

蓝藻叶绿素蛋白复合体的分离研究^{*}

李桐柱

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要 蓝藻类囊体膜用声波超时处理, 然后在 4℃下用低浓度的 LDS 增溶, 并经改进的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后被分离成 15 条绿色的带. 其中 CPa1~CPa6 有着相似的吸收光谱. 这 6 个组分的低温荧光光谱也很相似, 其荧光发射光谱的发射峰都位于 685 nm 处, 表明它们都属于光系统 II 叶绿素 a 蛋白复合体. 该系统对光系统 II 的分离能力是传统电泳的 3 倍.

关键词 凝胶电泳, 叶绿素蛋白复合体, 分辨率, 吸收光谱, 荧光光谱

学科分类号 Q946

凝胶电泳是带电粒子在直流电场中通过人工合成的凝胶作支持介质而达到分离目的的电泳方法. 由它具有简便、快速、分辨率高等特点而受到人们的青睐, 以致成为当代生化和分子生物学研究不可缺少的手段. 但随着研究工作的深化, 人们要求其具有更高的分辨率. 经过长期实践, 我们发展了一种用于分离叶绿素蛋白的凝胶电泳系统, 其分辨率高于目前国际上的同类系统^[1,2]. 可以预料该系统对各种蛋白质都有很高的分辨率及广泛的应用前景.

1 材料和方法

1.1 实验材料和培养方法

实验所用蓝藻为 *Anacystis nidulans* 625. 用 Allen 培养基在 35~39℃中通气培养. 以日光灯为光源在光强 3 000 lx 条件下每天照光 10~12 h, 7 d 后收集藻体.

1.2 类囊体膜的制备

用离心机在 $2\,000 \times g$ 离心 10 min 沉淀藻体. 将沉淀的藻体悬浮在等体积的 50 mmol/L Tricine-NaOH (pH 8.0) 悬浮液中. 用 250 CSF-74 型超声波发生器超声处理 60 min. 然后加入等体积的悬浮液, 用超速冰冻离心机在 $150\,000 \times g$ 离心 60 min. 倒掉上清液, 沉淀用悬浮液匀浆. 上述离心洗涤步骤需重复 3 次, 直至离心后的上层液不呈现蓝紫色为止. 最后

将洗涤过的膜组分悬浮在 50 mmol/L Tricine-NaOH (pH 8.0) / 25% 甘油匀浆液中, 使叶绿素浓度达 1~2 g/L, 并置于液氮中保存备用.

1.3 凝胶制备

新的不连续的聚丙烯酰胺凝胶电泳系统由分离胶和浓缩胶组成. 分离胶含有 8% 丙烯酰胺, 0.85 mol/L Tris-HCl (pH 9.18), 0.1% 过硫酸铵和 0.05% (体积比) TEMED. 浓缩胶含有 4% 丙烯酰胺, 0.0541 mol/L Tris-H₂SO₄ (pH 6.1), 0.1% 过硫酸铵和 0.05% TEMED. 其中丙烯酰胺与 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺的重量比为 30:0.8. 凝胶管长 7.2 cm, 内径为 0.8 cm, 内加分离胶 3.2 ml, 浓缩胶 0.5 ml. 上槽电极液为含有 0.1% SDS 的 41 mmol/L Tris-硼酸 (pH 8.64) 缓冲液, 下槽液为 0.43 mol/L Tris-HCl (pH 9.18).

1.4 样品增溶和电泳

纯化的类囊体膜在冰浴中加入 0.3 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) / 1% LDS 的增溶液, 使最后 LDS 与叶绿素的重量比为 10:1, 叶绿素浓度为 0.5 g/L 的条件下进行增溶. 增溶样品在 0℃下用 $40\,000 \times g$ 离心 10 min, 除去沉淀. 每支凝胶加膜增溶物 40 μl, 在 4℃下用 2.5 mA/支的电流强度进行电泳分离, 整个分

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39170071).

收稿日期: 1998-02-18, 修回日期: 1998-04-16

离过程约需 4~5 h.

2 实验结果

当蓝藻类囊体膜的增溶物用新的不连续的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离时, 共分成 15 条绿色的带. 根据电泳迁移率的增加顺序, 自上而下分别是 CPIa, CPIb, CPIc, CPId, CPIe, CPIf, CPIg, CPIh, CPa1, CPa2, CPa3, CPa4, CPa5, CPa6 和 FC (图 1). 与以前的分离结果^[3]相比, CPa 组分由 4 个增加到 6 个, 其分辨率是传统方法^[4,5]的 3 倍, 但 CPI 的分离结果则基本保持不变.

