

铜对类囊体膜叶绿素-蛋白质 复合物组成和光谱特性的影响

刘 冬 李功藩

(南京师范大学生物学系, 南京 210024)

提 要 菠菜和青菜类囊体膜经 SDS-PAGE*可分别分离出 8 条和 7 条含叶绿素的区带。经 Cu 螯合剂处理后发现菠菜 CPIa、青菜 CPIa、LHCP₂ 带缺失, 菠菜 CPIa₁ LHCP₂ 和青菜 CPI 减少, 两者的 LHCP₃ 明显增加。外源 Cu (5mmol/L CuCl₂) 可使菠菜 CPa₁ 带缺失, 青菜 CPa 带缺失, 并且使菠菜 CPI 带的吸收峰由 678nm 移到 672nm, 在 652nm 处有一微弱小肩, 并且出现 679nm 荧光发射峰, 表现出 LHC-II 的某些光谱特性。同时使菠菜和青菜的 LHCP₁ 和 LHCP₂ 的吸收峰均由 672nm 分别移到 668nm 和 669nm, 并且使 LHCP₂ 在 724nm 处产生较强的荧光发射, 接近于 LHC-I 的某些光谱特性。由此初步认为, 铜可能通过变构作用来调节两个光系统间从作用中心到捕光色素蛋白复合物, 以及二者捕光色素蛋白复合物本身之间的能量转移。

关键词 铜; 铜螯合剂; 叶绿素-蛋白质复合物; 吸收光谱; 荧光光谱

前 言

自1978年 Anderson 等人改进了 SDS-PAGE 技术, 并从菠菜类囊体膜上分离出 7 条含叶绿素的区带以来, 大大推进了这方面的研究工作。目前已充分肯定类囊体膜上所有的叶绿素及类胡萝卜素都是以非共价键与特殊蛋白质相结合, 形成叶绿素-蛋白质复合物。它们组成了在结构和功能上不同的光系统 I 和光系统 II 两个光合体系, 对调节和控制光合作用的光能转化具有十分重要的作用。

1977年, Holdsworth 和 Arshad 等首次报道在低等植物褐藻的 PS II 蛋白复合物中发现有 Cu 的存在。1984年 Ono 等报道, Tris 处理具有放氧活性的 PS II 颗粒, 可引起 Mn 及 Cu 的丢失, 并且 Cu 含量与放氧活性有密切关系。同一年, Droppa 等人从甜菜缺 Cu 实验中发现, Cu 不但对 PS I 和 PS II 产生影响, 而且可能通过维持类囊体膜的流动性对 PS I 和 PS II 之间的电子传递产生影响。1985 年李功藩等人发现, Cu²⁺ 可能通过钝

本文于1990年7月7日收到。

*文中缩写: CP: 叶绿素-蛋白质复合物; : PS I: 光系统 I; PS II: 光系统 II; SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳; LHC-II: 光系统 II 捕光叶绿素 a/b-蛋白质复合物; LHC-I: 光系统 I 捕光叶绿素 a/b-蛋白质复合物; LHC-II = LHCP₁ + LHCP₂ + LHCP₃

化参与 PS II 电子传递的膜蛋白而抑制其反应活性,并推测 Cu^{2+} 可能以相同方式作用于 PSI。1987年 Sibbald 和 Green 首次报道,菠菜 PS II 颗粒中大约含有 2.5Cu, 4.5 Mn/300Chl., 其中约 76% Cu 是与 LHC-II 相联系的。因此,从近年来国内外的陆续报道中可以发现,铜与类囊体膜的色素蛋白复合物有密切联系,但其作用性质尚不清楚。本实验通过外源 Cu^{1+} 及 Cu^{2+} 螯合剂对类囊体膜色素蛋白复合物组成的影响,以及外源 Cu^{2+} 对类囊体叶绿素-蛋白质复合物某些光谱性质的影响,来进一步探索 Cu 与类囊体膜色素蛋白复合物结构和光能利用及调节的关系。

