



## 黄化油菜突变体 *Cr3529* 子叶类囊体膜光谱性质研究

魏慧敏, 陈云伟, 张年辉, 赵 云, 杜林方\*

(四川大学 生命科学学院, 成都 610064)

**摘 要:** 以发育 10 d 的黄化油菜突变体为材料, 分析了突变体油菜子叶类囊体膜的色素含量、室温吸收光谱、叶绿素荧光发射和激发光谱以及蛋白内源荧光光谱的变化。数据显示: 与野生型相比, 突变体油菜子叶类囊体膜的光合色素 Chl *a* 和 Chl *b* 含量均减少, 但 Chl *a/b* 比值升高; 突变体油菜子叶类囊体膜叶绿素捕光能力和受激发能力均下降, 且较依赖于 Chl *a* 捕光并将光能激发传递给 PS II 反应中心; 突变体油菜子叶类囊体膜的蛋白内源荧光也明显异于野生型, 进一步表明突变体油菜子叶类囊体膜蛋白组成发生了改变。

**关键词:** 油菜; 子叶; 类囊体膜; 叶绿素减少突变体; 光谱性质

**中图分类号:** Q945.1      **文献标识码:** A

### Study on the Spectra Properties of Cotyledon Thylakoid Membranes in Chlorophyll-reduced Rapeseed Mutant *Cr3529* and its Wild Type

WEI Hui-min, CHEN Yun-wei, ZHANG Nian-hui, ZHAO Yun, DU Lin-fang\*

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** From 10-day old rapeseed (*Brassica napus* L.) mutant type *Cr3529* and its wild type 3529, the cotyledon thylakoid membranes were respectively prepared and a comparative study on their chlorophyll composition, room temperature absorption spectra, chlorophyll emission and excitation fluorescence spectra and protein fluorescence spectra was conducted. The figures showed that lower Chl (Chl *a* and Chl *b*) but a much higher Chl *a/b* ratio was in thylakoid membranes from the mutant type than in those from its wild type. Furthermore, the chlorophyll fluorescence spectra indicated, on contrary to that in wild type, Chl *a* rather than Chl *b* in the mutant type is responsible for harvesting light and being excited by light. In addition, composition of proteins on cotyledon thylakoid membranes also changed in the mutant type, suggesting by significant difference in protein fluorescence between these two kinds of membranes.

**Key words:** oilseed rape; cotyledon; thylakoid membranes; chlorophyll-reduced mutant; spectra properties

高等植物光能的捕获、传递和转化主要由叶绿体类囊体膜上的色素结合蛋白复合物来完成。色素结合蛋白主要分为 2 类: (1) 结合叶绿素 *a* (Chl *a*)、由叶绿体基因编码的色素蛋白 (D1、D2、CP47、CP43、CP47、P700A、P700B), 它们构成了光系统

(PS I / PS II) 反应中心复合物<sup>[1]</sup>; (2) 结合叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* (Chl *a/b*)、由核基因 *Lhc* 家族编码的色素蛋白, 它们构成了光系统的捕光天线复合物<sup>[2]</sup>。捕光天线复合物将捕获的光能传递给反应中心使之发生电荷分离。目前已知至少有 6 种 Chl *a/b* 色素蛋

收稿日期: 2004-08-18; 修改稿收到日期: 2004-11-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270124)

作者简介: 魏慧敏 (1977-), 女 (汉族), 博士研究生, 从事植物生理生化研究。

\* 通讯联系人。Correspondence to: DU Ling-fang. E-mail: dulinf@mail.sc.cninfo.net.

白(Lhc1 至 Lhc6)与 PS II 相连,其中由 Lhcb1 和 Lhcb2 组成的三聚体是 PS II 主要的外周天线复合物<sup>[2]</sup>。它结合了类囊体膜上 50% 的叶绿素和几乎所有的 Chl *b*。叶绿素作为色素蛋白结合的有机小分子在稳定反应中心复合物和捕光天线复合物中是必需的<sup>[3]</sup>。

