

# 盐生杜氏藻细胞光合特性的研究

彭建新 王国强 钱月琴 申俊江

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

**摘要:** 研究了盐生杜氏藻细胞的光合特性获知: (1) 在 700—300nm 波长范围, 出现三个吸收峰, 分别位于 680, 485 和 440nm 处; (2) 测定了该藻细胞内 ATP/ADP 比值, 钩酸钠处理可以提高 ATP/ADP 比值; (3) 以培养液为反应介质, 测出该藻细胞的光合放氧, 钩酸钠抑制放氧速率; (4) 用调制式荧光计测出该藻细胞的  $F_0$ ,  $F_m$  以及经间隔饱和光脉冲引起的  $F_m$ , 表明盐生杜氏藻具有正常的光系统结构; (5) 该藻细胞可诱导可逆的光状态转换, 光系统 II 电子传递抑制剂 DCMU 和磷酸酯酶抑制剂 NaF 均阻止光状态 II 向光状态 I 转换; (6) 提取了该藻细胞和经氯霉素处理的细胞类囊体膜蛋白制剂, 经 SDS-PAGE 分析表明, 两者蛋白带的分布有所差异。

**关键词:** 盐生杜氏藻; 抑制剂; 光合放氧; 叶绿素荧光; 膜蛋白

**中图分类号:** Q945.11    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3207(2000)01-07

盐生杜氏藻 *Dunaliella salina* 系单细胞绿藻, 能在较高盐浓度下 (5mol/L) 的培养液中生长, 其细胞内大量胡萝卜素和甘油的可利用性受到人们重视<sup>[1,2]</sup>。*D. salina* 细胞只含有一个叶绿体, 对于研究光合膜结构和功能的关系, 亦显示其制备简单快速、制剂中叶绿体发育均一等优越性。光合能量转换的几个重要步骤反应都是在叶绿体类囊体膜上进行的。高等植物叶绿体类囊体膜结构的形成及其影响因子的研究一直受到人们的重视。相比较 *D. salina* 光合特性的研究甚少报道。在研究叶绿体类囊体膜蛋白质生物合成过程中, 作者较为系统地研究了 *D. salina* 的光合特性。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞的培养和生长** *D. salina* 接种在改进的 Pick 等<sup>[3]</sup>的无菌培养基内培养, 温度为 30℃、光照强度为  $4 \times 10^3 \text{ erg.cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 光暗周期 12:12h, 培养 10—14d。每隔 3d 取样, 分别进行细胞生长量、叶绿素量和蛋白质量的测定。获得结果如下: (1) 在 1mol/L 的 NaCl 中, 细胞的生长量随生长期的延长呈相对的直线关系; (2) 在 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0mol/L) 四种盐浓度的培养液中, 培养 20d 左右, 叶绿素量达到最高; (3) 蛋白质含量在生长期为 16d 时

收稿日期: 1998-02-20; 修订日期: 1999-07-24

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (39730040); 中国科学院重点资助项目 (KJ952-S1-20)

中国科学院植物研究所施定基先生提供藻种, 张银屏参加部分工作, 王颖君协助光谱测定, 特此致谢。

作者简介: 彭建新 (1967-), 女, 上海市金山人, 助理研究员, 主要从事光合作用基础研究。

达到最高, 其后呈下降趋势。据此, 采用含 1mol/L 的 NaCl 培养基进行培养。分离提取膜蛋白采用生长期为 14d 的藻细胞, 荧光测定则用生长期为 2d 的藻细胞。

**1.2 氯霉素处理** 在培养 10—14d 的藻培养液中, 加入用乙醇溶解的氯霉素, 使其最终浓度为 1.2mg/mL, 再培养两天后测定。

**1.3 吸收光谱的测定** 采用 UV-3000 双波长双光束分光光度计测定藻细胞的吸收光谱, 波长范围为 700—300nm。

**1.4 ATP/ADP比值的测定** 将藻体细胞悬浮于含 1mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的培养液内, 分装成每管 1mL, 叶绿素浓度为 0.1mg/mL, 在 25℃ 照光 10min 后置沸水浴 2min 杀死, 再加 2mL 沸水, 冰浴冷确后超声破碎 1min, 置 -20℃ 的冰箱备用; 钩酸钠处理是在照光 5min 后加入钩酸钠(最终浓度为 4mmol/L)再照光 5min。ATP 和 ADP 的测定按王维光等<sup>[4]</sup>方法。

