



研究简报

羽藻叶绿体膜的纯化与多肽的初步研究*

邹喻苹 赵 原作小南** 梁 峰 汤佩松

(中国科学院植物研究所, 北京)

(中国科学院海洋研究所, 青岛)**

细胞膜系统,是细胞许多生命现象如收缩运动、信息传递、物质运输等的场所和调节关键部位。七十年代首先在红细胞发现了膜骨架。八十年代大多数红细胞膜蛋白已经提纯,其功能亦已清楚^[3,4]。在植物中, Palevitz 等(1974年)在 *Nitella* 细胞中观察到肌动蛋白;阎龙飞等^[1,2]先后从烟草维管束和黄瓜花粉中分离出肌动球蛋白、肌动蛋白和肌球蛋白。细胞器膜是生物膜系统的重要组成部分,但关于细胞器膜及其蛋白的研究,尚未见诸报道。本文以假根羽藻(以下简称羽藻)为材料,目的是获得一种良好的膜系统,以之作为研究植物细胞器膜骨架的实验材料;提取和纯化了羽藻叶绿体膜,并与纯化的菠菜叶绿体膜蛋白的多肽成分作了比较。

一、材料和方法

新鲜羽藻 *Bryopsis corticulans* 于1988年9月初采自青岛汇泉湾。洗净后置冰箱过夜或置净化海水中通气保存待用。

称取100g新鲜材料,剪碎后加入预冷过的200ml分离介质中(Tricin-NaOH, 25m mol/L; 山梨醇, 330m mol/L; EDTA-Na₂, 2m mol/L; MgCl₂, 1m mol/L; BSA, 0.1%; pH为7.9),充分搅拌后于240目尼龙绸过滤。滤液于LXJ-64-01型离心机上以1000 r/min 转速离心1 min,除去淀粉和其他残渣。上清液以1000r/min 转速离心10min,收集沉淀的粗叶绿体并悬浮在40ml上述介质中,待梯度离心纯化。

梯度离心参照文献[5]方法进行。蔗糖密度梯度自上至下依次为25%,34%,51%蔗糖溶液,蔗糖溶液含 Tricin-NaOH, 10m mol/L, pH为7.9; MgCl₂, 4m mol/L。在100ml离心管中分层铺放上述三种溶液各20ml,顶部加10ml粗叶绿体,于4000r/min 离心4min,用巴斯德吸管吸出上层梯度液并弃去,再分别吸出中层类囊体和下层完整叶绿体。分别用洗涤介质(Tricin-NaOH, 10m mol/L, pH=7.9; 山梨醇, 330m mol/L)缓慢稀释,于4000r/min 离心1min,沉淀为完整叶绿体和类囊体。

叶绿体完整性测定采用文献[8]方法。以YSI 53型(U. S. A)微量测氧仪监测放氧速率。光照30000lx。在2ml测定介质中,含 Tris-HCl, 10m mol/L, pH=7.5; 山梨醇, 330m mol/L; MgCl₂, 5m mol/L; NaCl, 10m mol/L; NaN₃, 3μ mol/L; K₃Fe(CN)₆,

* 中国科学院海洋研究所实验海洋生物开放研究实验室(EMBL)研究报告第22号。

获国家自然科学基金和 EMBL 基金资助。

收稿日期: 1989年2月14日。

1mmol/L。叶绿素浓度为 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。以放氧速率按文献 [8] 计算叶绿体完整性。若完整性低于 80%，进一步纯化时产率就会太低。参照文献 [6] 测定叶绿体细胞色素氧化酶和过氧化氢酶活性，以检测叶绿体被污染程度。十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳基本按文献 [7] 试验。梯度胶浓度为 6—15%，制备胶溶液为硼酸， $\text{pH} = 8.4$ ；在梯度胶上加一层高 2cm 的堆积胶，浓度为 3%；堆积胶溶液为 Tris-HCl， $\text{pH} = 6.8$ 。电泳缓冲液为 Tris-硼酸系统。电泳后，胶片用考马斯兰 R-250 染色，以醋酸甲醇脱色。用 CS910 光密度计于 595nm 扫描。红血球膜和鸡素囊肌动蛋白均为自制。

