

毕氏海蓬子光系统II颗粒的分离与鉴定

周峰*, 华春, 郑春梅

南京晓庄学院生物化工与环境工程学院, 南京211171

摘要: 采用去污剂Triton X-100增溶类囊体膜和高速离心的方法, 首次分离和纯化了毕氏海蓬子的光系统II (photosystem II, PSII)颗粒, 通过光谱学和SDS-PAGE对其进行鉴定并与类囊体膜进行比较。室温吸收光谱结果表明, PSII颗粒在蓝区的叶绿素(chlorophyll, Chl) *b*和胡萝卜素类吸收峰为485 nm, 在红区的Chl *b*吸收峰为655 nm, 这两个峰值均低于类囊体膜中的。77K荧光发射光谱结果表明, 提取的PSII颗粒基本不含光系统I (photosystem I, PSI)的低温荧光反射峰737 nm。77K荧光激发光谱结果显示, 海蓬子PSII颗粒在470~485 nm之间的Chl *b*和胡萝卜素类的荧光发射峰明显低于类囊体膜的。这说明在PSII中大部分的PSI已被除去。电泳结果显示, 海蓬子PSII颗粒缺少PSI反应中心蛋白质亚基PsaA和PsaB, 这说明提取到的PSII纯度较高, 这为进一步研究毕氏海蓬子PSII的结构与功能奠定基础。

关键词: 海蓬子; 光系统II; 光谱; 电泳

Isolation and Identification of Photosystem II Protein of *Salicornia bigelovii* Torr.

ZHOU Feng*, HUA Chun, ZHENG Chun-Mei

School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China

Abstract: The photosystem II (PSII) of *Salicornia bigelovii* from coastal wetlands was firstly isolated and purified by solubilization of thylakoid membrane using detergent Triton X-100 and high-speed centrifugation. The PSII particles of *S. bigelovii* were studied and compared with thylakoid membrane by spectroscopy and SDS-PAGE methods. The results of absorption spectra at room temperature showed that the absorption peak of chlorophyll (Chl) *b* and carotenoid in the blue region was 485 nm, and the absorption peak of Chl *b* in the red region was 655 nm. Moreover, the two peaks were lower than those in the thylakoid membrane. The results of 77K fluorescence emission spectra showed that PSII particles extracted were free of the low temperature fluorescence peak 737 nm of photosystem I (PSI). It was shown from 77K fluorescence excitation spectra that the emission peak between 470–485 nm was lower than that of the thylakoid membrane. These indicated that most of the PSI has been removed from the extracted PSII. The PSII particles of *S. bigelovii* were lack of PSI reaction center protein subunits (PsaA and PsaB). It demonstrated that the extracted PSII particles were high purity, which could be used for further study on the structure and function of *S. bigelovii*.

Key words: *Salicornia bigelovii*; PSII; spectra; electrophoresis

光合作用的光能吸收、传递和转化过程是在具有一定分子排列和空间构象的色素蛋白复合体以及有关的电子载体中完成的。这些复合体大多数都镶嵌在基本的光合膜系统——类囊体膜中。类囊体膜中的光系统II (photosystem II, PSII)复合体是进行光合作用原初反应的重要场所, 它的主要功能是吸收光能, 进行光诱导的电荷分离, 产生电子传递并催化水的光解(周峰2007)。

目前, 关于海蓬子的研究主要集中在耐盐生理和营养成份方面(刘伟成等2013; 吴演等2012), 作者前期也对海蓬子类囊体膜蛋白进行了相关研

究(周峰等2012), 其他盐生植物如海马齿(*Sesuvium portulacastrum*)、星星草(*Puccinellia tenuiflora*)和欧洲海蓬子(*Salicornia europaea*)等的类囊体膜蛋白光谱学和Western杂交分析也有报道(Rabhi等2010; Yu等2011; Fan等2011)。但关于海蓬子或其它盐生植物的PSII分离纯化报道很少, 而PSII的分

收稿 2013-12-23 修定 2014-02-10

资助 江苏省自然科学基金青年基金(BK2012073)、国家高技术研究发展“863”计划(2012AA021701)和江苏省生态学重点学科建设项目(2012)。

* 通讯作者(E-mail: zfbcas@163.com; Tel: 025-86178274)。

离纯化对于深入研究海蓬子光合作用机理以及在其基础上继续提取捕光天线II (light harvesting complexes II, LHCI)等具有重要意义。本文通过室温吸收光谱、77K荧光光谱和SDS-PAGE对首次分离得到的海蓬子PSII颗粒进行了鉴定与分析,为进一步研究海蓬子的耐盐高光效机制奠定基础。