**1.5 依赖 CO<sub>2</sub>的光合放氧的测定** 经 4000r/min 离心收集的藻体悬浮于新鲜的培养液内, 叶绿素浓度为 75μg/mL, 用氧电极法进行测定<sup>[5]</sup>。

**1.6 叶绿素 a 荧光的测定** 取叶绿素含量为 0.1mg/mL 藻细胞, 按 Volker. E<sup>[6]</sup>等的方法, 在室温条件下, 用调制式荧光仪 MKII(英国 Hansatech 公司制造)进行叶绿素 a 荧光动力学的测定。状态转换的测定<sup>[7]</sup>取接种后培养两天的 *D. salina*, 测定前先暗适应 10min; 诱导 F<sub>m</sub> 则用每间隔 1min 加饱和脉冲光照 2s。远红光(大于 720nm)光照处理 10min; 使用抑制剂的浓度, DCMU 为 10μmol/L, NaF 为 40mmol/L, 处理时间均为 10min。

**1.7 类囊体膜蛋白的分离和提取** 将 *D. salina* 培养液经 4000r/min 离心 4min, 收集藻细胞, 用 STK(0.2mol/L Sucrose, 50mmol/L Tris, 10mmol/L KCl, pH7.8)缓冲液洗涤一次, 再经 8000r/min 离心 10min, 收集的藻细胞用 TK 缓冲液(20mmol/L Tris, 10mmol/L KCl, pH7.8)悬浮至叶绿素为 0.5mg/mL 左右, 在冰浴中超声破碎 3min, 然后经 2000r/min 离心 2min, 弃去沉淀, 上清液再经 18000r/min 离心 20min, 收集沉淀用少量 STK 悬浮, 加入 CHAPS 使其最终浓度为 2%(v/v), 叶绿素浓度为 1.0mg/mL, 在冰浴中搅拌 30min 后, 经 18 × 10<sup>5</sup>g 的离心, 沉淀经悬浮后对 TK 缓冲液透析过夜, 次日经 2000r/min 离心 10min, 收集上清液即为膜蛋白制剂, -20℃ 保存备用<sup>[8]</sup>。

**1.8 其他测定** ATP 酶活性的测定按参考文献 [9] 的方法。叶绿素和蛋白质的测定及 SDS-PAGE 按前文<sup>[8]</sup>所述进行。

## 2 结果和讨论

### 2.1 吸收光谱

根据细胞光谱学原理, 用分光光度计对 *D. salina* 细胞进行吸收光谱测定, 在 680、485 和 440nm 波长处有三个吸收峰, 叶绿素 a 的吸收峰在 680nm 和 440nm 处, 类胡萝卜素的吸收峰在 485nm 处, 这与高等植物叶绿体的吸收光谱极为相近, 表明 *D. salina* 的叶绿体结构与高等植物叶绿体的结构相近(图1)。

### 2.2 细胞内 ATP/ADP比值的变化

细胞内的 ATP/ADP 比值反映了细胞内产生 ATP 和消耗 ATP 之间的平衡, 是细胞内能量转换、物质代谢及相关细胞器活动状况的一项具有生理生化意义的指标。从实验结果可见, 正常的 *D. salina* 细胞内的 ATP/ADP 比值为 0.21, 而经细胞质膜腺三磷酸酶的抑制

剂钒酸钠处理后的细胞内 ATP/ADP比值有所提高,达到 0.28,这可能因 *D. salina* 的细胞质膜腺三磷酸酶受钒酸钠的作用,使 ATP 的积累增加,或者 ATP 的消耗减少。

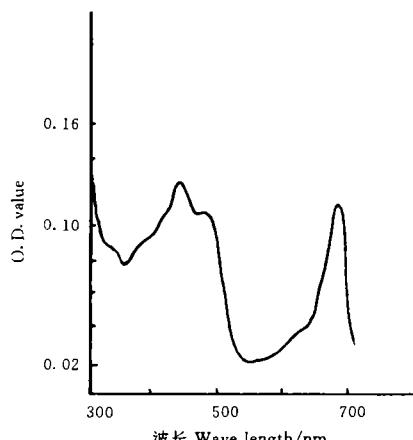


图1 *D. salina* 的吸收光谱

Fig.1 The absorption spectrum of *D. salina* cells

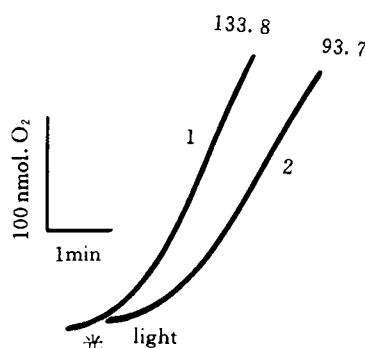


图2 *D. salina* 细胞的光合放氧

Fig.2 Photosynthetic  $O_2$ -evolution of *D. salina* cells

光合放氧单位 Unite of photosynthetic  $O_2$ -evolution:  $\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot h^{-1}$

