

多变鱼腥藻藻胆体的分离和荧光鉴定其完整性与解离程度*

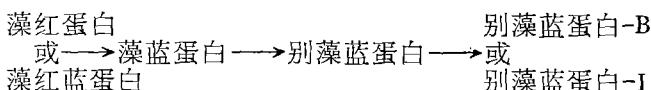
路 荣 昭 于 延 利

(中国科学院植物研究所)

提 要

完整藻胆体的室温荧光峰位于 678nm 附近，而不完整藻胆体其峰位于 673nm 以下。在液氮温度下，完整藻胆体的 F_{686} 与 F_{666} 相对荧光强度比值超过 10， F_{686} 与 F_{655} 之比值超过 20。不完整藻胆体的 F_{686} 与 F_{666} 和 F_{686} 与 F_{655} 之比值远低于完整藻胆体。可用室温荧光峰的波长位置和液氮温度下 F_{686} 与 F_{655} 和 F_{666} 的相对荧光强度比值来判断藻胆体的完整性和解离程度。而液氮温度下 F_{686} 与 F_{655} ， F_{666} 之比值是更灵敏的指标。

藻胆体是红藻和蓝藻的主要光能捕获器。其直径约 32—70nm，高约 25—45nm，厚约 12—40nm^[9]。它是由捕获光能的藻胆蛋白和在结构上起连接作用的无色蛋白或多肽所组成。藻胆蛋白占蓝藻细胞干重 12—24%^[10]。藻胆体中藻胆蛋白的光能传递的顺序为：



在藻胆体中藻胆蛋白之间光能传递效率很高。光能从 R-藻红蛋白传至藻蓝蛋白，效率为 93%；从藻蓝蛋白传递至别藻蓝蛋白为 98%；从别藻蓝蛋白传递至别藻蓝蛋白-B 为 96%^[10]。

藻胆体位于类囊体之间的间质，与类囊体光合膜紧密相连，通过锚蛋白（anchor protein）使藻胆体固着在类囊体上^[5]。藻胆体能将吸收的光能高效率地传递给类囊体光合膜中的叶绿素 a。

由于藻胆体是一个高效率光能传递的光能捕获器，因此它现已成为研究光能吸收、传递的一个重要而又理想的对象。

Gantt 等在 1972 年首先从红藻 (*Porphyridium cruentum*) 分离出藻胆体^[7]。我们制备藻胆体的方法是在 Gantt 等方法^[3]的基础上加以改变，以便在我们实验条件下能得到好的分离效果。

Gantt 等对多种红藻，蓝藻藻胆体荧光进行了研究，并确定完整藻胆体的室温荧光峰位于 670—675nm，液氮温度荧光峰位于 678—685nm^[4]。

* 冯丽洁同志协助测定荧光，特此致谢。

编辑部收到稿件日期：1983 年 4 月 23 日。

我们研究了多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 藻胆体荧光发射特性, 比较了完整藻胆体与不完整藻胆体室温荧光和液氮温度荧光。本文报道了这方面研究结果并对如何根据荧光发射特性来判断藻胆体的完整性和解离程度提出了我们的看法。

材 料 与 方 法

实验材料: 采用多变鱼腥藻 (ATCC 29413), 由美国俄亥俄州黄泉的凯特林实验室供给。藻在 1 公升锥形瓶中培养, 用 Allen 和 Arnon 培养基^[1], 日光灯连续光照, 25°C, 通空气, 当叶绿素 a 含量为 5—6 微克/毫升藻培养液时用离心方法进行收获。