材料与方法

1 材料

植物材料为滨海生境条件下的毕氏海蓬子 (*Salicornia bigelovii* Torr.) 采自江苏省盐城市。参照周峰等(2012)和Tang等(2007)的方法,制备具光化学活性的类囊体膜和PSII颗粒。

2 光谱测定

吸收光谱用岛津UV2450分光光度计进行检测,扫描速率为 $100 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$,分辨率为 0.5 nm ;样品中Chl浓度调至 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。低温荧光光谱的测定用Hitachi F-4500荧光分光光度计进行检测,样品在室温或77K液氮温度下,Chl浓度调至 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。激发光波长为436或480 nm,激发狭缝和发射狭缝分别是10和5 nm。Chl浓度和Chl a/b用Arnon公式(Arnon 1949)计算。

3 SDS-PAGE电泳

按照Shan等(2001)的方法,分离胶和浓缩胶的浓度分别为15%和4%。分离胶中加入 $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素以提高分辨率,先用80 V稳压电泳,溴酚兰进入分离胶后再改用120 V稳压。将提取的类囊体膜和PSII颗粒用含有 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mes (pH 6.5)和 $35 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的缓冲液稀释,加入上样缓冲液混匀(样品色素终浓度为 $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),然后沸水浴10 min。取 $20 \mu\text{L}$ 上样。

实验结果

1 毕氏海蓬子PSII的吸收光谱

图1是海蓬子类囊体膜和PSII颗粒两种色素蛋白复合物的室温吸收光谱。由图1中可以看出,PSII的吸收光谱在蓝区有2个吸收峰,分别是436和485 nm,436 nm主要是Chl a的吸收峰,485 nm主要来自Chl b和胡萝卜素类的吸收;在红区682 nm处有一个峰,主要是Chl a的吸收峰,类囊体膜在655 nm左右还有一个尖峰,是Chl b的吸收峰

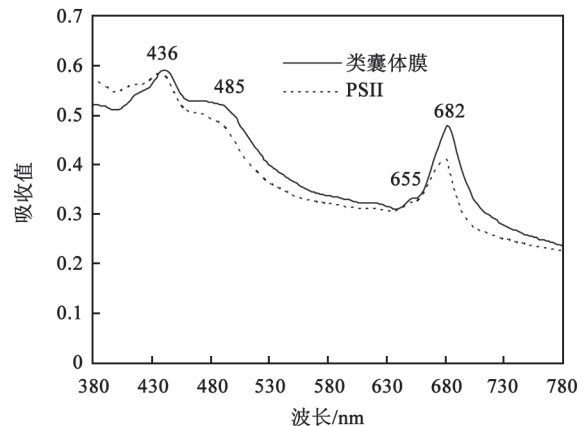


图1 海蓬子PSII颗粒和类囊体膜蛋白复合体的室温吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of PSII and thylakoid complexes of *S. bigelovii* at room temperature

(Ide等1987)。类囊体膜在Chl b处的吸收高于PSII颗粒,这是由于类囊体膜含有相对高的Chl b分子的缘故。

2 毕氏海蓬子PSII的77K荧光发射光谱

从图2可以看出,海蓬子的类囊体膜77K荧光发射光谱有3个荧光发射峰峰:688、697和737 nm。研究表明,荧光发射峰697 nm来源于PSII内周天线CP47中在690 nm处吸收的Chl a;荧光发射峰688 nm表示了内周天线CP43、CP47和PSII反应中心色素之间达到单线激发态平衡的荧光(Andri-zhiyevskaya等2005);737 nm是PSI的荧光发射峰。

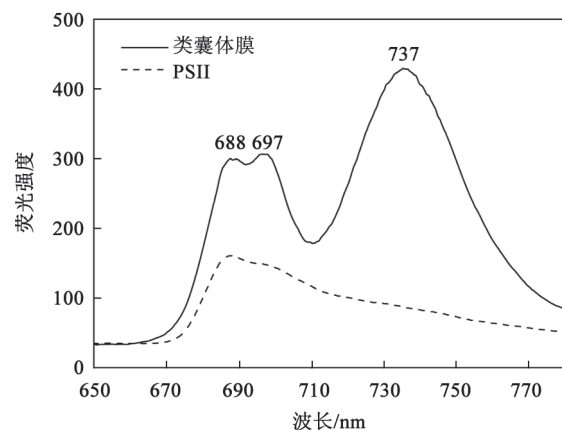


图2 海蓬子PSII颗粒和类囊体膜蛋白复合体的77K荧光发射光谱

Fig.2 The 77K fluorescence emission spectra of PSII and thylakoid complexes of *S. bigelovii*

