

条斑紫菜孢子体与配子体光合系统 II (PSII) 稳定性研究

柳葵葵^{1,3}, 张海霞¹, Verena Linhard², Hartmut Michel², 彭国宏^{1,2}

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main, Germany, D 60438; 3. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 膜蛋白是生物领域研究中的热点和难点。在光合作用研究中, 对于藻类个体发育过程中光合膜蛋白结构和功能的变化所知甚少, 其中的一个限制因素是能否纯化得到大量高活性的稳定且均一的光合膜蛋白。作者从条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)孢子体和配子体中分离纯化得到光合系统(PSII)复合物, 并研究了其完整性和放氧活性。结果表明, 孢子体和配子体的 PSII 复合物, 在 4℃ 条件下保存比在 -80℃ 下保存放氧活性高, 稳定性高。配子体 PSII 复合物, 在 -80℃ 保存第 6 天就已经没有放氧活性, 而孢子体 PSII 复合物仍有放氧活性。对 4℃ 下保存的 PSII 复合物进行分子筛柱层析, 室温吸收光谱测定以及放氧活性测定, 发现随着放氧活性逐渐降低, 蛋白大分子有聚合现象。室温吸收光谱表明经过长期的保存, 吸收峰向短波长方向偏移, 叶绿素易降解成为脱镁叶绿素。

关键词: 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*); 孢子体; 配子体; 光合系统(PSII)稳定性

中图分类号: Q945.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)10-0025-05

光合作用是地球上一切生物直接或间接的能量来源^[1], 光合系统 II(PSII)通过一系列光驱动的电子传递反应最终使光能转化为化学能, 同时使水裂解放氧。因此对光合膜蛋白研究具有重要意义。条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)是一种大型海洋红藻, 具有孢子体和配子体的异型世代交替生活史^[2]。孢子体和配子体在形态和生长环境上各不相同, 但都能进行光合作用。许多学者研究了高等植物和藻类个体发育过程中光合作用生理特征方面的变化^[3-5]。彭国宏等^[6]发现条斑紫菜在个体发育过程中具有两种不同的藻胆体。潘洁等^[7]研究表明, 条斑紫菜在个体发育过程中两个光系统间激发能的分配有所不同。在配子体阶段, PSII 吸收到的过多激发能能够传递给 PSI; 而在孢子体阶段, PSII 收到的过多激发能没有传递给 PSI。因此, 有必要进一步比较研究条斑紫菜孢子体和配子体类囊体膜蛋白的结构和功能。首先需要获得稳定均一的光合膜蛋白, 并进一步获得高分辨率的三维空间结构数据。但是膜蛋白具有疏水性, 致使分离纯化困难, 并降低其稳定性^[8]。作者采用纯化后的 PSII 复合物, 研究分析了储存过程中放氧活性与稳定性的变化, 为进一步的结构和功能研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和材料采集

1.1.1 条斑紫菜孢子体的培养

条斑紫菜孢子体培养在 PES 海水培养基中^[9], 温度为 18~21℃, 光强为 400 lx, 光照培养箱通气培养, 2 周后收集。

1.1.2 条斑紫菜配子体的采集

条斑紫菜配子体于 3 月中旬采自青岛汇泉湾海域, 用海水漂洗后悬挂阴干, 保存于 -20℃ 冰箱中。使用前 24 h 取出, 在 PES 海水培养基中静置恢复培养后用于实验。

1.2 孢子体与配子体 PS II 的分子筛柱层析

条斑紫菜孢子体和配子体离体类囊体膜的分离参照梁军等^[10]的方法。将分离得到的配子体与孢子体的 PSII 复合物用 superdex200 3.2/3(Pharmacia Smart System)进行分子筛柱层析。分子筛层析柱先用缓冲液平衡(30 mmol/L Na₂HPO₄, pH 7.0; 0.05% NaN₃, 0.03% Dodecylβ-D-maltopyranoside), 流速为 50 μL/min, 4℃ 条件下, 上样量为 50 μL, 流速为 50 μL/min, 检测波长 280、435 nm 处的光吸收值, 分别收集不同层析峰。