材 料 和 方 法

1. 材料 菠菜 (*Spinacia oleracea*) 和青菜 (*Brassica chinensis*) 新鲜而健壮的叶片,选购于农贸市场。

2. 方法

(1) 叶绿体类囊体膜的制备 根据 Anderson(1980)方法加以改进。即用含有 0.4 mol/L 山梨醇, 10mmol/L NaCl, 5mmol/L MgCl_2 , 0.1mol/L Tricine pH7.8 的溶液作为分离介质,经 2000×g 离心 5 分钟,弃去上清液,沉淀用蒸馏水匀浆,然后经 20000×g 离心 10 分钟,弃去上清液,沉淀再用分离介质洗涤一次,然后悬浮于少量含 0.3mol/L Tris, 10% 甘油 pH8.8 溶液中,置于冰箱中待用。

(2) 类囊体膜叶绿素-蛋白质复合物组成的分析 根据 Anderson (1980) 的 SDS-PAGE 方法加以改进。凝胶浓度分离胶为 9%, 堆积胶为 4%, 两者均含有 1% SDS (w/v)。将叶绿体类囊体膜制剂放于冰浴中,用含 10% 甘油, 20% 蔗糖, 1% SDS, 0.3 mol/L Tris-HCl pH8.8 溶液进行增溶处理,其中叶绿素浓度为 1 毫克/毫升, SDS: Chl = 10:1 (w/w)。

(3) 叶绿素含量测定 根据 Arnon (1949) 方法。

(4) 叶绿素-蛋白质复合物吸收光谱测定 将经 SDS-PAGE 分离的各色素带分别切下放入研钵中,加入适量 50mmol/L Tricine pH7.8 缓冲液,在 4℃ 下进行研磨,经 3000×g 离心 10 分钟,取上清液用岛津 UV-250 型紫外可见分光光度计进行吸收光谱的测定。

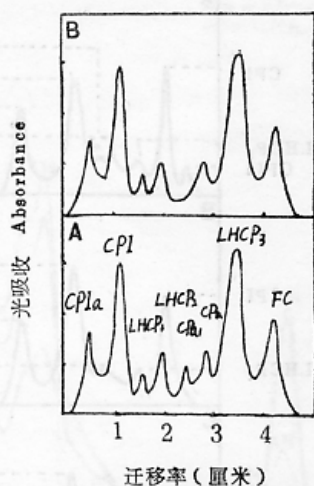
(5) 叶绿素-蛋白质复合物荧光光谱测定 样品制备同方法(4),用岛津 RF-540 型荧光分光光度计进行室温下 (20℃) 荧光光谱的测定。

实 验 结 果

1. 菠菜、青菜类囊体膜叶绿素-蛋白质复合物的分离

菠菜叶绿体类囊体膜经 SDS-PAGE 可分离出 8 条含叶绿素区带。根据电泳迁移率及其光谱特性分析结果,由凝胶柱自上而下依次命名为: CP1a CP I (此两条带属于 PS I 作用中心 Chl.a-蛋白质复合物); LHCP₁、LHCP₂ (此两条带属于 PS II 捕光 Chl.a/b-蛋白质复合物); CPa₁ (属于 PS II 作用中心 Chl.a-蛋白质复合物); CPa (属于 PS II 作用中心内周天线 Chl.a-蛋白质复合物); LHCP₃ (属于 PS II 捕光 Chl.a/b-蛋白质复合物); FC (游离色素) (图 1)。同样条件下,青菜叶绿体类囊体膜可

