

CPI 大部分缺失影响莱茵衣藻光能转换特性的研究

汤清秀, 魏家绵

(中国科学院上海植物生理研究所, 中国科学院上海生命科学研究院, 上海 200032)

摘要: 用紫外光处理野生型莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) CC-125 得到突变体 CC-1047。电泳检测证明: 突变型衣藻 CC-1047 缺失了绝大部分色素蛋白复合体 I (CPI)。进而详细地研究了 CPI 的部分缺失对突变型衣藻的光物理和光化学反应的影响。野生型衣藻的低温荧光峰有两个, 分别在 691 nm 和 717 nm 左右; 突变型 CC-1047 的低温荧光峰只有一个, 在 709 nm 左右, 且荧光强度增加了 3-4 倍, 709 nm 的峰被认为是光系统 I 捕光天线色素所发出的。在突变体中出现的这个峰, 说明天线色素吸收的光能未能传递到光系统 I 的反应中心, 再进行电荷分离; 而是以荧光的形式释放出来, 即从天线色素到反应中心的光能传递不能正常进行。CC-1047 的叶绿素荧光动力学也发生了改变, 野生型和突变型的荧光在开启作用光后都很快上升, 但随后野生型的逐渐下降, 而突变型 CC-1047 的则基本上不下降; 与野生型相比, 突变型衣藻 CC-1047 的光系统 I 反应中心色素 P700 的氧化还原活性降低 80% 以上, 表明突变型衣藻细胞内与 PSI 相关的电子传递已不能正常运转。

关键词: CPI 突变体; 光能转换; 荧光

中图分类号: Q632 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)04-0747-07

高等植物、绿色藻类的类囊体膜上存在着四大超分子蛋白复合体: 光系统 I (PSI) 复合体、光系统 II (PSII) 复合体、细胞色素 b₆/f 复合体和 ATP 酶复合体。在光合作用能量转换过程中, 需要两个光系统协同运转, 才能将电子从水传到 NADP。PSII 的光化学反应氧化水和还原质醌 (PQ)、细胞色素 (Cyt_f), 但它不能还原 FD 或 NADP⁺; PSI 通过可溶性蛋白质蓝素 (PC) 连接氧化 Cyt_f, 才能最后把 NADP⁺ 还原为 NADPH₂。

光系统 I 复合体是由叶绿体基因 *psaA*, *psaB*, *psaC*, *psaI*, *psaJ* 及核基因 *psaD*, *psaE*, *psaF*..... 等编码的多个蛋白亚基组成的。PSI 的核心是一个由 *PsaA* 蛋白和 *PsaB* 蛋白构成的异二聚体, 反应中心叶绿素 a 双分子体 P700、原初电子受体 A₀、A₁、铁硫中心 F_x 都结合在它上面。蛋白 *PsaC* 结合着末端电子受体 F_A、F_B 等。蛋白 *PsaF* 作为 PC 与 PSI 的连接物, 蛋白 *PsaD*、*PsaE* 是 F_d 与 PSI 的连接物。还有一些功能尚不清楚的其它亚基。用非变性凝胶电泳分离到的色素蛋白复合体 I (CPI) 包括 *PsaA*、*PsaB* 和反应中心色素 P700^[1]。

衣藻突变体对了解类囊体膜的结构功能提供了实验上的方便。早期对衣藻光合突变体

收稿日期: 2001 03-26

基金项目: 国家自然科学基金重点基金 (39730040) 和国家重点基础研究专项经费资助项目 (G1998010100)

作者简介: 汤清秀, 1970 年生, 博士研究生, 电话: 021-64042090-4519, E-mail: qxtang@iris.sipp.ac.cn.