叶绿素缺乏突变体是研究捕光色素蛋白复合物组装、形成及其在光合作用起作用的好材料。近年来,人们对大麦<sup>[1]</sup>等植物的叶绿素缺乏突变体进行研究,以探讨光合色素在光合作用中所起的作用。借助快中子辐射和 DES 化学诱变产生的幼叶黄化突变体甘蓝型油菜 Cr3529,属于叶绿素缺乏突变体<sup>[3]</sup>。它含有较少的类囊体和垛叠区,种子萌发 10 d 时,突变体油菜子叶与野生型油菜子叶具有明显的颜色差异,野生型油菜子叶为墨绿色,而突变体子叶仍为黄绿色。为进一步探讨子叶这种颜色表观差异的分子机理,揭示突变的机制,本实验以发育 10 d 的黄化油菜突变体 Cr3529 及其野生型 3529 的子叶为材料,制备类囊体膜,借助室温吸收光谱、荧光发射和激发光谱以及蛋白内源荧光光谱,比较了突变体和野生型油菜子叶的叶绿素组成差异,分析了油菜突变对叶绿素光能捕获、激发能传递的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

野生型油菜(*Brassica napus* L.)3529 及其黄化突变体 Cr3529 于(20±1)℃室温下 12 h 光照,取生长至 10 d 后的子叶为材料。

### 1.2 类囊体膜的制备

按 Rintamaki<sup>[6]</sup>等方法进行,取 1 g 子叶用液氮磨碎,加入预冷缓冲液 A(300 mmol/L 蔗糖、5

mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1 mmol/L Na-EDTA、10 mmol/L NaF、50 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.5)匀浆,匀浆液两层纱布过滤后 1 500 g 离心 4 min。沉淀用缓冲液 B(5 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、10 mmol/L NaF、10 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.5)洗涤 1 次,再经 3 000 g 离心 3 min。所得沉淀即为类囊体膜。将类囊体膜悬浮于少量缓冲液 C 中(100 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、10 mmol/L NaF、10 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.5),液氮保存。整个过程避光冷冻进行。

### 1.3 色素含量测定

叶绿素含量测定采用 Arnon<sup>[7]</sup>的方法,并按 Porra<sup>[8]</sup>法进行修正。

### 1.4 室温吸收光谱测定

类囊体膜室温吸收光谱用日本岛津 UV-240 分光光度计测定。

### 1.5 荧光光谱测定

于 25℃用 Hitachi-4500 荧光分光光度计测定叶绿素荧光发射/激发光谱和蛋白质内源荧光光谱。

## 2 结果

### 2.1 油菜子叶类囊体膜叶绿素含量组成分析

以相同鲜重的子叶提取类囊体膜,采用 Porra<sup>[8]</sup>法分别对突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜的叶绿素含量组成进行了分析,所得结果见表 1。结果表明:突变体油菜子叶类囊体膜的叶绿素含量相对较少,仅为野生型油菜子叶类囊体膜的 55%,其中 Chl *b* 约为野生型的 45%,Chl *a* 约为野生型的 58%。此外,色素组成也有明显的差异,野生型油菜子叶类囊体膜的 Chl *a/b* 比值为 2.82,而突变体油菜子叶类囊体膜的 Chl *a/b* 比值较高,约为 3.65。

表 1 突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜的叶绿素含量组成分析

Table 1 Analysis of chlorophyll composition of cotyledon thylakoid membranes in the mutant rapeseed and its wild type

	野生型油菜子叶类囊体膜 Wild type cotyledon thylakoid membranes	突变体油菜子叶类囊体膜 Mutant cotyledon thylakoid membranes	突变体/野生型油菜子叶类囊体膜 Mutant/wild type thylakoid membranes
Content of Chl <i>a</i> (mg/g)	0.395±0.003	0.229±0.005	0.5809
Content of Chl <i>b</i> (mg/g)	0.140±0.004	0.062±0.006	0.4487
Ratio of Chl <i>a</i> to Chl <i>b</i> (w/w)	2.819±0.007	3.650±0.010	
Content of Chl <i>a</i> and Chl <i>b</i> (mg/g)	0.535±0.002	0.292±0.004	0.5465

### 2.2 油菜子叶类囊体膜吸收光谱分析

为进一步考察突变体油菜子叶类囊体膜叶绿素含量组成的变化,我们分别对突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜进行了可见光区(360~720 nm)吸收光谱测定。图 1,a 显示,野生型油菜子叶类囊体膜具有 680 nm 红光区最大吸收峰和 440 nm 蓝光区

