

文章编号: 1000-0615(2004)03-0255-06

条浒苔蛋白核超微结构和 Rubisco 及其活化酶分子定位

何培民^{1,2}, 吴庆磊¹, 吴维宁¹,
陆巍², 张大兵³, 陈根云⁴, 张荣铄²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090; 2. 南京农业大学农学院, 南京 210095;
3. 上海市农业科学院, 上海 201106; 4. 中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200433)

摘要: 研究了条浒苔蛋白核超微结构及其 Rubisco 和 Rubisco 活化酶金相免疫分子定位。超微结构显示, 条浒苔细胞具有形态及组成相同的 1~2 个蛋白核, 每个蛋白核被淀粉鞘所包围。蛋白核中央均有 1 条由 1 个类囊体构成的纵向孔道, 并有时局部特别膨大。纵向孔道两端与叶绿体基质相连接。小球藻 Rubisco 抗体对条浒苔 Rubisco 的 Western 印迹图谱显示仅为 1 条带, 其位置与 SDS-PAGE 电泳图谱上的主带相对应, 分子量大约为 55kD。金相免疫分子定位的结果显示, 条浒苔 Rubisco 金标颗粒主要分布于叶绿体的蛋白核(71.86%)和淀粉鞘(27.94%)部位中, 按面积密度计算二者总和占 99.8%, 极少分布在叶绿体类囊体和基质中(0.2%)。Rubisco 活化酶分子定位也显示其主要分布于蛋白核和淀粉鞘中。这些结果均表明条浒苔蛋白核(及淀粉鞘)与单细胞绿藻的蛋白核相同, 具有光合作用功能。条浒苔 Rubisco 初始活性和总活性的测定结果表明, 其活化率较高, 高达 77.62%。

关键词: 条浒苔; 蛋白核; 超微结构; Rubisco; Rubisco 活化酶; 金相免疫分子定位

中图分类号: Q248 文献标识码: A

Pyrenoid ultrastructure and molecular localization of Rubisco and Rubisco activase in *Enteromorpha clathrata*

HE Pei-min¹, WU Qing-lei¹, WU Wei-ning¹,
LU Wei², ZHANG Da-bing³, CHEN Gen-yun⁴, ZHANG Rong-xian²

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 2. Department of Agronomy, Agriculture University of Nanjing, Nanjing 210095, China; 3. Agriculture Institute of Shanghai, Shanghai 201106, China;
4. Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Science, Shanghai 200433, China)

Abstract: The pyrenoid ultrastructure, gold immunolocalization of Rubisco and Rubisco activase in chloroplast of *Enteromorpha clathrata* were studied in this paper. *E. clathrata* is a marine macroalga with rapid growth and multiple pyrenoids. The ultrastructure studies showed that there were 1-2 pyrenoids with similar shape and component in the cells of *E. clathrata*. The pyrenoids were embedded by starch sheath. There was a portrait channel formed by a thylakoid through pyrenoid. Sometimes the portrait channel was enlarged in the middle of pyrenoid and was connected with the stroma of chloroplast at both channel ends. The Western blotting with antibody raised against Rubisco large subunit from *Chlorella protothecoides* showed there was only one protein band in the Western blotting map. The SDS-PAGE and Western blotting showed the molecular weight of Rubisco large subunit

收稿日期: 2003-01-16

资助项目: 上海市曙光计划资助项目(SG-98-032); 国家自然科学基金资助项目(30371101)

作者简介: 何培民(1959-), 江西南昌人, 博士, 教授, 主要从事藻类光合生理分子生物学、藻类养殖和生物技术、海洋生物学和生态修复研究。Tel: 021-65710364, E-mail: pmhe@shfu.edu.cn

of *E. dathrata* was about 55kDa. Gold immunolocalization showed the gold particles with antibodies raised against the large subunit of Rubisco heavily concentrated the pyrenoid (71.86%) and starch sheath (27.94%), both totalling 99.8% by area calculation, whereas the thylakoid region of the chloroplast was lightly labeled (0.2%). Rubisco activases also were mainly distributed in the pyrenoid and starch sheath. All the results demonstrated pyrenoid and starch sheath were closely related with photosynthetic function. Furthermore, the results of initial and total activity of Rubisco in *E. clathrata* determination of Rubisco showed its active ratio of Rubisco was as high as 77.62%.