通讯作者: 魏家绵

的研究为 Z 方案提供了实验依据,使得一些电子传递链中的新成分,如 Cytb₆/f 复合体中的 Rieske 铁硫蛋白等得以发现^[2]。近年来分子生物学的新技术及核基因组和叶绿体基因组的转化技术进一步推动了光合作用与生物能学力的研究。通过研究缺少连接天线的衣藻突变体的光化学特性,提出了衣藻的 PSI 中色素蛋白复合体结构组成的模型^[3]。用定点突变、插入突变等方法,发现 *psaA*、*psaB*、*psaC* 等基因产物对 PSI 的组装是不可缺少的^[4-6]。*psaF* 基因突变后,改变了 PSI 活性^[7]。而在蓝藻中缺失 *psaF* 基因对其光自养生长和 P700 的活性没有影响^[8]。在缺少光系统 I 反应中心核心复合体的蓝藻突变体中,PSI 的其它亚基蛋白不能积累到正常水平,但对 PSII 的组装和活性没有明显影响^[9]。

用波长 2537Å、光强 60 ergs/mm²·s 的紫外光照射野生型衣藻 CC-125 的培养液 1 分钟获得突变体 CC-1047^[10],突变是发生在 *psaA* 的 mRNA 的剪接上^[13]。鉴于迄今为止对这种突变衣藻的研究^[10,11-13]多集中于光自养生长等生理过程的研究,本文则对此突变体的光物理和光化学特性进行了深入研究。通过实验观察到它与野生型的差异,探讨了光系统 I 相关的光能转换的机理。

1 材料和方法

1.1 实验材料

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 野生型 CC-125 及其突变体 CC-1047 由美国 Duke 大学衣藻中心 Elizabeth Harris 赠送。利用 Minimal 培养基,在 25℃ 按 12h 光(光强约 60μmol·m⁻²·s⁻¹)暗周期交替培养。突变体的培养基中另加 2 g/L 的乙酸钠。

1.2 衣藻类囊体膜的提取

参照 Selman-Reimer 方法^[14],但衣藻细胞的破碎改用超声波法破碎,仪器功率 80 瓦左右,每次破碎持续 30s,共三次。

1.3 LDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照 Wollman 方法^[15]。5%的浓缩胶,12%的分离胶。样品用 1%LDS 在 4℃ 先处理 1h。

1.4 低温(77K)荧光的测定

用 44W 平面光栅单色仪(上海光学仪器厂)外加低温反应室组装成的荧光分光光度计测定衣藻细胞的低温(77K)叶绿素荧光光谱,激发光波长为 440nm。测量杯中加 1.5 ml 藻液(含叶绿素 0.5mg/ml)。

1.5 PSI 反应中心 P700 活力检测

用 PAM 叶绿素荧光仪(德国 WALZ 公司生产)检测 P700 氧化还原活性的变化。作用光远红光由钨灯加 720nm 的截止滤光片获得。以 820nm 处吸收值的变化代表光系统 I 反应中心色素 P700 的氧化与还原活性变化。

1.6 叶绿素荧光动力学特性测定

利用 PAM 叶绿素荧光仪测定衣藻细胞的叶绿素荧光动力学特性。测定光为 1.6Hz 的调制光,作用光为光强 600μmol·m⁻²·s⁻¹ 的白光,远红光由 RG710 截止滤光片获得。测定前样品在暗中适应 10 min,然后开调制测量光,记录初始荧光 F₀ 信号,然后开启作用光。

