

# 一种海生超微型黄藻的色素蛋白复合体

胡晗华 戴玲芬 戴和平 张宪孔

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

**摘要:** 从海生超微型黄藻品系 PP983 中分离得到一种水溶性色素蛋白复合物, 其光学特性与普遍存在于甲藻叶绿体中的多甲藻素-叶绿素  $\alpha$  蛋白复合物(Peridinin Chlorophyll  $\alpha$  Protein Complexes, PCP)类似; 初步测得该色素蛋白复合体的分子量约为 154,200, 分子中多甲藻素、叶绿素  $a$ 、蛋白的摩尔比为 16:2:5。研究结果显示, PP983 中的 PCP 是作为聚光色素复合体存在于藻细胞的叶绿体中的。

**关键词:** 超微型藻; 黄藻; PCP; 聚光色素复合体

中图分类号: Q945.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)01-0055-004

类胡萝卜素(Carotenoid)是大多数藻类的重要光合色素, 在黄藻中主要包括硅甲藻黄素(Diadinoxanthin)、黄藻黄素(Heteroxanthin)和无隔藻黄素(Vaucherianthinester), 其中黄藻黄素被认为是黄藻的特征色素<sup>[1]</sup>。黄藻所含的叶绿素中, 除无隔藻属(*Vaucheria*)含有叶绿素  $a$  和叶绿素  $c$  外, 其他种类只含叶绿素  $a$ <sup>[2]</sup>。黄藻中最主要的光合作用辅助色素不如其他种类明确, 如蓝藻以藻胆蛋白作聚光色素复合体, 高等植物和绿藻以 chl  $a$ /chl  $b$  蛋白为聚光色素复合体, 而含 chl  $c$  的杂色藻则以 chl  $a$ /chl  $c$  蛋白为聚光色素复合体, 以及多数甲藻以 PCP 为聚光色素复合体等。

现在已知所有的聚光色素都是与蛋白结合的, 并围绕在 PS I 和 PS II 反应中心的附近。已经发现的许多聚光色素复合体中还有多种类型类胡萝卜素的存在<sup>[1]</sup>。所以对于仅含叶绿素  $a$  的黄藻来说, 以哪一种类胡萝卜素作为主要的辅助色素并形成相应的聚光色素复合体是一个有趣的问题。作者从一种超微型黄藻中得到了含多甲藻素的 PCP 复合体, 说明仅含叶绿素  $a$  的黄藻中类胡萝卜素与叶绿素  $a$  结合形成聚光色素复合体, 能量直接从类胡萝卜素传递至叶绿素  $a$ , 而无需以叶绿素  $c$  为中介。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 黄藻(Xanthophyta)为采自太平洋南部海

域的一种超微型藻, 品系 PP983; 培养条件参照胡晗华等的方法<sup>[3]</sup>。

**1.2 PCP 的分离及初步纯化** 参照 Haxo FT 等<sup>[4]</sup>, 略作修改。取 10L 对数后期的藻培养液, 经离心收集(3000r/min, 10min, 4℃)得到藻细胞; 重复三次用适量预冷(4℃)的 0.1mol/L pH8.4 的 Tris-HCl 缓冲液重悬藻细胞, 离心(10,800r/min, 20min, 5℃)后得到砖红色上清液; 沉淀再加入适量的 0.1mol/L pH8.4 的 Tris-HCl 缓冲液, 细胞经超声破碎后离心(10,800r/min, 20min, 5℃), 得到砖红色上清液, 重复一次, 合并两次上清液, 用 30% 及 45% 的硫酸铵分级沉淀得到蛋白并置于-20℃的冰箱中储存, 该步同时达到了初步纯化和浓缩体积的效果; 样品测定前于 4℃下对 2mmol/L pH8.4 的 Tris-HCl 缓冲液暗中透析脱盐, 然后用蔗糖浓缩; 得到的暗桔红色液体用于柱层析纯化。柱层析方法: Sephadex G-100, 层析柱 1.7cm×40cm, 平衡液为 1mmol/L pH8.4 的 Tris-HCl 缓冲液, 洗脱液为 5mmol/L pH8.4 的 Tris-HCl 缓冲液(含 0.2mol/L NaCl), 流速为 1.3mL/min, 通过分步收集器使每管收集 1mL, 用  $A_{478\text{nm}}$ :  $A_{280\text{nm}}$  检测; 同样用 Haxo FT 等的方法测定 PCP 的分子量。

