

单细胞光合生物莱茵衣藻光系统 II 产生超氧阴离子自由基的 ESR 研究*

袁 瀚^{1,2)} 韩 璐²⁾ 杜立波²⁾ 田 秋²⁾ 刘 科¹⁾ 杜林方^{1)**} 刘 扬^{2)**}

¹⁾四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064;

²⁾中国科学院化学研究所, 分子动态与稳态结构国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 强光辐照下高等植物光系统 II (PS II) 会产生超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$), 该过程中产生的 $O_2^{\cdot-}$ 在高等植物光合作用活性氧自由基代谢中具有重要作用. 莱茵衣藻光系统结构与高等植物非常相近. 应用新型高特异性自旋捕获 -ESR 方法及四唑氮蓝还原法, 首次在莱茵衣藻的类囊体膜和 PS II 中检测到 $O_2^{\cdot-}$ 的生成, 通过与有关菠菜的 ESR 实验结果对比发现两者的 $O_2^{\cdot-}$ 产生分子机制可能极为相似. 相比高等植物, 单细胞莱茵衣藻具有结构简单、遗传背景清晰与基因组测序工作完备等诸多特点. 因而, 针对莱茵衣藻的 $O_2^{\cdot-}$ 分析可能为深入研究高等植物光合系统中的活性氧代谢机制提供新的契机.

关键词 莱茵衣藻, 光系统 II, 超氧阴离子自由基, 自旋捕获 -ESR

学科分类号 Q5

早在 1951 年著名的 Mehler 反应中就提出高等植物类囊体膜经光照可产生超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)^[1]. $O_2^{\cdot-}$ 在高等植物光合作用活性氧(ROS)代谢中具有重要意义, 高等植物细胞中的其他 ROS 如过氧化氢(H_2O_2), 羟基自由基($\cdot OH$) 等都是由 $O_2^{\cdot-}$ 歧化衍生而来^[2]. 然而, 由于 $O_2^{\cdot-}$ 化学性质活泼, 在生物体内含量很低且极易转化为其他 ROS, 受物理检测手段的局限, 长时间来对其研究的进展不多. 20 世纪 90 年代末期在植物类囊体膜和光系统 II (PS II) 中采用新型高特异性自旋捕获 -ESR (spin trapping-ESR) 方法可确切验证 $O_2^{\cdot-}$ 生成. 首先, 在小麦幼苗类囊体膜^[3]和 PS II 颗粒^[4]内以 5- 二乙氧基磷酰基 -5- 甲 -1- 吡咯啉 - 氮氧化物(5-diethoxy phosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide, DEPMPO) 为自由基捕获剂捕获到 $O_2^{\cdot-}$ 信号. 相比 5, 5- 二甲基 -1- 吡咯啉 - 氮氧化物(5, 5-dimethyl-1- pyrroline N-oxide, DMPO), DEPMPO 与 $O_2^{\cdot-}$ 的加合物更稳定, 半衰期更长, 分子结构的特异性也更强^[5]. 而后, 作者研究组对光合作用模式植物菠菜 PS II 颗粒内 $O_2^{\cdot-}$ 的产生机制进行了一系列研究^[6~9]. 综合以往研究实验, 我们发现存在两个难以解决的问题:

a. 菠菜等高等植物受季节等生长环境影响, 不易严格控制每批次样品间活性的彼此差异; b. 菠菜虽然是光合作用的模式植物, 但其基因组测序工作尚未完成, 且某些光系统突变体诱发比较困难, 不易结合分子生物学手段进行自由基生成机制的深入探索. 虽然分子生物学模式植物拟南芥的基因组测序工作已完成^[10], 但拟南芥叶片太小, 难于基于传统叶片提取 PS II 颗粒的方法获得足够样品进行活性氧代谢生理研究.

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 是一种直径约 10 μm 的单细胞真核绿藻, 其光系统结构特别是 PS II 与高等植物非常相近, 也是研究光合作用的一种模式生物^[11, 12]. 相对高等植物, 莱茵衣藻结构简单, 生长迅速 (传代时间为 8 h) 且生长条件严格可控, 遗传背景清晰, 基因组测序业已完

* 国家自然科学基金资助项目(20473098).