Key words: *Enteromorpha dathrata*; pyrenoid; ultrastructure; Rubisco; Rubisco activase; gold immunolocalization

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, EC4.1.1.39, 简称 Rubisco) 是光合作用过程中第一个关键酶,在活体里植物需要 Rubisco 活化酶的活化才具有光合固碳功能。高等植物 Rubisco 主要分布于叶绿体基质中,而大部分单细胞绿藻的 Rubisco 主要存在于蛋白核中^[1],因而认为,蛋白核可能涉及光合功能以及 CO₂ 浓缩机制(CO₂ concentrating mechanism, CCM)^[2-7]。蛋白核的有无、数量、位置和形状都是绿藻分类的一个重要形态特征^[8]。由于藻类蛋白核涉及光合作用功能,其超微结构和功能的研究越来越受重视^[8-12]。Morita 等^[8,13]及何培民等^[14]的研究已分别显示莱茵藻和小球藻的 99% 以上的 Rubisco 是分布于蛋白核及淀粉鞘中,这进一步证明了蛋白核(及淀粉鞘)具有光合功能,亦即蛋白核确实为 CCM 中一个主要组成成份。以往对单细胞绿藻有较多的研究,而对大型绿藻 Rubisco 在蛋白核分子定位研究较少。大型海洋绿藻是一种经济海藻。在日本、韩国已有栽培,目前我国南方也开始栽培。浒苔在富营养化条件下生长特别快,目前已成为世界范围内“绿潮”形成的主要种类之一^[15,16];此外在我国条斑紫菜栽培海区,浒苔已成为紫菜栽培和加工的最主要敌藻。其中条浒苔(*Enteromorpha dathrata*)的细胞具有 2 个以上的蛋白核^[17],因此研究其蛋白核 CCM 和光合分子生物学特性,具有很重要的光合理论和实际意义。本文特选用条浒苔为材料,主要研究 CCM 重要组成成份蛋白核的超微结构和 Rubisco 及其活化酶在蛋白核中的分子定位。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验材料条浒苔采集于江苏启东吕泗海丰紫

菜养殖海区。采回后用消毒海水洗刷干净并放入光照培养箱进行培养。

1.2 藻体培养

条浒苔置于 800mL 三角瓶,加入 500mL 消毒的 PES 培养液进行充气培养,光照强度 30~45 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照周期 12L:12D,培养温度为 20 $^{\circ}\text{C}$,每隔 4~6 天,更换新鲜培养基。

1.3 Rubisco 和 Rubisco 活化酶及其抗体的制备

Rubisco 大亚基第一抗体制备方法参考文献 [18]。离心收集培养的原始小球藻(*Chlorella protothecoides*)经液氮冻融、研磨、离心获上清液,用 35%~55% 硫酸铵分部沉淀蛋白质,经 Sephacryl S-300 柱和 DEAE-纤维素(DE-52)柱层析及 NaCl 梯度洗脱,获得纯化的 Rubisco。将 2mg 纯化的小球藻全酶、大亚基、分别和 1mL 弗氏完全佐剂混合,给大白兔皮下注射,并每隔一定时间进行加强,40 多天后,制备出抗体。

Rubisco 活化酶第一抗体和制备方法参见文献 [19]。首先将菠菜叶片经液氮冷冻研磨成粉,按 1:2 加入提取缓冲液(50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES-KOH, pH 7.2, 5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂, 1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, PMSF, DTT, 2% (W/V) PVP, 0.4 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ATP),匀浆后经过滤,离心(20000 $\times g$)后,用 35% 饱和硫酸铵分步沉淀上清液蛋白。再经 Sephadex G50 脱盐,DEAE-Sephacryl CL-4B 层析柱层析及 KCl 洗脱,透析去盐后,再经 FPLC MonoQ 柱层析和 KCl 梯度洗脱,收集 0.21~0.25 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 分部,加入 ATP 至终浓度 0.3 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ATP 于液氮保存。