1. *D. salina* cells

2. *D. salina* cells +  $Na_2VO_4$  (4mmol/L)

### 2.3 光合作用放氧

光合放氧涉及光合电子传递、磷酸化和碳素固定,取决于光合器内同化力的形成以及光合器内外膜的完整。利用氧电极法测定小麦叶肉组织、完整叶绿体和蓝藻细胞的光合放氧已有报告<sup>[12]</sup>。收集培养的 *D. salina*,以培养液为反应介质,进行了光合放氧的测定,经光照出现诱导期,而后放氧速率趋向最大。测试前加入钒酸钠到反应介质内,发现钒酸钠明显延长 *D. salina* 细胞光合作用放氧的诱导期,同时亦抑制放氧(图2)。

### 2.4 叶绿素 a 荧光变化

植物体内叶绿素荧光信号包含了十分丰富的光合作用信息,而且极易受外界环境条件的影响而变化。叶绿体光系统 II 还原其原初醌受体  $Q_A$  以及氧化  $Q_A^-$  的能力均可通过光照和暗适应而诱导的叶绿素 a 荧光的变化反映出来。利用调制式荧光动力学计测定了 *D. salina* 细胞的叶绿素 a 荧光动力学曲线。首先按不同光量密度对 *D. salina* 细胞的  $F_v/F_m$  的比值的影响进行了测定(图 3),这个比值反映了光系统 II 的活性。即随着光量密度的增加,  $F_v/F_m$  的比值下降。在 300, 675 和  $1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  三种光量密度的光作用下, *D. salina* 细胞的  $F_v/F_m$  比值下降至最低点处。在  $1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  光照后的 10min, 据此选用  $1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  光量密度进行藻细胞叶绿素 a 荧光动力学的测定(图 4)。调制式荧光计可测出藻细胞的  $F_0$  值,一般认为,光系统 II 在暗适应期间可用极其微弱的光激发而处于开启状态,  $F_0$  则代表在此状态下所测出的叶绿素 a 荧光的暗水平,由饱和光脉冲引起的最大荧光  $F_m$  及其后每间隔 1min 的光脉冲所引起的  $F'_m$ ,均表示 *D. salina* 细胞具有如高等植物叶绿体光系统 II 相近的结构和功能<sup>[13]</sup>。

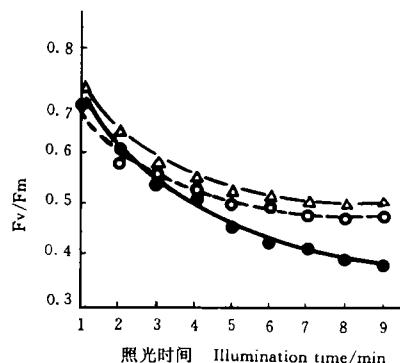


图3 不同光量密度对 *D. salina* 细胞  
荧光猝灭的影响

Fig.3 Effects of FPD on fluorescence quenching in  
*D. salina* cells  
 $\Delta$ — $300\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , ○— $1200\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  
●— $675\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

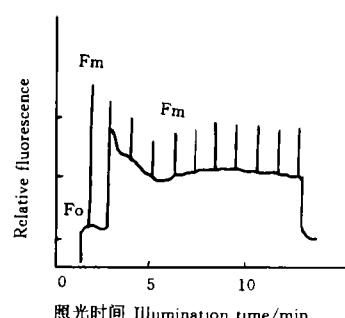


图4 *D. salina* 细胞叶绿素a的相对荧光  
Fig.4 Relative fluorescence of chlorophyll  
a in *D. salina* cells

