

褐藻裙带菜中PSII复合物及其亚复合物的分离和特性研究

陈敏^{1,*} 邢克克² 李爱芬² 周百成³

¹ 山东烟台大学生物化学系, 山东烟台 264005; ² 暨南大学水生生物研究中心, 广州 510632; ³ 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071

摘要 用不连续梯度蔗糖密度超离心, 从经 Triton X-100 增溶的褐藻裙带菜类囊体膜中分离到3种色素蛋白复合物条带, 分别是捕光复合物、具有光氧化活性的PSII复合物颗粒(区带II)以及PSI(区带III)。PSII颗粒经毛地黄皂苷增溶后, 再次超离心分离得到3条PSII的亚复合物条带。吸收和荧光激发谱显示其中的区带II-1为墨角藻黄素-Chl a/c-蛋白复合物, 区带II-2为Chl a/c-蛋白复合物, 两者都只含20 kDa多肽; 而鲜绿色的区带II-3为不含捕光复合物的活性PSII核心。

关键词 裙带菜; 蔗糖密度梯度离心; PSII; PSII核心; 捕光复合物; 多肽

Study on Isolation and Characterization of PSII Pigment-protein Complex and Subcomplexes from a Brown Alga [*Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar]

CHEN Min^{1,*}, XING Ke-Ke², LI Ai-Fen², ZHOU Bai-Cheng³

¹Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai, Shandong 264005, China; ²Research Center of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ³Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China

Abstract Three pigment-protein complexes which were light-harvesting complex and active PSII (zone II) and PSI (zone III) particles were isolated from a brown alga *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar by Triton X-100 sucrose gradient centrifugation. The three subcomplexes were separated by further density gradient after digitonin solubilization of PSII particle. Zone II-1 was a fucoxanthin-Chl a/c-protein complex, and zone II-2 was a Chl a/c-protein complex according to their absorption and fluorescence spectra. They all presented a major peptide component at 20 kDa. The fresh green fraction zone II-3 was a active PSII core complex depleting light-harvesting complexes.

Key words *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar; sucrose gradient centrifugation; PSII; PSII core; light-harvesting complex; peptide

褐藻属于含有叶绿素a (Chl a)和叶绿素c (Chl c)的杂色藻类, 它在进化上比含有Chl a、b的绿色植物相对原始, 没有基粒, 类囊体膜成束排列 (Berkaloff等1983); 缺少高等植物作为PSI标志的730 nm长波荧光 (Berkaloff等1990); 其捕光复合物为特殊的墨角藻黄素-Chl a/c-蛋白复合物, 并且没有PSI和PSII的分化 (De Martino等2000)。褐藻色素蛋白复合物的结构和组成的特殊性, 可以反映出光合系统结构在进化上的多样性, 是比较光合作用研究不可缺少的环节。

但由于褐藻含有大量的藻胶, 色素蛋白复合物尤其是PSII复合物的稳定性差, 因此人们对其了解程度远不及高等植物。目前只有李爱芬等 (2000a)报道用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 分离

到一个类似于高等植物的PSII中心复合物 (core complex of PSII, CPa); Berkaloff等 (1984)用蔗糖密度梯度离心从锯齿形墨角藻 (*Fucus serratus*) 中得到有活性的PSII颗粒; Douady等 (1993)和De Martino等 (2000)进一步以十二烷基麦芽糖苷增溶PSII颗粒, 再用DEAE离子交换层析和等电点聚焦电泳各分离到2种PSII的亚复合物。但是分离物的组成、特性、色素比率则由于使用的去污剂种类以及分离方法不同而存在差异。因此, 褐藻PSII系统结构还待进一步比较和分析。

本文以褐藻裙带菜 [*Undaria pinnatifida* (Harvey)]