将获得的活化酶,经 SDS-PAGE 进一步纯化。用纯化的 Rubisco 活化酶和弗氏完全佐剂注射兔子,制备出兔免 Rubisco 活化酶抗血清,并对其抗体用 Western 印迹鉴定。

1.4 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 电泳

条浒苔培养 3~4d 后收集 2g(鲜重),分别加入液氮研磨。再加入 8mL 酶提取液(20mL 50mmol·L⁻¹ Tris-HCl, EDTA 1mmol·L⁻¹, 5% 甘油, 巯基乙醇 5mmol·L⁻¹, PH 8.0)。研磨稍许,分别 4 000r·min⁻¹ 离心 10min。收集上清液 4℃ 保存。

SDS-PAGE 电泳参考文献[20]的方法,电泳仪为 Bio-Rad 公司产品。Native-PAGE 电泳参考文献[20]的方法,但其中的 SDS 试剂用蒸馏水代替。

1.5 Western 印迹法

SDS-PAGE 电泳或 Native-PAGE 电泳结束后,进行蛋白转移电泳。蛋白转移电泳参考文献[20]。用原始小球藻大亚基抗体作第一抗体,磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG(华美公司)作第二抗体。

1.6 免疫金电镜切片制作

条浒苔 Rubisco 免疫金电镜切片制作方法基本按照 Morita 等^[6] 和何培民等^[14] 的方法进行。Rubisco 分子定位用原始小球藻 Rubisco 抗体为第一抗体(按 1:100 稀释), Rubisco 活化酶分子定位用烟草 Rubisco 活化酶抗体为第一抗体(按 1:200 稀释),第二抗体为羊抗兔免疫球蛋白,并连接胶体金颗粒(直径为 10μm),为 Sigma 公司产品。

1.7 Rubisco 总活性和初始活性的测定

Rubisco 羧化总活性和初始活性采用同位素¹⁴C 方法测定,测定方法参照文献[21]方法。

1.8 叶绿素含量的测定

叶绿素含量的测定参考文献[22]的方法。

2 结果

2.1 条浒苔蛋白核超微结构

大多数条浒苔电镜照片显示其细胞叶绿体中有多个蛋白核,其形态结构基本相同(图版-1)。蛋白核位于周边叶绿体之中,椭圆形或豆状,大小为 600~1000nm×1200~1500nm。蛋白核中央有 1 条由 1 个类囊体形成的纵向孔道(图版-1,2,3),孔道类囊体膜状结构不明显,孔道直径为 20~200nm,孔道中具有网状结构的基质(图版-4)。有时纵向孔道的中段膨大,宽度为两端处的 2~3 倍(图版-4,6)。蛋白核由淀粉鞘包围,淀粉鞘的厚度约为 50~350nm。淀粉鞘的厚薄与藻体大小有关,较大藻体(长约 15~20cm)的淀粉鞘厚度较薄(图版-4),较小藻体(长约 1~3cm)的淀粉鞘较厚,可达 350nm(图版-2)。淀粉鞘是由淀粉形成,

电子密度高,在超微结构照片上颜色很深(图版-2)。条浒苔淀粉鞘比较完整,一般仅在纵向孔道的两端处被隔断。蛋白核的纵向孔道向两端伸展与叶绿体的类囊体相联系(图版-1,2,3)。但有时在蛋白核的中部,也能见到蛋白核与类囊体区有联系(图版-7)或者纵向孔道在中部形成接点与类囊体区联系,使纵向孔道成 V 字形(图版-5)。

2.2 SDS-PAGE 电泳、Native-PAGE 电泳和 Western 印迹鉴定

对条浒苔可溶性蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳图谱见图版-9 的 S 泳道。用小球藻 Rubisco 大亚基抗体对条浒苔 Rubisco 进行 Western 印迹反应,结果显示也仅有一条主带,其位置与 SDS-PAGE 电泳图谱上染色较深的蛋白条带位置相对应(图版-9, W 泳道),说明该条深带即为 Rubisco 大亚基条带,分子量大约为 55kD 左右。