叶绿素 a 的测定: 取 10 毫升藻培养液, 离心($1000 \times g$) 5 分钟。留沉淀, 加 5 毫升甲醇, 混合充分。离心($1000 \times g$) 5 分钟。取上清液, 测定 665nm 的光密度。根据 Mackinney 报道的叶绿素 a 的消光系数^[2], 按以下公式计算叶绿素 a 含量:

$$\text{叶绿素 a 微克/毫升藻培养液} = \text{O.D.}_{665\text{nm}} \times 6.71。$$

细胞破碎: 用上海超声波仪器厂生产的 CPS-1 型超声波粉碎机破碎细胞。

吸收光谱测定: 用日立 356 型双光束双波长分光光度计测定。

荧光光谱测定: 用日立 MPF-4 型荧光分光光度计测定室温和液氮温度(-196°C)荧光。激发光波长为 580nm。激发光狭缝宽度为 5nm。波长误差为 $\pm 1\text{nm}$ 。

试剂: 磷酸二氢钠、磷酸氢二钾和蔗糖系国产分析纯试剂。Triton X-100 系 ROTH 的特纯产品。

结 果

1. 藻胆体的分离

(1) 超声波破碎细胞 将收获的 1 克鲜重藻体用 0.9M 磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液, pH7.0 (以下简称磷酸缓冲液)洗二次, 然后将离心后沉淀的藻体悬浮在 10 毫升磷酸缓冲溶液中。在冰浴中用 CPS-1 型超声波粉碎机破碎细胞 15—20 分钟 (每次破碎 2 分钟, 间隔 2 分钟)。用显微镜检查破碎情况。

(2) Triton X-100 处理 加 Triton X-100 溶液至以上 10 毫升破碎的藻细胞悬浮液中, 使 Triton X-100 的浓度为 2%。室温保温 30 分钟, 连续和缓搅拌。离心($30,000 \times g$) 30 分钟, 20°C。仔细取出离心管中部蓝色溶液作为进行以下蔗糖密度梯度离心的样品。

(3) 蔗糖密度梯度离心 蔗糖溶液用 0.9M 磷酸缓冲溶液配制。在 11 毫升离心管中自下而上放入以下浓度和体积的蔗糖溶液 0.85M (2ml), 0.7M (2ml), 0.55M (2ml), 0.4M (2ml) 和 0.25M (2ml)。在 0.25M 蔗糖溶液上部加 0.6 毫升样品。用 MSE-75 型离心机, 水平旋转离心头离心 ($144,000 \times g$) 5 小时, 20°C。

蔗糖密度梯度离心后带的分布有时为四条, 有时为三条(图 1)。带 1 位于顶部, 呈黄绿色, 含有叶绿素和类胡萝卜素。带 2 为浅蓝色, 含有解离的藻胆蛋白, 有时缺少此带。带 3 为深蓝色, 是藻胆体的主带。带 4 为蓝色, 也是藻胆体带, 但含量较少, 因此颜色也较浅。