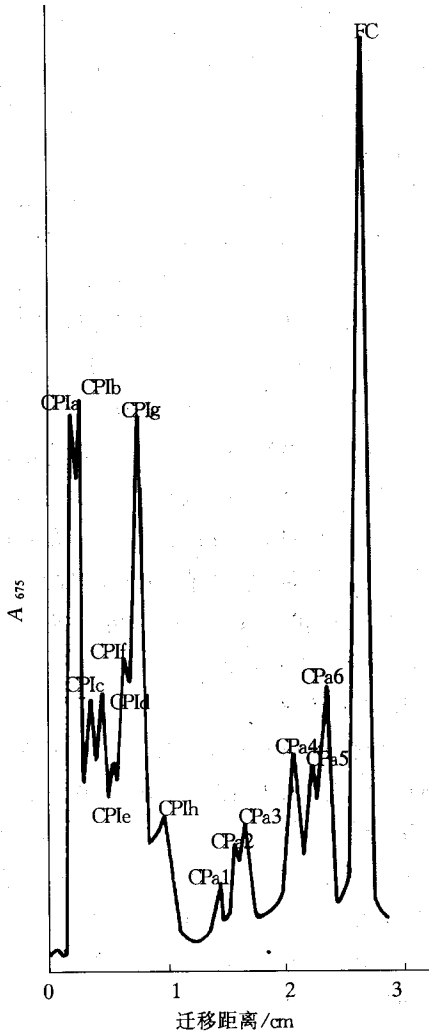


图 1 凝胶中叶绿素带在 675 nm 处的吸光度扫描图

图 2 为 CPa1-CPa6 在室温下的吸收光谱. 由图 2 看出 6 种组分的吸收光谱相似, 它们在红区的吸收峰位于 670~673 nm 附近, 而在蓝区的吸收峰都位于 436 nm 处. 与 CPI 相比, 蓝峰的位置相同, 而红峰则蓝移了 4~6 nm^[3,5]. 另外在 460~500 nm 处的吸收肩为类胡萝卜素的吸收带.

蓝藻类囊体膜在低温下有三个荧光发射带, 其中在 685 nm 和 695 nm 附近的发射带与光系统 II 有关, 而在 726 nm 附近的发射带则与光系统 I 有关. CPa1~CPa6 在 77 K 的荧光发射峰都位于 685 nm 处 (图 3), 表明它们都属于光系统 II 叶绿素 a 蛋白复合体. 这些组分的低温荧光激发光谱在 416 nm 和 438 nm 处具有 2 个相同的激发峰 (图 4), 说明它们所含的这两种状态的叶绿素比例大致相等, 它们都能增进 685 nm 的荧光发射.

CPIa~CPIh 8 种组分都属于光系统 I, FC 为游离色素带.

3 讨 论

蛋白质混合样品经过聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 被分离的不同蛋白质组分的电泳迁移率互不相同. 这种差异主要是由于各种蛋白质组分所带的净电荷以及分子的形状和大小等因素的不同引起的. 但如果在待分离样品中加入一定数量的 SDS, 则蛋白质的电泳迁移率便主要取决于分子质量的大小, 而其他因素对迁移率的影响可以忽略不计^[6]. 这是因为 SDS 是一种阴离子去污剂, 它能破坏蛋白质分子之间以及蛋白质与其他物质分子之间的非共价键连结, 使蛋白质变性而改变原有的形状. 蛋白质分子与 SDS 充分结合之后, 所带的电荷大大超过了蛋白质分子原有的电荷量, 因而也就掩盖或消除了不同种类蛋白质分子之间原有的电荷差异. 蛋白质-SDS 复合物在水溶液中的形状类似于长椭圆棒. 不同蛋白质-SDS 复合物, 其椭圆棒短轴长度是恒定的, 而长轴的长度则与蛋白质分子质量的大小成正比例地变化. 这样的蛋白质-SDS 复合物在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶

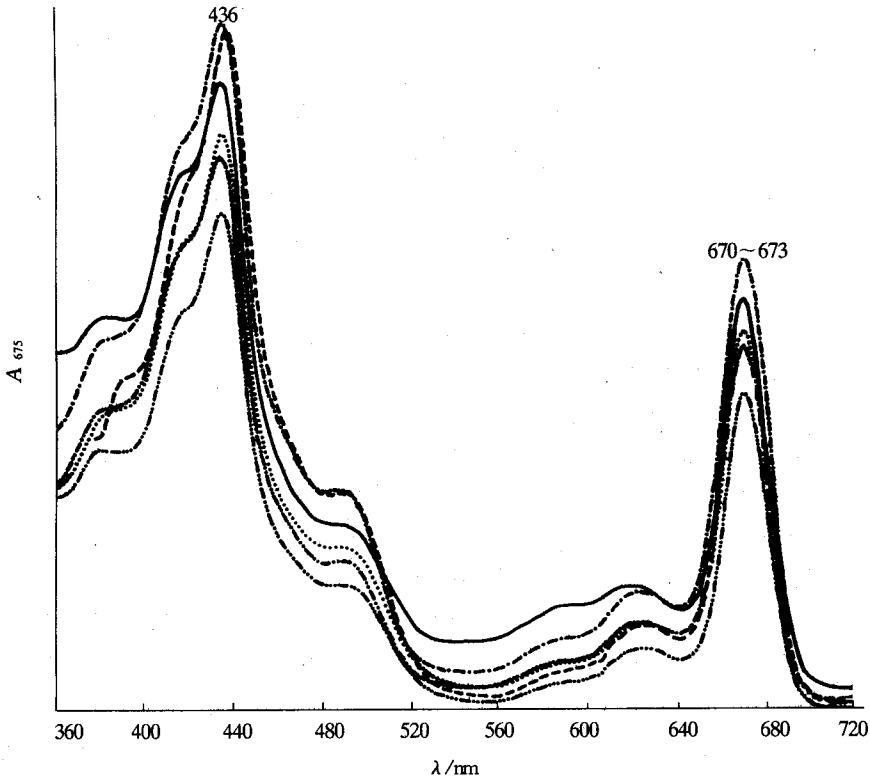


图2 CPa1~CPa6在室温下的吸收光谱

—: CPa1; ----: CPa2;: CPa3; - · - ·: CPa4; — · — ·: CPa5; — · · · — ·: CPa6.

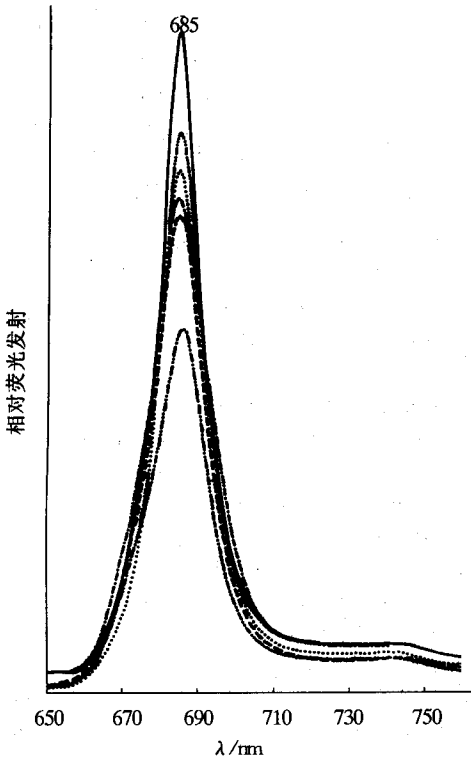


图3 CPa1~CPa6在77 K的荧光发射光谱
激发波长为436 nm.

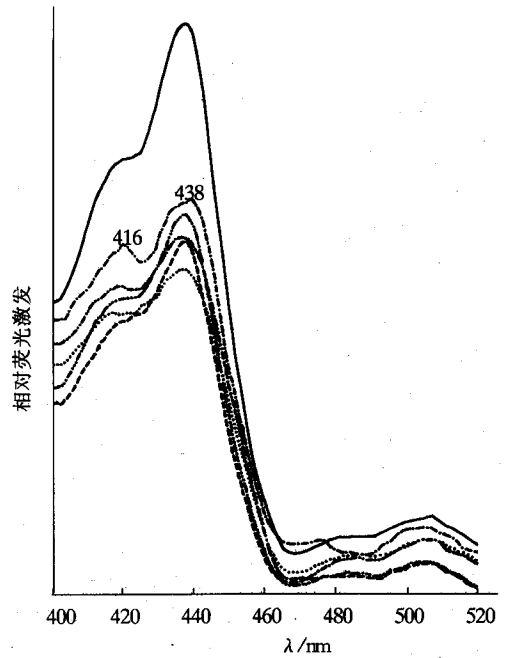


图4 CPa1~CPa6在77 K的荧光激发光谱
发射波长为685 nm.