最大吸收峰,它们分别为 Chl *a* 的 Q<sub>x</sub> 和 Q<sub>y</sub> 区的吸收;420 nm 左右的肩峰是脱镁叶绿素 *a* 或 Cyt<sub>b</sub>559 的吸收,500~460 nm 为类胡萝卜素的吸收;472 nm 附近的肩峰和 650 nm 处的小峰则为 Chl *b* 的吸收。突变体油菜子叶类囊体膜具有类似的图谱,但最大吸收峰的位置却有所不同:Chl *a* 在红光区的吸收

峰为 679 nm, 蓝光区吸收峰在 438 nm 处。

相同鲜重子叶提取的 2 种类囊体膜的吸收光谱显示: 突变体油菜子叶类囊体膜吸收光谱中  $A_{679}$ 、 $A_{438}$  以及  $A_{472}$  的值均小于野生型油菜子叶类囊体膜吸收光谱中相应的值(图 1, a)。子叶类囊体膜经丙酮抽提所得叶绿素溶液的吸收光谱也显现出类似的特征(图 1, b)。这表明子叶鲜重相等时, 突变体油菜类囊体膜中 Chl *a* 和 Chl *b* 的含量均少于野生型油

菜类囊体膜。

对相同叶绿素浓度的子叶类囊体膜进行测定时, 突变体油菜子叶类囊体膜的  $A_{438}/A_{679}$  比值大于野生型  $A_{440}/A_{680}$  比值, 而  $A_{438}$  远大于  $A_{440}$ , 表明此时突变体含有较多的 Chl *a*, 而 Chl *b* 含量较少。这说明总叶绿素浓度相等时, 与野生型相比, 突变体含有较少的 Chl *b* 和较多的 Chl *a*。

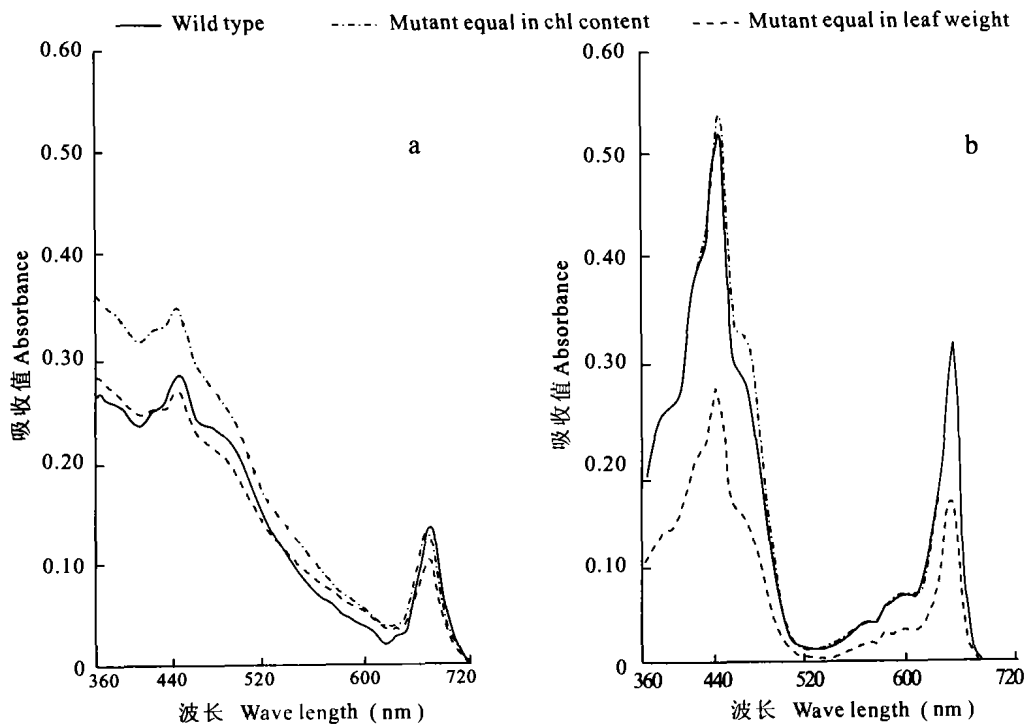


图 1 突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜的室温吸收光谱

a 和 b 中类囊体膜分别溶于缓冲液 C(100 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L NaCl,