对条浒苔可溶性蛋白进行 Native-PAGE 电泳,电泳图谱显示有一条染色较深蛋白条带(图版-8, N 泳道)。用小球藻 Rubisco 大亚基抗体对条浒苔 Rubisco 进行印迹鉴定,结果显示仅有一条主带,位置与 Native-PAGE 电泳图谱上染色较深的蛋白条带位置相对应(图版-8, W 泳道)。说明该条带即为 Rubisco 全酶。

2.3 条浒苔 Rubisco 分子定位

图版-3,4,6 示条浒苔 Rubisco 大亚基分子标金颗粒在叶绿体中的分布,且绝大部分标金颗粒均匀地分布于蛋白核中。在淀粉鞘区域有少量分布,类囊体区域中仅有零星分布(图版-4,6)。按面积密度计算,蛋白核为 $660 \pm 256.16 \text{ ind} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, 淀粉鞘区为 $272.22 \pm 127.13 \text{ ind} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, 类囊体区为 $27.5 \pm 11.98 \text{ ind} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, 本底为 $25.5 \pm 15.58 \text{ ind} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ 。除去本底,蛋白核、淀粉鞘和类囊体分别为 71.86%、27.94% 和 0.2%。另外,蛋白核的纵向孔道中也有数个标金颗粒分布(图版-3,4,5)。

2.4 条浒苔 Rubisco 活化酶分子定位

用菠菜 Rubisco 活化酶抗体对条浒苔 Rubisco 活化酶的免疫金标分子定位,结果表明 Rubisco 活化酶的标金颗粒主要集中于蛋白核和淀粉鞘中,密度比例为 1:1(图版-7)。说明 Rubisco 活化酶主要分布于蛋白核和淀粉鞘区。

2.5 条浒苔 Rubisco 活性测定

对大型海藻条浒苔 Rubisco 酶总活性和初始活性进行测定,其结果为图 1。从图中可看出,条浒

苔初始活性和总活性分别为 $0.6006 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{chl} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $0.7737 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{chl} \cdot \text{min}^{-1}$, 其 Rubisco 活化率比较高, 可达 77.62%。

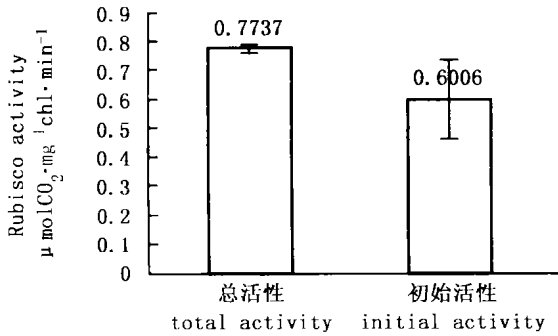


图1 条浒苔 Rubisco 酶初始活性和总活性

Fig.1 Initial and total activity of Rubisco from *E. clathrata*

3 讨论

从结果可以看出, 多数藻类只有 1 个蛋白核, 而条浒苔细胞的蛋白核为 2 个以上。且多个蛋白核之间在形态和结构上没有差别, 并均能被 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的标金颗粒均匀标记, 说明其结构、组成成份和功能均相同。

条浒苔蛋白核纵向孔道是由 1 个类囊体组成, 这与单细胞绿藻 (如小球藻) 不同。小球藻蛋白核纵向孔道是由 2 个类囊体所组成^[14]。条浒苔孔道直径也大于小球藻, 且中部有时膨大, 这种现象在其它藻类中并未见到过。图版-3~6 的蛋白核孔道中均有 Rubisco 标金颗粒分布, 表明 Rubisco 也可能作为运输对象。蛋白核孔道结构及其特点均表明蛋白核与光合作用有密切关系。