收稿日期: 2006-06-20; 修回日期: 2006-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(B33023019, Max Planck Gesellschaft)

作者简介: 柳葵葵(1979), 女, 山东栖霞人, 硕士, 研究方向为海洋生物学, E-mail: liukuikui@ms.qdio.ac.cn; 彭国宏, 通讯作者, E-mail: ghpeng@ms.qdio.ac.cn, guohong.peng@mipbfrankfurt.mpg.de

1.3 室温吸收光谱分析

用 Perkin Elmer UV/VIS spectrometer Lambda40 测定 PSII 提取物的室温吸收光谱, 扫描波长范围为 400 nm 至 750 nm, 扫描速度为 500 nm/min, 狭缝为 0.5 nm。

1.4 PSII 放氧活性测定

PSII 的放氧活性用 Clark (Hansatech CB1D electrode, Hansatech, UK) 型氧电极测定。Dichloro *p*-benzoquinone (DCBQ) 和 ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) 作为人工电子受体。电子传递是从 H_2O 到人工电子受体 DCBQ 和 $K_3Fe(CN)_6$ 。测定液为 20 mmol/L MES (pH 6.4), 5 mmol/L $CaCl_2$, 2 mmol/L ferricyanide, 0.2 mmol/L DCBQ。将含有 2.5 μg 到 5.0 μg 叶绿素的一份 PSII 加入到测定液, 最终体积是 1 mL^[11]。测定温度为 18℃。测定过程中以饱和光持续照射。

2 结果和讨论

2.1 分子筛柱层析分析结果

将纯化后得到的孢子体与配子体的 PSII 复合物, 分别保存在 4℃ 冰箱中, 从制备之日起, 每 4 d, 分别取 50 μL 储备蛋白进行分子筛柱层析分析 superdex200 PC 3.2/3 (Pharmacia smart system)。图 1 结果显示, 配子体的 PSII 成份, 随着储存时间的增长蛋白 0.9 mL 处洗脱峰逐渐降低, 而在 1.1 mL 处逐渐增加, 同时峰位左移, 说明在这段时间内配子体的蛋白成分同时有聚合和降解现象发生。图 2 结果显示, 孢子体也有类似聚合的现象发生。