分离出7条含叶绿素区带,与菠菜相比,青菜缺少一条CPa₁带(图2)。



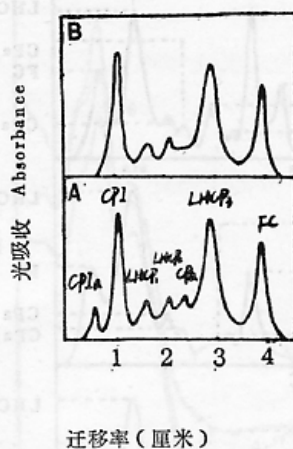
迁移率(厘米)

Migration distance(cm)

A: 对照; (control) B: 处理(treatment)

图1 菠菜叶绿体类囊体膜经Cu²⁺处理, SDS-PAGE柱在675nm处光密度扫描图谱

Fig. 1 Photodensitometer scans at 675nm of spinach chloroplast thylakoid membranes resolved by SDS-PAGE after treatment by Cu²⁺



迁移率(厘米)

Migration distance(cm)

A: 对照; (control) B: 处理(treatment)

图2 青菜叶绿体类囊体膜经Cu²⁺处理, SDS-PAGE柱在675nm光密度扫描图谱

Fig. 2 Photodensitometer scans at 675nm of Chinese cabbage chloroplast thylakoid membranes resolved by SDS-PAGE after treatment by Cu²⁺

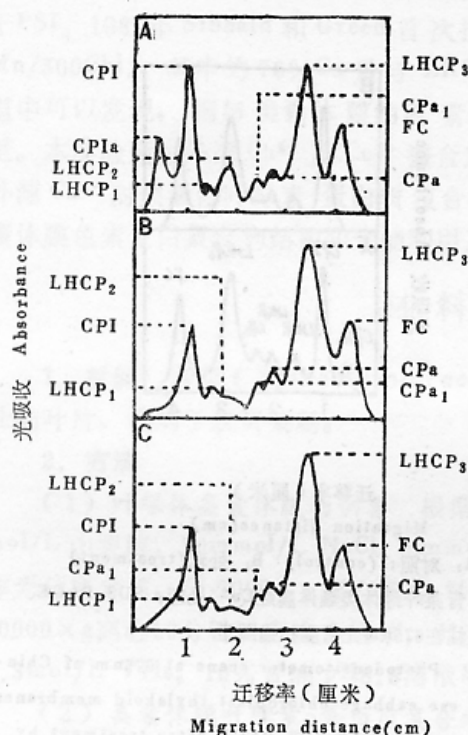
2. 外源Cu²⁺和Cu螯合剂对菠菜和青菜类囊体膜叶绿素-蛋白质复合物组成的影响

在4℃条件下,将5mmol/L CuCl₂溶液加至菠菜或青菜叶绿体类囊体膜制剂中处理10分钟,经增溶后进行SDS-PAGE分离(图1,图2)。结果发现,经Cu²⁺处理后菠菜CPa₁带消失,青菜CPa带消失,说明Cu²⁺可与光系统II作用中心色素蛋白复合物结合,并产生变构作用,导致区带消失。

为了进一步了解Cu²⁺与类囊体膜色素蛋白复合物之间的关系,在4℃条件下,将铜螯合剂浴铜灵(Bathocuproine)50μmol/L;组氨酸1mmol/L分别加入类囊体膜制剂中,然后再增溶处理并进行SDS-PAGE分离及光密度扫描。结果如图3、图4所示。经铜螯合剂处理后,菠菜CPIa带消失,CPI、LHCP₂含量减少,LHCP₃含量高于对照。青菜CPIa、LHCP₂带消失,CPI减少,LHCP₃含量高于对照。可以看出,两种铜螯合剂对菠菜和青菜叶绿体类囊体膜的影响基本上是一致的。这就暗示CPIa、CPI、LHCP₂中均可能有Cu的存在。