** 通讯联系人.

刘 扬. Tel: 010-62571074, E-mail: yliu@iccc.ac.cn

杜林方. Tel: 028-85415008, E-mail: dulinfang@yahoo.com

收稿日期: 2008-03-18, 接受日期: 2008-05-29

成^[13]。并且由于其细胞内含有一个巨大叶绿体(占细胞总体积 40%), 叶绿体靠近细胞膜, 使诱发光系统突变体相对容易^[11, 14]。现已获得上百种有关莱茵衣藻光系统的突变体并投入商用。因此, 莱茵衣藻可为深入分析高等植物光系统内 O_2^- 产生分子机制提供一条新的思路。

鉴于上述理由, 本文在前期系列研究工作^[6~9]的基础上, 应用 spin trapping-ESR 技术及四唑氮蓝(nitroblue tetrazolium, NBT)还原法, 首次在莱茵衣藻类囊体膜和 PS II 内检验和证实了光诱导 O_2^- 的生成过程, 并对比分析了它与菠菜光系统中 O_2^- 产生的差异。

1 材料与方法

1.1 莱茵衣藻的实验室培养

野生型莱茵衣藻 CC-124 (mating type-) 购自美国杜克大学衣藻研究中心, 参照 Harris 的方法^[15], 22℃ 恒温培养于灭菌的 TAP 培养液, 在 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 白色光源下每天照射 12 h。

1.2 莱茵衣藻类囊体膜和 PS II 颗粒的制备

类囊体膜的制备参考 Selman-Reimer 等^[16]的方法: 提取缓冲液调整为 0.33 mol/L D- 山梨醇, 10 mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 3 mmol/L MgCl_2 (pH 6.5)。超声波破碎细胞功率为 80 W, 每次破碎持续 20 s, 共 4 次。沉淀悬浮于 0.1 mol/L D- 山梨醇, 5 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L Hepes-NaOH (pH 6.5) 中以待提取 PS II。

PS II 的提取参考 Shim 等^[17]和 Schiller 等^[18]的方法并略作修改: 类囊体膜样品调至叶绿素浓度 2 g/L, Triton X-100 的加入量为每毫克 Chl 加入 15 mg Triton X-100, 孵育时间为 25 min。样品经 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 4 000 g / 5 min, 90 000 g / 20 min 洗涤 2 次后, 重悬浮于 0.4 mol/L 蔗糖, 50 mmol/L Mes-NaOH (pH 6.5), 10 mmol/L NaCl (SMN 溶液) 并储存于液氮中。所有步骤均在 4℃ 下避光进行。叶绿素的定量采用 Arnon 的方法^[19]。

1.3 O_2^- 的室温 spin trapping-ESR 测定

在 22℃ 恒温避光条件下, 将类囊体膜或 PS II 颗粒(叶绿素浓度均为 0.6 g/L) 悬浮于含 20 mmol/L DEPMPO 的 SMN 溶液中, 将其转移至石英扁平池中, 在 X 波段电子自旋共振仪 (Bruker ESP300) 光照腔内经 He-Ne 激光器 (25 mW, 663 nm, 光斑直径 6 mm) 光照 3 min 后, 记录捕获自由基的 ESR

信号。参数设置如下: 调幅 0.102 mT, 调制频率 100 kHz, 微波功率 12.8 mW, 放大倍数 2×10^5 , 扫描 15 mT, 扫描时间 42.94 s, 时间常数 0.164 s。

1.4 NBT 还原法测定 O_2^- 的生成

参考 Sgherri 等^[9]的方法, PS II 颗粒(终浓度 10~30 mg/L Chl) 悬浮于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5), 75 $\mu\text{mol}/\text{L}$ NBT, 0.1 mmol/L Na_2EDTA 中, 对比 He-Ne 激光器 (25 mW, 663 nm, 光斑直径 6 mm) 光照 4 min 组与未光照对照组在 560 nm 处吸收光谱的差值。

1.5 主要试剂

DEPMPO 参照 Fréjaville 等^[9]的方法合成。

2 结果与讨论

由于植物光系统内会产生 O_2^- , 单线态氧 ($^1O_2$), H_2O_2 , $\cdot OH$ 等多种 ROS, 使得基于氧化还原反应的 O_2^- 检测方法如细胞色素 c (Cyt c) 还原法等会因其他 ROS 的存在而使结果准确性受到干扰。新型磷酸基自由基捕获剂 DEPMPO 与 O_2^- 经自由基加成反应生成 DEPMPO- 超氧阴离子自由基 (DEPMPO-OOH) 加合物, 该加合物具有特异性超精细裂分常数, 可有效排除或区分其他 ROS 的干扰^[5]。