收稿 2006-03-06 修定 2006-07-03

*E-mail: chenmclm@163.com, Tel: 0535-6637167

Suringar]为材料,用Triton X-100蔗糖密度超离心分离得到具有明显光氧化活性的PSII复合物颗粒,以毛地黄皂苷增溶后,经2次超离心得到了3条PSII亚复合物条带,并对PSII复合物和亚复合物的性质、多肽组成进行了研究。

材料与方法

裙带菜[*Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar]于3月采自山东烟台海滨。参照李爱芬等(2000b)的方法制备叶绿体和类囊体膜,按Jeffery和Humphrey(1975)的方法测定叶绿素浓度、计算含量和Chl a/c比值。

依照陈敏等(2001)的方法增溶类囊体膜并铺设不连续蔗糖梯度,用日立-55P-72SW-41型水平转头,于4℃下以220 000×g离心14~16 h。梯度离心结果立即拍照。

将超离心所得的区带II、III用5 mmol·L⁻¹的麦黄酮(Tricine)-NaOH缓冲液(pH 8.0)透析过夜,去除游离的Triton X-100,以100 000×g离心1 h后,收集沉淀。用适量甘油悬浮液溶解,测定叶绿素含量、光氧化活性等。

以DCIPH₂作为电子供体,用分光光度法(华东师范大学生物系植物生理教研组1980)测定超离心所得各条带的PSI光氧化活性。

以K₃Fe(CN)₆为电子受体,将含有20~50 μg叶绿素复合物条带加入到反应液中,参照范淑琴和梁淑文(2004)方法测定PSII光氧化活性。

用毛地黄皂苷:Chl (W/W)=25:1的比例向收集到的PSII颗粒悬浮液中加入去污剂,室温下增溶7~8 h后,以30 000×g离心10 min,取上清液上样。所用的蔗糖梯度为:0.4 mol·L⁻¹ (0.6 mL)、0.6 mol·L⁻¹ (0.6 mL)、0.8 mol·L⁻¹ (0.6 mL)、1.0 mol·L⁻¹ (0.6 mL)和1.5 mol·L⁻¹ (0.4 mL)。于4℃下,以220 000×g超速离心16 h,梯度结果立即拍照或测定吸收光谱、荧光光谱、PSI和PSII光氧化活性。

将梯度离心得到的区带迅速用预冷的5.0 mmol·L⁻¹的Tricine-NaOH (pH 8.0)缓冲液稀释,以岛津UV-3000紫外-可见分光光度计测定吸收光谱,用日立-851型荧光分光光度计测定室温荧光光谱。

SDS-PAGE电泳分析时,收集梯度离心得到的PSII复合物及其亚复合物条带,对固体蔗糖浓缩,控制叶绿素浓度为0.2~0.6 mg·mL⁻¹,参照Laemmli(1970)的方法分析多肽。堆积胶和分离胶中各含有1和4 mol·L⁻¹的脲。

实验结果

1 色素蛋白复合物的蔗糖梯度离心分离和鉴定

用温和的非离子型去污剂Triton X-100增溶后的类囊体膜,经蔗糖梯度离心后得到3个区带,自上而下依次称为区带I、II、III(图1)。

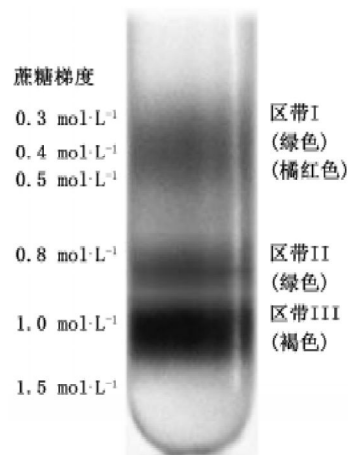


图1 裙带菜色素蛋白复合物的蔗糖密度梯度离心
Fig. 1 Pigment-protein complexes of *U. pinnatifida* separated by sucrose gradient centrifugation