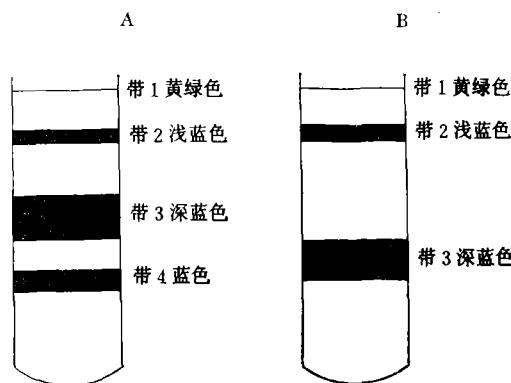


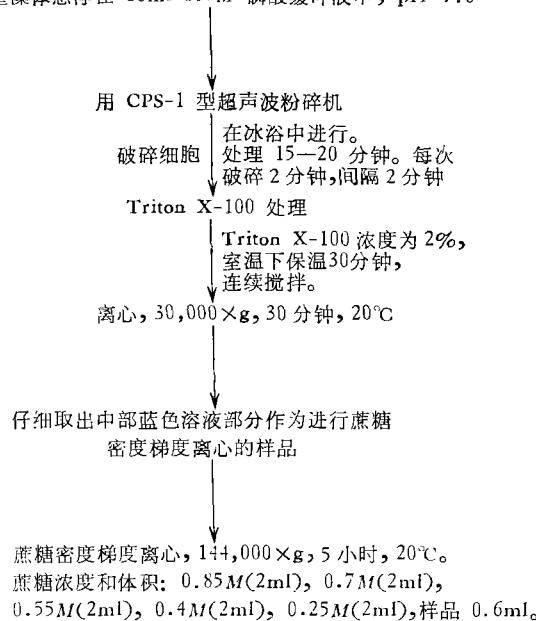
图 1 蔗糖密度梯度离心后带的分布图示

Fig. 1 Sucrose density gradient profile after centrifugation.

表 1 多变鱼腥藻藻胆体的分离程序

Separate procedure of phycobilisomes of *A. Variabilis*

1 克鲜重藻体悬浮在 10ml 0.9M 磷酸缓冲液中, pH 7.0



2. 藻胆体的吸收光谱 藻胆体的吸收光谱峰位于 618nm。完整藻胆体与不完整藻胆体在吸收峰位置方面无明显差别(图 2)。

3. 藻胆体的荧光发射光谱

(1) 室温荧光: 完整的藻胆体的荧光峰位于 678nm, 不完整的藻胆体的荧光峰位于 670nm(图 3)。这是由于在不完整的藻胆体中藻胆蛋白之间光能传递效率低, 有一部分光能没有最终地传给别藻蓝蛋白-B, 这一部分光能是以其他藻胆蛋白的荧光形式消耗掉了。因此长波长荧光(别藻蓝蛋白-B 荧光)强度相对减弱, 而短波长荧光增强, 从而使荧光峰的位置向短波长位移。

(2) 液氮温度荧光: 完整藻胆体的液氮温度(-196°C)荧光峰位于 686nm, 在 666nm

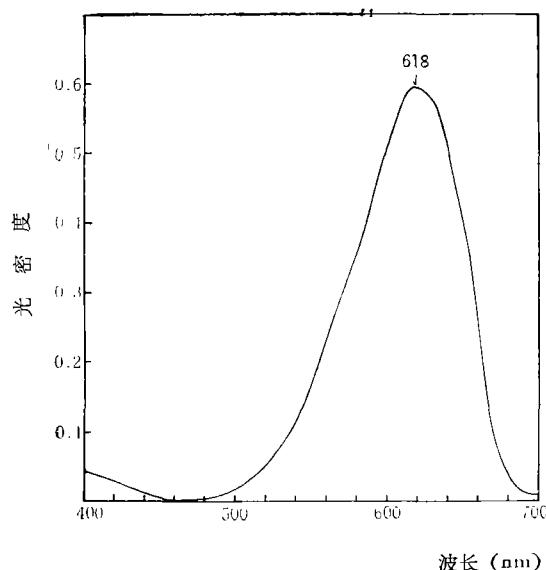
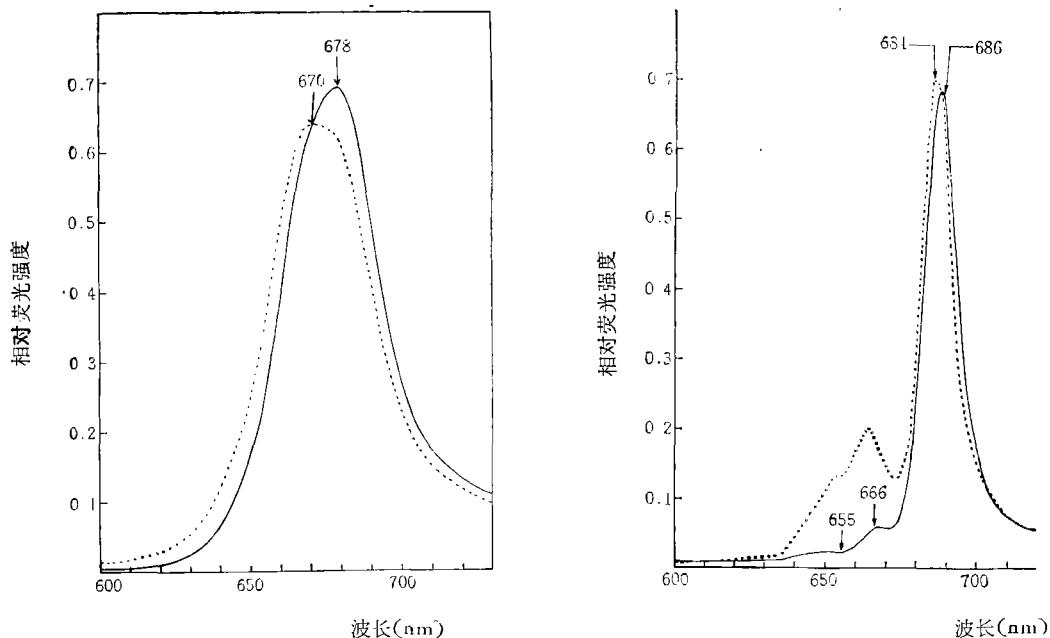


