizontally on a SDS- urea-polyacrylamide gel for electrophoresis in the second dimension (b). The two-dimensional separated proteins were electroblotted onto NC membranes and immunodetected with antibodies of against specific protein components of thylakoid membrane protein complexes (c).

2.3 基质和基粒类囊体膜复合物的组成分析

叶绿体类囊体膜分为基质和基粒类囊体膜;基质类囊体膜以 PS I 为主,基粒类囊体膜富含 PS II^[9]。将分级分离得到的基质和基粒类囊体膜,以 Chl 0.5 g/L 为初始浓度,用 1% DM 增溶,以分析其中色素蛋白复合物组成的变化。结果表明,基质和基粒类囊体膜蛋白复合物的组成差异显著,进一步证明了 PS I 和 PS II 在基质和基粒类囊体膜的分布^[9]。在蓝绿温和胶电泳分离基质和基粒类囊体膜后,在 SDS-脲-聚丙烯酰胺凝胶电泳系统中进行第二向电泳。该结果进一步说明基质和基粒类囊体膜的色素蛋白复合物的多肽组成(图 3)。

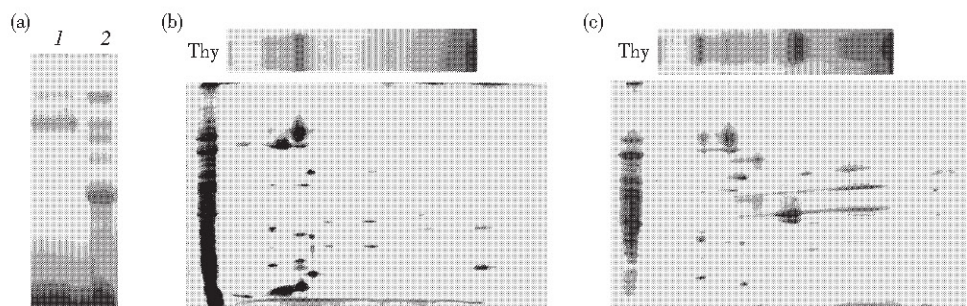


Fig. 3 Analysis of stromal thylakoid and granal thylakoid membrane protein complexes

The stromal thylakoid and granal thylakoid membrane protein complexes (a: 1, 2) were solubilized by 1% DM, then lanes of blue-native gel were placed on urea-SDS gels and two-dimensional map of thylakoid membrane protein complexes are shown (b, c).

3 讨 论

温和电泳系统可以使叶绿体蛋白质复合物在近似天然的状态下分开, 但是对疏水性蛋白质的分离效果往往不好. 为了解决这个困难, 科学家在绿色温和胶电泳系统中, 进行了电泳之前先用离子去垢剂处理样品的改进, 以使蛋白质从膜上分离下来, 取得了很好的结果^[3,10]. 而蓝绿温和胶电泳系统不采用离子去垢剂, 而是在电泳之前, 将蛋白质与考马斯亮蓝染液共存, 使蛋白质带上负电荷, 屏蔽了各复合物自身电荷, 从而使得蛋白质复合物根据自身分子质量的不同而在蓝色温和胶电泳系统得到更好的分离, 条带更清晰 (图 1). 这种方法可以同时在一块胶上将光系统 I、光系统 II、细胞色素 b_6/f 复合物、捕光复合物 II、ATP 合酶和 RuBP 羧化酶分开. 进一步在变性条件下进行第二向凝胶电泳, 各个蛋白质的亚基可以根据其分子质量而分开 (图 2). 采用该方法对基质和基粒类囊体膜进行了色素蛋白复合物组成分析 (图 3), 得到的结果证实了关于基质和基粒类囊体膜蛋白复合物分布的结果^[9]. 因此, 蓝绿温和胶电泳系统是一种非常有效的、可以根据分子质量的不同而将完整的蛋白质复合物区分开的可靠方法.