在 20 mol/L DEPMPO 存在条件下, 光照莱茵衣藻 PS II 3 min 后出现了较强的特征 DEPMPO-OOH 加合物图谱(图 1a), 其超精细裂分常数为: $A_N=1.32$ mT, $A_H=1.10$ mT, $A_P=5.01$ mT。ESR 图谱为具有特征波谱参数的 8 线谱, 与次黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶体系所产生的外源 O_2^- 的 ESR 信号谱图一致^[9]。以往对菠菜 PS II 的研究中发现, 四氰乙烯 (tetracyanoethylene, TCNE) 作为 PS II 中具有内源超氧化物歧化酶(SOD)活性的细胞色素 b_{559} (Cyt b_{559}) 的抑制剂, 能够通过将具有 SOD 活性的高氧化还原态 Cyt b_{559} 转变为不具 SOD 活性的低氧化还原态 Cyt b_{559} 来抑制其内源 SOD 活性^[20]。为验证莱茵衣藻 PS II 的内源 SOD 活性, 加入 1 mmol/L TCNE 于莱茵衣藻 PS II 光照体系。图 1b 中的 ESR 结果显示: 当 TCNE 加入后, DEPMPO-OOH 加合物的信号强度增加到图 1a 信号强度的 4 倍左右。充分显示莱茵衣藻 PS II 中也存在相当数量具内源 SOD 活性的 Cyt b_{559} , 用以有效保护其光系统免受由 O_2^- 引起的损伤。为提高实测 spin trapping-ESR 信号的可信性, 在图 1c 实验中于 PS II 光照体系内外加了 200 U/ml 外源性 SOD, 发现, O_2^- 信号立即被完

全清除, 充分证实图 1a 与图 1b 实验中 ESR 所捕获的信号确实来自 O_2^- .

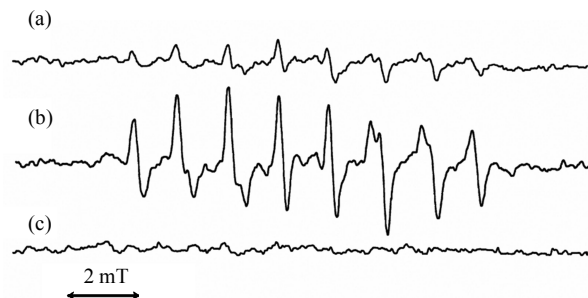


Fig. 1 Spin trapping-ESR evidence of photo-initiated O_2^- obtained after 3 min continuous illumination of the PS II particles of *C. reinhardtii*

(a)PS II /DEPMPO. (b)PS II /DEPMPO+TCNE (1 mmol/L). (c)PS II /DEPMPO+SOD (200 U/ml).

除光系统 II 外, 类囊体膜内其他蛋白复合物在光照下也有 O_2^- 产生的可能. 为此, 在相似条件下检验了光照等同叶绿素浓度的莱茵衣藻类囊体膜中的 O_2^- 捕获信号. 类似结果正如图 2 所示: 加入 TCNE 实验组(图 2b)的 DEPMPO-OOH 加合物信号强度约为未加入 TCNE 的对照实验组(图 2a)的 3 倍左右, 在加入外源 SOD 后 O_2^- 信号可被完全清除(图 2c). 由图 2a 与图 1a 的比较还可以看出, 图 2a 的 ESR 信号高于图 1a, 这是由于类囊体膜体系中不仅包含 PS II, 还包含 PS I. 此结果说明衣藻 PS I 也是衣藻类囊体膜中 O_2^- 产生的重要位点, 这恰好与著名 Mehler 反应由高等植物中提出的设想一致^[2].

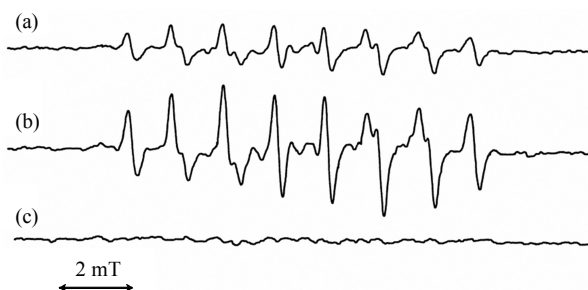


Fig. 2 Spin trapping-ESR evidence of photo-initiated O_2^- obtained after 3 min continuous illumination of the thylakoid membranes of *C. reinhardtii*

(a) Thylakoid membranes/DEPMPO. (b) Thylakoid membranes/DEPMPO+TCNE (1 mmol/L). (c) Thylakoid membranes/DEPMPO+SOD(200 U/ml).

