

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 一种观察藻胆体移动的光漂白后荧光恢复技术

马为民<sup>1,\*</sup>, 米华玲<sup>2</sup>, 沈允钢<sup>2</sup><sup>1</sup>上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; <sup>2</sup>中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

## A Method for Observing the Movement of Phycobilisomes by Florescence Recovery after Photobleaching

MA Wei-Min<sup>1,\*</sup>, MI Hua-Ling<sup>2</sup>, SHEN Yun-Gang<sup>2</sup><sup>1</sup>College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; <sup>2</sup>Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

提要: 文章从样品制备、测定方法、数据分析方面就如何应用光漂白后的荧光恢复(FRAP)技术观测蓝藻藻胆体在类囊体膜上的移动进行介绍, 得到的结果表明FRAP技术可以直接而有效地观测蓝藻藻胆体在类囊体膜上的移动情况。

关键词: 光漂白后的荧光恢复(FRAP); 藻胆体移动; 蓝藻

蓝藻是一类能进行放氧光合作用的原核生物, 也是研究光合作用的模式生物之一。藻胆体(phycobilisome, PBS)是蓝藻的主要捕光天线, 它们在类囊体膜上的移动能够调节激发能在两个光系统间的分配, 从而优化光能在光合作用中的利用。能量传递研究表明, PBS能直接与光系统II(photosystem II, PS II)或光系统I(photosystem I, PS I)相连(Zhao等1992; Glazer等1994; Mullineaux 1994; Ashby和Mullineaux 1999; Rakhimberdieva等2001), 据此人们推测PBS可通过其在类囊体膜上的移动达到优化光能利用的目的。1997年, Mullineaux等采用激光共聚焦显微镜和光漂白后的荧光恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)技术, 首次在蓝藻细胞类囊体膜上观测到PBS的快速移动过程。随后, 这一技术得到广泛应用和发展, 现已成为人们研究蓝藻PBS移动最为直接和有效的技术(Sarcina等2001; Aspinwall等2004; Joshua和Mullineaux 2004; Joshua等2005; Ma等2007)。但迄今国内采用这一技术研究PBS移动的报道尚不多见。为此, 结合我们的研究工作, 本文从样品制备、测定方法和数据分析等方面就如何应用FRAP技术观测PBS在类囊体膜上的移动进行介绍。

## 材料与方法

## 1 材料

聚球藻(*Synechococcus* sp. strain PCC 7942)细胞用BG-11培养基(含5 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0, Allen 1968), 在30℃、连续光照(40 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)下通气(2% CO<sub>2</sub>的空气)培养。

## 2 方法

2.1 样品制备 5 000×g离心5 min收集处于对数生长期的聚球藻细胞(A<sub>730</sub>=0.4~0.6), 用新鲜BG-11培养基洗涤2次, 最后将细胞重悬于新鲜BG-11培养基中, 并调整叶绿素浓度至5 μg·mL<sup>-1</sup>。同时在细胞悬浮液中加入1 mol·L<sup>-1</sup>甜菜碱(glycinebetaine, GB), 将聚球藻细胞的PBS固定在类囊体膜上, 以抑制其在膜表面的快速移动(Li等2001; Ma等2007)。样品制备按如下步骤:(1)将经GB处理和未处理的聚球藻细胞分别加入到1.5%的低熔点琼

收稿 2008-01-04 修定 2008-04-31

资助 国家自然科学基金(30770175)、上海市科委自然科学基金(07ZR14086)、上海市教育委员会科研创新重点项目(08ZZ67)和上海师范大学博士启动基金(PL709)。

致谢 中国科学院化学研究所夏安东先生、中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所高孝舒和王凌健先生曾给予指导和帮助。上海师范大学魏兰珍和王全喜先生曾提出意见。

\* E-mail: cyanoma@hotmail.com; Tel: 021-64321617

脂糖(用新鲜 BG-11 培养基配制)中 ;(2)放在载玻片上固定细胞,细胞应尽量分散 ;(3)用激光共聚焦显微镜进行FRAP测定。另外,高温会影响PBS的移动,温度应低于 35℃,这样才能将细胞加入到低熔点琼脂糖中。

**2.2 FRAP 测定** 以 633 nm 的光激发蓝藻细胞时,产生的荧光主要来自 PBS 的核心体(Mullineaux 等 1997),所以用FRAP技术观测PBS在类囊体膜上的移动,必须在激光共聚焦显微镜上配备 633 nm 的氩-氦激光器。实验按如下步骤进行:(1)用 2% 的激光强度扫描并记录蓝藻细胞的图像 ;(2)在记录的图像中选定一个长方形区域(宽约为 0.5 μm ;图 2 中的虚线框),然后用 100% 的激光强度对选定区域进行彻底的荧光漂白 ;(3)再用 2% 的激光强度监测被光漂白区域内的荧光恢复情况,并每隔 1 或 3 s 记录荧光恢复数据或图像。另外,实验过程中用于扫描的激光强度应选择不会对样品产生重大光漂白的激光强度。

