

固氮蓝藻 *Anabaena* sp. 7120 的叶绿素蛋白复合体的分离和光谱特性的研究*

刘梅 刘其芳 张宪孔 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

用光合膜片增溶和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,从固氮蓝藻 *Anabaena* sp. 7120 分离到 7 条色素带。

迁移率较慢的五条叶绿素蛋白复合体带,具有相同的吸收光谱和室温荧光光谱特性。它们的红区最大吸收峰在 676 nm; 蓝区最大吸收峰在 438 nm。它们的室温荧光发射最高峰在 672—673 nm; 在 710, 732 和 740 nm 都有小峰。这些是 CPI 叶绿素所特有的。我们认为这 5 条带都是属于光系统 I 的叶绿素蛋白复合体。

另一条迁移率稍快的叶绿素蛋白复合体带为 CPII。它的红区最大吸收峰在 672 nm; 蓝区最大吸收峰在 436 nm。与 CPI 带相比,两个峰均向短波端偏移。它们的室温荧光发射最高峰在 675 nm, 没有 CPI 所特有的小峰。这些性质说明此带和 CPI 带不同,而是和光系统 II 反应中心相关的一个复合体。

迁移率最快的带是游离色素带。

1966 年 Ogawa 等用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离到两个叶绿素蛋白复合体,证明叶绿素是和蛋白质结合的^[1]。随着电泳技术的不断改进,对叶绿素蛋白复合体的了解也不断深入。发现光合膜的叶绿素吸收光谱是复合的,并指出色素是以几种不同状态或形式存在于体内^[2]。每一种叶绿素蛋白复合体包含一群以上的叶绿素分子,这些叶绿素分子具有共有的键和独有的吸收特性。完整膜的吸收光谱是代表所有这些叶绿素分子群的吸收总和^[4]。不同植物种由于它们的叶绿素蛋白复合体的组成及叶绿素分子在其中的排列不同,使它们具有各自的吸收光谱。

蓝藻是一类只有叶绿素 a, 没有叶绿素 b, 并以藻蓝素和类胡萝卜素为捕光色素的低等植物。与高等植物的垛叠式类囊体膜相比,它具有一个简单的膜片结构。研究蓝藻光合膜的叶绿素蛋白复合体,对于叶绿素遗传和光合作用演化都具有一定的意义。为此,我们选用蓝藻为材料,分离了它的叶绿素蛋白复合体,并对它们进行了光谱分析。

* 本文缩写 Chl: 叶绿素; CP: 叶绿素蛋白复合体; PAGE: 聚丙烯酰胺电泳; PC: 藻蓝素; PSI: 光系统 I; PSII: 光系统 II; SDS: 十二烷基磺酸钠; Tris: 三羟甲基氨基甲烷。

吸收光谱承武汉大学化学系冯勇跃同志测定;胶条原位扫描承我所朱兰菲同志测定。工作中还得到中国科学院北京植物所储仲稀、许春辉和李桐柱等同志的帮助。在此一并致谢。

1983 年 4 月 23 日收到。

材 料 和 方 法

(一) 实 验 材 料

固氮蓝藻 *Anabaena* sp. 7120 用修改的 Allen-Arnon 培养基于 30℃ 通空气培养。用 4 支 20W 日光灯和 300W 钨丝灯交替光照,光强为 3,000lx,每天光照 10 小时,生长 7 天收集。

(二) 光合膜片的分离

离心收得的藻体,悬浮于少量 0.001M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中,转放到液氮中冻结,然后取出在冰箱中融化,反复 2—3 次。离心后弃去蓝色上清液 (或加硫酸沉淀供研究藻蓝素用),立即用蒸馏水洗绿色沉淀表面一次,除去残留的藻蓝素。此沉淀即为光合膜片,贮于液氮中待用。

(三) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用不连续系统管状 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,以 Anderson^[2] 的方法为基础稍加修改。凝胶管 0.9×9cm。

分离胶组成: 430mM Tris-HCl (pH 9.35), 0.05% 过硫酸胺 (w/v) 和 0.05% N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED v/v), 0.1% SDS。胶浓度为 9.0%。

浓缩胶组成: 210mM Tris-HCl (pH 6.14), 0.05% 过硫酸胺 (w/v) 和 0.05% N, N', N'-四甲基乙二胺 (v/v)、0.1% SDS。胶浓度为 3%。