Holdsworth^[23] 最早发现绿藻 *Eremosphaera* 的蛋白核主要是由 Rubisco 大亚基和小亚基组成的, 其后相继在其它单细胞绿藻莱茵藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 及 *Micromonas sguamata* 中证实^[2]。随着免疫化学分子精确定位技术的发展, Rubisco 金相免疫技术分子定位研究显示单细胞绿藻的 Rubisco 主要定位于蛋白核中, 因而推测蛋白核可能涉及光合功能。其中关键问题是 Rubisco 在蛋白核中所占比率。Süss 等^[24] 用高等植物 Rubisco 抗体对莱茵藻研究表明大约有 30%~40% 的 Rubisco 是位于叶绿体基质中, 60%~70% 是位于蛋白核中。而 Morita 等^[6] 用莱茵藻 Rubisco 抗体显示莱茵藻 Rubisco 大亚基在蛋白核中, 所占比例高达 99%。为了更客观地反映 Rubisco 在蛋白核所占比率, 本

实验特用与条浒苔亲缘关系比较接近的小球藻 Rubisco 抗体作为第一抗体, 避免因使用亲缘关系太远 (如菠菜) 或本身 Rubisco 抗体所带来的干扰。研究结果显示, 按面积密度计算, 蛋白核、淀粉鞘和类囊体分别为 71.86%、27.94 和 0.2%。可见大型绿藻条浒苔 Rubisco 与单细胞绿藻一样主要分布于蛋白核和淀粉鞘, 两者占 99.8%。其结果类似何培民等^[14] 对小球藻研究结果。绿藻类蛋白核均被淀粉鞘所包围, 但目前还不能解释 Rubisco 是如何越过淀粉鞘障碍到达蛋白核的。已有实验证明 Rubisco 集中于蛋白核与光照和 CO_2 浓度有关^[5,12]。本实验结果显示在淀粉鞘区域具有 Rubisco 分布, 说明 Rubisco 可能是穿过淀粉鞘进入到蛋白核。在细胞内 Rubisco 的活化主要依靠 Rubisco 活化酶, 在莱茵藻中已证明 Rubisco 活化酶等被定位于蛋白核中。本实验也显示 Rubisco 活化酶主要分布于蛋白核和淀粉鞘中, 这进一步证明大型绿藻的蛋白核及淀粉鞘具有光合作用功能。此外碳酸酐酶、硝酸还原酶也被定位于蛋白核中^[25], 说明蛋白核功能比较复杂。