**2.3 FRAP 数据分析** FRAP 实验数据分析有:(1)对荧光恢复数据进行标准化处理。标准化处理的公式(Goodwin 和 Kenworthy 2005) :  $I(t)_{\text{norm}} = 100 \times [I(t)_{\text{ROI}} - I_b] / [I(t)_{\text{cell}} - I_b] \times (I_{I_{\text{cell}}} - I_b) / (I_{I_{\text{ROI}}} - I_b)$ , 其中,  $I(t)_{\text{norm}}$  为标准化的荧光恢复数据 ;  $I(t)_{\text{ROI}}$  为光漂白区域内随时间变化的荧光强度(region of intensity, ROI) ;  $I_{I_{\text{ROI}}}$  为光漂白区域内漂白前的荧光强度 ;  $I(t)_{\text{cell}}$  为光漂白区域外随时间变化的荧光强度 ;  $I_{I_{\text{cell}}}$  为光漂白区域外漂白前的荧光强度 ;  $I_b$  为背景荧光强度的变化。(2)分析标准化的荧光恢复曲线(图 1-a),用移动公式求出 PBS 中向光漂白区域内移动的百分比。移动的公式(Goodwin 和 Kenworthy 2005) :  $M_f = 100 \times (I_E - I_0) / (I_1 - I_0)$ , 其中,  $M_f$  为 PBS 移动的百分比 ;  $I_E$  为恢复完全时的荧光强度 ;  $I_0$  为光漂白后的荧光强度 ;  $I_1$  为光漂白前的荧光强度。(3)用一元移动经验方程对标准化的 FRAP 荧光恢复数据进行拟合(图 1-b),求出 PBS 在类囊体膜上的移动速率。一元移动经验方程(Ellenberg 等 1997) :  $I(t) = I_E [1 - w^2 \times (w^2 + 4\pi D t)^{-1}]^{1/2}$ , 其中,  $I(t)$  为随时间变化的荧光强度 ;  $I_E$  为恢复完全时的荧光强度 ;  $w$  为长方形的宽 ;  $D$  为 PBS 的移动速率 ;  $t$  的零值为光漂白时间的一半。

## 结果与讨论

FRAP技术一直认为是研究真核细胞膜组份横

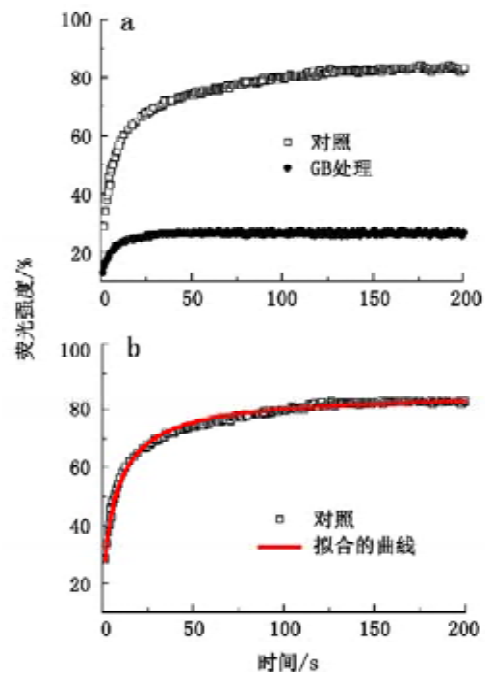


图 1 标准化的FRAP荧光恢复曲线(a)和用一元移动经验方程对其进行拟合的曲线(b)

PBS 移动数低于 45% 的,则不适合用一元移动经验方程进行拟合。

向移动的手段(Zhang 等 1993) ; 直至 1997 年 Mullineaux 等应用这一技术观测到蓝藻细胞 PBS 在类囊体膜上的快速移动现象,嗣后这一技术就成为研究蓝藻 PBS 移动最为直接、有效的手段。GB 是一种小分子化合物,它能将蓝藻 PBS 固定在类囊体膜上,从而抑制其在膜表面的快速移动(Li 等 2001 ; Ma 等 2007),因此,我们遂以经 GB 处理与否的聚球藻细胞为材料,采用FRAP技术观测光漂白后细胞中 PBS 荧光的恢复过程,直接观察聚球藻中 PBS 在类囊体膜上的移动情况。