丙烯酰胺: N, N'-亚甲基-双丙烯酰胺 = 30:0.8 (w/w)。

上槽电解缓冲液为 41mM Tris 用硼酸调整 pH 至 8.64, 加 0.1% SDS。下槽电解缓冲液为 430mM Tris, 用 HCl 调整 pH 至 9.35。

样品处理: 取光合膜片制剂以 Triton:Chl = 25:1 的比例加入 1% Triton-50 mM Tris-20mM 抗坏血酸增溶溶液,在冰箱中用磁力搅拌增溶 20 分钟,离心去沉淀。上清液为叶绿素蛋白复合体制剂,加蔗糖使最后浓度为 20%。每管加样 50ml, 电流 6 毫安,电泳持续时间为 1.5—2 小时,在 4℃ 条件下进行。

(四) 光谱分析

吸收光谱测定: 将凝胶柱中的色带分别切下,直接用岛津 CS-300 二波长双光束分光光度计进行可见光扫描,扫描波长 350—750nm。

室温下荧光光谱测定: 将数条凝胶柱的相同色素带切下,用增溶液浸泡,浸出液用 FP-550 数字显示荧光分光光度计测定。

胶条原位吸收光谱扫描用 Chromscan 200 测定。

实 验 结 果

(一) 光合膜的叶绿素蛋白复合体

在我们的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的条件下,从 *Anabaena* sp. 7120 的光合膜分离

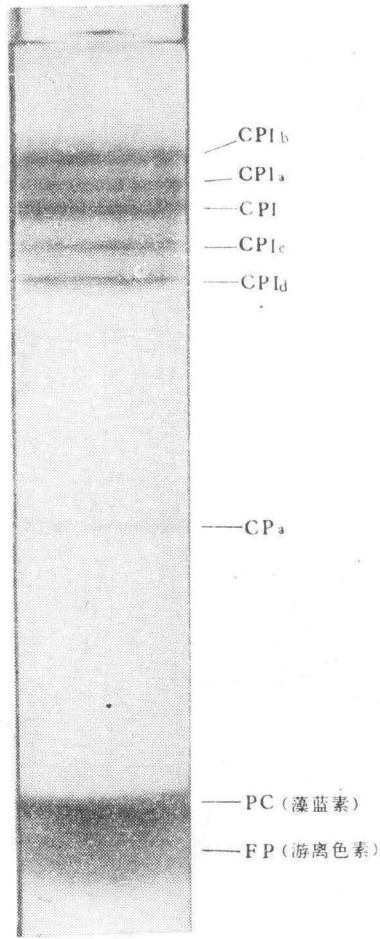


图 1 *Anabaena* sp. 7120 叶绿素蛋白复合体的 SDS-PAGE 柱

Fig. 1 SDS-PAGE column of chlorophyll-protein complex of *Anabaena* sp. 7120

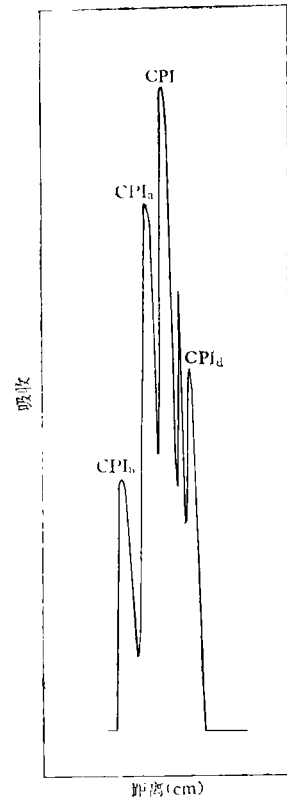


图 2 CPI 群的凝胶柱在 670 nm 的光密度扫描

Fig. 2 Photodensitometry scanning at 670 nm of PAGE gel of CPI group in situ

得到 7 条含叶绿素带, 其中 6 条为叶绿素蛋白复合体, 主要含叶绿素 a 和少量类胡萝卜素; 一条为游离色素, 它含有少量的叶绿素和藻蓝素, 大部分为类胡萝卜素。根据它们的迁移率, 我们将它们分别命名为 CPIb、CPIa、CPI、CPIc、CPId、CPa 和 FP (图 1, 2)。