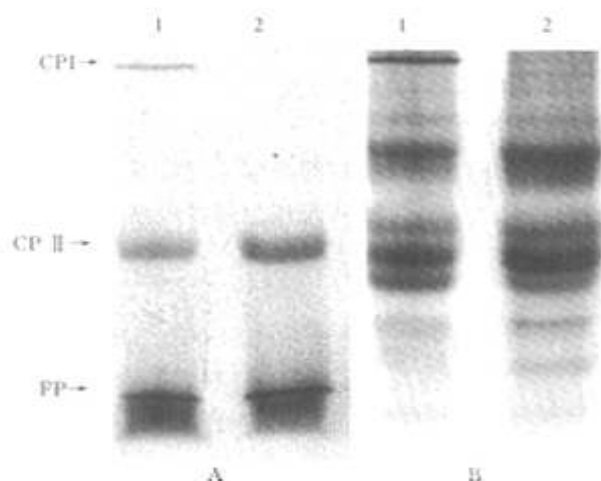


Fig.1 LDS - PAGE of the thylakoid from wild type (1) and mutant - type (2) *Chlamydomonas reinhardtii*. A. the gel was unstained; B. the gel was stained by Coomassie Brilliant Blue

相关的色素蛋白复合体 CPIII、CPIV、CPV^[27]。在衣藻中还可分离到相当于高等植物的捕光色素蛋白复合体的 CPO^[23]。

从未经考马斯亮兰染色的衣藻类囊体膜的 LDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(图 1, A)中可以看到,野生型衣藻(lane 1)的有三条绿色条带: CPI、CPII、FP。突变型衣藻(lane 2)只有两条明显绿色条带: CPII、FP,在相应于 CPI 的位置只有痕量的绿色条带。进一步将凝胶进行考马斯亮兰染色,电泳图谱(图 1, B)上显示突变型衣藻(lane 2)的 CPI 位置上也只有很淡的一条带。这清楚地表明突变型衣藻 CC - 1047 的类囊体膜中缺失了绝大部分的 CPI,并且是色素与蛋白的共同缺失。在其它位置未见明显差别。

2.2 CPI 的部分缺失对光系统 I 光能吸收与传递特性的影响

为研究 CPI 的部分缺失对光能转换的影响,在本文中我们测定了衣藻细胞的低温(77K)荧光光谱(图 2)。观察到野生型衣藻主要有两个荧光峰,分别在 691nm 和 717nm 处,而突变型衣藻只有一个峰,在 709nm 处,

2 结果与讨论

2.1 LDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析确定突变型衣藻 CC - 1047 中大部分 CPI 的缺失

在分析藻类类囊体膜组分和结构时,非变性胶分离色素蛋白复合体是一种常用的手段^[16]。研究表明,用中性去垢剂处理类囊体膜后,在未经染色的凝胶图谱上一般可以看到三条稳定的绿色条带,第一条是与 PSI 光化学反应有关的色素蛋白复合体 I (CPI),第二条是与捕光天线色素蛋白复合体有关的色素蛋白复合体 II (CPII),第三条是游离色素(FP)^[1]。用改进的方法还可在 CPI 和 CPII 条带之间进一步分离到三种与 PSII 有

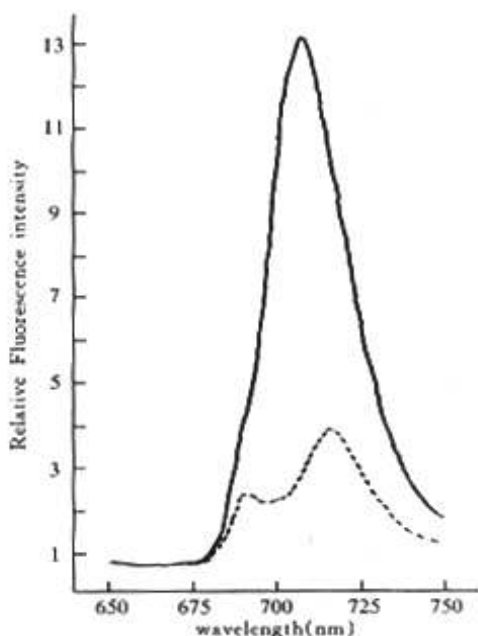


Fig.2 Fluorescence emission spectra of wild type (---) and CC - 1047 mutant (-) *Chlamydomonas reinhardtii* cells at 77K