二、结果和讨论

1. 叶绿体完整性

制备的粗叶绿体分为低渗胀破的和完整的两组。由图 1 可以看到完整叶绿体，由于铁氰化钾进入有障碍，所以放氧速率很低；叶绿体膜破后，消除了障碍，放氧速率急剧升高。破膜叶绿体的放氧速率为 $357\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ ；完整的叶绿体，放氧速率为 $51\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 。叶绿体完整性为 86%。

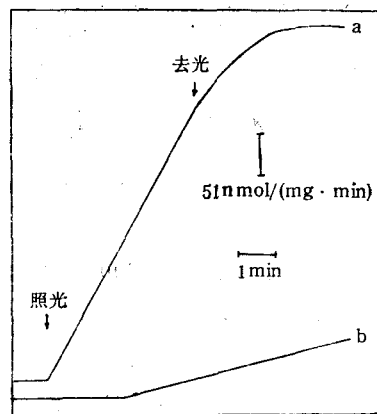


图 1 羽藻叶绿体完整性的测定

Fig. 1 Measurement of chloroplasts intactness of *Bryopsis corticulans*

a. 胀破叶绿体的放氧； b. 完整的叶绿体的放氧。

2. 叶绿体的纯化

粗叶绿体制剂经蔗糖密度梯度离心后，得层次分明的三层绿色溶液(图版 I: A)：上层为叶绿体被膜与类囊体混合物，中层为类囊体，下层为完整叶绿体。离心和收集得到的纯化的叶绿体和类囊体，其结果与文献 [5] 用菠菜制备的叶绿体十分一致。

3. 细胞色素氧化酶与过氧化氢酶活性

细胞色素氧化酶为线粒体标记酶，过氧化氢酶为过氧化物酶体标记酶。分别测定了粗叶绿体和纯化叶绿体制剂中两种酶的活性。纯化叶绿体的细胞色素氧化酶活性，比粗叶绿体的降低约 8 倍；纯化叶绿体的过氧化氢酶活性甚微(表 1)。表明上述用蔗糖密度梯度离心纯化的叶绿体，基本上无线粒体与过氧化物酶体的污染。其纯度合乎研究叶绿体膜蛋白的要求。

表 1 叶绿体中的细胞色素氧化酶及过氧化氢酶的活性

Tab. 1 Activities of cytochrome oxidase and catalase of chloroplast from *Bryopsis corticulans*

叶绿体	细胞色素氧化酶 [nmol/(mg·min)]	过氧化氢酶 [μmol/(mg·min)]
粗叶绿体	617.28	49.86
纯叶绿体	76.77	2.28

4. 膜蛋白多肽成分的电泳分析

着重分析讨论膜骨架蛋白的主要成分即红细胞膜收缩蛋白(α 带, 240KD; β 带, 220KD)及肌动蛋白(45KD)在叶绿体膜中是否存在。

图版 I:B 中, 1 是标准蛋白; 2 是纯化的鸡素囊肌动蛋白, 分子量为 45KD; 7 是人红细胞膜蛋白, 最上面两条可能是收缩蛋白 α 带和 β 带。在完整菠菜叶绿体中, 有明显的 45KD 蛋白带[图版 I:B(5), 图 2a], 高分子量区有 α 带; 而在菠菜类囊体膜中, 45KD 带模糊[图版 I:B(6)], 高分子区的 α , β 带处均无明显染色带[图版 I:B(6), 图 2b]。在完整羽藻叶绿体中, 可见 45KD 带[图版 I:B(3), 图 2c], 高分子量区的 α 带清晰可见, β 带微弱; 而在羽藻类囊体中, 45KD 带及高分子量 α , β 带均未发现[图版 I:B(4), 图 2d]。图 2e, 2f 是人红细胞膜蛋白和鸡素囊肌动蛋白扫描图, 作为其他蛋白扫描图参考。45KD