区带I位于0.3~0.5 mol·L⁻¹梯度内,占总叶绿素浓度的56.1%(表1),上部分偏绿色,中部褐色,下部偏橘红色,除了Chl a(435和670~672 nm)外,还富含Chl c(460~465和630 nm)和墨角藻黄素(540 nm)(图2),没有光氧化活性,是墨角藻黄素-Chl a/c-捕光蛋白复合物(LHC)。绿色的区带II处于0.8 mol·L⁻¹蔗糖梯度区,是3条带中含量最少的,占叶绿素总量的17.9%,具有明显的PSII光氧化活性,主要呈现Chl a(435和670~672 nm)、胡萝卜素(490 nm)和Chl c(630 nm)的吸收,墨角藻黄素较少,是附有部分天线复合物的天然PSII颗粒。区带III则呈褐色,处于1.0 mol·L⁻¹蔗糖梯度处,可以还原DCIPH₂,含有长波长Chl a(436和675~676 nm),是有活性的

表1 裙带菜色素蛋白复合物的性质
Table 1 Characteristics of pigment-protein complexes of *U. pinnatifida*

区带	蔗糖梯度/mol·L ⁻¹	颜色	叶绿素相对含量/%	吸收峰/nm	光氧化活性
I	0.3~0.5	褐绿色 + 橘红色	56.1	Chl a: 435, 670~672 Chl c: 460~465, 630 胡萝卜素: 490 墨角藻黄素: 540	无
II	0.8	绿色	17.9	Chl a: 435, 670~672 Chl c: 630 胡萝卜素: 490	有 PSII 光氧化活性
III	1.0	褐色	26.0	Chl a: 435, 675~676 Chl c: 630 胡萝卜素: 490	有 PSI 光氧化活性

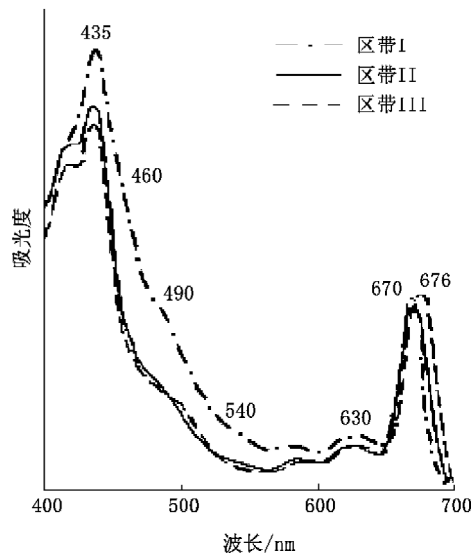


图2 蔗糖密度梯度离心分离的裙带菜色素蛋白复合物的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of pigment-protein complexes of *U. pinnatifida* isolated by sucrose-density centrifugation

PSI 颗粒。

2 PSII 亚复合物的分离和鉴定

收集活性PSII颗粒去除游离的Triton X-100后,用自行摸索的毛地黄皂苷增溶及超离心分离方法,得到3个亚复合物条带,分别命名为区带II-1、2、3(图3)。

最上层的区带II-1含量最高,占PSII颗粒中叶绿素总量的63%(表2),呈褐绿色,含有Chl a (434~436和670~671 nm)、Chl c (461和626~628 nm)和墨角藻黄素(540 nm)(图4),是一个与PSII相结合的墨角藻黄素-Chl a/c-捕光复合物,没有

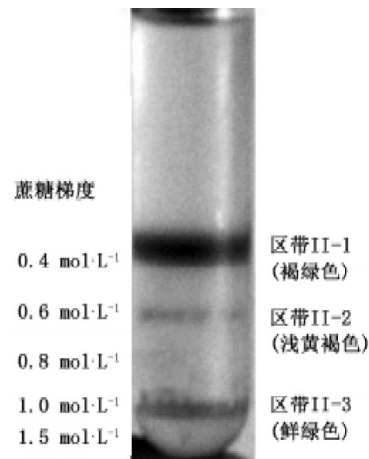


图3 2次蔗糖密度梯度离心得到的PSII亚复合物
Fig. 3 Subcomplexes of PSII particles isolated by sucrose density gradient for two times

