

海洋管藻目绿藻刺松藻光系统 I 复合物的分离

陈 敏* 李爱芬

(烟台大学生物化学系, 烟台 264005)

周百成

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 采用 Triton X-100 蔗糖密度梯度离心法, 从管藻目绿藻刺松藻中分离到三种不同形式的光系统 I (PS I) 复合物. 区带 III 富含 PS I 核心复合物 (CC I), 叶绿素 (Chl) a/b > 20, 在温和的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 中只显示一条 PS I 中心复合物 CPI 条带. 区带 IV 和 V 在 436 和 674 nm、467 和 650 nm 以及 540 nm 的吸收表明, 含有 Chl a、b 及管藻黄素和管藻素, Chl a/b 比值分别为 3.23 和 2.4. 经 PAGE 检测, 有 CPI 和 CPI a 两种 PS I 色素蛋白复合物带, 因此区带 IV 和 V 是由 CC I 和含量不等的捕光复合物 LHC I 构成的 PS I 颗粒. 区带 III 只有 66 和 56 ku 两种核心多肽; 区带 IV 和 V 除了 66、56 ku 多肽以外, 还有 4 种分子质量为 25、26、26.2 和 27.5 ku 的 LHC I 多肽. 室温荧光光谱显示, 分离物中的各种光合色素之间保持着良好的能量传递关系, 由 Chl b 及管藻黄素和管藻素吸收的能量都可以传递给 Chl a.

关键词 光系统 I 复合物, 蔗糖密度梯度离心, 多肽, 刺松藻

学科分类号 Q946

管藻目藻类是绿藻中较为原始的一类, 因兼有绿色植物和杂色植物的特点, 在系统进化中占有特殊的地位. Anderson^[1]和曾呈奎等^[2]曾报道, 某些管藻目绿藻的叶绿体或类囊体膜没有高等植物作为光系统 I (PS I) 标志的 730 nm 长波荧光, 说明其 PS I 的结构及能量传递方式可能具有特异性. 因此, 对管藻目绿藻 PS I 的分离和研究对于探讨光合系统结构多样性以及光合生物的进化将具有重要意义. 目前, 大多数报道都采用温和的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 可分离到 2~6 种解离程度不同的 PS I 复合物, 但是除了 Itagaki^[3]和 Benson^[4]之外未涉及多肽组成的研究. 由于 SDS 的作用剧烈, 而电泳分离过程本身对色素蛋白复合物也会产生一定的影响, 因此 Anderson^[5]采用了较为温和的非离子型去污剂 Triton X-100 增溶, 并结合蔗糖密度梯度离心法从一种未定名的松藻 (*Codium* sp.) 中分离到一种 PS I 复合物. 分离物的光谱特性及多肽构成与 PAGE 法得到的结果有所差异^[3,6]. 因此管藻目绿藻 PS I 的结构还有待于进一步的比较和确定. 本文以管藻目绿藻刺松藻 (*Codium fragile*) 为材料, 改变分离方法, 得到了包括核心复合物在内的三种不同形式的 PS I 颗粒, 并对其多肽及光谱特性等进行了研究.

1 材料与方法

1.1 叶绿体及类囊体膜的制备

刺松藻 (*Codium fragile*) 于每年 9~11 月采自青岛汇泉湾. 参照 Anderson^[1]的方法制备叶绿体和类囊体膜.

1.2 类囊体膜的增溶及初步离心分离

类囊体膜的处理参照 Anderson^[5]方法稍加改变. 将类囊体膜用含有 50 mmol/L 山梨醇的 7.5 mmol/L EDTA 溶液 (pH 8.0) 洗涤两次, 12 000 × g 离心收集. 将沉淀重新悬浮于重蒸水中, 用 Tricine 三乙醇胺调 pH 至 7.8, 控制叶绿素浓度为 0.8 g/L. 然后加入 20% Triton X-100 至终浓度为 0.7%, 于 4℃ 震荡增溶 30 min. 增溶后的类囊体膜于 30 000 × g 离心 10 min, 上清液用于蔗糖密度梯度离心.

1.3 复合物的蔗糖密度梯度离心分离

在 5 ml 离心管中由下至上铺设不连续蔗糖梯度, 依次为 1.5 mol/L (0.5 ml)、0.8 mol/L (0.5 ml)、0.6 mol/L (1 ml)、0.5 mol/L (1 ml)、0.4 mol/L (1 ml) 和 0.3 mol/L (0.5 ml), 各含

* 通讯联系人.