**1.3 复合体中色素组成的分析方法** 层析后的蛋白溶液加入 100% 丙酮, 离心取上清液, 上清液加入等体积的去除过氧化物的乙醚, 再加入 10 倍体积的

10% 冷(4℃)NaCl 溶液, 混匀, 分相, 色素转入上层的乙醚层而丙酮及水溶性的杂质进入下层的水相, 通过离心除去乙醚层中含有的极少量水分, 并随之加入少量干燥的氯化钠, 使其完全无水。最后在乙醚提取液中充氩气浓缩样品, 用聚酰胺层析分离得到色素后剪下色素斑点用丙酮溶解, 用 UV-1601 分光光度计扫描 400—700nm 处的吸收光谱, 确定色素的种类。

**1.4 色素含量** 层析后的蛋白溶液测定其浓度后加入适量的 100% 丙酮, 最终浓度为 90% 的丙酮; 暗中抽提四次, 最后体积为 3mL, 离心得到的上清液在 722 光栅分光光度计上分别测定 469nm 及 664nm 处的 OD 值。叶绿素 *a* 和多甲藻素的含量(在 90% 的丙酮中) 分别根据下式计算<sup>[4]</sup>:  $C_{chl\ a} = A_{664\ nm} / (E_{664\ nm} \times L) = 11.41 A_{664\ nm} (\mu\text{g}/\text{mL})$ 、peridinin ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) =  $7.53 A_{469\ nm} - 0.124 A_{664\ nm}$ 。叶绿素 *a* (90% 丙酮):  $E_{664\ nm} = 876.7 (E_{1\text{cm}}^{1\%})$ , 分子量为 893.5; 多甲藻素 (90% 丙酮):  $E_{469\ nm} = 1330 (E_{1\text{cm}}^{1\%})$ , 分子量为 630.35。

**1.5 吸收光谱测定** 整细胞、层析后的色素蛋白溶液稀释液和层析后的蛋白溶液用丙酮沉淀离心得到的上清液用 UV-1601 分光光度计扫描 400—700nm 处的吸收光谱。

## 2 结果与讨论

粗提得到的砖红色上清液吸收光谱如图 1, 从图 1 可以看出该复合体在 444nm 和 685nm 处有高的吸收峰, 480nm 处有一肩峰, 推测是复合体中叶绿素 *a* 和一种叶黄素引起的。粗提物经 G-100 柱层析可得到两个明显的峰(图 2), 峰 1 为杂蛋白, 峰 2 为暗红色液体; 同时检测 478nm、280nm 和 418nm 的吸收峰, 其中蛋白吸收峰值高于多甲藻素的吸收峰值,  $A_{478}/A_{280}$  小于 1; 这一点与甲藻的 PCP 不同, 反映在两者的摩尔比值上也有差异。纯化得到的暗红色液体吸收光谱(图 3a)显示, 吸收峰为 458nm、482nm 和 670nm, 且在 300nm 处有最高吸收峰; 在 458nm、670nm 的最大吸收峰分别是 chl *a* 的 Soret 和 *a* 带, 482nm 处的吸收峰是多甲藻素造成的。因而复合体中含有 chl *a* 和多甲藻素两种色素。计算得到的 chl *a*: peridinin 为 8:1。经过柱层析测得该复合体的分子量为 154,200, 所以 peridinin: chl *a*: protein = 16:2:5。

从整细胞和纯化后的 PCP 吸收光谱(图 3b, 和 3a)对比中可以看出整细胞在 480—530nm 处的吸收峰主要是由多甲藻素造成的。根据 chl *a* 的吸收带

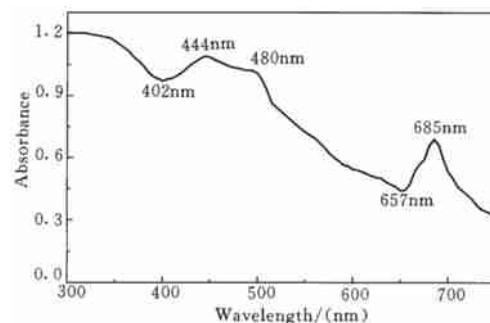


图 1 PCP 的粗提物在室温下的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of crude extracts of PCPs at room temperature in 5mmol/L Tris HCl buffer, pH8.4

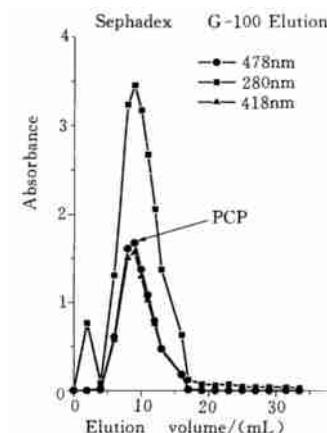


图 2 PCP 的洗脱曲线

Fig. 2 Gel filtration of an extract of PP983 on column of Sephadex G-100 with 5mmol/L Tris HCl buffer, pH8.4