10 mmol/L  $MgCl_2$ , 10 mmol/L NaF, 10 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.5) 和 80% 丙酮

Fig. 1 Room temperature absorption spectra of cotyledon thylakoid membranes in the mutant rapeseed and its wild type

In a and b, the membranes are suspended in buffer C(100 mmol/L sucrose, 5 mmol/L NaCl, 10 mmol/L  $MgCl_2$ ,

10 mmol/L NaF, 10 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.5) and in 80% acetone, respectively

### 2.3 油菜子叶类囊体膜叶绿素荧光光谱分析

叶绿素具有荧光且在类囊体膜上与光合功能蛋白形成色素蛋白复合物。436 nm 波长光可激发 Chl *a*, 而 475 nm 波长光激发 Chl *b*。分别以 475 nm 和 436 nm 波长光激发, 可分别得到 2 种叶绿素荧光发射光谱。其中 680 nm 附近的最大荧光发射峰为 PS I 反应中心的发射, 其发射峰强度可反映叶绿素的捕光效率。

为此我们先对相同叶绿素浓度的突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜进行了叶绿素荧光发射光谱测定。相同波长光激发检测到的发射谱(图 2)中, 突

变体油菜子叶类囊体膜在 680 nm 附近最大荧光发射峰( $F_{ex436}^{680}$  和  $F_{ex475}^{680}$ ) 的强度都要比野生型的弱, 这说明突变体油菜子叶类囊体膜 PS II 天线系统中的叶绿素捕光效率下降, 使得光能不能被有效传递给 PS II 反应中心, 因此反应中心的荧光发射强度相对较低。进一步比较荧光发射峰的强度(表 2), 野生型油菜子叶类囊体膜中  $F_{ex436}^{680}$  和  $F_{ex475}^{680}$  的值约为 0.84, 而突变体油菜子叶类囊体膜较高, 约为 0.98。可见, 与野生型油菜相比, 突变体油菜子叶类囊体膜更多地依赖于 Chl *a* 捕获光能。

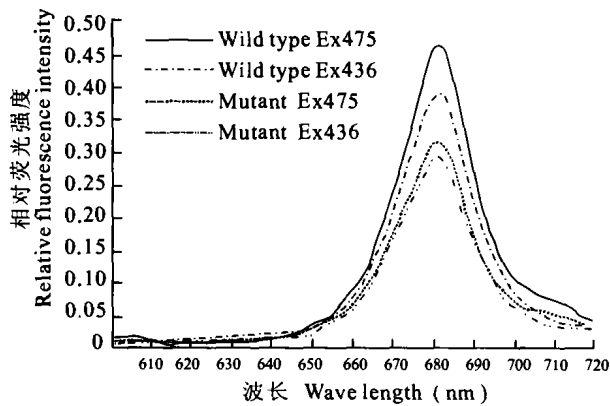


图 2 突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜的叶绿素荧光发射光谱

2 种子叶类囊体膜用缓冲液 C 稀释至相同浓度

Fig. 2 Chlorophyll fluorescence emission spectra of cotyledon thylakoid membranes in the mutant rapeseed and its wild type

The membranes are suspended in buffer C at the same concentration

以 680 nm 光波长检测叶绿素激发光谱时,436 nm 峰来自 Chl *a* 的激发,475 nm 峰是 Chl *b* 的激发,417 nm 的肩峰是脱镁叶绿素 *a* 或 Cyt<sub>b559</sub> 的激发,530 nm 附近微弱峰是类胡萝卜素的激发。436 nm 和 475 nm 两个激发峰(和),它们可分别反映 Chl *a* 和 Chl *b* 受激发的能力。

我们在相同叶绿素浓度(10 μg Chl/mL)下,分别测定了突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜的叶绿素激发光谱(图 3)。突变体中的 Chl *a* 和 Chl *b* 激发峰的强度都要比野生型的弱。这说明,突变使得