图 2 多变鱼腥藻藻胆体的吸收光谱

Fig. 2 The absorption spectrum of phycoobilisomes of *A. variabilis*.图 3 多变鱼腥藻藻胆体的室温荧光光谱
——完整藻胆体 -----不完整藻胆体Fig. 3 Room temperature fluorescence emission spectra of phycoobilisomes of *A. variabilis*.
— intact phycobilisomes;
····· non-intact phycobilisomes.图 4 多变鱼腥藻藻胆体的液氮温度(-196°C)荧光发射光谱
——完整藻胆体 -----不完整藻胆体Fig. 4 Liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectra of phycoobilisomes of *A. variabilis*.
— intact phycobilisomes,
····· non-intact phycobilisomes.

处有一小的荧光峰, 在 655nm 处荧光很弱。不完整藻胆体荧光峰位于 684nm, 在 666nm 有明显的荧光峰, 在 655nm 有一荧光发射肩(图 4)。

完整藻胆体与不完整藻胆体在长波长荧光 (686nm 荧光) 与短波长荧光 (655nm 和 666nm 荧光) 的相对强度比值方面有显著差别。完整藻胆体的 F_{686} 与 F_{666} 的比值为 12.0; F_{686} 与 F_{655} 的比值为 26.0。而不完整藻胆体此比值依次为 3.4 和 5.0 (表 2)。

表 2 F_{686} 与 F_{655} 和 F_{666} 相对荧光强度比

Table 2 The ratio of relative fluorescence intensity of F_{686} to F_{655} and F_{666} .

藻胆体类别	$\frac{F_{686}}{F_{666}}$	$\frac{F_{686}}{F_{655}}$
完整藻胆体	12.0	26.0
不完整藻胆体	3.4	5.0