3. 外源Cu²⁺对类囊体膜叶绿素-蛋白质复合物光谱特性的影响

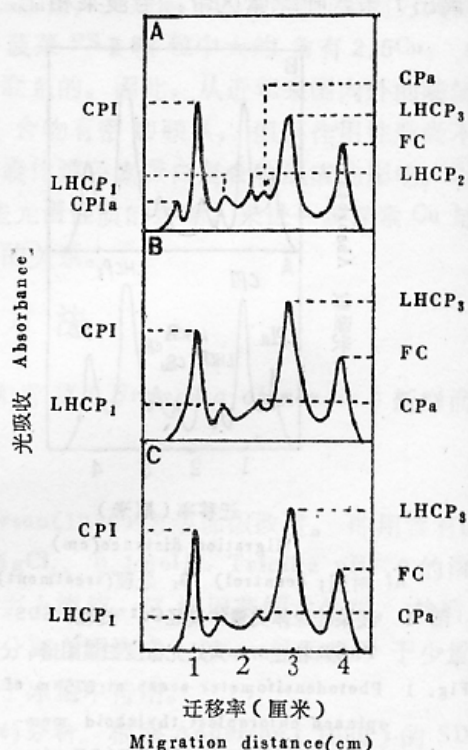
经CuCl₂(5mmol/L)处理后,菠菜CPIa、青菜CPIa和CPI带的吸收光谱都和对照基本上相似,但菠菜CPI带的吸收光谱性质则发生了显著的变化,它在红区的最高吸收峰由678nm转移至672nm,在652nm处出现一微弱小肩(图5)。这些光谱性质与LHC-II的光谱特性很相似(Anderson等,1978)。同时,菠菜LHCP₁和LHCP₂带在红区最高



- A. 对照 Control
B. 浴铜灵 Bathocuproine
C. 组氨酸 Histidine

图 3 菠菜叶绿体类囊体膜经 Cu^{2+} 螯合剂处理 SDS-PAGE柱在675nm的光密度扫描图谱

Fig. 3 Photodensitometer scans at 675nm of spinach chloroplast thylakoid membranes resolved by SDS-PAGE after treatment by Cu^{2+} -chelators



- A. 对照 Control
B. 浴铜灵 Bathocuproine
C. 组氨酸 Histidine

图 4 青菜叶绿体类囊体膜经 Cu^{2+} 螯合剂处理 SDS-PAGE柱在675nm光密度扫描图谱

Fig. 4 Photodensitometer scans at 675nm of Chinese cabbage chloroplast thylakoid membranes resolved by SDS-PAGE after treatment by Cu^{2+} -chelators

吸收峰由 672nm 转移到 668nm, 青菜 LHCP₁ 和 LHCP₂ 在红区最高吸收峰由 672nm 移到 669nm 处, 它们在蓝区的最高吸收峰均由 436nm 移至 433nm 处 (图 6, 图 7)。可见, 加 Cu^{2+} 处理使得 LHCP₁ 和 LHCP₂ 光谱性质也发生了显著的改变, 接近于 LHC-I 光谱特性 (Lam 等, 1984)。由此可以推测, Cu^{2+} 可能通过变构作用来影响部分色素蛋白复合物在类囊体膜上构象变化, 从而使光谱性质发生显著的改变。

另外经 CuCl_2 (5mmol/L) 处理后, 菠菜 CPI 带荧光发射光谱中除了在 722nm 处仍有很强发射峰外, 在 679nm 处出现了较弱的荧光发射峰, 该发射峰接近于 LHC-II 的发射峰 (Anderson 等, 1978) (图 8)。这与上述吸收光谱向 LHC-II 转变是一致的, 说明出现了类似于 LHC-II 的光谱特性。菠菜 LHCP₂ 和青菜 LHCP₂ 带荧光发射光谱也发生了显著的变化, 原来的 683nm 发射峰消失, 新出现了 678nm 或 679nm 弱发射峰和 724nm 强发射峰。两者的 LHCP₃ 带的发射峰也由原来的 683nm 转变在 681nm 处出现