## 2.5 光状态转换

在上述实验结果的基础上, 研究了 *D. salina* 细胞内与激发能在两个光系统之间分配有关联的光状态转换。暗适应后的藻细胞经饱和光脉冲出现最大荧光  $F_m$ , 即处于状态 II。停止饱和光脉冲, 加照远红光 10min 后, 则可诱导出现光状态 I。从图 5 可见, 状态 I 的  $F_m$  值要高于状态 II 的。较为准确的是以荧光参数  $F_m/F_0$  比值来表示。在状态 II,  $F_m/F_0 = 1.95$ , 而在状态 I 这个比值为 2.17。一般情况下这种光状态的转换是可逆的。Schreiber 等<sup>[7]</sup>曾在蓝藻细胞加远红光照射诱导出现光状态 I, *D. salina* 的实验的结果与 Schreiber 等是一致的。在远红光照射前加入磷酸酯酶抑制剂  $\text{NaF}$ , 则严重抑制这种可逆的转换, 表明 *D. salina* 细胞内的磷酸酯酶的活性左右着其光状态的转换。在样品中加入光系统 II 电子传

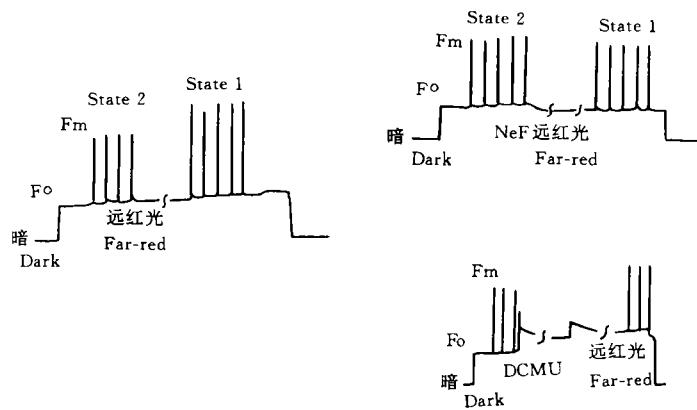


图5 *D. salina* 的光状态转换

Fig.5 The light-state transitions in cells of *D. salina*  
1. *D. Salina* cells, 2. The cells of *D. Salina* treated by  $\text{NaF}$  and DCMU.

递抑制剂 DCMU,  $F_0$ 上升,  $F_m$ 不变, 并难以观察到光状态 II 向光状态 I 的转换。

## 2.6 类囊体膜蛋白

叶绿体类囊体膜主要由磷脂、色素和蛋白质构成。就蛋白质而言, 可分为结构蛋白质和功能蛋白质两大类, 目前从类囊体膜已分离并鉴别的多为功能蛋白质, 如光系统 I 复合物, 光系统 II 复合物, 细胞色素蛋白复合物, 捕光叶绿素 a/b 蛋白复合物和腺三磷酸酶蛋白复合物。

利用 CHAPS 作为 *D. salina* 类囊体膜蛋白的增溶分离介质, 并经冷冻高速离心的分级分离, 制备出类囊体膜制剂, 经测试此制剂具有类囊体膜上腺三磷酸酶活性 ( $40.2 \mu\text{mol Pi / mg Chl \cdot h}$ )。SDS-PAGE 的结果表明叶绿体类囊体膜具有相应于高等植物叶绿体类囊体膜上的几种蛋白带, 如 94KD, 57KD, 51KD, 43KD, 34KD, 28KD 等, 这些蛋白带经鉴别分别属于腺三磷酸酶蛋白复合物, 光系统 I 和光系统 II 复合物的亚单位(资料)。氯霉素处理导致其类囊体膜蛋白图谱出现变化, 与对照相比, 相应于 43KD 及更小分子量的蛋白带增加, 缺少一条近 94KD 的蛋白带(图 6)。这些结果表明, 氯霉素处理可能影响膜蛋白中高分子量的功能蛋白质的合成或装配, 也不排除影响较小分子量蛋白质合成的可能性。

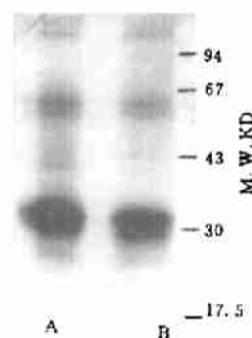


图 6 *D. salina* 类囊体膜蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 6 Pattern of thylakoid membrane protein from *D. salina* cells

- A. 氯霉素处理 (*D. salina* cells treated by chloramphenicol, containing 31 μg protein)
- B. 盐生杜氏藻细胞 (*D. salina* cells, containing 31 μg protein)