蓝绿温和胶电泳系统还具有游离色素少的特点. 蓝绿温和胶电泳后, 大部分蛋白质复合物都保持其完整性, 但是捕光复合物 II 从 PS II 中解离出来, PS II 部分解离为两个亚复合物. 其中一种为完整的 PS II 复合物, 而另外一种为 CP43 缺失的复合物^[4~6]. 在本实验中检测到豌豆 PS I 的亚复合物的存在, 该结果证实豌豆 PS I 存在异质性^[11].

与其他温和胶系统相比, 本凝胶系统可以同时分离多种蛋白质复合物, 具有直观、快速的突出特点, 分离和染色同时进行. 我们用此方法分析豌豆的类囊体蛋白复合物, 得到了满意的结果, 为叶绿体蛋白质组学、叶绿体生物发生的研究提供了良好的工具.

参 考 文 献

- 1 Wollman F A, Minai L, Nechushtai R. The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1411** (1): 21~81
- 2 杜林方, 林宏辉, 潘用华, 等. 一种用于色素蛋白分离的新凝胶系统. *生物化学与生物物理进展*, 1995, **22** (3): 268~272
- 3 Du L F, Lin H H, Pan Y H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 1995, **22** (3): 268~272
- 4 Peter G F, Thornber J P. Electrophoretic procedures for fractionation of Photosystems I and II pigment-proteins of higher plants and for determination of their subunit composition. *Meth Plant Biochem*, 1991, **5**: 195~210
- 5 Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 1991, **199** (2): 223~231
- 6 Kügler M, Jansch L, Kruft V, *et al.* Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). *Photosyn Res*, 1997, **53** (1): 35~44
- 7 Zhang L, Paakkari V, Suorsa M, *et al.* A SecY homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis. *J Biol Chem*, 2001, **276** (41): 37809~37814
- 8 Zhang L, Paakkari V, van Wijk K J, *et al.* Co-translational assembly of the D1 protein into Photosystem II. *J Biol Chem*, 1999, **274** (23): 16062~16067
- 9 Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 18.48~18.54
- 10 Wollenberger L, Stefansson H, Yu S G, *et al.* Isolation and characterization of vesicles originating from the chloroplast grana margins. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1184** (1): 93~102

- 10 Anderson B, Andersson J M, Ryrie I J. Transbilayer organization of the chlorophyll-proteins of spinach thylakoids. *Eur J Biochem*, 1982, **123** (2): 465~472
- 11 郑彩霞, 高荣孚. 豌豆光系统 I 的异质性. *科学通报*, 1998,

43 (18): 1973~1977

Zheng C X, Gao F R. *Chin Sci Bull*, 1998, **43** (18): 1973~1977

Blue Native Gel Electrophoresis Analysis of Chloroplast Pigment Protein Complexes*

LI Bei-Bei¹⁾, GUO Jin-Kui¹⁾, ZHOU Yun¹⁾, ZHANG Zhu-Zhu¹⁾, ZHANG Li-Xin^{1,2)} **

(¹⁾ *School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;*

²⁾ *Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)*

Abstract Blue-native polyacrylamide gel electrophoresis is a very powerful procedure that can be used to analyze the components of chloroplast protein complexes. The two photosystems, the ATP synthase, the cytochrome complex b_6f complex, the light-harvesting complexes and the RubisCO are well resolved. Analysis of chloroplast protein on a second gel dimension allows separation of more than 50 different proteins which are part of multi-subunit enzymes. Western blotting analysis was also used to confirm the identity of the complex. The method has been used to analyze protein complexes of grana and stromal thylakoid.

Key words blue-native polyacrylamide gel electrophoresis, thylakoid membrane protein complexes, Western blotting

* This work was supported by grants from The Trans-Century Training Program Foundation for The Talents by The Ministry of Education, One Hundred Talent Project and Excellent Ph. D thesis foundation (199924).

** Corresponding author. Tel: 86-931-4967216, E-mail: zhanglx6@ns.lzb.ac.cn

Received: December 24, 2002 Accepted: February 27, 2003