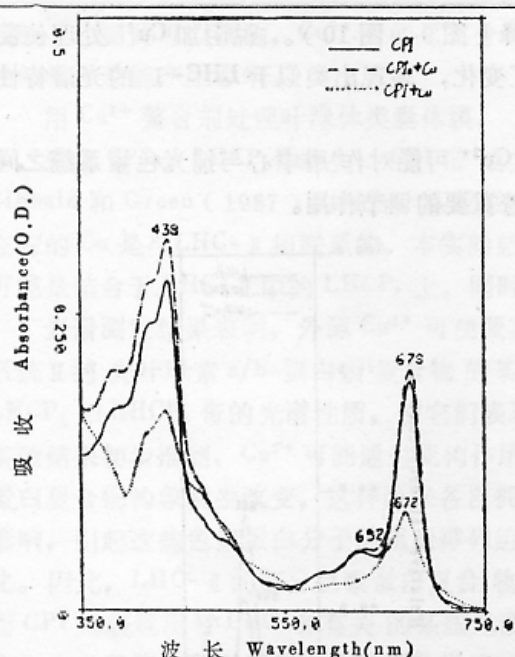


图 5 菠菜叶绿体类囊体膜经 Cu^{2+} 处理后 CPIa和CPI区带的吸收光谱

Fig. 5 Absorption spectra of CPIa and CPI bands of chloroplast thylakoids of spinach after treatment by Cu^{2+}

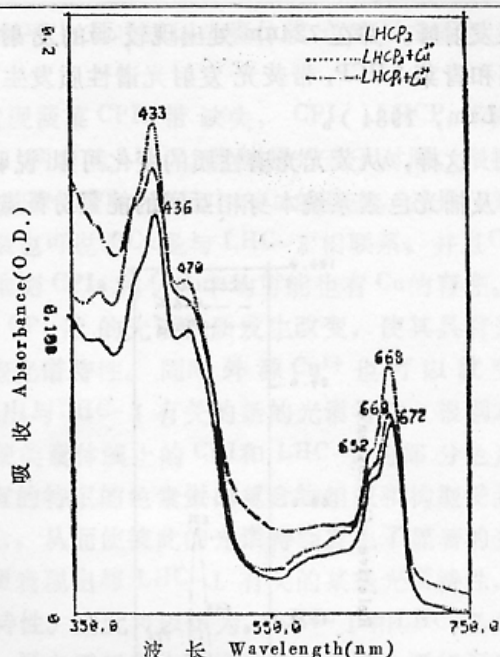


图 6 菠菜叶绿体类囊体膜经 Cu^{2+} 处理后的 LHCP₁和 LHCP₂区带的吸收光谱

Fig. 6 Absorption spectra of LHCP₁ and LHCP₂ bands of chloroplast thylakoids of spinach after treatment by Cu^{2+}

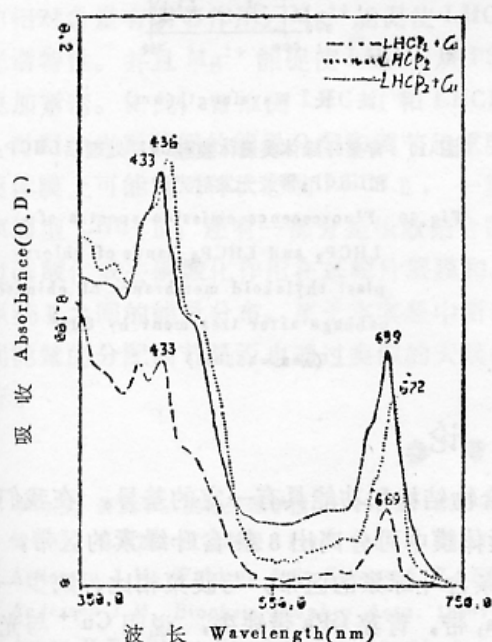


图 7 青菜叶绿体类囊体膜经 Cu^{2+} 处理后 LHCP₁和 LHCP₂区的吸收光谱

Fig. 7 Absorption spectra of LHCP₁ and LHCP₂ bands of chloroplast thylakoids membranes of Chinese cabbage after treatment by Cu^{2+}