峰的强度比较大。在相同叶绿素浓度下测定,它比野生型衣藻的 717nm 峰要高 3.6 倍。709nm 的峰很强,以至于看不到 690nm 等其它峰。藻细胞的 680nm~690nm 荧光峰与 PSII 的光能转换活性有关,710nm~720nm 的峰与 PSI 的光能转换活性有关^[18],Wollman 等人^[15]报告,在低温下,光系统 I 的捕光天线(CPO)的荧光发射峰为 709nm。荧光发射与光化学活性是相互竞争的,因此出现增强的 709nm 荧光峰说明,天线色素吸收的光能未能传递到光系统 I 的反应中心,再进行电荷分离;而是以荧光的形式释放出来,即从天线色素到反应中心的光能传递不能正常进行。

2.3 CPI 的部分缺失对光系统 I 光化学活性的影响

叶绿素荧光动力学是一种间接反映电子传递特性的手段。在饱和作用光下,PSII 电子受体 Q_A 、 Q_B 和 P_0 库等被依次还原,PSII 进入“关闭”状态,荧光增强。随后,由于一些酶系逐渐被活化,PSI 开始运转,使 Q_A 、 Q_B 和 P_0 库等再氧化,引起荧光猝灭,荧光峰逐渐下降到接近不变荧光 F_0 的水平^[19]。

在测定衣藻细胞的荧光动力学时发现,开启作用光以后,野生型和突变型衣藻 CC-1047 的荧光都有一快速升高,但随后野生型衣藻的荧光逐渐下降,而 CC1047 的荧光却基本不下降(图 3)。其原因是由于其 CPI 的部分缺失,PSI 复合体的电子传递不能正常运转,使 Q_A 、 Q_B 和 P_0 库不能象野生型一样正常地再氧化。所以荧光诱导动力学曲线显示,突变型衣藻 CC-1047 荧光不能很快猝灭,始终维持在较高水平。Girard 等测定了用 MMS(methyl methane sulfonate)突变的另一种缺失 CPI 的衣藻突变体 F14 的荧光动力学,同样发现野生

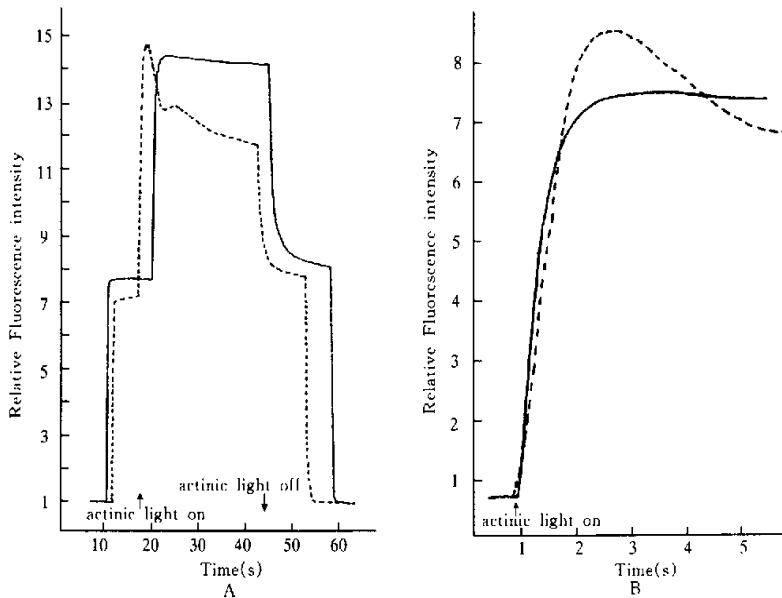


Fig.3 Kinetics of fluorescence emission from wild type (---) and CC-1047 mutant (-) *Chlamydomonas reinhardtii* cells. Panel B is the expansion of kinetics after actinic light was turned on in panel A