光氧化活性,该条带与Douady等(1993)用离子交换层析得到的IE1类似。

区带II-2为浅黄褐色,与区带II-1相比含有较少的Chl c,尤其是500~550 nm之间吸收明显降低,说明该条带基本不含墨角藻黄素,是一个Chl a/c-蛋白复合物,约占PSII颗粒中叶绿素总量的13.5%。在以往的文献中,用十二烷基麦芽糖苷增溶、离子交换(Douady等1993)或IEF分离(De Martino等2000)都没有报道有此PSII亚复合物。

区带II-3为鲜绿色,基本不含Chl c和墨角藻黄素,只含有Chl a (435和671nm)和少量的胡萝卜素(492 nm),并且仍然保持着一定的光氧化活性,是一个纯化了的活性PSII核心复合物。

表2 裙带菜PSII色素蛋白亚复合物的性质
Table 2 Characteristics of subcomplexes of PSII particles of *U. pinnatifida*

区带	蔗糖梯度/mol·L ⁻¹	颜色	叶绿素相对含量/%	吸收峰/nm	荧光激发峰/nm	荧光发射峰/nm
II-1	0.4	褐绿色	63	Chl a: 434~436, 670~671 Chl c: 461, 626~628 墨角藻黄素: 540	Chl a: 436~439, 670~672 Chl c: 462~465, 632~635 墨角藻黄素: 540	680~681
II-2	0.6	浅黄褐色	13.5	Chl a: 436, 671 Chl c: 460, 628 胡萝卜素: 490	Chl a: 436, 671 Chl c: 462, 632 胡萝卜素: 490	680
II-3	0.9~1.0	鲜绿色	23.5	Chl a: 435, 671 胡萝卜素: 492	Chl a: 436, 671 胡萝卜素: 492	680

3 PSII复合物及其亚复合物的荧光光谱

区带II及其3种亚复合物的Chl a激发峰都在436~439和670~672 nm (图5)。区带II和区带II-1中还有明显的Chl c (462~465和632~635 nm)和墨角藻黄素的激发峰(500~550 nm), 是墨角藻黄素-Chl a/c-蛋白复合物的特征, 采用435、460和540 nm激发时, 两者均发射680~681 nm的Chl a的荧光。而区带II-2除了Chl a外只有Chl c的激发峰(462、632 nm), 以435、460 nm激发时, 发射峰在680 nm, 这再次证实区带II-2是一个Chl a/c-蛋白复合物。在区带II-3中则发现只有Chl a的激发峰, 位于436和671 nm, 说明区带II-3是不含捕光复合物的PSII核心复合物。

以上结果清楚表明, 复合物中各种色素之间

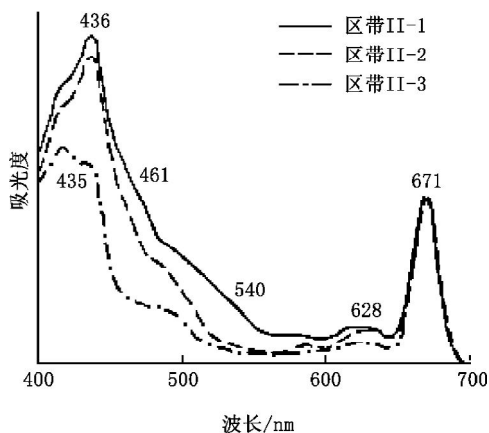


图4 2次蔗糖密度梯度离心得到的PSII亚复合物吸收光谱
Fig. 4 Absorption spectra of subcomplexes of PSII particles isolated by sucrose density gradient for two times