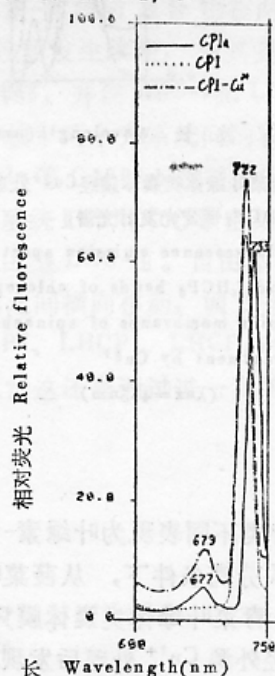


图 8 菠菜叶绿体类囊体膜经 Cu^{2+} 处理后 CPI 区带荧光发射光谱

Fig. 8 Fluorescence emission spectra of CPI band of chloroplast thylakoids membranes of spinach after treatment by Cu^{2+} ($\lambda_{\text{ex}} = 480\text{nm}$)

强发射峰,并在724nm处出现较弱的发射峰(图9,图10)。说明加 Cu^{2+} 处理使菠菜和青菜LHCP₂带荧光发射光谱性质发生了变化,表现出类似于LHC-I的光谱特性(Lam, 1984)。

这样,从荧光光谱性质的变化可以说明 Cu^{2+} 可能对作用中心与捕光色素系统之间以及捕光色素系统本身相互间的能量分配起着重要的调节作用。

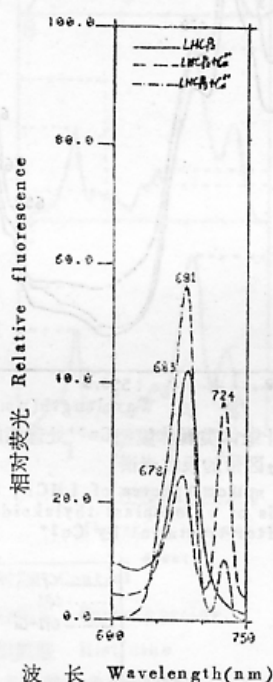


图9 菠菜叶绿体类囊体膜经 Cu^{2+} 处理后LHCP₂和LHCP₃带荧光发射光谱

Fig.9 Fluorescence emission spectra of LHCP₂ and LHCP₃ bands of chloroplast thylakoids membranes of spinach after treatment by Cu^{2+}
($\lambda_{\text{ex}}=455\text{nm}$)

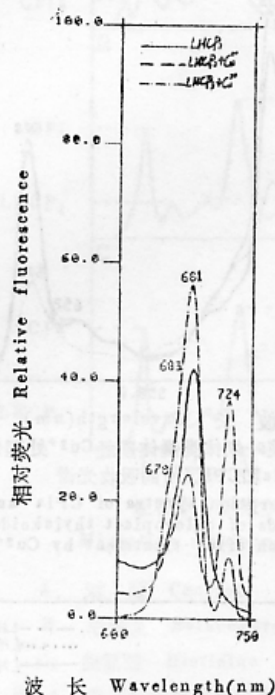


图10 青菜叶绿体类囊体膜经 Cu^{2+} 处理后LHCP₂和LHCP₃带荧光发射光谱

Fig.10 Fluorescence emission spectra of LHCP₂ and LHCP₃ bands of chloroplast thylakoid membranes of chinese cabbage after treatment by Cu^{2+}
($\lambda_{\text{ex}}=455\text{nm}$)