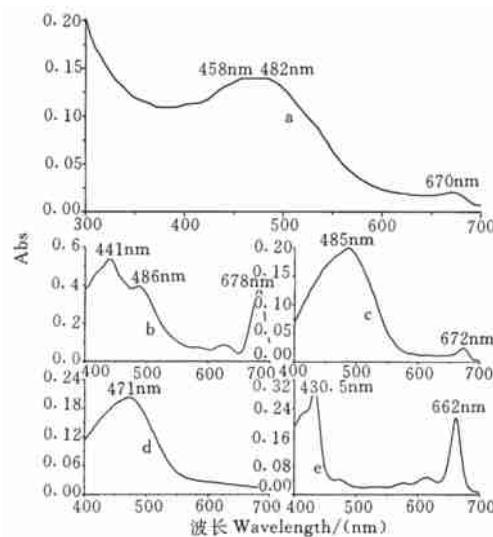


图 3 整细胞和纯化后的 PCP 及其组分在室温下的吸收光谱

Fig. 3 Absorption spectra of preparative fractions from PP983 at room temperature: a, purified PCP in 5mmol/L Tris pH8.4; b, whole cells in medium; c, extracted PCP chromophore in 90% acetone; d, peridinin isolated from PCP chromophore by TLC in 100% acetone; e, chlorophyll *a* isolated from PCP chromophore by TLC in 100% acetone

位置 670nm 改变不大的结果可以判断分离后的 PCP 仍保持其天然状态下的光谱特性。用有机溶剂(如丙酮, 加入丙酮后溶液颜色变为米黄色)很容易将 PCP 的发色团抽提出来(图 3c); 这说明发色团与蛋白是非共价结合的。通过薄层层析所分离发色团中的两种色素的光谱分析也表明分别为 chl *a*(图 3e) 和多甲藻素(图 3d)。

总之, 本文得到的 PCP 虽然与以前在甲藻中报道的 PCP 有相似的组成, 但它们之间仍存在许多差异。主要是 PP983 藻在靠近 300nm 处有最高的吸收峰, 而甲藻则在 476nm 处有最高的吸收峰; 复合体中色素与蛋白的摩尔比也与甲藻不同, 报道的甲藻 peridinin chl *a*: protein 一般接近 9: 2: 1 或 4: 1: 1 而本文为 16: 2: 5; 本文中 PCP 的分子量远大于甲藻的 PCP(一般为 34,500—39,200)<sup>[5]</sup>, 这可能是由于两种藻类的亲源关系较远之故。

### 3 小结

由于黄藻中多数种类仅含 chl *a*, 而不含其他如 chl *b*、chl *c* 或藻胆素等重要的光合作用辅助色素, 因而认为其光合辅助色素主要应该是类胡萝卜素类。色素分析的结果<sup>[6]</sup>显示该藻含有一种在黄藻门中未曾报道过的, 仅在甲藻中(尽管偶尔在其他藻类中也有报道, 然而该色素对于甲藻似乎具有专一特性)含有的多甲藻素(Peridinin)。已知多甲藻素与叶绿素 *b*、褐藻素(Fucoxanthin)、管藻黄素(Siphonaxanthin)等常常作为辅助色素与蛋白结合在一起形成光系统 I 的聚光色素复合体(LHCl)。其中由多甲藻素形成的 PCP 复合体广泛存在于甲藻中, 自 Haidak 等首次报道这一复合体后<sup>[7]</sup>, 许多人对其光学特性、分子组成及拓扑结构、光合作用功能、光适应生理学、调节机理等方面进行了详细的研究<sup>[4,5,8,10]</sup>, 认为 PCP 作为一种主要的聚光色素复合体, 在光适应中起着重要的调节作用。

对黄藻的聚光色素复合体的研究进行得较少, 再加上黄藻的色素特点, 所以不含叶绿素 *c* 的黄藻中哪一种类胡萝卜素是主要的辅助色素尚不清楚。本文

结果初步显示, 虽然多甲藻素不是黄藻的主要色素, 但在该藻中, 它却作为一种辅助色素, 并存在于一种水溶性的聚光色素复合体中, 易于提取。这为黄藻聚光色素复合体的研究提供了一个好的材料。