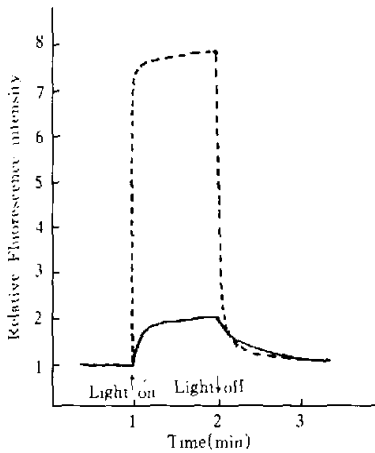


Fig.4 Spectroscopic measurement of P700 in wild type (---) and CC-1047 mutant (—) *Chlamydomonas reinhardtii* cells

型衣藻的荧光可以较快下降,而突变体 F14 荧光却不下降的现象^[10]。Webber 等对 *psaB* 基因进行定点突变,发现突变后的衣藻也具有类似的荧光动力学曲线^[5]。这些报告与本文实验结果相互印证。表明 CPI 部分缺失不仅影响光能从 CPO 向 CPI 的传递,而且影响了 PSI 的光化学反应活性。

PSI 光化学反应活性还可以从 P700 的氧化还原能力上反应出来。图 4 显示两种衣藻细胞中 PSI 反应中心 P700 的氧化还原活性。与野生型相比,突变型衣藻 CC-1047 的 PSI 反应中心 P700 的氧化还原活性降低了 80% 以上。Lee 等的结果指出,突变型衣藻的 P700 完全没有活性^[11], Redding 等测定的活性与我们测定的结果差不多^[13]。因此我们的实验支持 Redding 等人的结果,与 Lee 等的结果不同可能与

藻的培养条件、测定时藻的活力及仪器的灵敏度有关。

植物的两个光系统通过电子传递链串联,互相协调运转,才能高效地把光能转换为化学能。PSI 是超大分子的复合体,它的有关组分的缺失对其结构和功能的影响是当今研究的热点。同时研究突变体功能特性也可以间接反映野生型的结构与功能。本文的实验结果有力地表明 CPI 的部分缺失是如何影响突变型衣藻的光物理和光化学反应的,也进一步揭示了衣藻细胞内与 PSI 相关的光能的转换机理。

参考文献:

- [1] Thornber JP. Chlorophyll proteins light harvesting and reaction center components of plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol*. 1975,26:127-158.
- [2] Levine RP, Gorman DS. Photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. 3. Light-induced absorbance changes in chloroplast fragments of the wild type and mutant strains[J]. *Plant Physiol*. 1966,41:1293-1300.
- [3] Ish-shalom D, Ohad I. Organization of chlorophyll-protein complexes of photosystem in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biochim Biophys Acta*. 1983,722:498-507.
- [4] Hallahan BJ, Purton S, Ivison A, et al. Analysis of the proposed Fe-Sx binding region of photosystem I by site directed mutation of *PsaA* in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Photosynthesis Rev*. 1995,46:257-264.
- [5] Webber AN, Gibbs PB, Ward JB, et al. Site-directed mutagenesis of the photosystem I reaction center in chloroplasts[J]. *J Biol Chem*. 1993,268:12990-12995.
- [6] Takahashi Y, Goldschmidt-Clermont M, Soen S-Y, et al. Directed chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: insertional inactivation of the *psaC* gene encoding the iron sulfur protein