讨 论

植物种类不同表现为叶绿素-蛋白质复合物结构和功能具有一定的差异。在我们的SDS-PAGE分离条件下,从菠菜叶绿体类囊体膜中可分离出8条含叶绿素的区带,同样条件下,青菜叶绿体类囊体膜只分离出7条含叶绿素的区带,与菠菜相比,缺少一条CPa₁带。经外源 Cu^{2+} 处理后发现,菠菜CPa₁带,青菜CPa带缺失,说明 Cu^{2+} 与光系统II作用中心有结合位点并使其变构。这种现象也许可以说明 Cu^{2+} 对光系统II电子传递有明显抑制作用,并且不能被加入人工电子供体DPC而恢复其活性,以及 Cu^{2+} 表现出对胰蛋白酶消化叶绿体被膜后光系统II电子传递所受抑制有加成作用,和 Cu^{2+} 又可拮抗胰蛋白酶对被DCMU阻止的光系统II电子传递的部分恢复作用(李功藩和蔡琬平等;

1985)。由此可以推测, Cu^{2+} 可能是在分子水平上对叶绿体类囊体膜色素蛋白质复合物结构和功能产生影响。

用 Cu^{2+} 螯合剂处理叶绿体类囊体膜, 发现菠菜 CPIa 带缺失, CPI 、 LHCP_2 带减少, 青菜 CPIa 、 LHCP_2 带缺失, CPI 带减少, 两者的 LHCP_3 带含量均高于对照。根据 Sibbald 和 Green (1987) 的报告, 从菠菜中提取的 PS II 颗粒中有 Cu 的存在, 并且 76% 左右的 Cu 是与 LHC-II 相联系的。本实验结果也可说明 Cu 是与 LHC-II 相联系, 并且 Cu 可能是结合于 LHC-II 中的 LHCP_2 上, 同时推测 CPIa 和 CPI 中均可能也有 Cu 的存在。

光谱测定结果表明, 外源 Cu^{2+} 可使菠菜 CPI 带的光谱性质发生改变, 使其具有光系统 II 捕光叶绿素 a/b -蛋白质复合物的某些光谱特性。同时外源 Cu^{2+} 也可以改变 LHCP_1 和 LHCP_2 带的光谱性质, 使它们表现出与 LHC-I 有关的新的光谱特性。根据本实验结果初步推测, Cu^{2+} 可能通过变构作用使类囊体膜上的 CPI 和 LHC-II 的部分色素蛋白复合物构象发生改变, 这样原来各自拥有的特定的色素蛋白复合物组成和构型受到影响, 引起这些色素蛋白分子的重新排列组合, 从而使彼此的光谱特性发生了显著的变化。因此, LHC-II 的部分色素蛋白复合物便表现出与 LHC-I 有关的某些光谱特性, 而 CPI 则表现出与 LHC-II 有关的某些光谱特性。由此可以认为, LHC-I 和 LHC-II 分别作为光系统 I 和光系统 II 的捕光叶绿素 a/b -蛋白质复合物可能在类囊体膜上既相互独立, 又相互联系并相互制约, 起着共同调节和控制两个光系统间能量分配的作用, 以保证光能高速吸收、传递、分配和转化。储钟稀和毛大璋等 (1986) 曾有与本文研究结果相类似的报道。他们发现, Mg^{2+} 对叶绿体膜上的叶绿素-蛋白质复合物在两个光系统中的相对含量有调节作用, Mg^{2+} 能促使 LHCP_2 的光谱性质发生改变, 使其具有 LHC-I 的光谱特性。并且 Mg^{2+} 能促使 LHC-I 从 PSI 向 PS II 转移, 并使 LHC-I 和 LHCP_2 联系得更加紧密。由此, 曾推测 LHC-I 和 LHCP_2 可能是穿梭于两个光系统间的移动天线蛋白, 对两个光系统间的能量分配和调节起重要作用。Kyle 等 (1983) 也曾提出在叶绿体类囊体膜上可能有两种状态的 LHC-II , 一部分是与光系统 II 作用中心紧密结合的, 称为束缚型 LHC-II ; 还有一部分是松散结合的, 称为自由型 LHC-II 。自由型 LHC-II 可通过磷酸化或去磷酸化作用在基粒片层膜和基质片层膜之间横向移动, 调节光系统 I 和光系统 II 之间的能量分布。至于本实验中所观察到的 CPI 、 LHCP_1 、 LHCP_2 对两个光系统间能量的分配调节是否也通过类似的天线转移机制呢? 这还需通过进一步的实验加以揭示。