通过比较发现, 提取的PSII颗粒的没有PSI的737 nm峰, 这表明提取的PSII颗粒样品纯, 不含PSI的蛋白亚基。

3 毕氏海蓬子PSII的77K荧光激发光谱

从图3可以看出, 海蓬子的类囊体膜和PSII颗粒的荧光激发光谱在440 nm左右有一个峰, 属于Chl *a*; 在470~485 nm之间的峰属于Chl *b*和类胡萝卜素分子的复合峰。类囊体膜在此处的峰要比PSII颗粒高, 这是因为类囊体膜含有较多Chl *b*的原因。PSII颗粒在470~485 nm之间的峰低, 表明在PSII中, 大部分的LHCI (Chl *b*)已被除去。

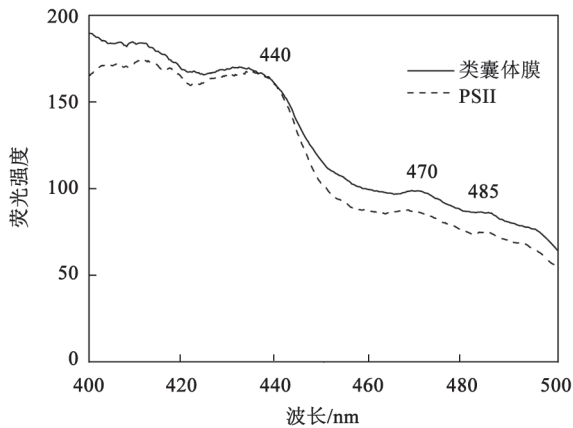


图3 海蓬子PSII颗粒和类囊体膜蛋白复合体的77K荧光激发光谱

Fig.3 The 77 K fluorescence excitation spectra of PSII and thylakoid complexes of *S. bigelovii*

4 毕氏海蓬子PSII的SDS-PAGE

由图4可以看出, 与类囊体膜相比, 海蓬子PSII颗粒缺少PSI反应中心蛋白质亚基PsaA和PsaB, 这进一步说明提取到的PSII纯度较高。PSII中含有分子量分别为47和43 kDa的内周天线蛋白CP47和CP43、32 kDa的D2蛋白和外周天线蛋白LHCII, LHCII包括Lhcb1和Lhcb2蛋白的混和条带以及Lhcb3蛋白的条带(Jasson 1994)。此外, 还包括分子量分别为33、23和17 kDa的3个放氧外周蛋白, 这与前人在菠菜和欧洲海蓬子的研究结果一致(Eshaghi等1999)。相同色素总浓度条件下, PSII颗粒的蛋白亚基CP47、CP43、D2等的表达量高于类囊体膜中的(图4), 这是因为类囊体膜在进一步纯化中所含的PSI反应中心蛋白亚基被去除, 这与

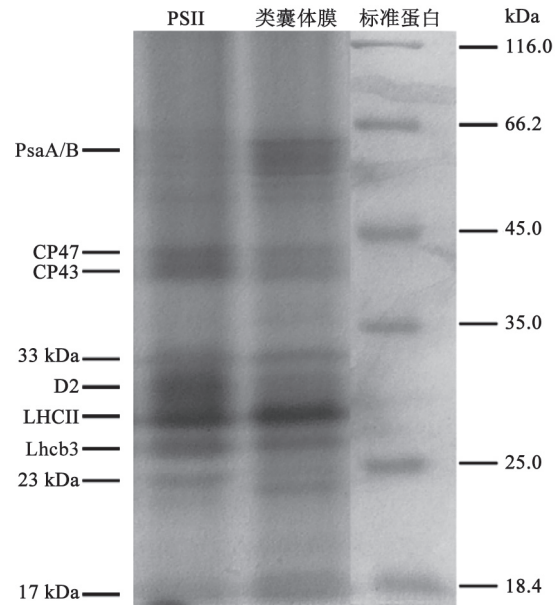


图4 海蓬子PSII颗粒和类囊体膜蛋白复合体的SDS-PAGE
Fig.4 SDS-PAGE of PSII and thylakoid complexes of *S. bigelovii*

低温荧光发射光谱的研究结果一致(图2)。

讨 论

高等盐生植物的PSII结构与功能研究具有重要意义, 可为了解盐生植物的耐盐高光效机制奠定基础。Liu等(2010)对海洋绿藻石莼(*Ulva lactuca*)的研究表明, 石莼类囊体膜多肽组成和菠菜类囊体膜的基本相同, 但也存在一些差异, 包括D2蛋白与D1蛋白的分界不明显, 而且D1蛋白含量更高。Rabhi等(2010)对盐生植物海马齿(*Sesuvium portulacastrum*)的研究发现, 盐处理的海马齿的类囊体膜蛋白亚基D1、CP47和CP43未发生明显变化, LHCII降低了15%。Trotta等(2012)对盐沼节黎属一种盐生植物(*Arthrocnemum macrostachyum*)的研究发现, 33 kD蛋白、PsbS和PsbR不受盐胁迫影响, 但盐胁迫使LHCII含量下降约10%, 而所有PSII反应中心蛋白在无NaCl处理时含量最低。这些研究主要是在植物的类囊体膜上层次上开展的, 关于高等盐生植物PSII的提取鉴定报道很少, 而高等盐生植物PSII的分离纯化可为研究耐盐高光效机制奠定基础。本文的研究结果表明, 首次分离纯化得到的毕氏海蓬子的PSII纯度较高, 77K荧光发射光谱结果表明, 提取的PSII颗粒的基本不含PSI