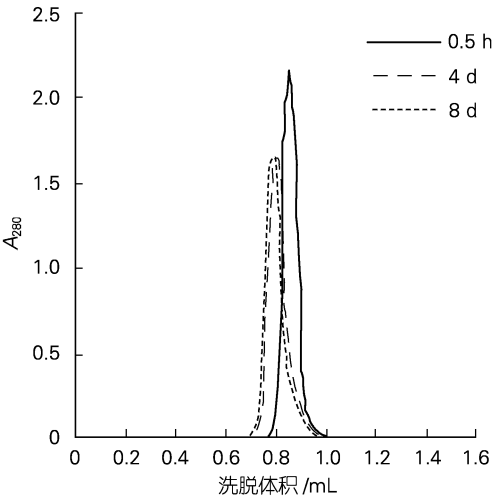


图 1 配子体 PSII 复合物 4℃ 储存条件下, 不同时间的分子筛柱层析

Fig. 1 Gel filtration analysis of PSII complexes from gametophytes stored in 4℃

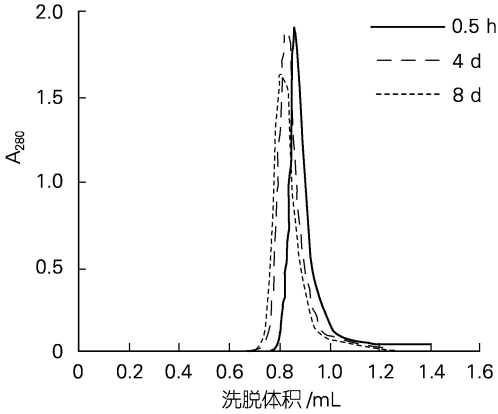


图 2 4℃ 储存条件下的孢子体 PSII 复合物不同时间的分子筛柱层析

Fig. 2 Gel filtration analysis of PSII complexes from gametophytes stored in 4℃

2.2 配子体与孢子体 PSII 室温吸收光谱

分别测定新制备的 PSII 复合物与在 4℃ 下保存 12 d 的 PSII 复合物的室温吸收光谱。在制备的新鲜配子体 PSII 的室温吸收光谱中, 两个主要的峰为 435 nm 与 675 nm, 来自于叶绿素 a 的吸收。同时在 417 nm 处有一个小的吸收肩。在 4℃ 冰箱中保存 12 d 后, 红区的吸收峰向左移 1 nm, 同时 435 nm 处的吸收降低, 417 nm 处的吸收峰成为蓝区主要的吸收峰 (图 3)。在新鲜制备的孢子体的室温吸收光谱中, 两个主要的吸收峰为 437 nm 与 678 nm, 417 nm 处也有小的吸收肩。孢子体新鲜样品在 483 nm 处的小峰可能是来自胡萝卜素的吸收, 在 4℃ 冰箱中保存 12 d 后 483 nm 处的吸收峰消失, 417 nm 处的吸收峰明显高于 435 nm 处的吸收峰, 同时红区的吸收峰由 678 nm 移至 674 nm。417 nm 处的吸收可能来自于脱镁叶绿素^[12], 说明在保存过程中部分叶绿素 a 转变成成为脱镁叶绿素 (图 4)。

2.3 保存条件对孢子体与配子体 PSII 活性的影响

将提取的 PSII 样品分成 2 份, 一份在 4℃ 冰箱中保存, 一份液氮冷冻后在 -80℃ 保存。每 48 h 测定一次放氧活性。配子体 PSII 复合物放氧活性在光照强度为 1 856 lx, 18℃, 叶绿素质量浓度为 5 mg/L 条件下测定; 孢子体 PSII 复合物放氧活性在光照强度为 2 240 lx, 18℃, 叶绿素质量浓度为 5 mg/L 条件下测定。图 5, 6 结果显示, 随着时间的推移, PSII 的放氧活性逐渐降低。但是相对于 -80℃ 的保存条件, 在

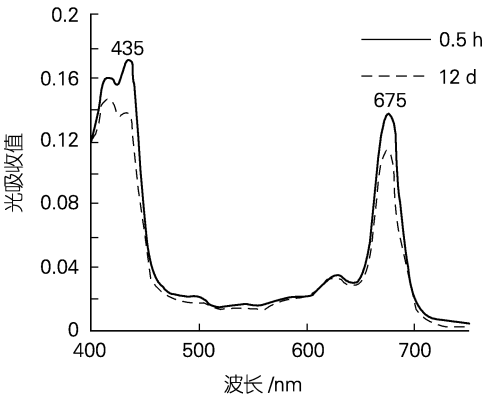


图3 制备的新鲜配子体 PSII 复合物与 4℃下储存 12 d 的样品的室温吸收光谱

Fig. 3 Absorption spectroscopy at room temperature of fresh and old(stored in 4℃ for 12d) PSII complexes and from gametophytes

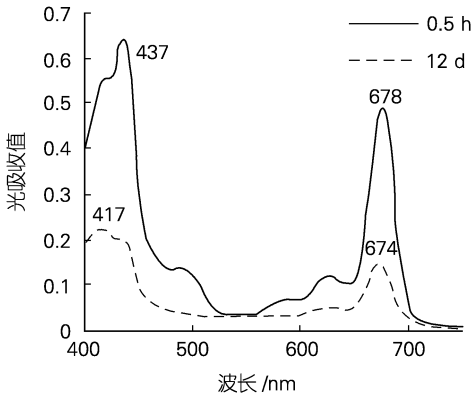


图4 制备的新鲜孢子体 PSII 复合物与 4℃下储存 12d 的样品的室温吸收光谱

Fig. 4 Absorption spectroscopy at room temperature of fresh and old(stored in 4℃ for 12d) PSII complexes and from sporophytes