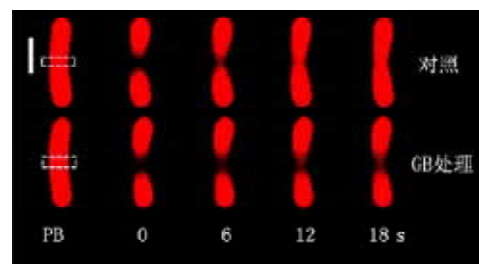


图 2 经 GB 处理的聚球藻细胞光漂白前后的 FRAP 检测  
标尺为 2 μm。

## 1 定性分析

在采用 633 nm 的光激发聚球藻细胞的前提下, 首先用 2% 的激光强度扫描并记录细胞的图像(图 2 中的 PB), 然后用 100% 的激光强度对选定的长方形区域(图 2 中的虚线框)进行彻底的荧光漂白(图 2 中的 0 s), 随后用 2% 的激光强度监测光漂白区域内的荧光恢复情况(图 2 中的 6、12 和 18 s)。从图 2 可见, 在光漂白区内, 未经 GB 处理的细胞(对照)中 PBS 荧光可以有效恢复, 而经 GB 处理的细胞中的 PBS 荧光则不恢复。这表明, PBS 可在类囊体膜上进行快速移动, 因而光漂白区中的 PBS 荧光也得以恢复; 而 GB 对 PBS 移动有抑制作用, 所以 PBS 荧光恢复过程明显减慢甚至不能恢复。

## 2 定量分析

为减少由于背景荧光的变化和光漂白过程中的荧光损失等原因造成的误差, 定量分析之前, 必须首先对荧光恢复曲线进行标准化处理(图 1-a), 然后对标准化的荧光恢复曲线进行分析和计算(图 1-b), 可以得到对照和 GB 处理细胞中 PBS 向光漂白区域内移动的百分比(表 1), 在对照细胞中, 80% 以上的 PBS 能够移动到光漂白区内, 而在 GB 处理的细胞中, 只有不足 16% 的 PBS 能够扩散到光漂白区内, 这就进一步证实 PBS 能够在类囊体膜上进行快速移动; 此外, 还可以测得 PBS 在类囊体膜上的移动速率, 平均移动速率为  $(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (表 1)。

表 1 GB 处理与否的聚球藻细胞中 PBS 移动的百分比和速率

处理	PBS 移动数 / %	移动速率 / $10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
对照	80.1 ± 7.9	2.2 ± 0.3
GB 处理	15.9 ± 4.1	—

总之, 上述定性、定量分析 FRAP 荧光恢复数据的结果不仅证实 GB 对 PBS 移动有抑制作用, 而且还说明 FRAP 技术可以直接而有效地观测 PBS 在类囊体膜上的移动情况。因此认为, FRAP 技术在观测蓝藻 PBS 移动这一领域中有一定的应用前景。

## 参考文献

Allen MM (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-

- green algae on plates. *J Phycol*, 4: 1~4
- Ashby MK, Mullineaux CW (1999). The role of ApcD and ApcF in energy transfer from phycobilisomes to PS I and PS II in a cyanobacterium. *Photosynth Res*, 61: 169~179
- Aspinwall CL, Sarcina M, Mullineaux CW (2004). Phycobilisome mobility in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 is influenced by the trimerisation of photosystem I. *Photosynth Res*, 79: 179~187
- Ellenberg J, Siggia ED, Moreira JE, Smith CL, Presley JF, Worman HJ, Lippincott-Schwartz J (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol*, 138: 1193~1206
- Glazer AN, Gindt YM, Chan CF, Sauer K (1994). Selective disruption of energy flow from phycobilisomes to photosystem I. *Photosynth Res*, 40: 167~173
- Goodwin JS, Kenworthy AK (2005). Photobleaching approaches to investigate diffusional mobility and trafficking of Ras in living cells. *Methods*, 37: 154~164
- Joshua S, Bailey S, Mann NH, Mullineaux CW (2005). Involvement of phycobilisome diffusion in energy quenching in cyanobacteria. *Plant Physiol*, 138: 1577~1585
- Joshua S, Mullineaux CW (2004). Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria. *Plant Physiol*, 135: 2112~2119
- Li Y, Zhang J, Xie J, Zhao J, Jiang L (2001). Temperature-induced decoupling of phycobilisomes from reaction centers. *Biochim Biophys Acta*, 1504: 229~234
- Ma W, Ogawa T, Shen Y, Mi H (2007). Changes in cyclic and respiratory electron transport by the movement of phycobilisomes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biochim Biophys Acta*, 1767: 742~749
- Mullineaux CW (1994). Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1184: 71~77
- Mullineaux CW, Tobin MJ, Jones MR (1997). Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. *Nature*, 390: 421~424
- Rakhimberdieva MG, Boichenko VA, Karapetyan NV, Stadnichuk IN (2001). Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochemistry*, 40: 15780~15788
- Sarcina M, Tobin MJ, Mullineaux CW (2001). Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* 7942. Effects of phycobilisome size, temperature, and membrane lipid composition. *J Biol Chem*, 276: 46830~46834
- Zhang F, Lee GM, Jacobson K (1993). Protein lateral mobility as a reflection of membrane microstructure. *Bioessays*, 15: 579~588
- Zhao J, Zhou J, Bryant DA (1992). Energy transfer processes in phycobilisomes as deduced from analyses of mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. In: Murata N (ed). *Research in Photosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Acad Pub, 25~32