Tel: 0535-6223671, E-mail: chenmclm@public.ytptt.sd.cn

收稿日期: 2001-01-17, 接受日期: 2001-04-27

0.02%的 Triton X-100. 将初步离心得到的上清液加入管顶, 上样量 0.5 ml/管. 采用 Hitachi 55P-72 SW-41 型水平转头, 于 4℃、220 000 × *g* 离心 12 ~ 14 h.

1.4 类囊体膜复合物及离心分离物的分离检测

类囊体膜的增溶与梯度离心法相同, 增溶液于 8 000 × *g* 离心 10 min, 取上清液上样. 梯度离心得到的各区带不需增溶, 直接上样. 复合物的分离参照李桐柱等^[7]的方法稍加改进. 分离胶浓度为 10%. 电泳后的结果立即照相.

1.5 叶绿素浓度及 Chl a/b 比值的测定

取梯度离心得到的含有色素的区带各 0.1 ml, 依 Arnon^[8]的方法测定叶绿素 (Chl) 的浓度和 Chl a/b 比值.

1.6 常温吸收光谱及荧光光谱测定

将梯度离心得到的区带迅速用预冷的 50 mmol/L 的 Tricine-NaOH (pH 8.0) 缓冲液稀释, 在岛津 UV-3000 紫外-可见分光光度计上测定吸收光谱.

采用日立-851 型荧光分光光度计测定室温荧光光谱.

1.7 多肽组成分析

将梯度离心得到的各区带在 4℃对固体蔗糖透析, 浓缩至叶绿素浓度为 0.2~0.6 mol/L. 将待测样品与样品处理液 (含 4% SDS、10% 巯基乙醇、20% 甘油、0.005% 溴酚蓝及 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 6.8) 等体积混和, 在室温下放置 2 h 以上, 参照 Laemmli^[9]的方法进行多肽分析. 堆积胶和分离胶中各含有 1 mol/L 和 4 mol/L 的脲. 染色液中乙醇: 乙酸: H₂O = 50: 7: 43, 含有 0.25% 的考马斯亮蓝 R250, 脱色液中乙醇: 乙酸: H₂O = 25: 7: 68.

2 结 果

2.1 色素蛋白复合物的蔗糖梯度离心分离及鉴定

经 Triton X-100 增溶后的类囊体膜, 在 30 000 × *g* 初步离心, 上清液经过蔗糖梯度离心后得到了 5 个区带, 自上而下依次称为区带 I、II、III、IV、V (图 1). 绿色的区带 I 位于顶部 0.3 mol/L 梯度内, 主要是游离色素 (FP). 深褐绿色的区带 II 处于 0.4 mol/L 蔗糖梯度区的中部, PAGE 检测结果显示该条带富含 PS II 捕光复合物 LHCP₁ 及 LHCP_{3+3'}, 此外还杂有少量的 PS II 和 PS I 中心复合物 CPa 和 CP I. 区带 III 则呈鲜绿色, 处于 0.5

~ 0.6 mol/L 蔗糖梯度交界处, PAGE 结果只有 CP I 一条带, 因此是 PS I 核心组分. 区带 IV 和区带 V 都呈浅黄褐色, 分别在 0.6 mol/L 梯度底部和 0.8~1.5 mol/L 梯度界面处, PAGE 结果除了 CP I 条带以外, 还有含量不同的 CP I a 条带, 因此两者是解离程度不同的 PS I 颗粒. 此外, 在离心管底部的少量沉淀为未去除的类囊体膜碎片.

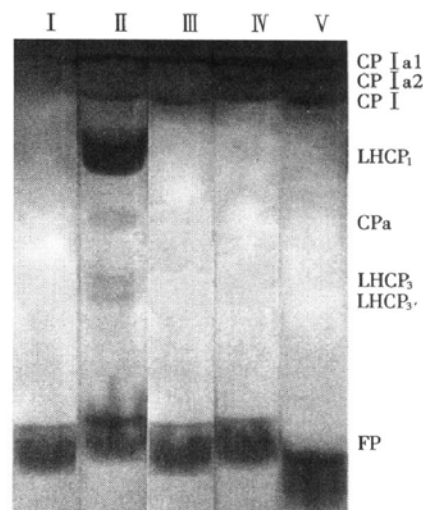


Fig. 1 Mild PAGE profiles of zones isolated by sucrose gradient centrifugation

2.2 PS I 复合物室温吸收光谱及荧光光谱

区带 III (CC I) 基本只有叶绿素 a (Chl a) 的吸收峰, 在 436 和 673 nm (图 2), Chl a/b 比值大于 20. 而区带 IV 和区带 V 的蓝区明显增加了 Chl b 的吸收, 在 467~469 nm, 红区的 650 nm 肩峰也