注: F_{686} , F_{666} 和 F_{655} , 分别代表 686nm, 666nm 和 655nm 荧光。

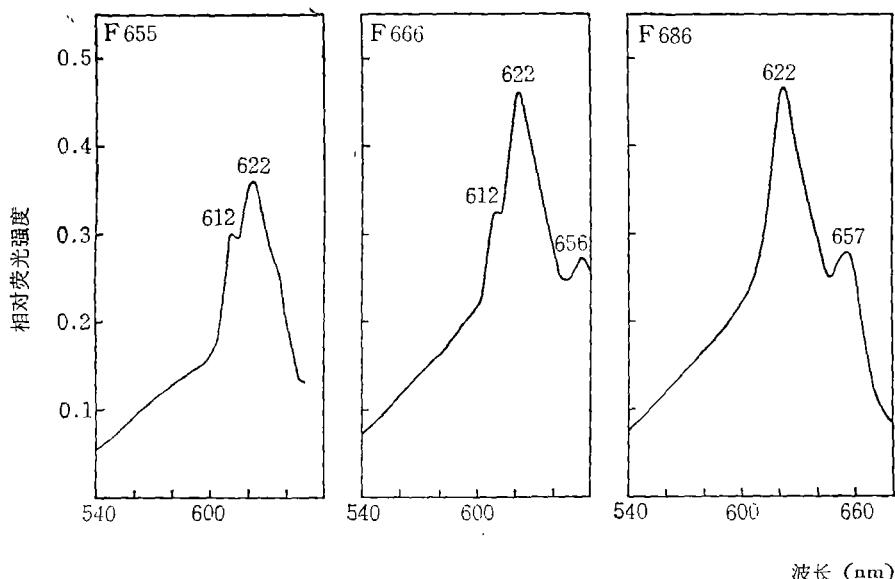


图 5 F_{655} , F_{666} 和 F_{686} 的液氮温度荧光的激发光谱

Fig. 5 Liquid nitrogen temperature fluorescence excitation spectra of F_{655} , F_{666} and F_{686} .

4. 藻胆体液氮温度荧光的激发光谱 我们进行了多变鱼腥藻藻胆体 F_{655} , F_{666} 和 F_{686} 的液氮温度荧光激发光谱的测定。 F_{655} 激发光谱峰位于 612nm 和 622nm; F_{666} 激发光谱峰位于 612nm, 622nm 和 656nm; F_{686} 的激发光谱峰位于 622nm 和 657nm(图 5)。

讨 论

多变鱼腥藻藻胆体在液氮温度(-196°C)下有三个荧光发射带, 分别命名为 F_{655} , F_{666}

和 F_{686} 。它们依次为 C-藻蓝蛋白, 别藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白-B 的荧光发射峰。在完整的藻胆体中, 藻红蓝蛋白, C-藻蓝蛋白, 别藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白-B 在无色蛋白作用下呈有序排列并紧密结合在一起, 能高效率地传递光能并把绝大部分已捕获的光能传递给别藻蓝蛋白-B。因此别藻蓝蛋白-B 相对荧光 (F_{686}) 强度高, 而其他藻胆蛋白相对荧光 (F_{655} 和 F_{666}) 强度低。 F_{686} 与 F_{655} 和 F_{666} 的相对荧光强度比值就大。不完整的藻胆体, 也就是部分解离的藻胆体, 在藻胆蛋白之间发生了结构上的解离, 不能很好地进行光能传递, 因此光能传递效率低, 只能将一部分光能传递至别藻蓝蛋白-B, 而其它光能便用于发射 C-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的荧光。因而 F_{686} 与 F_{655} 和 F_{666} 相对荧光强度比值就降低。

Gantt 提出完整藻胆体室温荧光峰位于 670—675nm, 液氮温度荧光峰位于 678—685 nm^[4]。根据我们实验结果表明, 多变鱼腥藻完整藻胆体室温荧光峰位于 678nm, 而当藻胆体荧光峰位于 670nm 时, 藻胆体已发生解离。藻胆体解离程度愈大, 室温荧光峰位置愈向短波长位移。

我们试验又进一步说明用液氮温度荧光峰的波长位置来判断多变鱼腥藻藻胆体的完整性是一个不灵敏的指标; 因为完整藻胆体与部分解离的不完整藻胆体的液氮温度荧光峰的波长位置没有显著差异。我们提出判断藻胆体完整性和解离程度的最灵敏指标是 F_{686} 与 F_{655} 和 F_{666} 的相对荧光强度比值。

在制备藻胆体时, 为了获得完整的藻胆体制品, 除了要注意藻体生长正常、新鲜以及超声波破碎细胞要适当和 Triton X-100 处理时间要恰当外, 尚需特别注意以下两点:

一是磷酸缓冲溶液浓度的选择: 藻胆体在 0.9M 磷酸缓冲溶液中很稳定, 而在低浓度磷酸缓冲溶液中则发生解离, 浓度愈低解离程度愈大, 解离速度也愈快。因此在制备藻胆体中, 以采用 0.9M 磷酸缓冲溶液为好。