4℃条件下放氧活性较高。配子体 PSII 复合物在 4℃条件下活性最初为 2 256.33 mmol/(g·h), 到第 10 天的时候只有 298.4 mmol/(g·h)。孢子体 PSII 复合物在 4℃条件下活性最初为 2 269.77 mmol/(g·h), 到第 10 天只有 352.85 mmol/(g·h)。配子体在 - 80℃下保存第 6 天就已经没有放氧活性, 但是此时 - 80℃保存的孢子体 PSII 复合物仍然具有放氧活性, 而且保存在 - 80℃下第 10 天放氧活性仍然

有 293.6 mmol/(g·h)。分析配子体与孢子体差别的原因, 可能是由于 PSII 是一种含有色素的多亚基膜蛋白复合物, 在脱离了类囊体膜的情况下直接冷冻, 缓冲液中水分会很快形成冰晶, 引起一系列不良反应, 如局部电解质浓度增高, pH 值改变, 部分蛋白质由于上述原因而变性, 引起 PSII 内部电荷分离, 电子传递变化, 导致放氧活性降低。

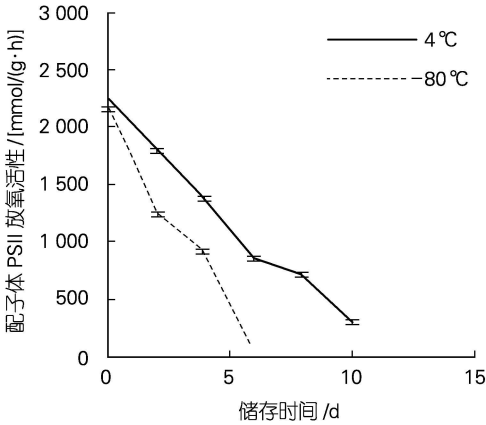


图5 4℃与- 80℃保存条件下, 配子体 PSII 复合物活性的变化

Fig. 5 The oxygen evolution of PSII complexes from gametophytes stored at 4℃ and - 80℃ during storage

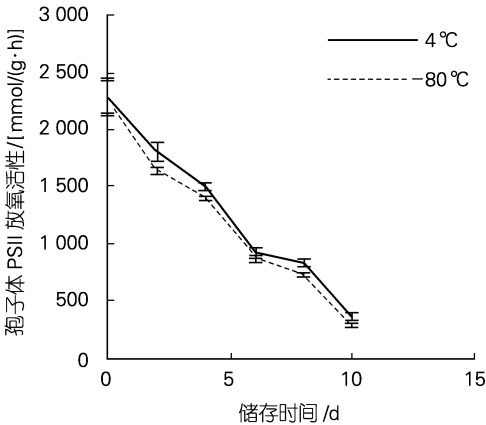


图6 4℃与- 80℃保存条件下, 孢子体 PSII 复合物活性的变化

Fig. 6 The oxygen evolution of PSII complexes from sporophytes stored at 4℃ and - 80℃ during storage

条斑紫菜孢子体和配子体 PSII 复合物的光系统

活性均随保存时间的延长而降低,但是孢子体与配子体在-80℃下变化趋势的差别,可能是由于二者的复合物结构差异所致。这可能与它们不同的生长环境有关。条斑紫菜孢子体多生长在海底贝壳中,而配子体则多生长在海边岩礁上^[2],由于生长环境的不同可能造成了二者对光强和温度条件的不同的色适应性反应,从而导致了光系统的差异。Prakash 等^[13]报道, *Cucumis sativus* 子叶衰老过程中捕光天线组成、与反应中心的结合状态、叶绿素分子的比例等均发生变化。作者分析 PSII 的 SDS-PAGE 的结果已表明它们之间亚基组成有所差别(结果待发)。由此推测,在-80℃下,条斑紫菜孢子体和配子体 PSII 复合物光系统活性变化的差异,也可能是由于二者光系统蛋白复合物上的亚基和叶绿素分子的组成差异所致。上述研究结果表明条斑紫菜配子体与孢子体的 PSII 复合物聚合状态下色素的组成对环境条件较敏感,对如何增强其稳定性,提高其活性,尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Bricker T M, Ghanotakis D F. Introduction to oxygen evolution and oxygen evolving complex[A]. Ort D R, Yocum C F. Oxygenic Photosynthesis: the Light Reactions[C]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. 113-136.