(二) 叶绿素蛋白复合体的吸收光谱

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳从 *Anabaena* sp. 7120 的光合膜中分得的 7 条含叶绿素带中, 5 条迁移率较慢的为 CPI 群叶绿素蛋白复合体带, 它们的吸收光谱很相似 (图 3)。红区的最大吸收峰在 676nm, 蓝区最大吸收峰在 438nm; 在 500nm 处有较宽的肩峰, 这是类胡萝卜素所致。它们在 670nm 的原位扫描 (图 2)。从它们的电泳迁移率和吸收光谱来看, 和高等植物的 P_{700} -Chla-蛋白复合体^[5,12,14,15]相似。

迁移率稍快的 CPa 带的吸收光谱和 CPI 带的吸收光谱不一样 (图 4)。它的红区吸收

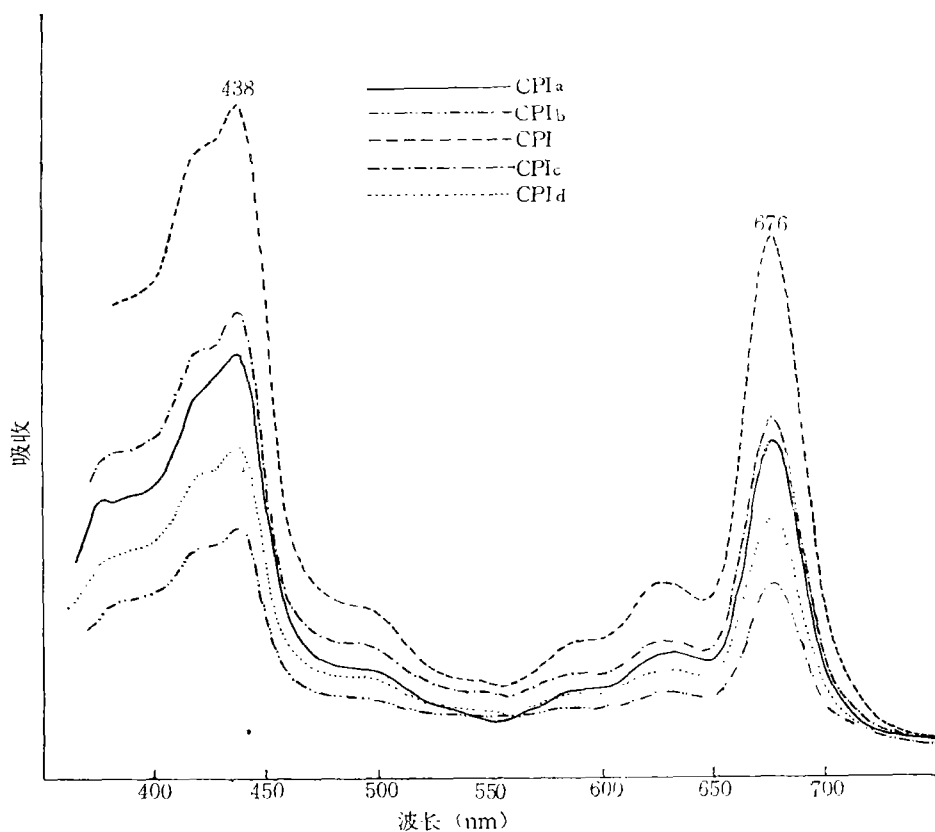


图3 CPI, CPIa, CPIb, CPIc 和 CPId 胶切片的吸收光谱

Fig. 3 Absorbance spectra of CPI, CPIa, CPIb, CPIc and CPId in PAGE gel slice

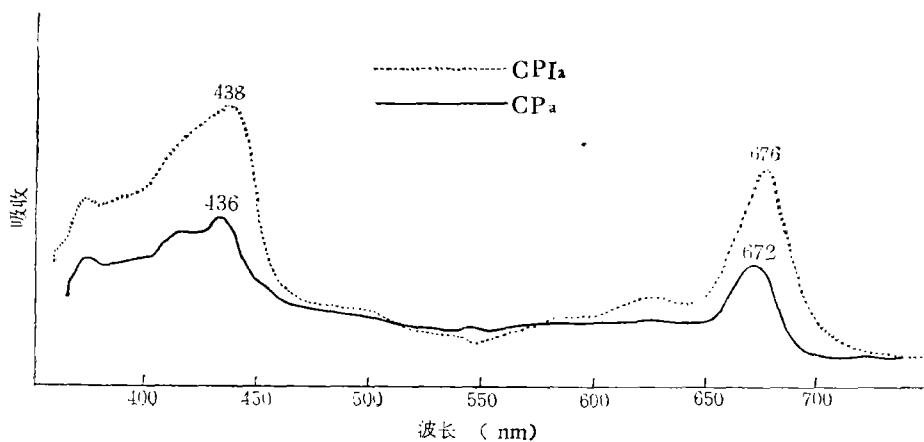


图4 CPIa 和 CPa 胶切片的吸收光谱

Fig. 4 Absorbance spectra of CPIa and CPa in PAGE gel slice

峰最大值在 672nm, 蓝区最大吸收值在 436nm。与 CPI 比, 两个峰值均偏向短波段。它们在 630nm 和 500nm 的峰都没有 CPI 的那么明显。从它的特征看, 和 Anderson^[1] 用 SDS