作为对照, 在实验中我们也检验了高等植物菠菜 PS II 与类囊体膜中 O_2^- 产生的过程. 对比相似实验条件下菠菜 PS II 与类囊体膜的 DEPMPO-OOH 加合物 ESR 信号可知: 菠菜 PS II 与类囊体膜未加入 TCNE 组 O_2^- 信号强度分别为加入 TCNE 组的 23%和 33%, 在加入外源 SOD 时 O_2^- 信号消失(谱图略). 以上结果与以往有关菠菜 PS II 与类囊体膜中的 O_2^- 实验相符^[6~9], 也与上述实验中关于莱茵衣藻的分析结果极为相近, 这暗示无论对莱茵衣藻还是以菠菜为代表的高等植物都可能具有非常相近的 O_2^- 产生分子机制.

为了对莱茵衣藻 PS II 中 O_2^- 的产生进行补充验证, 本文又使用了另一种常见的 O_2^- 检测手段——NBT 还原方法. NBT 在被 O_2^- 还原后产生蓝色的甲臃(NBT-formazan), 并在 560 nm 处产生最大特征吸收峰. NBT 还原实验结果如图 3 所示. 实验中改变莱茵衣藻 PS II 浓度, 但 PS II 光照时间固定为 4 min. 在图 3 中还增加了一组 SOD 酶抑制剂 NaN_3 ^[4] 的对比实验. 显然, 无论 SOD 酶抑制剂 NaN_3 存在与否, 随着 PS II 浓度的增加 O_2^- 生成量都呈线性增加. 说明目标自由基 O_2^- 确是来自莱茵衣藻 PS II. 另一方面, 对比外加 NaN_3 组(●—●)与未加抑制剂组(▲—▲)发现前者的 O_2^- 信号一致强于后者. 这一结果不但可与前文中 spin trapping-ESR 实验相互印证, 也与菠菜 PS II 中的相关报道相符^[7].

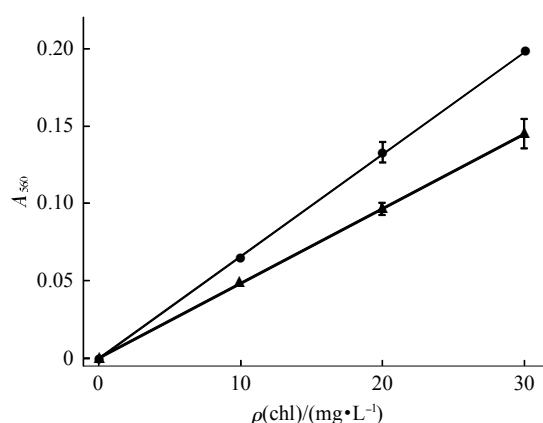


Fig. 3 NBT reduction by illuminated *C. reinhardtii* PS II particles in the absence and in the presence of 5 mmol/L NaN_3 as inhibitor of SOD

●—●: + NaN_3 (5 mmol/L); ▲—▲: Control.

总之, 莱茵衣藻 PS II 在强光光照过程中可产生 O_2^- , 并且其 PS II 内高氧化还原态 Cyt b_{559} 具有

内源 SOD 活性, 可抑制或调节 O_2^- 的过度产生. 与菠菜 PS II 实验对比进一步说明两者的 O_2^- 产生机制可能极为相似. 考虑到莱茵衣藻结构简单, 生长迅速, 培养条件严格可控, 实验操作可比性强, 且相关光合作用的突变体更易获得, 易结合分子生物学手段, 因而, 我们认为以莱茵衣藻 PS II、类囊体膜或单细胞活体为模型的 O_2^- 生成机制研究, 将直接推动对高等植物光系统内活性氧代谢及其强光抑制机理的深入探索.