[2] 曾呈奎, 张德瑞. 紫菜的研究 I. 甘紫菜的生活史[J]. 植物学报, 1954, 3(3): 287-302.

[3] 曾呈奎, 张德瑞. 温度因子对不同种类紫菜的壳孢子形成和放散的影响的比较研究[J]. 植物学报, 1963, 11(3): 261-271.

[4] 刘力, 高尚德. 失水干燥对紫菜光合作用、呼吸作用及生长的影响[J]. 水产学报, 1987, 9(3): 233-239.

[5] Luning K. Critical levels of light and temperature reg-

ulationary the gametogenesis of three *Laminaria* species[J]. *J Phycol*, 1980, 16: 1015-1021.

[6] 彭国宏, 施定基, 潘洁, 等. 条斑紫菜两种藻胆体与类囊体膜体外重组的光谱分析[J]. 科学通报, 1998, 43(10): 1061-1065.

[7] 潘洁, 施定基, 陈建新, 等. 紫菜两个光系统间激发能分配研究对光合进化的启示[J]. 科学通报, 2000, 45(12): 1276-1279.

[8] 杨福愉, 张旭家. 生物膜蛋白三维结构研究的现状与展望[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 569-575.

[9] Provasoli L. Media and prospects of the cultivation of marine algae[A]. Watanabe A, Hattori A. Culture and Collection of Algae[C]. US-Japan Conf Hokone: Japanes Society of Plant Physiologists, 1986. 63-75.

[10] 梁军, 张海霞, Guenter Fritzsche, 等. 温度、光强和 pH 对条斑紫菜孢子体和配子体类囊体膜上光系统活性的影响[J]. 海洋科学, 2005, 29(9): 14-17.

[11] Kern J, Loll B, Lüneberg C, et al. Purification, characterisation and crystallisation of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* cultivated in a new type of photobioreactor[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2005, 1706: 147-157.

[12] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes[J]. *Methods Enzymol*, 1987, 148: 350-382.

[13] Prakash J S S, Baig M A, Bhagwat A S, et al. Characterisation of senescence induced changes in light harvesting complex II and photosystem I complex of thylakoids of *Cucumis sativus* cotyledons: age induced association of LH CII with photosystem I[J]. *J Plant Physiol*, 2003, 160(2): 175-184.

(下转第 35 页)

Stability analysis of PSII from gametophytes and sporophytes of *Porphyra yezoensis*

LIU Kui kui^{1,3}, ZHANG Hai xia¹, Verena Linhard², Hartmut Michel², PENG Guo hong^{1,2}

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main 60438, Germany; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Jun., 20, 2006

Key words: *Porphyra yezoensis*; sporophytes; gametophytes; PSII stability

Abstract: Little is known about the structural and functional alterations of photosystem membrane proteins during ontogenesis. One limitation of such studies is the availability of sufficient amounts of pure, stable and homogenous photosystem proteins with high activities. In this report, photosystem II was isolated from the sporophyte and gametophyte cells of the red alga *Porphyra yezoensis*. PSII activity assays were performed by measuring oxygen evolution during electron transfer from H₂O to 1, 4-benzoquinone, using an oxygen electrode (Hansatech). The isolated PSII complexes were stored at 4°C and -80°C. The oxygen evolution activity was measured every other day. The results showed that PS II activity from both gametophytes and sporophytes decreased during storage. The oxygen evolution of PS II stored at 4°C was higher than that stored at -80°C; At -80°C, Gametophyte PS II was completely inactive after 6 days while sporophyte PS II retained 50% of activity, nearly the same as when stored at 4°C. The PSII complexes stored at 4°C were further analysed by gel filtration, oxygen evolution and absorption spectroscopy at room temperature. The gel filtration profiles showed that the protein complexes aggregated during storage. The chlorophyll absorption at 435 nm decreased, while the absorption at 417 nm increased. This implies that chlorophyll in PS II degraded to pheophytin.

(本文编辑:张培新)