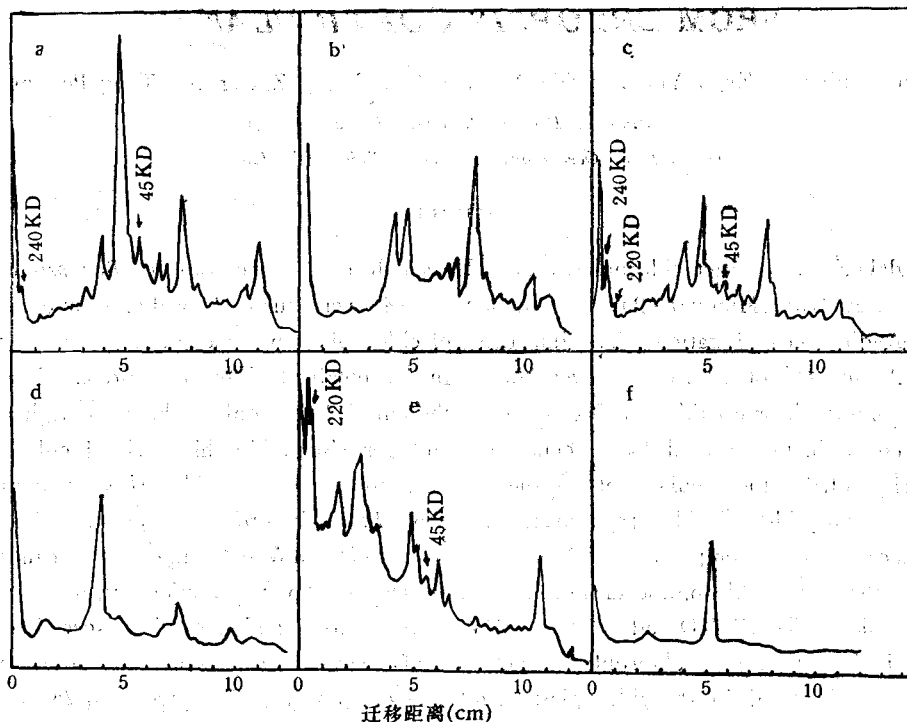


图 2 羽藻和菠菜叶绿体膜蛋白电泳图谱的光密度扫描

Fig. 2 Densitometric scan tracings of electrophoretograms of the membrane proteins from *Bryopsis corticulans* and *Spinacia oleracea* L.

a. 菠菜完整叶绿体, b. 菠菜的类囊体; c. 羽藻完整叶绿体, d. 羽藻的类囊体;
e. 人红细胞膜; f. 鸡素囊肌动蛋白。

带及 α , β 带很可能是定位在叶绿体的被膜上。这些分子量的蛋白是否就是膜骨架蛋白,有待于免疫实验进一步证实。

参 考 文 献

- [1] 阎龙飞、王秀珍、滕晓月等, 1965。高等植物中的收缩蛋白。中国科学 14: 601—608。
- [2] 阎龙飞、王秀珍、滕晓月等, 1985。花粉中的肌动蛋白和肌球蛋白及其在花粉管伸长中的作用。科学通报 30: 945—948。
- [3] Branton, D., C. M. Cohen and J. Tyler, 1981. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell* 24: 24—32.
- [4] Branton, D., 1983. Some lessons from the erythrocyte. *Cell Motility* 3: 363—366.
- [5] Douce, R. and J. Joyard, 1982. Purification of the chloroplast envelope. In *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, ed. by M. Edelman et al. Elsevier Biomedical Press, pp. 239—256.
- [6] Liang, Z., C. Yu and AHC Huang, 1982. Isolation of spinach leaf peroxisomes in 0.25 molar sucrose solution by Percoll density gradient centrifugation. *Plant Physiol.* 70: 1 210—1 212.
- [7] Pharmacia Fine Chemicals, 1980. Polyacrylamide Gel Electrophoresis Laboratory Techniques. Pharmacia Co., Sweden.
- [8] Walker, D. A., 1985. Measurement of oxygen and chlorophyll fluorescence. In *Techniques in Bioproduction and Photosynthesis*, ed. by J. Coombs et al. Pergamon Press, New York.