电泳从蒹菜类囊体膜分离到的 CPa 带相似,乃是和光系统 II 反应中心有关的叶绿素蛋白复合体。

(三) 叶绿素蛋白复合体的室温荧光光谱

我们用各叶绿素蛋白复合体的凝胶切片浸出液测了室温荧光激发光谱和荧光发射光谱。激发波长为 435nm 时, CPI 的发射最高峰在 672—673nm, 在 710, 732 和 740nm 都有小峰(图 5A); 而 CPa 的发射光谱(图 5B)和 CPI 的不同,它只有一个发射峰位于 675nm。

两者的激发光谱有些相似(图 6)。以 670nm 为发射波长,它们在 414nm 和 435nm 都有激发峰,只是 CPI 在 414nm 的激发峰较 435nm 的峰高,在 385nm 有一小峰,而 CPa 的 414nm 和 435nm 峰差异较小,385nm 只是一个肩峰。

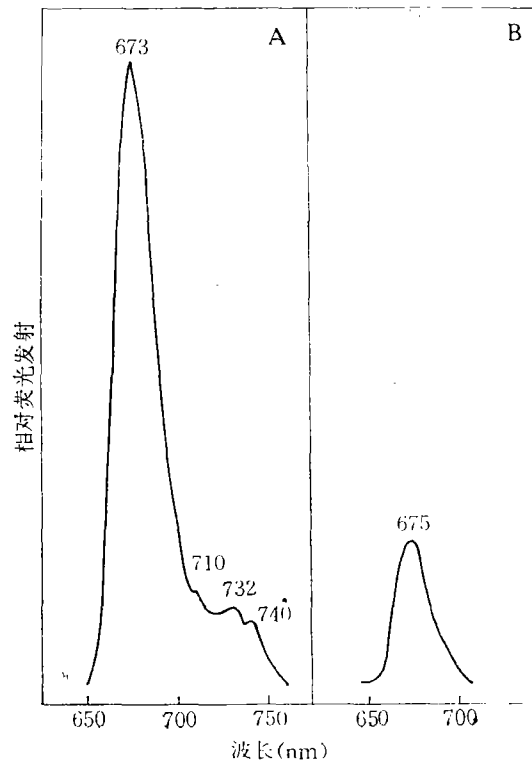


图 5 CPI, CPa 胶切片浸出液的室温荧光发射光谱。
激发波长 435nm。A 为 CPI, B 为 CPa

Fig. 5 Fluorescence emission spectra of CPI and CPa under room temperature in PAGE gel slice extract.

The excitation wavelength is 435 nm. A is CPI, B is CPa

无论从荧光激发光谱还是发射光谱来看,蓝藻 *Anabaena* sp. 7120 的 CPI 带和 Mohanty 等^[8]所测得的蒹菜 P₇₀₀-Chla-蛋白复合体的荧光光谱很相似。