二是温度选择: 除了超声波破碎细胞是在冰浴中进行以防止过热外, 其他操作是在室温中进行, 因为藻胆体在 20—25°C 下最稳定, 在低温中则易解离^[4]。这与制备叶绿体需在 4°C 下进行是不同的。

参 考 文 献

- [1] Allen M. B. and D. L. Arnon, 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. 1. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiol.*, **30**: 366—372.
- [2] Bryant D. A., Guglielmi, G., Tandeau de Marsac, N., Castets, A. and Cohen-Bazire, G., 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a Model. *Arch. Microbiol.*, **123**: 113—127.
- [3] Gantt E., Lipschultz, C. A., Grabowski, J., and B. Z. Zimmerman, 1979. Phycobilisomes from blue-green and red algae. Isolation criteria and Dissociation Characteristics. *Plant Physiol.*, **63**: 615—620.
- [4] Gantt E., 1980. Structure and function of phycobilisomes: Light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. *Int. Rev. Cyt.*, **66**: 45—80.
- [5] Gantt E., 1981. Phycobilisomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**: 327—347.
- [6] Gantt E. and C. A. Lipshultz, 1972. Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum* 1. Isolation. *J. Cell Biol.*, **54**: 313—324.
- [7] Gray B. H. and E. Gantt, 1955. Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green algae *Nostoc* sp. *Photochem. Photobiol.*, **21**: 121—128.

- [8] Mackinney G., 1941. Absorption of Light by Chlorophyll Solution. *J. Biol. Chem.* **140**: 315—324.
- [9] Marcoll R., 1982. Phycobilisome and phycobiliprotein. *Photochem. Photobiol.*, **35**: 899—904.
- [10] Nies, M. and W. Wehrmeyer, 1980. Isolation and biliprotein characterization of phycobilisomes from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Cohn. *Planta*, **150**: 330—337.
- [11] O'Carra P. and C. O'hEocha, 1976. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Acad. press, London, New York and San Francisco. 328—376.
- [12] Yamamaka, G. Glazer, A. N. and R. C. Williams, 1978. Cyanobacterial phycobilisomes. Characterization of the phycobilisomes of *Synechococcus* sp. 6301. *J. Biol. Chem.*, **253**: 8303—8310.

ISOLATION OF PHYCOBILISOMES OF *ANABAENA VARIABILIS* AND FLUORESCENCE IDENTIFICATION OF THEIR INTACTNESS AND DISSOCIATION

Lu Rongzhao and Yu Yanli

(Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract

Phycobilisomes were isolated from *Anabaena variabilis*. The cells were disrupted by sonication, treated with 2% Triton X-100 and ultracentrifuged on a sucrose step gradients. Isolation was carried out in 0.9 M Na-K-Phosphate buffer (pH 7.0) at 20°C. Phycobilisomes were recovered in the dark blue band.

There are three liquid nitrogen temperature fluorescence emission bands in phycobilisomes of *A. variabilis*. In intact phycobilisomes, the relative fluorescence of 686 nm was very high, those of 655 nm and 666 nm were low, the ratios of relative fluorescence of 686 nm to 655 nm was more than 20, and that of 686 nm to 666 nm was more than 10. In non-intact phycobilisomes, the relative fluorescence of 686 nm decreased, those of 655 nm and 666 nm increased. The room temperature fluorescence emission maximum of intact phycobilisomes was located around 678 nm, that of non-intact phycobilisomes was less than 673 nm.

We suggest that the main criteria to be used in assessing intact phycobilisomes of *A. variabilis* should be the fluorescence emission around 678 nm at room temperature and the ratios of relative fluorescence of 686 nm to 655 nm and 666 nm at liquid nitrogen temperature.

Liquid nitrogen temperature fluorescence excitation spectra of F_{655} , F_{666} and F_{686} were studied.