电泳中的迁移率便不再受蛋白质原有电荷和形状等因素的影响, 而主要取决于椭圆棒长度即蛋白质分子质量大小这一因素. 组成光合膜的叶绿素蛋白复合体是脂溶性的膜蛋白, 只有当它们跟去污剂 SDS 结合形成色素蛋白-SDS 复合物后才能溶解或分散于水溶液之中, 也只有这样才能对其组分进行分离和鉴定. 但加入 SDS 又同时破坏叶绿素蛋白复合体中蛋白质和叶绿素之间的非共价连结, 从而导致叶绿素从蛋白质上脱落下来, 使复合体受到严重破坏. 这种破坏作用对光系统 II 叶绿素 a 蛋白复合体 CPa 组分尤其严重, 高浓度的 SDS 会使这些色素蛋白带因分解而完全消失. 为使色素蛋白免遭破坏, 在样品处理方面做了一系列的研究^[3, 5, 8]. 用物理和化学相结合的处理方法较为理想, 也就是在制备类囊体膜时先用声波对藻体进行充分的破碎处理. 这不只是为了打破细胞壁, 而且可以打断类囊体膜上各种色素蛋白分子之间的相互联系. 经过这样处理的样品再用 LDS 代替 SDS 进行化学增溶时就可将其浓度降低 1 倍. 这里 LDS (十二烷基硫酸锂) 的增溶力跟 SDS (十二烷基硫酸钠) 基本相同, 但 LDS 在低温条件下不像 SDS 那样容易产生沉淀, 所以更适于类囊体膜的增溶. 而且除上槽电极液外, 整个电泳系统的 SDS 都将除去不用, 从而使去污剂对色素蛋白的损伤作用降低到最低点. 实验证明不同的声波处理时间在相同的电泳系统中的分离结果有着明显的不同. 传统的电泳系统最多只能将其分成 6 种色素蛋白组分, 其中 4 种属于光系统 I, 2 种属于光系统 II. 延长声波处理时间只能使光系统 II 的 2 个组分的含量增加, 但色素带的数目不变. 显然这是由于传统电泳系统的分辨率所限. 而在改进的新系统中, 一次可将破碎 30 min 的膜分成 12 个色素蛋白组分, 即将传统电泳中的每个色素蛋白带一分为二, 这在属于光系统 II 的色素蛋白带看得最清楚, 从而使新系统的分辨率提高了 1 倍. 现将处理时间延长到 60 min, 从分离结果看出光系统 I 的 8 个组

分改变不大, 而位于传统电泳光系统 II 位置上的 2 个色素蛋白带则又一分为三, 从而使其对光系统 II 的分辨率提高了 2 倍. 新系统之所以有较高的分辨率, 是由于调整了凝胶中缓冲系统的浓度, 使凝胶对样品的浓缩作用、缓冲作用及凝胶本身的分子筛作用进一步增强的结果. 新系统的另一个优点是在整个电泳过程中色素带的扩散作用非常小, 从而使各色素带之间的界限更加清晰, 给测定工作带来了极大方便. 而传统电泳不仅分辨率低, 而且在电泳中色素带扩散严重, 使凝胶上部分离出的带在向下移动过程中每条带变得越来越宽, 最后导致带与带之间界限不清, 甚至使各带连成一体, 使分离工作归于失败. 新系统不仅对色素蛋白有很高的分辨率, 对脱辅基蛋白也是一样. 用该系统所做的多肽分析表明 CPa5 含有 3 种分子质量为 36 ku 左右的同工蛋白, 而 CPa6 则含有 4 种分子质量在 28 ku 左右的同工蛋白成分. 而一般的多肽分析则难于将这些分子质量如此接近的同工蛋白分开, 一般只把它们当作一种成分. 这里的 CPa6 色素蛋白带就是蓝藻光系统 II 中担负光能转化任务的 D1 组分. 此结果跟基因工程的研究结果相似^[8]. 同时也是首次用简单的凝胶电泳方法证明 D1 组分是一种含叶绿素 a 的叶绿素蛋白复合体.