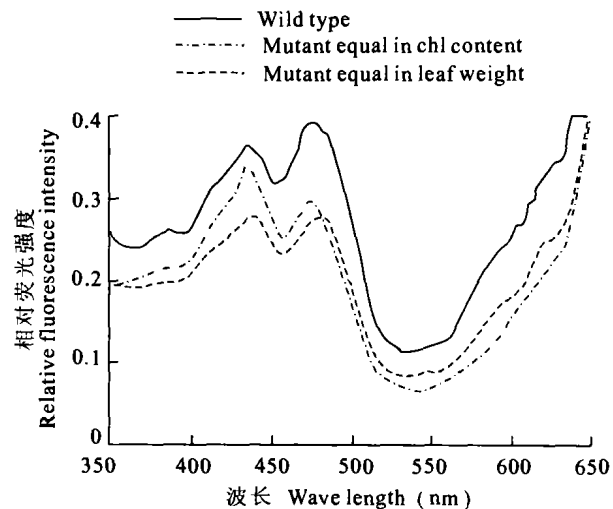


图 3 突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜的叶绿素荧光激发光谱

Fig. 3 Chlorophyll fluorescence excitation spectra of cotyledon thylakoid membranes in the mutant rapeseed and its wild type

Cr3529 叶绿素捕获的光能不能被有效激发并传递给 PS II 反应中心。

进一步比较荧光峰强度(表 2),野生型油菜子叶类囊体膜中  $F_{em680}^{436}$  和  $F_{em680}^{475}$  的值约为 0.93,而突变体中的较高,约为 1.14。与野生型油菜子叶类囊体膜相比,相对于 Chl *b* 的激发,突变体中 Chl *a* 的激发较强。这说明,突变体油菜子叶类囊体膜上光能的传递更多依靠于 Chl *a* 受激发并将光能传递给 PS II 反应中心。

表 2 突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜荧光发射峰(激发峰)相对强度的比较分析

Table 2 Comparative analysis of the fluorescence relative intensity of cotyledon thylakoid membranes in the mutant rapeseed and its wild type

相同 Chl 浓度 Equal in Chl content	Chl 荧光发射峰和激发峰强度 Relative intensity of chlorophyll emission and excitation fluorescence				$F_{em680}^{436}/F_{em680}^{475}$	$F_{ex436}^{680}/F_{ex475}^{680}$
	$F_{em680}^{436}$	$F_{em680}^{475}$	$F_{ex436}^{680}$	$F_{ex475}^{680}$		
野生型油菜子叶类囊体膜 Wild type cotyledon thylakoid membranes	0.36	0.39	0.39	0.47	0.93	0.84
突变体油菜子叶类囊体膜 Mutant cotyledon thylakoid membranes	0.34	0.29	0.30	0.34	1.14	0.98

#### 2.4 油菜子叶类囊体膜蛋白质内源荧光光谱分析

278 nm 或 295 nm 波长光检测时,蛋白质的酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)和色氨酸(Trp)残基受到激发,这些氨基酸残基的激发能以荧光形式发射出来。蛋白内源荧光可以反映蛋白组分的变化。

2 种油菜子叶类囊体膜的蛋白内源荧光如图 4 所示。野生型油菜子叶类囊体膜用 278 nm 波长光激发时,330 nm 附近有 1 个明显的宽峰(图 4,a); 295 nm 波长光激发时,在 319 nm 和 337 nm 处有 2 个明显的发射峰(图 4,b)。与野生型油菜相比,突变

体油菜子叶类囊体膜的发射峰位置发生改变:与 330 nm 相对应的发射峰略红移至 331 nm, 319 nm 对应的峰也红移了 2 nm, 而 337 nm 处发射峰位置不变。发射峰强度的变化则更为明显:子叶鲜重相等时, 突变体油菜类囊体膜在 331 nm、321 nm 和 337 nm 的发射峰强度相对较低, 分别为野生型相应发射峰强度的 86%、78% 和 79%; 叶绿素浓度相同时, 突变体油菜子叶类囊体膜 3 个发射峰强度相对较高, 分别为野生型的 111%、98% 和 103%。以上结果

显示突变体油菜子叶类囊体膜的蛋白内源荧光发生了改变, 说明其蛋白组分发生了变化。

蛋白内源荧光强度可进一步反映蛋白含量的变化。子叶鲜重相同时, 蛋白内源荧光强度比野生型的小, 表明突变体油菜子叶类囊体膜含有较少的蛋白组分。叶绿素浓度相同时, 突变体油菜子叶类囊体膜的荧光强度则比野生型的大, 表明此时突变体中含有较多的蛋白组分。