在光合作用有关步骤反应通过现代生物化学和生物物理学等方法逐步澄清之际, 人们认识到各步骤反应之间的相互关系的研究更具有生理学的意义, 而这方面的研究则要求在完整的叶绿体、完整细胞, 以至叶片或植株上进行。比如植物依据  $\text{CO}_2$  的光合放氧, 要求叶绿体被膜完整。被膜的破碎必然导致光合中间产物的流失, 光合放氧速率降低, 甚至难以测出。叶绿体类囊体膜蛋白质磷酸化调节机理以及光状态转换机理的研究, 也是要求光合能量转换膜结构的完整。综观上述实验结果, *D. salina* 不失为在完整细胞水平上研究光合作用机理, 并具有植物生理学意义的模式材料之一。值得提出的是, 分离 *D. salina* 叶绿体类囊体膜用于测定光诱导膜内外质子浓度差  $\Delta\text{pH}$  的变化, 一直未能成功, 其原因尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 杨雪梅, 吴超元. 盐藻的研究与现状 [J]. 生命科学, 1994, (6): 7—10
- [2] Avron M, Ben-Amotz A. *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology* [M]. London: CRC Press, 1992
- [3] Pick U, Karin L, Avron M. Determination of ion content and ion fluxes in the alotolerant alga *Dunaliella Salina* [J]. *Plant Physiology*, 1986, 81: 92—96
- [4] 王维光, 顾伶本. 从叶绿体中提取 ATP 方法的比较 [J]. 植物生理学通讯, 1986, (5): 259—265
- [5] 王国强, 肖建平, 蔡剑萍等. 完整叶绿体的光合作用放氧 [J]. 植物生理学通讯, 1980, 5: 31—36

- [6] Ebbert V, Godde D. Regulation of thylakoid protein phosphorylation in intact chloroplasts by the activity of kinases and phosphatases[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, **187**:335—346
- [7] Schreiber U, Endo T, Mi Hualing, Asada K. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation plus method: particular aspects relating to the study of Eukaryotic algae and Cyanobacteria[J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, **36**:873—882
- [8] 钟健, 彭建新, 史晓虹等. 鱼腥藻类囊体膜及其性质的研究 [J]. 植物学报, 1997, **39**: 359—265
- [9] 王国强, Selman B R. 豌豆叶绿体偶联因子腺三磷酸的分离和纯化 [J]. 植物生物学报, 1988, **14**: 380—384
- [10] 徐宜为, 免疫检测技术(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1991, 21—23
- [11] 陈根云, 缪有刚, 李立人. 光和蛋白合成抑制剂对水稻 RubisCo 大、小亚基和 RubisCo 亚基结合蛋白的基因表达的影响 [J]. 植物生理学报, 1993, **19**: 243—249
- [12] 李德耀, 沈允钢, 质子动力势各组成部分与光合作用的关系 [J]. 科学通报, 1994, **39**: 1712—1715
- [13] Schreiber U, Rienits K G, ATP-induced photochemical quenching of variable chlorophyll fluorescence[J]. *FEBS Lett.*, 1987, **211**:99—104
- [14] 谭新星, 许大全, 沈允钢, 小麦叶片的状态转换涉及 PSII 向 PSI 激发能的满溢的变化 [J]. 植物生理学报, 1997, **23**: 9—14

## STUDIES ON PHOTOSYNTHETIC PROPERTIES OF *DUNALIELLA SALINA* CELLS

PENG Jian-xin, WANG Guo-qiang, QIAN Yue-qin and SHEN Jun-jiang

(Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

**Abstract:** Photosynthetic properties of *Dunaliella salina* cells were investigated. The following results were obtained: (1) The absorption spectra of *D. salina* cells in the range of 700—300nm exhibited three high peaks at 680, 485 and 440nm. (2) The value of ATP / ADP in samples of *D. salina* cells was measured. The inhibitor of plasma membrane—Sodium vanadate increased the value of ATP/ADP in the cells. (3) Photosynthetic O<sub>2</sub>—evolution of *D. salina* cells was measured when the culture fluids were used as reaction medium. It was found that sodium vanadate delayed the induction, inhibited the rate of photosynthetic O<sub>2</sub>—evolution. (4) The F<sub>0</sub>, F<sub>m</sub> and F<sub>m</sub> of chlorophyll a in *D. salina* cells were measured by pluse modulation fluorometry. It showed that the abilities of reoxidation of PSII in the cells were normal. (5) Reversible light state transition in the cells were induced by light—dark. DCMU and NaF inhibited the reversion of Cells in state 2 to in state 1. (6) The preparations of thylakoid membranes of control and treatment cells of *D. salina* by chloromycetin were isolated. Different stain densities of proteins in the control and treatment samples were showed at the pattern of SDS-PAGE.

**Key words:** *Dunaliella salina*; Inhibitor; Photosynthetic O<sub>2</sub>—evolution; Chlorophyll fluorescence; Membrane protein