- destabilizes photosystem I[J]. *EMBO J.* 1991,10:2033-2040
- [7] Farah J, Rappaport F, Choquet Y, et al. Isolation of a *psaF*-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*: efficient interaction of plastocyanin with the photosystem I reaction center is mediated by the *PsaF* subunit[J]. *EMBO J.* 1995,14:4976-84.
- [8] Xu Q, Yu L, Chitnis VP, et al. Function and organization of photosystem I in a cyanobacterial mutant strain lacking *PsaF* and *PsaJ* subunits[J]. *J Biol Chem.* 1993,269:3205-3211
- [9] Shen G, Bryant DA. Characterization of a *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 mutant lacking photosystem I. Protein assembly and energy distribution in the absence of the photosystem I reaction center core complex[J]. *Photosynthesis Res.* 1995,44:41-53.
- [10] Girard J, Chua N-H, Bennoun P, et al. Studies on mutants deficient in the photosystem I reaction centers in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Curr Genet.* 1980,2:215-221.
- [11] Lee JW, Tevault CV, Owens TG, et al. Oxygenic photosynthetic growth without photosystem I[J]. *Science.* 1996,273:364-367.
- [12] Cournac L, Redding K, Bennoun P, et al. Limited photosynthetic electron flow but no CO₂ fixation in *Chlamydomonas reinhardtii* mutants lacking photosystem I[J]. *FEBS Letters.* 1997,416:65-68.
- [13] Redding K, Cournac L, Vassiliev IR, et al. Photosystem I is indispensable for photoautotrophic growth, CO₂ fixation, and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *J Biol Chem.* 1999,274:10466-10473.
- [14] Selman-Reimer S, Merchant S, Selman BR. Isolation, purification, and characterization of coupling factor I from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biochemistry.* 1981, 20: 5476-5482.
- [15] Wollman FA, Bennoun P. A new chlorophyll-protein complex related to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biochim Biophys Acta.* 1982,680:352-360.
- [16] Thornber JP. Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organisms[A]. In: Staehelin LA, Arntzen CJ. Encyclopedia of plant physiology (new)[C]. Heidelberg: Springer, 1986,19: 98-142.
- [17] Delepelarre P, Chua N-H. Electrophoretic purification of chlorophyll *a/b*-protein complexes from *Chlamydomonas reinhardtii* and spinach and analysis of their polypeptide compositions[J]. *J Biol Chem.* 1982, 256:9300-9307.
- [18] Lin SK, Nox RS. Studies of excitation energy transfer within the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its mutants at 77K[J]. *Photosynthesis Res.* 1991,27:157-168.
- [19] Krause GH, Weis E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology - II Interpretation of fluorescence signals[J]. *Photosynthesis Res.* 1984,5:139-157.

**LIGHT CONVERSION CHARACTERISTICS OF
Chlamydomonas reinhardtii MUTANT DEFICIENT IN CPI**

TANG Qing-xiu, WEI Jia-mian

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Mutant *Chlamydomonas reinhardtii* CC-1047 was obtained by UV irradiation. LDS-PAGE showed that most of chlorophyll-protein complex I of photosystem I (PSI) missed in the CC-1047 mutant. The effect of the CPI-deficiency on the photophysical and photochemical characterization of the mutant alga was further studied. At low temperature (77K), there is a high peak (around 709nm) of fluorescence in mutant *C. reinhardtii* that is different from the two-peaks-feature (691nm and 717nm) of wild type. Previous work showed that the 709nm emission is thought to arise from some PSI antennae and is quenched in the wild type by the presence of PSI traps located in CPI. The appearance of the fluorescence peak at 709nm reflects that the light energy absorbed by light harvesting chlorophyll could not be transferred to PSI reaction center to cause charge separation and so the energy was released as fluorescence. On the other hand, from observing the kinetics of fluorescence emission, it showed that after the actinic light was turned on, the fluorescence intensity of both types increased quickly, but then it decreased slowly only in wild-type while in mutant type it almost maintained a higher level. These results indicate that the operation of the electron transport related with PSI was abnormal in mutant *C. reinhardtii*. Compared with wild type, the oxidation-reduction activity of P700 in mutant *C. reinhardtii* was decreased to 20% of that of wild type. These results reflect the light conversion mechanism of related with PSI in the *C. reinhardtii*.

Key Words: CPI; Mutant; Light conversion; Fluorescence

致谢: 感谢徐春和先生和叶济宇先生在本研究中给予的指导和帮助。