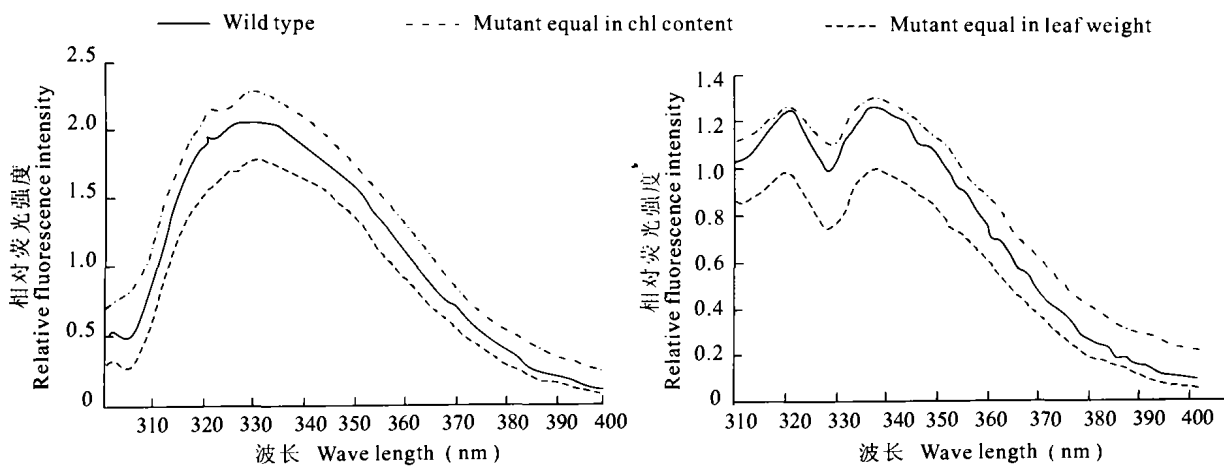


图 4 突变体及其野生型油菜子叶类囊体膜的蛋白内源荧光发射光谱

a 和 b 分别为 278 nm 和 295 nm 波长光激发

Fig. 4 Protein fluorescence spectra of cotyledon thylakoid membranes in the mutant rapeseed and its wild type

In a and b, the wavelength of exciting light are 278 nm and 295 nm respectively

### 3 讨论

甘蓝型油菜 *Cr3529* 是借助快中子辐射和 DES 化学诱变得到的幼叶黄化突变体<sup>[2]</sup>。

本实验以颜色表观差异最为明显、发育 10 d 的突变体和野生型油菜子叶为材料提取类囊体膜, 进行了类囊体膜叶色素含量组分分析和光谱测定。分析结果表明, 造成这种差异的原因是突变体子叶的叶绿素(Chl *a* 和 Chl *b*)含量明显低于野生型(只有野生型的 54%), 并且 Chl *b* 比 Chl *a* 更为缺乏(突变体 Chl *a/b* 的比值为 3.6, 而野生型的为 2.8)(表 1)。已有研究显示: 叶绿素会影响反应中心复合物和捕光天线复合物的翻译、合成、组装等过程<sup>[3]</sup>。我们对抽薹期突变体油菜叶片类囊体膜的蛋白组分分析<sup>[9]</sup>也显示, PS II 天线组分中的主要捕光色素复合物 I (LHC I) 含量减少, PS II 反应中心多以单体形式存在, 且含有较多的 CP47 和 CP43 复合体。本实

验借助蛋白内源荧光光谱也观察到突变体油菜子叶类囊体膜蛋白组分的变化(图 4)。叶绿素浓度相同时突变体油菜子叶类囊体膜含有较多的蛋白组分。子叶鲜重相同时则含有较少的蛋白组分。