STUDY ON THE PURIFICATION OF THE MEMBRANE AND THE POLYPEPTIDE OF CHLOROPLAST MEMBRANE FROM *BRYOPSIS CORTICULANS**

Zou Yuping, Zhao Yuan, Wu Xiaonan**, Liang Zheng and Tang Peisong

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)**

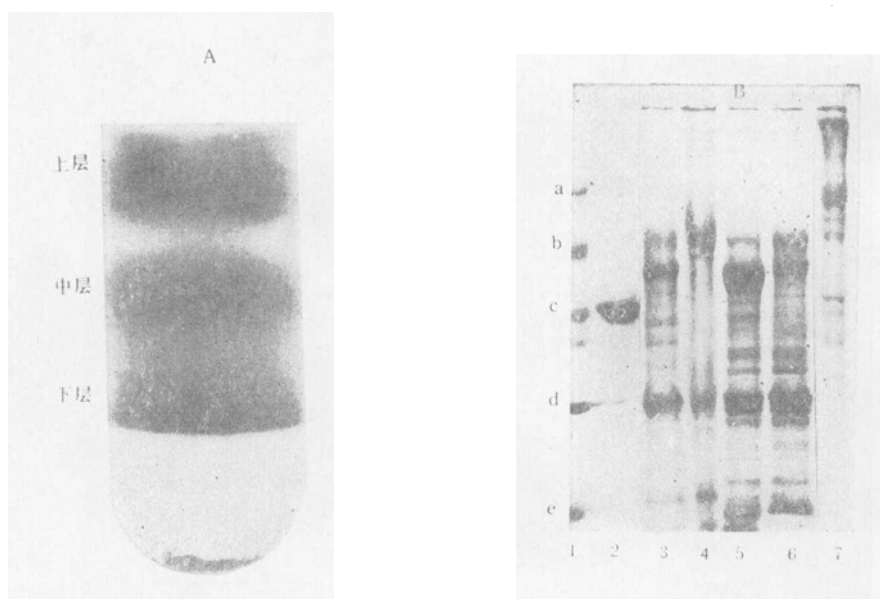
ABSTRACT

Thylakoids and intact chloroplasts, as well as chloroplast membrane of *Bryopsis corticulans* collected from Huiquan Bay of Qingdao in 1988 were purified by discontinuous sucrose density gradient centrifugation. The intactness of chloroplasts was measured by a oxygen electrode. About 86% of chloroplasts were intact in the obtained chloroplast preparation. The activities of cytochrome oxidase and catalase in the purified chloroplasts showed that there were slightly contamination caused by mitochondria and peroxisomes in this purified chloroplasts. The purity fulfilled the requirement for the study of polypeptides of chloroplast membranes.

The polypeptides of chloroplast membranes from *Bryopsis corticulans* and spinach (*Spinacia oleracea* L.) were compared by SDS-PAGE. The 45 KD (MW of actin) protein bands were found in the intact chloroplast membrane of spinach and *Bryopsis corticulans*, but not in the two thylakoids. The 240 KD and 220 KD (MW of the α band and β band of spectrin) bands were obvious in the intact chloroplast membrane of *Bryopsis corticulans*, but only weaker 240 KD protein band in the chloroplast membrane of spinach. There were no 240 KD and 220 KD polypeptides bands in the two thylakoids.

It seems likely that the main proteins of membrane skeleton may be in envelope of chloroplast. These results will be further confirmed by immunotechnique.

* Contribution No. 22 from Experimental marine Biological Laboratory, Institute of Oceanology, Academia Sinica.



A. 羽藻叶绿体在蔗糖密度梯度上的分布。 B. 羽藻和菹藻叶绿体膜蛋白电泳图谱: a. 94KD, b. 67KD, c. 43KD, d. 30KD, e. 20KD; 1. 标准蛋白, 2. 鸡素囊肌动蛋白, 3. 羽藻叶绿体蛋白, 4. 羽藻类囊体蛋白, 5. 菹藻叶绿体蛋白, 6. 菹藻类囊体蛋白, 7. 人红细胞膜蛋白。