参 考 文 献

- Mehler A H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. Arch Biochem Biophys, 1951, **33**(1): 65~77
- Asada K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer C H, Mullineaux P M, eds. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in plants. Boca Raton FL: CRC Press, 1994. 77~104
- Sgheri C L M, Pinzino C, Samaritani E, et al. Activated oxygen generation from thylakoids: a novel spin trap. Free Radical Res, 1999, **31**: S199~204
- Navari-Izzo F, Pinzino C, Quartacci M F, et al. Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PS II membrane fragments from wheat. Free Radical Res, 1999, **31**: S3~9
- Fréjaville C, Karoui H, Tuccio B, et al. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide ~ a new efficient phosphorylated nitron for the *in vitro* and *in vivo* spin-trapping of oxygen-centered radicals. J Med Chem, 1995, **38**(2): 258~265
- 刘 科, 孙 健, 刘 扬, 等. 高等植物光系统 II 中强光照射产生超氧阴离子自由基的 ESR 探索. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28**(3): 372~376
Liu K, Sun J, Liu Y, et al. Prog Biochem Biophys, 2001, **28**(3): 372~376
- Liu K, Sun J, Song Y G, et al. Superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in D1/D2/cytochrome b-559 photosystem II reaction center complex. Photosynth Res, 2004, **81**(1): 41~47
- 孙 健, 刘 科, 徐英凯, 等. 类囊体膜光系统 II 中超氧阴离子生成机制的研究. 高等学校化学学报, 2002, **23**(5): 979~981
Sun J, Liu K, Xu Y K, et al. Chemical Journal of Chinese Universities, 2002, **23**(5): 979~981
- Song Y G, Liu B, Wang L F, et al. Damage oxygen-evolving complex by superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in photoinhibition of photosystem II. Photosynth Res, 2006, **90**(1): 67~78
- The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature, 2000, **408**(6814): 796~815
- de Vitry C, Vallon O. Mutants of *Chlamydomonas*: tools to study thylakoid membrane structure, function and biogenesis. Biochimie, 1999, **81**(6): 631~643
- Minagawa J, Takahashi Y. Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. Photosynth Res, 2004, **82**(3): 241~263
- Merchant S S, Prochnik S E, Vallon O, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science, 2007, **318**(245): 245~251
- Rochaix J D. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. Annu Rev Genet, 1995, **29**: 209~230
- Harris E H. The *Chlamydomonas* Sourcebook. New York: Academic Press, 1989. 31~52
- Selman-Reimer S, Merchant S, Selman B R. Isolation, purification and characterization of coupling factor 1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochemistry, 1981, **20**(19): 5476~5482
- Shim H, Cao J C, Govindjee, et al. Purification of highly active oxygen-evolving photosystem II from *Chlamydomonas reinhardtii*. Photosynth Res, 1990, **26**(2): 223~228
- Schiller H, Dau H. Preparation protocols for high-activity Photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S_2 -state multiline signal by X-band EPR spectroscopy. J Photochem Photobiol B, 2000, **55**(2): 138~144
- Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 1949, **24**(1): 1~15
- Nugent J H A. Photoreducible high spin iron electron paramagnetic resonance signals in dark-adapted Photosystem II: are they oxidised nonhaem iron formed from interaction of oxygen with PS II electron acceptors?. Biochem Biophys Acta, 2001, **1504**(2): 288~298

Spin Trapping-ESR Studies on The Superoxide Anion Radical Generated in Photosystem II of Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii**

YUAN Han^{1,2)}, HAN Lu²⁾, DU Li-Bo²⁾, TIAN Qiu²⁾, LIU Ke¹⁾, DU Lin-Fang^{1)**}, LIU Yang^{2)**}

(¹College of Life Sciences, Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, The Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610064, China; ²State Key Laboratory for Structural Chemistry of Unstable and Stable Species, Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Higher plant photosystem II (PS II) generates superoxide anion radicals ($O_2^{\cdot-}$) under strong illumination, in which the $O_2^{\cdot-}$ plays a pivotal role in reactive oxygen species (ROS) metabolism during higher plant photosynthesis. The photosystem of *Chlamydomonas reinhardtii* is highly similar to that of higher plants. The generation of $O_2^{\cdot-}$ in *C. reinhardtii* thylakoid membranes and PS II particles has been firstly proved by means of spin trapping-ESR technique and NBT-mediated spectral assay. Referring to the spin trapping-ESR evidences in spinach, the mechanisms of $O_2^{\cdot-}$ generation both in *C. reinhardtii* and spinach look identical. Compared to higher plant, *C. reinhardtii* has several irreplaceable advantages: simpler structure; clearer genetic background and genomic sequencing has been finished; easy to introduce mutations in photosystem. As a result, the study concerning the $O_2^{\cdot-}$ generation in *C. reinhardtii* introduces a new promising model for further investigation of ROS metabolism in higher plant photosynthesis.

Key words *Chlamydomonas reinhardtii*, photosystem II, superoxide anion radicals, spin trapping-ESR

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (20473098).

**Corresponding author.

LIU Yang. Tel: 86-10-62571074, E-mail: yliu@iccac.ac.cn

DU Lin-Fang. Tel: 86-28-85415008, E-mail: dulinfang@yahoo.com

Received: March 18, 2008 Accepted: May 29, 2008