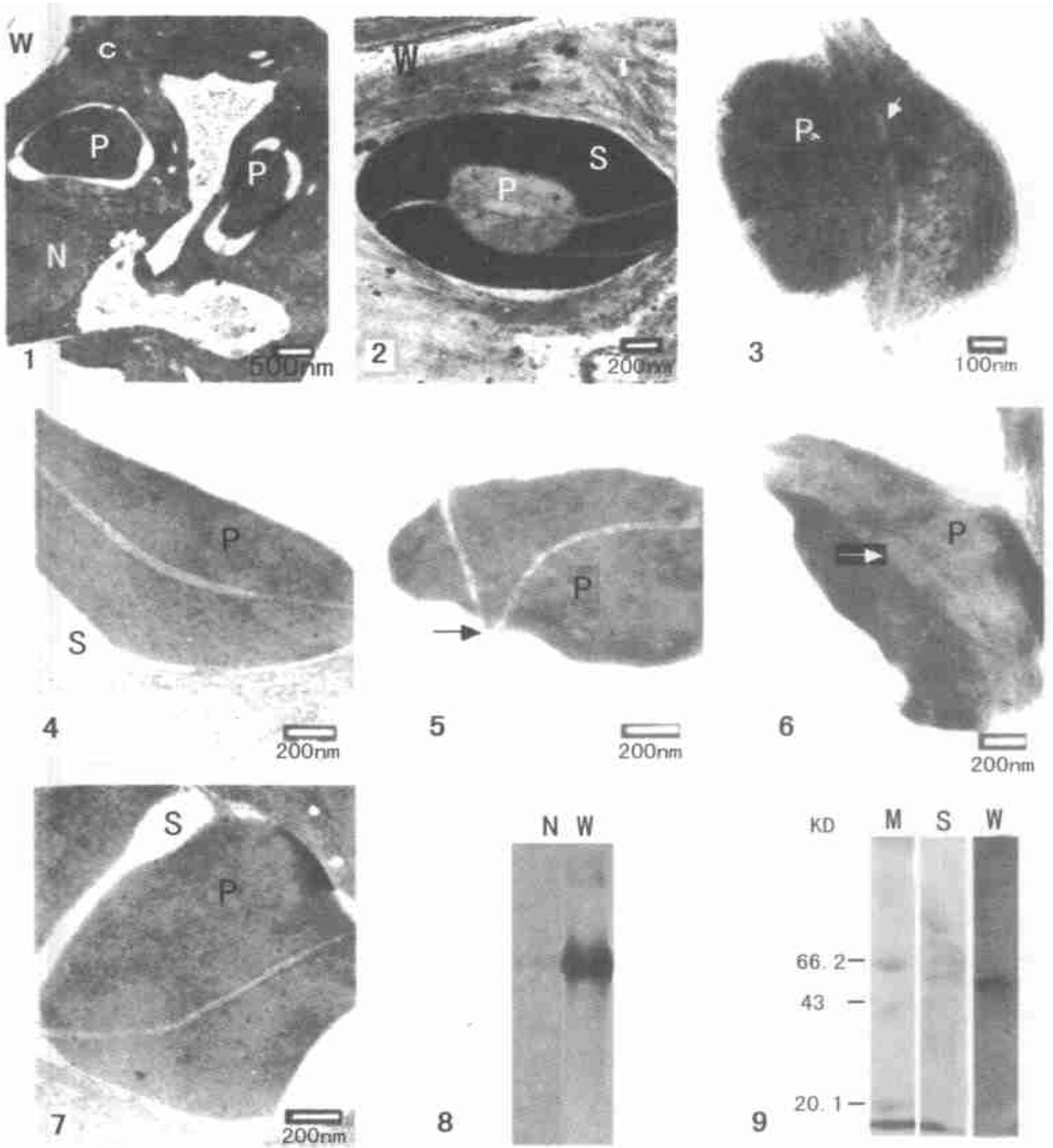
从藻类 CCM 角度来看, 藻类 Rubisco 集中于蛋白核是藻类适应自然的一种表现。由于水中 CO_2 浓度较低, Rubisco 集中更有利于藻类高效固定浓度较低的 CO_2 , 使 CO_2 不被逸漏。因此, Rubisco 被认为是 CCM 重要组分^[3,4,8]。但目前还不了解藻类 Rubisco 会集聚于蛋白核的机制。条浒苔 Rubisco 初始活性很高, 因而具有较高的活化率 (达 77%) 但高活化率的原因尚不清楚。是由于具有较多的 Rubisco 活化酶, 还是由于具有多个蛋白核能俘获更多的 CO_2 , 仍有待于研究。

我国条浒苔主要产于浙江、福建沿海一带及广东大陆和海南岛沿岸, 为泛暖温带性海藻, 多生长于中潮带, 全年都有生长, 但以春季最繁盛, 繁殖季节为 6~7 月。江苏省海岸由于长期栽培紫菜, 浒苔已为紫菜栽培器具上常见大型绿藻种类, 并成为紫菜栽培主要敌害。而紫菜 Rubisco 的活化率为 35% 左右, 为条浒苔 Rubisco 活化率一半, 且条浒苔光合作用的光补偿点比紫菜低很多, 因此在有限营养供应条件下或一定体积培养液中, 紫菜竞争不过条浒苔, 在紫菜栽培网绳上, 即使原本紫菜苗密度很高的地方也能被条浒苔小苗占领。在富营养化的海区和沿海岸海水中, 条浒苔生长要快于其它大型海藻以及微型绿藻, 细长的藻体易被海浪冲

断, 因此, 沿岸海区出现大量飘浮浒苔以及石莼而形成所谓的绿潮。

参考文献:

- [1] Mackay R M L, Gibbs S P. Composition and function of pyrenoids: cytochemical and immunocytochemical approaches [J]. *Can J Bot*, 1991, 69: 1040- 1052.
- [2] Kuchitsu K, Tsuzuki M, Miyachi S. Characterization of the pyrenoid isolated from unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: particulate form of Rubisco protein [J]. *Protoplasma*, 1988, 144: 17- 24.
- [3] Ramazanov Z, Henk C, Mason C, *et al.* The induction of the CO₂-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Planta*, 1994, 195: 210- 216.
- [4] Badger M R, Price G D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45: 369- 92.
- [5] Lin S, Carpenter E J. Rubisco of *Dunaliella tertiolecta* is redistributed between the pyrenoid and the stroma as a light-shade response [J]. *Mar Biol*, 1997, 127: 521- 529.
- [6] Morita E, Kuroiwa H, Huroiwa T, *et al.* High localization of Ribulose- 1, 5- biphosphate carboxylase/ oxygenase in the pyrenoids of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), as revealed by cryofixation and immunogold electron microscopy [J]. *Phycol*, 1997, 33: 68- 72.
- [7] He P M, Xu C H, Yu J X, *et al.* Molecular localization and activity inducement of periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, 19: 317- 321. [何培民, 徐春和, 於新建, 等. 莱茵藻胞外碳酸酐酶分子定位和 [J]. *植物学通报*, 2002, 19(3): 317- 321.]
- [8] Morita E, Abe T, Tsuzuki M, *et al.* Presence of the CO₂-concentrating mechanism in some species of the pyrenoid-less free-living algal genus *Chloromonas* (Volvocales, Chlorophyta) [J]. *Planta*, 1998, 204: 269- 276.
- [9] Hanson D, Andrews T J, Badger M R. Variability of the pyrenoid-based CO₂-concentrating mechanism in hornworts (Anthocerotophyta) [J]. *Functional Plant Biology*, 2002, 29: 407- 416.
- [10] Nagasato C, Motomura T. New pyrenoid formation in the brown alga, *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae) [J]. *Phycol*, 2002, 38: 800- 806.
- [11] Soe K S, Fritz L. Die changes in pyrenoid and starch researches in dinoflagellates [J]. *Phycologia*, 2002, 41: 22- 28.
- [12] Xia J R, Gao K S. Effect of CO₂ enrichment on microstructure of two species of freshwater green algae [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(5): 527- 531.
- [13] Morita E, Abe T, Tsuzuki M, *et al.* Role of pyrenoids in the CO₂-concentrating mechanism: comparative morphology, physiology and molecular phylogenetic analysis of closely related strains of *Chlamydomonas* and *Chloromonas* (Volvocales) [J]. *Planta*, 1999, 208: 365- 372.
- [14] He P M, Zhang R X, Zhang D B, *et al.* Gold immunolocalization of Rubisco in Chloroplast in *Chlorella* [J]. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 2001, 34: 17- 23. [何培民, 张荣铎, 张大兵, 等. 小球藻 Rubisco 在叶绿体中的金标免疫分子定位 [J]. *实验生物学报*, 2001, 34(1): 17- 23.]
- [15] Lotze H K, Schramm W. Ecophysiological traits explain species dominance patterns in macroalgal bloom [J]. *Journal of Phycology*, 2000, 36: 287- 295.
- [16] Blomster J, Back S, Fewer D P, *et al.* Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvothycidae) forming green tides [J]. *American Journal of Botany*, 2002, 89: 1756- 1763.
- [17] Li W X, Zhu Z J, Liu F X. Introduction of phycology [M]. Shanghai Shanghai Science & Technology Press, 1982. 173- 217. [李伟新, 朱仲嘉, 刘凤贤. 海藻学概论 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1982. 173- 217.]
- [18] Zhang D B, Li L R, Miao Y G, *et al.* Rubisco purification and its content change in the conversion from heterotrophy to autotrophy in *Chlorella* [J]. *Acta Plant Physiology Sinica*, 1994, 20(4): 346- 352. [张大兵, 李立人, 缪有刚, 等. 小球藻 Rubisco 的纯化及其在异养向自养转变过程中的含量变化 [J]. *植物生理学报*, 1994, 20(4): 346- 352.]
- [19] Tang R H, Jia J W, Li L R. Purification and its characters of Rubisco activase in *Tobacco* [J]. *Acta Plant Physiology Sinica*, 1997, 23(1): 1- 6. [唐如航, 贾军伟, 李立人. 烟草 Rubisco 活化酶纯化及其特性 [J]. *植物生理学报*, 1997, 23(1): 1- 6.]
- [20] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [21] Perchorowicz J J, Raynes D A, Jensen R G. Measurement and preservation of the *in vivo* activation of ribulose 1, 5- biphosphate carboxylase in leaf extracts [J]. *Plant Physiol*, 1982, 69: 1165- 1168.
- [22] Maribel L D, Mikio T, Shigetoh M. Light requirement for carbonic anhydrase induction in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30(2): 207- 213.
- [23] Holksworth R H. The isolation and partial characterization of the pyrenoid protein of *Eremosphaera viridis* [J]. *Cell Biol*, 1971, 51: 499- 513.
- [24] Süß K H, Prokhorenko I, Adler K. In situ association of Calvin cycle enzymes, ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/ oxygenase, ferredoxin-NADP+ reductase, and nitrite reductase with thylakoid and pyrenoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as revealed by immunoelectron microscopy [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1387- 1397.
- [25] Miyamura S, Hori T, Ohya T, *et al.* Co-localization of chloroplast DNA and ribulose- 1, 5- biphosphate carboxylase/ oxygenase in the so-called pyrenoid of the silhouous green alga *Caulerpa lentillifera* (Caulerpaceae, Chlorophyta) [J]. *Phycologia*, 1996, 35(2): 156- 160.