保持着良好的能量传递关系, Chl c或墨角藻黄素吸收的光能都可以传递给Chl a。

4 多肽组成分析

SDS-PAGE的结果显示, PSII颗粒(图6, 第3泳道)中主要含有52、47、41、37、34、20以及13 kDa等多肽。这些多肽成分在亚复合物区带II-3(图6, 第4泳道)中大部分存在, 只缺少20 kDa多肽, 而51 kDa多肽含量有所增加。捕光复合物区带II-1、2只含20 kDa多肽, 区带II-2在30~50 kDa处有微量的蛋白组分。显然, 20 kDa多肽是褐藻主要的捕光复合物成分, 而52、47和41 kDa多肽应属于PSII的内周天线(Douady等1993), 37、34 kDa多肽为PSII反应中心多肽,

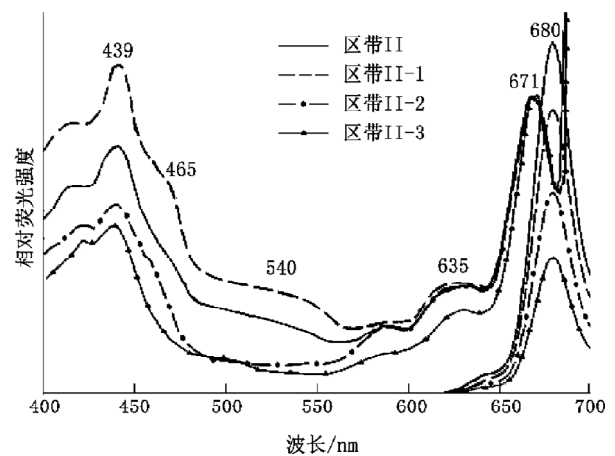


图5 PSII复合物及其亚复合物的室温荧光光谱
Fig. 5 Fluorescence spectra of PSII complex and subcomplexes at room temperature
Em=700 nm (激发谱); Ex=436 nm (发射谱)。

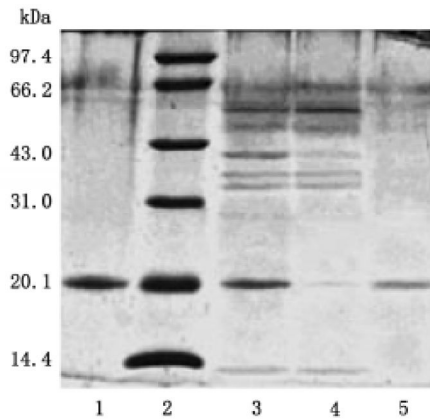


图6 PSII复合物及其亚复合物多肽的电泳图谱

Fig. 6 Electrophoretograms of peptides analysis of PSII complex and subcomplexes

1: 区带II-1; 2: 标准蛋白; 3: 区带II; 4: 区带II-3; 5: 区带II-2。

13 kDa多肽可能属于Cyt b-559 (Douady等1993)。

讨 论

褐藻的光合系统结构特殊性之一在于, 它的捕光系统是由分子量单一的多肽成分聚合而成的超分子复合体(Kato等1989; Kato和Ehara 1990), 均衡地为2个光合系统供能(De Martino等2000)。尽管目前已经知道, 这一捕光复合物多肽均来自一个保守的基因家族(Passaquet等1991), 但是褐藻捕光系统结构是以怎样的方式和关系连接在一起的, 与高等植物有何不同, 目前还不清楚。

本文以褐藻裙带菜为材料, 用Triton X-100蔗糖密度超离心后得到具有明显光氧化活性的PSII复合物颗粒, 在了解复合物多肽组成、光谱特性以及复合物性质的基础上, 进一步以毛地黄皂苷增溶PSII颗粒, 经2次超离心分离后成功地得到了3条PSII的亚复合物条带。其中区带II-3为依然保持着光氧化活性PSII核心, 是一个Chl a-蛋白复合物, 从多肽组成来看, 含有52、47、41 kDa内周天线组分和与高等植物类似的2个反应中心多肽, 但分子量更大一些。亚复合物区带II-1与第1次离心得到的捕光复合物(区带I)在多肽组成和光谱性质上基本相同, 都只含有20 kDa多肽, 为墨角藻黄素-Chl a/c-蛋白复合物, 但由于亚复合物区带II-1是从活性的PSII颗粒上增溶而