低温荧光发射峰737 nm。77K荧光激发光谱结果显示,海蓬子PSII颗粒在470~485 nm之间的Chl *b*和胡萝卜素类的荧光发射峰明显低于类囊体膜的。这说明在PSII中,大部分的PSI已被除去。电泳结果也证实,海蓬子PSII颗粒缺少PSI反应中心蛋白质亚基PsaA和PsaB,这与77K荧光发射光谱结果相一致。成功分离纯化的海蓬子PSII蛋白颗粒不仅可研究其在盐渍环境下的结构与功能,而且可在其基础上继续分离纯化LHCII等光合膜蛋白,全面了解海蓬子的PSII。

参考文献

- 刘伟成, 郑春芳, 陈琛, 彭益全, 曾国权, 冀德伟, 陈少波, 谢起浪, 於俊琦(2013). 花期海蓬子对盐胁迫的生理响应. 生态学报, 33 (17): 5184~5193
- 吴演, 杨瑞琦, 陈美珍, 廖绪标(2012). 海蓬子籽油亚油酸共轭化产物的抗肿瘤作用. 食品科学, 33 (23): 318~322
- 周峰(2007). 光合膜蛋白晶体的结构与功能. 生命的化学, 27 (5): 370~372
- 周峰, 华春, 顾祝军, 秦晓春(2012). 盐酸胍对毕氏海蓬子类囊体膜蛋白光谱特征的影响. 植物生理学报, 48 (1): 63~68
- Andrizhiyevskaya EG, Chojnicka A, Bautista JA, Diner BA, van Grondelle R, Dekker JP (2005). Origin of the F685 and F695 fluorescence in photosystem II. *Photosynth Res*, 84 (1-3): 173~180
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24 (1): 1~15
- Eshaghi S, Andersson B, Barber J (1999). Isolation of a highly active PSII-LHCII supercomplex from thylakoid membranes by a direct method. *FEBS Lett*, 446 (1): 23~26
- Fan PX, Feng JJ, Jiang P, Chen X, Bao H, Nie L, Jiang D, Lv S, Kuang T, Li Y (2011). Coordination of carbon fixation and nitrogen metabolism in *Salicornia europaea* under salinity: comparative proteomic analysis on chloroplast proteins. *Proteomics*, 11 (22): 4346~4367
- Ide JP, Klug DR, Kühlbrandt W, Giorgia LB, Portera G (1987). The state of detergent solubilised light-harvesting chlorophyll-a/b protein complex as monitored by picosecond time-resolved fluorescence and circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, 893 (2): 349~364
- Jasson S (1994). The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1184 (1): 1~19
- Liu S, Qiu Y, Yu DY (2010). The effect of amphiphilic peptide surfactants on the light harvesting complex II. *Photosynthetica*, 48 (4): 610~616
- Rabhi M, Giuntini D, Castagna A, Remorini D, Baldan B, Smaoui A, Abdelly C, Ranieri A (2010). *Sesuvium portulacastrum* maintains adequate gas exchange, pigment composition, and thylakoid proteins under moderate and high salinity. *J Plant Physiol*, 167 (16): 1336~1341
- Shan JX, Wang JS, Ruan X, Li L, Gong Y, Zhao N, Kuang T (2001). Changes of absorption spectra during heat-induced denaturation of photosystem I core antenna complexes CP43 and CP47: revealing the binding states of chlorophyll molecules in these two complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1504 (2-3): 396~408
- Tang Y, Wen X, Lu Q, Yang Z, Cheng Z, Lu C (2007). Heat stress induces an aggregation of the light-harvesting complex of photosystem II in spinach plants. *Plant Physiol*, 143 (2): 629~638
- Trotta A, Redondo-Gómez S, Pagliano C, Clemente ME, Rascio N, Rocca NL, Antonacci A, Andreucci F, Barbato R (2012). Chloroplast ultrastructure and thylakoid polypeptide composition are affected by different salt concentrations in the halophytic plant *Arthrocnemum macrostachyum*. *J Plant Physiol*, 169 (2): 111~116
- Yu J, Chen S, Zhao Q, Wang T, Yang C, Diaz C, Sun G, Dai S (2011). Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *J Proteome Res*, 10 (9): 3852~3870