叶绿素荧光发射光谱(图 2)显示, 突变体油菜子叶类囊体膜上 PS II 反应中心的荧光发射强度降低。说明突变导致其天线系统中叶绿素的捕光效率下降, 叶绿素的荧光激发光谱(图 3)显示: 突变体油菜子叶类囊体膜的荧光激发峰强度也有所下降。说明突变也使叶绿素捕获的光能不能被有效激发。进一步比较荧光发射峰或激发峰的相对强度(表 2): 突变体中的比  $F_{ex436}^{680}$  和  $F_{ex175}^{680}$  值高于野生型, 这说明与野生型相比, 相对于 Chl *b*, 突变体中 Chl *a* 的捕光能力更强。突变体中  $F_{cm680}^{436}$  和  $F_{cm380}^{175}$  的比值也高于野生型, 这也表明相对于 Chl *b*, 突变体中 Chl *a* 的受激发能力更强, 说明突变体油菜子叶类囊体膜更多依靠于 Chl *a* 捕光并有效地将激发能传递给 PS II 反应中心。

## 参考文献:

- [1] MULLET J E. Chloroplast development and gene expression[J]. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.*, 1988, 90: 560-566.
- [2] JANSSON S. The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1184: 1-19.
- [3] HERRIN D L, BETTEY J F, GREER K, JSCHMIDT G W. Regulation of chlorophyll apoprotein expression and accumulation[J]. *J. Bio. Chem.*, 1992, 267: 8 260-8 269.
- [4] LIN H H(林宏辉), DU L F(杜林方), JIA Y J(贾勇炯), LIANG H G(梁厚果), YANG Z SH(汤泽生). Isolation and comparison of thylakoid membranes pigment-proteins from wild type and mutant barley[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sina.* (西北植物学报), 1997, 17: 34-38 (in Chinese).
- [5] ZHAO Y, WANG M L, ZHANG Y ZH, DU L F. Inheritance and agronomic performance of a chlorophyll-reduced seedling mutant in rapeseed (*Brassica napus* L.) and its utilization in F1 hybrid production[J]. *Plant Breeding*, 2001, 154: 131-135.
- [6] RINTAMAKI E, KETTUNEN R, ARO E M. Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem I centers. Dephosphorylation is a prerequisite for degradation of damaged D1[J]. *J. Biol. Chem.*, 1997, 271(25): 14 870-14 875.
- [7] ARNON D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*[J]. *Plant Physiol.*, 1949, 24: 1-15.
- [8] PORRA J R. The extraction and assay of refractory chlorophylls and a simple method to correct data from Arnon's equation [J]. *Current Research in Photosynthesis*, 1990, vol. II: 237-240.
- [9] YANG SH H(杨胜洪), DU L F(杜林方), ZHAO Y(赵云), ZHANG Y ZH(张义正). Study on the thylakoid membranes from a chlorophyll-deficient oilseed rape mutant at bolting stage [J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), 2001, 23 (1): 97-104 (in Chinese).

### 美国《剑桥科学文摘社网站:生物技术与生物工程》 (CSA-BB)2003 年收录中国期刊名单

美国《剑桥科学文摘社网站:生物技术与生物工程》2003 年共收录全世界期刊 644 种;其中中国期刊 17 种(黑体字为新进入的期刊,摘译自 Serials Source List for Biotechnology and Bioengineering)。在该数据库收录的期刊中,按期刊与该数据库宗旨和符合程度分为 3 种:

(1) Core sources:核心期刊,每期论文全部收入;(2) Priority sources:优先期刊,收录 50%以上;(3) Selective sources:选择期刊,收录 50%以下。

期刊名称	刊号	收录类型	期刊名称	刊号	收录类型
<b>西北植物学报</b>	1000-4025	选择期刊	中国计量学院学报	1004-1540	选择期刊
海洋学报	0253-505X	选择期刊	环境科学学报(英文版)	1001-0742	选择期刊
细胞研究(英文版)	1001-0602	选择期刊	福建农业大学学报	1006-7817	选择期刊
应用与环境生物学报	1006-687X	选择期刊	华南农业大学学报	1004-411X	选择期刊
中国海洋与湖沼学报 (英文版)	0254-4059	选择期刊	浙江农业大学学报(已易名浙江大学学报:农学版)	1000-2111	选择期刊
农药学学报	1008-7303	选择期刊	中国科学:C辑	1006-9305	选择期刊
工业用水与废水	1009-2455	选择期刊	中国科学:F辑	1009-2757	选择期刊
亚洲天然产品研究 (英文版,英国)	1028-6020	选择期刊	林业科学	1001-7488	选择期刊
中国农业大学学报	1007-4333	选择期刊			

(朱 诚 供稿)