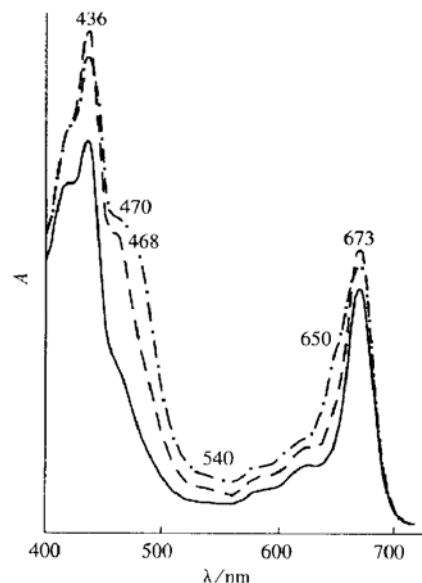


Fig. 2 Absorption spectra of PS I complexes of *C. fragile*

—: III; ---: IV; - · - · -: V.

很明显. Chl a/b 比值分别为 3.23 和 2.4. 区带 V 的 Chl b 峰高于区带 IV, 说明结合着更多的 PS I 捕光复合物 (LHCI). 两区带在 540 nm 处的肩峰, 对应于管藻黄素和管藻素的吸收.

CCI 和两种 PS I 颗粒在室温下分别发射 685 和 683 nm 的荧光 (图 3), 在此发射波长下测定的激发光谱中, Chl a、Chl b 及管藻黄素和管藻素的激发峰分别在 440、472~475 nm 和 538~540 nm (图 3). 表明分离出的 PS I 复合物中, 各种色素对该荧光都有贡献.

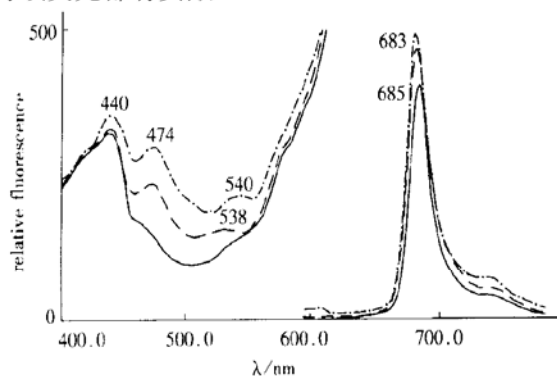


Fig 3 Fluorescence spectra of PS I complexes of *C. fragile* at room temperature

Left: excitation spectra (The emission wavelength was at 683 nm); Right: emission spectra (The excitation wavelength was at 436 nm). —: III; - - - -: IV; - · - · -: V.

2.3 多肽组成分析

SDS-PAGE 的结果显示, 区带 III 中只有 66、56 ku 两种多肽 (图 4). 而区带 IV 和区带 V 含有 66、56 及 4 种小分子质量 LHCI 多肽, 分别为 25、26、26.2 和 27.5 ku. 区带 V 中的 LHCI 多肽的

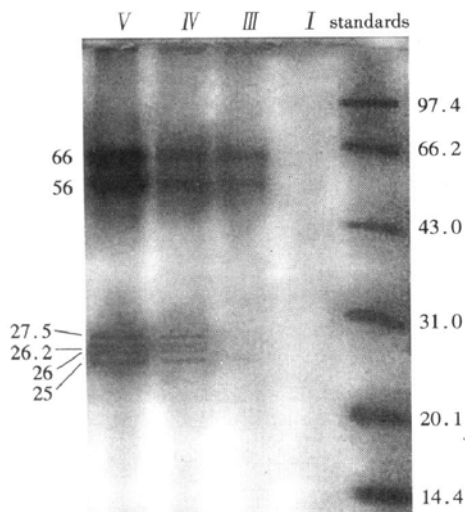


Fig 4 Peptides analysis of PS I complexes of *C. fragile*

含量明显高于区带 IV. 这一结果与 PAGE 分离的大羽藻 PS I 复合物 CPI_{a1~6} 的多肽组成相似^[3]. 但没有检测到松藻 LHCI 的 19 ku 多肽^[10].

3 讨 论

管藻目绿藻的 PS I 由核心复合物 CCI 和捕光复合物 LHCI 构成^[10], 由于 LHCI 的解离程度不同而呈现出不同的颗粒形式. 本文采用 Triton X-100 蔗糖密度梯度离心法分离出三种形式的 PS I 复合物, 经 PAGE 检测, 没有 PS II 组分. 其中区带 III 不含 Chl b, 由表观分子质量为 66 和 56 ku 的两种多肽构成, 是 PS I 的核心复合物 CCI. 其色素及多肽组成与高等植物相似, 都是 P700-Chl a 蛋白复合物.