来, 因此在结构关系上显然比第1次离心得到的捕光复合物区带I更接近PSII反应中心。分离到浅黄褐色的区带II-2是一个不含墨角藻黄素的Chl a/c-蛋白亚复合物, 并且多肽分析除了20 kDa捕光复合物多肽外, 还有微量的内周天线成分, 说明区带II-2不是由于区带II-1中墨角藻黄素脱落形成的, 而是更靠近PSII反应中心、包含内周天线的不同的捕光复合物形式。因此, 经毛地黄皂苷增溶后所得到的3种亚复合物的结构关系为: 区带II-3为PSII核心, 区带II-2为中间部分, 区带II-1在最外侧, 它们共同构成了PSII颗粒。而第1次超离心得到的捕光复合物(区带I)则可能联系着PSI(区带III)和PSII颗粒。

上述结果显示, 褐藻的PSII核心与高等植物相似, 是只含有Chl a的蛋白复合物, 外部结合着内周天线成分, 靠近核心部分的捕光复合物除了含有Chl a外, 还含有Chl c, 而最外部的捕光复合物为墨角藻黄素-Chl a/c-蛋白复合物。本文分离到的不含墨角藻黄素的Chl a/c-蛋白亚复合物的存在, 说明褐藻的20 kDa主要捕光复合物多肽成分, 在结合色素时并非均一。今后, 与褐藻PSII结构相关的多肽以及色素分子计量仍需做进一步的分析。

参考文献

- 陈敏, 李爱芬, 周百成(2001). 海洋管藻目绿藻刺松藻光系统I复合物的分离. 生物化学与生物物理进展, 28(6): 858~861
- 范淑琴, 梁淑文(2004). 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 108~109
- 华东师范大学生物系植物生理教研组(1980). 植物生理学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 116~117
- 李爱芬, 陈敏, 周百成(2000a). 褐藻裙带菜色素-蛋白质复合物分离与命名. 植物学报, 42(2): 153~157
- 李爱芬, 陈敏, 周百成(2000b). 褐藻叶绿体的制备. 生物化学与生物物理进展, 27(5): 551~553
- Berkaloof C, Caron L, Rousseau B (1990). Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigment analysis. Photosynth Res, 23: 181~193
- Berkaloof C, Duval JC, Hauswirth N, Rousseau B (1983). Freeze fracture study of thylakoids of *Fucus serratus*. J Phycol, 19: 96~100
- Berkaloof C, Duval JC, Rousseau B (1984). Active PSII particles

- from a brown algae: spectral and electrophoretic characterization. *Adv Photosynth Res*, 1 (4): 449~452
- De Martino A, Douady D, Quinet-Szely M, Rousseau B, Crépineau F, Apt K, Caron L (2000). The light-harvesting antenna of brown algae: highly homologous proteins encoded by a multigene family. *Eur J Biochem*, 267: 5540~5549
- Douady D, Rousseau B, Berkaloff C (1993). Isolation and characterization of PSII core complexes from a brown alga, *Laminaria saccharina*. *FEBS Lett*, 324 (1): 22~26
- Jeffrey S, Humphrey G (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen*, 167: 191~194
- Katoh T, Ehara T (1990). Supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes isolated from a brown alga, *Petalonia fasciata*. *Plant Cell Physiol*, 31: 439~447
- Katoh T, Mimuro M, Takaichi S (1989). Light-harvesting particles isolated from a brown alga, *Dictyota dichotoma*. A supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes. *Biochim Biophys Acta*, 976: 233~240
- Laemmli U (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680~685
- Passaquet C, Thomas JC, Caron L, Hauswirth N, Puel F, Berkaloff C (1991). Light-harvesting complexes of brown algae. Biochemical characterization and immunological relationships. *FEBS Lett*, 280: 21~26