参 考 文 献

- 1 Yamagishi A, Katoh S. Two chlorophyll-binding subunits of the photosystem 2 reaction center complex isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. Arch Biochem Biophys, 1983, **225** (2): 836~846
- 2 Pakraci H B, Riethman H C, Sherman L A. Organization of pigment proteins in the photosystem 2 complex of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, **82** (20): 6903~6907
- 3 李桐柱, 林世青 (Li T Z, Lin S Q). 一个高分辨率的凝胶电泳系统及其从蓝藻中分离叶绿素蛋白复合体. 植物学报 (Acta Botanica Sinica), 1995, **37** (1): 34~40
- 4 Guikema J A, Sherman L A. Electrophoresis profiles of cyanobacterial membrane polypeptides showing heme-dependent peroxidase activity. Biochim Biophys Acta, 1981, **637** (2): 189~201

(下转第 475 页, Continued on page 475)

- 3 Fang G, Weiser B, Visosky A A. Molecular cloning of full-length HIV-1 genomes directly from plasma viral RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1996, **12** (4): 352~ 357
- 4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, (162): 156~ 159
- 5 陈勇, 柴少爱, 洪艳等 (Chen Y, Chai S A, Hong Y *et al*). 甲肝病毒减毒活疫苗 (H₂ 株) 的 cDNA 克隆及序列分析. *浙江省医学科学院报 (Acta Academiae Medicinae Zhejiang)*, 1995, (21): 3~ 4
- 6 林万明 (Lin W M). PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社, 1995. 7~ 8

The RT-PCR Amplification of Full Length RNA of Hepatitis A Virus H₂ Strain. ZHOU Xiang, TAN De-yong, LAI Jian-hua, ZAN Rui-guang (*Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China*).

Abstract A method for RT-PCR amplifying long fragments cDNA was established and the

7.4 kb full-length cDNA of Hepatitis A virus (HAV) H₂ strain was amplified by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). HAV H₂ was precipitated by anti-H₂ serum specifically, then the RNA of HAV H₂ was isolated from this precipitation by acid guanidinium hydrochloride-phenol-chloroform extraction. The first-strand of HAV H₂ cDNA was synthesised by reverse transcriptase without RNase H activity, then was amplified by PCR using the 32mer primer and the Taq DNA polymerase with Deep Vent DNA polymerase. For obtaining longer PCR products, it is necessary to prepare high quality RNA and employ the longer primers and special Taq DNA polymerase.

Key words hepatitis A virus H₂ strain, full length RNA, RT-PCR amplification

(上接第 468 页, Continued from page 468)

- 5 李桐柱, 匡廷云 (Li T Z, Kuang T Y). 一种聚球藻属蓝藻类囊体膜上的光系统 II 叶绿素蛋白复合体. *海洋与湖沼 (Oceanology and Limnology Sinica)*, 1988, **19** (3): 232~ 237
- 6 Shapiro A L, Vinuela E, Maizel J V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Comm*, 1967, **28** (5): 815~ 820
- 7 李桐柱, 匡廷云 (Li T Z, Kuang T Y). 从超声波破碎的蓝藻类囊体膜中分离的叶绿素蛋白复合体. *植物学报 (Acta Botany Sinica)*, 1989, **31** (1): 29~ 35
- 8 Vrba J M, Curtis S E. Characterization of a four-member psbA gene family from the cyanobacterium *Anabaena PCC7120*. *Plant Mol Biol*, 1989, **14** (1): 81~ 92

Studies on Separation about Chl-Protein Complexes of Blue-green Algae. LI Tong-zhu (*Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*).

Abstract When the thylakoid membranes of blue-green algae broken over a longer time than usual by sonication were solubilized with low concentration of LDS and subjected to discontinuous SDS-PAGE improved at 4 °C, 15 containing chl bands for the first time was resolved. CPa1-CPa6 of them had similar absorption spectra. The fluorescence spectra of CPas at 77 K were very similar too, all having a emission peaks at 685 nm. It is concluded that 6 CPas were chl α protein complexes of PS II. The resolved capability to PS II of the new system were 3 times of the popular ones.

Key words gel electrophoresis, chl protein complexes, resolution, absorption spectra, fluorescence spectra