区带 IV 和 V 为 PS I 复合物, 至少含有 6 种多肽成分, 除了两种核心多肽以外, 还有 4 种 LHCI 多肽. 吸收光谱和荧光激发光谱表明, 它们具有与高等植物完全不同的色素组成, 除了 Chl a 以外, 还有更多的 Chl b 以及特殊的类胡萝卜素——管藻黄素及管藻素, 为管藻黄素-Chl a/b 蛋白复合物. 分离物中各种色素之间保持着良好的能量传递关系, 其中 Chl b 和管藻黄素及管藻素吸收的光能都可传递给 Chl a.

参 考 文 献

- 1 Anderson J M. Chlorophyll protein complexes of a *Codium* species including a light-harvesting siphonaxanthin-chlorophyll a/b protein complex, an evolutionary relic of some Chlorophyta. *Biochim Biophys Acta*, 1983, **724** (3): 370~380
- 2 曾呈奎, 周百成. 海藻光合作用和进化. 见: 曾呈奎主编. 光合作用研究进展, 第 3 集. 北京: 科学出版社, 1984. 202~207
- 3 Tseng C K, Zhou B C. Photosynthesis and evolution of marine algae. In: Tseng C K ed. *Advances on Photosynthesis Studies*, III. Beijing: Science Press, 1984. 202~207
- 4 Itagaki T, Nakayama K, Okada M. Chlorophyll protein complexes associated with photosystem I isolated from the green alga, *Bryopsis maxima*. *Plant Cell Physiol*, 1986, **27** (7): 1241~1247
- 5 Benson E E, Cobb A H. Pigment/protein complexes of the intertidal alga *Codium fragile* (Suringar) Hariot. *New Phytol*, 1983, **95** (2): 581~594
- 6 Anderson J M. Chlorophyll protein complexes of a marine green alga, *Codium species* (Siphonales). *Biochim Biophys Acta*, 1985, **806** (11): 145~153
- 7 陈 敏. 管藻目绿藻 PS I 和 PS II 结构特异性研究: [博士论文]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 1998
- 8 Chen M. Structural characterization of PS I and PS II in siphonous green algae: [Dissertation]. Qingdao: Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, 1998

- 7 李桐柱, 林世青. 一个高分辨率的凝胶电泳系统及其从蓝藻中分离的叶绿素蛋白复合体. 植物学报, 1995, **37** (1): 34~ 40
Li T Z, Lin S Q. Acta Bot Sin, 1995, **37** (1): 34~ 40
- 8 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 1949, **924** (1): 1~ 15
- 9 Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, **227** (5259): 680~ 685
- 10 Chu Z X, Anderson J M. Isolation and characterization of a siphonaxanthin-chlorophyll a/b protein complex of photosystem I from a *Codium* species (Siphonales). Biochim Biophys Acta, 1985, **806** (1): 154~ 160

Isolation of PS I from a Siphonous Marine Green Alga, *Codium fragile*

CHEN Min*, LI Ai-Fen

(Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai, 264005, China)

ZHOU Bai-Cheng

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

Abstract Three different forms of PS I complexes were isolated from a siphonous marine green alga, *Codium fragile*, by Triton X-100 sucrose gradient centrifugation. Zone III had a Chl a/b > 20, and designated as PS I core complex CC I because it created only CP I band in mild PAGE. Zone IV and V had absorption at 436 and 674 nm, 467 and 650 nm, and 540 nm, suggesting the presence of Chl a, Chl b, siphonaxanthin and siphonein, Chl a/b were 3.23 and 2.4, respectively. Both CP I and CP I_a bands were observed when they were subjected to mild PAGE. Therefore, Zone IV and V were different forms of PS I complexes that consisted of CC I and different amount of light-harvesting complex LHC I. Zone III contained only 66 and 56 ku peptides in SDS-PAGE, while Zone IV and V had 4 different LHC I peptides of 25, 26, 26.2 and 27.5 ku in addition to 66, 56 ku peptides. Fluorescence emission spectra showed that efficient energy transfer were kept among pigments in isolated PS I complexes. Excitation energy absorbed by Chl b, siphonaxanthin and siphonein can be transferred to Chl a.

Key words PS I, CC I, sucrose gradient centrifugation, peptide, *Codium fragile*

* Corresponding author. Tel: 86-535-6223671, E-mail: chenmclm@public.ytptt.sd.cn

Received: January 17, 2001 Accepted: April 27, 2001