参 考 文 献

- 1 李功藩, 蔡琬平. 植物生理学报, 1985; 11: 303—309
- 2 储钟稀, 毛大璋. 植物学报; 1986; 28(1): 69—78
- 3 Anderson J M, Waldron J C, Thorne S W. *FEBS Lett*, 1978; 92: 227—233
- 4 Anderson J M. *Biochem Biophys Acta*, 1980; 591: 113—126
- 5 Arnon D T. *Plant Physiol*, 1949; 24: 1—5
- 6 Camm E L, Green B R. *Biochem Biophys Acta*, 1983; 724: 291—293
- 7 Droppa M, Terry N, Horvath G. *Proc Natl Acad Sci*, 1984; 81: 2369—2373
- 8 Green B R, Camm E L, Houten J V. *Biochem Biophys Acta*, 1982; 681: 248—255
- 9 Holdsworth E S, Arshad J H. *Arch Biochem Biophys*, 1977; 183: 361—373

- 10 Kyle D T, Stachelin L A, Arntzen C T. *Arch Biochem Biophys*, 1983; 222: 527—541
- 11 Lam E, Ortiz W, Malkin R. *FEBS Lett.* 1984; 168: 10—14
- 12 Ono T, Nakatani H Y, Johnson E, Arntzen C T, Inoue Y. Comparative biochemical properties of oxygen-evolving photosystem II-particles and of chloroplasts isolated from intermittently-flashed wheat leaves. in *Advances in photosynthesis Research*. (Sybesma, C. ed.) 1984; 1: 383—386
- Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague
- 13 Sibbald P R, Green B R. *Photosynthesis Research*, 1987; 14: 201—209

EFFECTS OF COPPER ON THE CHLOROPHYLL- PROTEIN COMPLEXES COMPONENTS AND SOME SPECTRAL PROPERTIES OF CHLOROPLAST THYLAKOID MEMBRANES

Liu Dong, Li Gongfan

(Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing, 210024)

Abstract The chlorophyll-protein complexes of spinach and Chinese cabbage chloroplast thylakoid membranes could be resolved by SDS-PAGE into 8 and 7 chlorophyll-containing bands respectively. After treatment of Cu^{2+} -Chelators such as bathocuproine and histidine, the experimental results indicated that the CPIa , CPI and LHCP_2 bands of both plants were damaged, and the amount of LHCP_3 band of them obviously increased. After treatment of Cu^{2+} , the experimental results indicated that Cu^{2+} led to the loss of CPa_1 band of spinach and CPa band of Chinese cabbage. Cu^{2+} could change the spectral properties of the CPI band of spinach that led to a shift of the red maxima absorption from 678 nm to 672 nm, and appeared a very weak shoulder at 652 nm, and also showed a fluorescence emission peak at 679 nm, so that it became similar to the property of LHC-II . Cu^{2+} could change the spectral properties of LHCP_1 and LHCP_2 bands of both plants that led to a shift of the red maxima absorption from 672 nm to 668 nm or 669 nm, and led to the LHCP_2 band show a main fluorescence emission peak at 724 nm, so that it is likely to close to the property of LHC-I . Therefore, it is suggested that a possible role of Cu^{2+} is in regulating the energy distribution between reaction center and light-harvesting chlorophyll protein complexes and the light-harvesting chlorophyll protein complexes themselves by allosteric effect in both photosystems.

Key words Copper; Cu^{2+} -chelators; Chlorophyll-protein complex; Absorption spectrum; Fluorescence spectrum