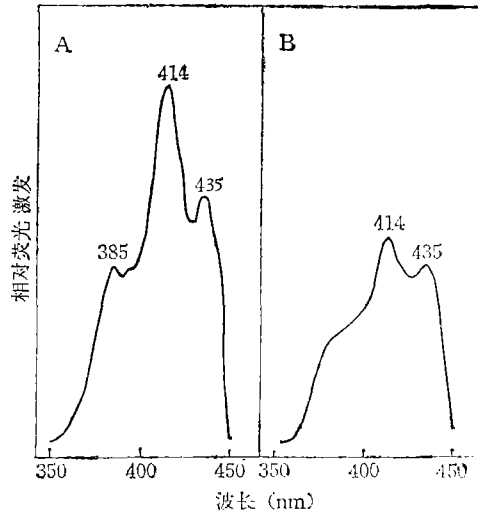


图6 CPI、CPa 胶切片浸出液的室温荧光激发光谱。发射波长 670nm。A 为 CPI, B 为 CPa

Fig. 6 Fluorescence excitation spectra of CPI and CPa under room temperature in PAGE gel slice extract.

The emission wavelength is 670 nm. A is CPI, B is CPa.

讨 论

蓝藻是一种原核生物。从核相来看,它比较原始;从它的色素组成来看,它没有叶绿素 b 而有大量的藻蓝素,能在不破坏膜结构的情况下把它们除去,使膜制剂含较少的色素组成。因此,研究这种膜中叶绿素的组成较高等植物方便。

蓝藻光合器的组成和功能与高等植物十分相似^[6]。它也含有两个光合系统和一个相同的光合电子传递组分。如将蓝藻的叶绿素蛋白复合体与高等植物及光合细菌的进行比较,它与前者更为密切^[13]。我们从 *Anabaena* sp. 7120 分离到的几条叶绿素蛋白复合体的色素组成和吸收光谱、荧光发射光谱及激发光谱特性,都与高等植物十分相似^[7,8,11,12,14,15],也证实了这一点。

我们从 *Anabaena* sp. 7120 的光合膜中分离到的 CPI 和 CPIa 带的吸收光谱与 Anderson (1978)^[11] 从菠菜中分得的 CPI 和 CPIa 带、Reinman 和 Thornber(1979)^[10] 从蓝藻 *Phormidium luridum* 分得的 A、A-II 带类似。它们的室温荧光激发光谱和发射光谱和 Mohanty 等(1977)^[8] 测得的 P₇₀₀-Chla-蛋白复合体带的室温荧光光谱相近。在 710, 730 和 740nm 都有荧光发射峰。这些峰恰恰是 CPI 叶绿素所特有的^[8]。除这 2 条带外,我们还分离到 3 条 CPI 带,即 CPIb、CPIc 和 CPId。它们的吸收光谱和荧光光谱都和 CPI 及 CPIa 带十分相似,但它们的电泳迁移率不同,这可能是叶绿素与不同的多肽相结合所致。根据这些性质,我们推测 CPIa、CPIb、CPIc 和 CPId 为 CPI 的不同寡聚体。由此说明 *Anabaena* sp. 7120 的光合膜中属于光系统 I 的叶绿素蛋白复合体至少有 5 个。

另一条 Chla-蛋白复合体带是 CPa 带。它的吸收最高峰在 672nm 和 436nm, 都较

CPI 带向短波段偏移; 室温荧光光谱只有 675nm 一个峰, 没有远红光的几个小峰 (710, 732 和 740nm)。这些性质说明 CPa 带显然与 CPI 带不同, 它不是和 PSI 反应中心相关的蛋白复合体。

从 CPa 带的光谱性质看, 与 Reinmam 和 Thornber (1979)^[10] 的 A-2 带、Anderson (1978)^[1] 的 CPa 带及 Brown (1980)^[4] 的 CPa₁ 带相近。说明我们从 *Anabaena* sp. 7120 光合膜分得的 CPa 带可能是与光合系统 II 反应中心相关的一个复合体。