图版说明

Explanation of Plate

1. 示条浒苔细胞中含有2个蛋白核(藻体长度为15~20cm); 2. 示条浒苔幼藻体细胞的蛋白核和淀粉鞘(藻体长度为15~20cm); 3. 蛋白核及其纵向通道, 且 Rubisco 大亚基金标颗粒主要标记在蛋白核; 4. Rubisco 大亚基金标颗粒标记在蛋白核、纵向通道和淀粉鞘上; 5. 在蛋白核中央形成蛋白核通道结, 并与叶绿体基质相连接; 6. 蛋白核中间段的纵向通道膨大(箭头); 7. Rubisco 活化酶的金标颗粒标记在蛋白核和淀粉鞘上; 8. 条浒苔 Rubisco 的 Native-PAGE 图谱(N 道)和 Western 印迹图谱(W 道); 9. 条浒苔 Rubisco 的 SDS-PAGE 图谱(N 道)和 Western 印迹图谱(W 道) —— C: 叶绿体; P: 蛋白核; S: 淀粉鞘; T: 类囊体; N: 细胞核; W: 细胞壁

1. Showing there are two pyrenoids in the cell of *E. dahrata* (about 15~20 cm in length); 2. Showing the pyrenoid and starch sheath in the cell of younger *E. clathrata*. (1~3 cm in length); 3. Showing the pyrenoid and its portrait channel and the Rubisco large subunit gold particles labeling the pyrenoid heavily; 4. Showing the Rubisco large subunit gold particles labeling the pyrenoid and its portrait channel, starch sheath; 5. Showing the pyrenoid channel nod formed in the middle of pyrenoid, which connected with matrix of chloroplast; 6. Showing the enlargement (arrow) of the portrait channel in the pyrenoid middle; 7. Showing the gold particles of Rubisco activase labeling the pyrenoid and starch sheath; 8. Showing the map of Native-PAGE (lane N) and Western blotting (lane W) for Rubisco of *E. clathrata*; 9. Showing the map of SDS-PAGE (lane S) and Western blotting (lane W) for Rubisco large subunit of *E. dahrata* —— C: chloroplast; P: pyrenoid; S: starch sheath; T: thylakoid; N: nuclear; W: wall