### 参考文献:

- [1] Rowan K S. Photosynthetic pigments of algae[M]. New York: Cambridge University Press, 1989. 124, 212—225
- [2] Lee R E. Phycology (2nd)[M]. New York: Cambridge University Press, 1989. 516
- [3] Hu H H, Dai L F, Dai H P, et al. Amino acid and fatty acid composition of a marine species of Xanthophyceae. Chin. J. Appl. Environ. Biol. 1999, 5(5): 487—491. [胡晗华, 戴玲芬, 戴和平, 等. 一种海生黄藻的氨基酸和脂肪酸组成. 应用与环境生物学报, 1999, 5(5): 487—491]
- [4] Haxo F T, Kycia J H, Somers G F, et al. Peridinin chlorophyll *a* proteins of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* (Plymouth 450) [J]. Plant physiol., 1976, 57: 297—303
- [5] Song P S, Koka P, Pézelin B B, et al. Molecular topography of the photosynthetic light harvesting pigment complex, peridinin chlorophyll *a* protein, from marine dinoflagellates [J]. Biochemistry, 1976, 15(20): 4422—4427
- [6] Hu H H, Dai L F, Dai H P, et al. Occurrence of Peridinin in a Marine Species of Xanthophyta. Oceanologia et Limnologia Sinica. 2001, 32(5): 489—493. [胡晗华, 戴玲芬, 戴和平, 等. 多甲藻素在一种海生黄藻中的存在. 海洋与湖沼, 2001, 32(5): 489—493]
- [7] Haidak D J, Mathews C K, Sweeney B M. Pigment protein complex from *Gonyaulax* [J]. Science, 1966, 156: 212—213
- [8] Roman S J, Govind N S, Triplett E L, et al. Light regulation of peridinin chlorophyll *a* protein (PCP) complexes in the dinoflagellate, *Glenodinium* sp[J]. Plant Physiol., 1988, 88: 594—599
- [9] Jovine R V M, Triplett E L, Nelson N B, et al. Quantification of chromophore pigments, apoprotein abundance and isoelectric variants of peridinin chlorophyll *a* protein complexes (PCPs) in the dinoflagellate *Heterocapsa pygmaea* grown under variable light conditions [J]. Plant Cell Physiol., 1992, 33(6): 733—741
- [10] Ten Lohuis M R, Miller D J. Light regulated transcription of genes encoding peridinin chlorophyll *a* proteins and the major intrinsic light harvesting complex proteins in the dinoflagellate *Amphidinium carterae* Hulbert (Dinophyceae): Changes in cytosine methylation accompany photoadaptation [J]. Plant physiol. 1998, 117: 189—196

## PIGMENT PROTEIN COMPLEXES IN A MARINE SPECIES OF XANTHOPHYTA

HU Han-hua, DAI Ling-fen, DAI He-ping and ZHANG Xian-kong

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**Abstract:** A water-soluble photosynthetic light-harvesting complex was being isolated from a marine picoalga strain PP983 of Xanthophyta, grown under mass culture conditions. A crude preparation of this complex was obtained as a brick red supernatant by sonication of a whole cell suspension in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  Tris buffer pH8.4 followed by high speed centrifugation. The extract was purified by 30% and 45%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation and Sephadex G-100 chromatography. The pigment-protein complex is characterized by its absorption spectrum having main absorption maxima at 458nm, 482nm and 670nm, and another maximum at approximately 300 nm by using a SHIMADZU UV-1601 spectrophotometer to scan room spectra ranging from 300 to 750nm. The results of absorption spectra showed that the complex have the characteristics of the peridinin-chlorophyll  $\alpha$  protein complex (PCP) of dinoflagellates. Chromophore analysis, by spectral analysis of extracts and polyamide thin layer chromatography confirmed the presence of peridinin and chlorophyll  $\alpha$  in the complex. Therefore, the peak at 458nm and 670 nm corresponds to Soret band and  $\alpha$  band of chlorophyll  $\alpha$  respectively, and the maximum at 482 nm is due to peridinin present in the complex. The chromoprotein has a molecular weight of about 154,200 and shows that a peridinin:chlorophyll  $\alpha$ :protein ratio is close to 16:2:5 according to spectrophotometric analyses of chromophore content. The result indicated that the peridinin-chlorophyll  $\alpha$ -protein complex presumably functions *in vivo* as photosynthetic light-harvesting pigments.

**Key words:** picoalga; Xanthophyta; Peridinin-chlorophyll  $\alpha$  protein complex (PCP); Light-harvesting complex (LHC)