从反复分离中发现 CPI 的 5 条带的色素浓度比例并不恒定, 但这些变化不影响其光谱特性。同样, 在有些分离样品中, CPa 带极不明显, 似与生长期有关, 尚须进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Anderson, J. M., 1978. Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. Spectral characterization of six complexes resolved by an improved eletrophoretic procedure. *FEBS Letters*, **92**: 227—233
- [2] Anderson, J. M., 1980. P-700 content and polypeptide profile of chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. *Biochem. et Biophys. Acta.*, **591**: 113—126.
- [3] Brown, J. S., 1972. Forms of chlorophyll in vivo. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **23**: 73—86.
- [4] Brown, J. S., 1980. Absorption and fluorescence spectra of chlorophyll-protein isolated from *Euglena gracilis*. *Biochem. et Biophys. Acta.*, **591**: 9—12.
- [5] Dietrich, W. E. Jr. and J. P. Thornber, 1971. The P700-chlorophyll a-protein of a blue-green alga. *Biochem. et Biophys. Acta*, **245**: 482—493.
- [6] Krogmann, D. W., 1973. Photosynthetic reactions and structure of thylakoids. in *The biology of the blue-green algae* (Carr, N. G. and B. A. Whitton, eds.), pp. 80—98, University of California Press, Berkeley, California 94720
- [7] Markwell, J. P., Reinmam, S. and J. P. Thornber, 1978. Chlorophyll-protein complexes from higher plants. A procedure for improved stability and fractionation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**: 136—141.
- [8] Mohanty, P., Braun, B. Z., Govindjee and J. P. Thornber, 1972. Chlorophyll fluorescence characteristics of system I chlorophyll a-protein complex and system II particles at room and liquid nitrogen temperatures. *Plant and Cell Physiol.*, **13**: 81—91.
- [9] Ogawa, T., Obata, F. and K. Shibata, 1966. Two pigment proteins in spinach chloroplasts. *Biochem. et Biophys. Acta.*, **112**: 223—234.
- [10] Reinmam, S. and J. P. Thornber, 1979. The eletrophoretic isolation and partial characterization of three chlorophyll-protein complexes from blue-green algae. *Biochem. et Biophys. Acta.*, **547**: 188—197.
- [11] Remy, R., Hoarau, J. and J. C. Leclerc, 1977. Eletrophoretic and spectrophotometric studies of chlorophyll-protein complexes from Tobacco chloroplasts. Isolation of a light harvesting pigment protein complex with a molecular weight of 70000 *Photochem. Photobiol.*, **26**: 151—158.
- [12] Shiozawa, J. A., Alberte, R. S. and J. P. Thornber, 1974. The p₇₀₀-chlorophyll a-protein isolation and some characteristics of the complex in higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**: 388—397.
- [13] Thornber, J. P., 1969. Comparison of a chlorophyll a-protein complex isolated from a blue-green alga with chlorephyll-protein complexes obtained from green bacteria and higher plant. *Biochem. et Biophys. Acta.*, **172**: 230—241.

- [14] Thornber, J. P., 1975. Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **26**: 127—158.
- [15] Thornber, J. P., Markwell, J. P. and S. Reinmam, 1979. Plant chlorophyll-protein complex: Recent advances. *Photochem. Photobiol.*, **29**: 1205—1216.

STUDIES ON CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEXES ISOLATED FROM N₂-FIXING BLUE-GREEN ALGA *ANABAENA* SP. 7120 AND THEIR SPECTRAL CHARACTER

Liu Mei, Liu Qifang, Zhang Xiankong and Li Shanghao (S. H. Ley)

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

Abstract

Seven bands have been isolated from photo-membranes of N₂-fixing blue-green alga *Anabaena* sp. 7120 using membrane solubilization and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis methods.

Five chlorophyll-protein complex zones with lowest electrophoretic mobility show the same characteristics of absorbance spectra and room temperature fluorescence spectra. They have a red absorbance maximum at 676 nm and a blue absorbance maximum at 438 nm. They exhibit a fluorescence emission maximum at 672—673 nm under room temperature; there are also three small peaks at 710, 732 and 740 nm respectively. These are characteristics of CP I chlorophyll. Therefore, we consider these chlorophyll-protein complex zones belong to photosystem I.

Another chlorophyll-protein complex zone with intermediate mobility is termed complex II (CP II), with a red absorbance maximum at 672 nm and a blue absorbance maximum at 436 nm. Compared with CPI, both of the peaks shifted to shorter wavelength. It has a fluorescence emission maximum at 675 nm, and has not the smaller peaks characterizing of CP I. These properties show that this zone is different from CPI zones, and it is a complex associated with reaction center of photosystem II.

The zone of fastest mobility is free pigment.

The fluorescence excitation spectra of CPI and CPII at room temperature have been determined too.

Key words: Chlorophyll-protein complex (contraction: CP), absorbance spectra, room temperature fluorescence spectra