

钝顶螺旋藻藻胆体的简易制备及褐藻酸钠对其稳定性的保护作用*

张玉忠^① 周百成 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 以钝顶螺旋藻为材料,用改进的简易方法分离得到完整藻胆体,室温最大荧光发射峰位于 681 nm,加水解离后最大荧光发射峰蓝移到 655 nm, F680 有两个峰,分别位于 638 nm 和 650 nm,从而表明藻胆体是完整的。用 436 nm 波长激发,没有出现 Chl a 的特征荧光峰, F720 的荧光激发光谱,也没有出现 Chl a 的峰,表明藻胆体溶液中不含 Chl a。在藻胆体溶液中加入 1 % 的褐藻酸钠,室温下保存 15 d 后,光谱特性没有变化,藻胆体依然完整,表明褐藻酸钠对藻胆体的稳定性具有保护作用,可以延长完整藻胆体的保存时间,并对其可能的机理进行了讨论。

关键词 钝顶螺旋藻,藻胆体,荧光,褐藻酸钠

* ① 藻胆体是红藻和蓝藻的主要光能捕获器,由于其结构的独特性,因此在光合生物进化中占有极其重要的地位。Gantt 等^[1]在 1972 年首先从红藻 *Porphyridium cruentum* 中分离出完整藻胆体。此后许多人对分

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告 2887 号。
① 现在通讯地址: 山东大学生命科学学院微生物研究所, 济南, 250100。
收稿日期: 1996 年 12 月 2 日

离方法进行了改进^[3,5,6,7]。但这些方法基本类似,并且操作繁锁,对设备要求严格,并且分离得到的藻胆体不稳定,从而大大限制了对各种不同来源的藻胆体进行大量研究。目前为止,仅对为数很少的几种在实验室内培养的藻类的藻胆体进行了研究,据此提出了4种不同的藻胆体类型^[4]。从蓝藻到红藻的进化过程中藻胆体的结构是如何变化的,到目前为止还知之甚少,而对这些问题的澄清需对多种不同进化类型的藻类的藻胆体进行大量研究。为此,需要找到一种快速简便地分离制备藻胆体的方法,并且寻找能在较长的时间内保持其完整性的途径。作者以钝顶螺旋藻为材料,对藻胆体的分离方法进行了改进,并对完整藻胆体的长期保存进行了初步探讨。

1 材料和方法

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)培养在3 000 m l

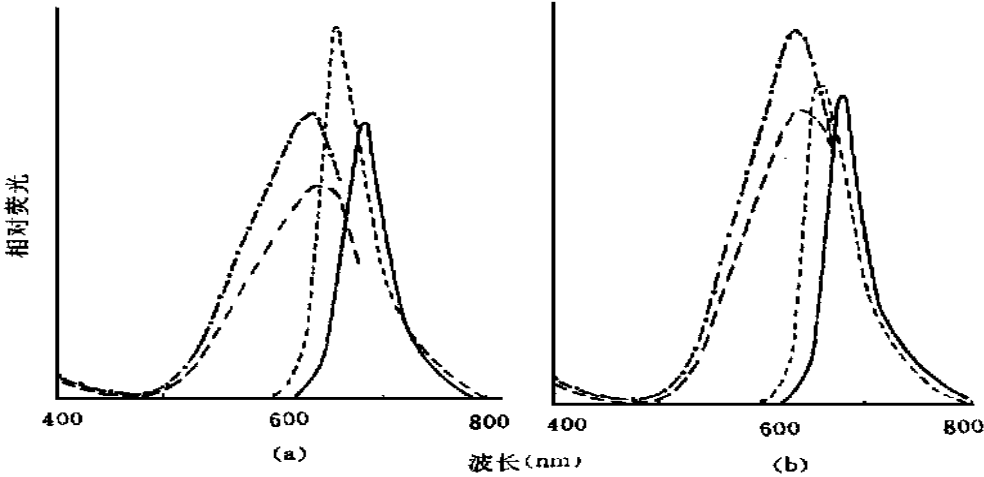


图2 钝顶螺旋藻藻胆体的室温荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectrum of phycobilisomes in *S. platensis* at room temperature

荧光发射光谱

(a) Ex580——完整藻胆体;-----解离藻胆体;(b) Ex436——完整藻胆体;-----解离藻胆体
荧光激发光谱

(a)——完整藻胆体(F680);-·-·-解离藻胆体(F655);

(b)——完整藻胆体(F720);-·-·-解离藻胆体(F720)

锥形瓶中,置于光照培养箱中,用白炽灯照光,光强 $50 \mu E/m^2 \cdot s$,温度 $30 \pm 2^\circ C$ 。培养7~8 d,于对数生长期收集藻体,用于分离藻胆体。藻胆体的吸收光谱用岛津UV-240紫外可见分光光度计测定,荧光光谱用日立850荧光分光光度计测定,带宽5 nm。

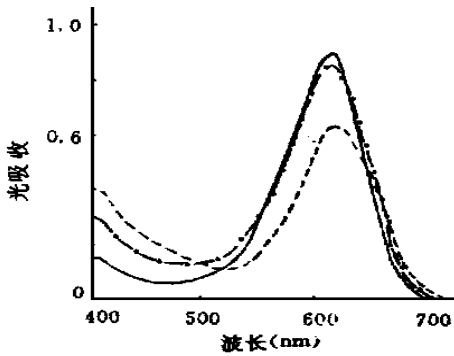


图1 钝顶螺旋藻藻胆体的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of phycobilisomes in *Spirulina platensis*

——室温保存;-·-·-加水解离;
-----加1%褐藻酸钠

2 结果与讨论

2.1 完整藻胆体的简易制备及完整性鉴定

钝顶螺旋藻鲜藻体0.70 g,用1 mol/L NaH_2PO_4 -K 缓冲液(pH 7.0)15 m l悬浮,在冰浴中用4710系列

50-Watt Model 超声破碎器破碎 5 次, 每次 2 m in, 间隔 3 m in, 破碎时的输出功率为 12 W, 然后加 Triton X-100 至上述溶液中, 终浓度为 2 %, 室温下搅拌 30 m in,

然后用 LD 5-2A 型离心机 4 000 rpm 离心 10 m in, 取中部上清液用 LG15-W 型高速台式离心机 13 000 rpm 离心 10 m in, 再次取中部上清液用 LG15-W 型高速离心机 13 000 rpm 离心 10 m in, 收集中部上清液做光谱检测。将藻胆体提取液分成三部分: 一部分室温 (21~23 ℃) 下保存; 一部分用重蒸水稀释两倍, 使其在低离子强度下解离; 第三部分加入褐藻酸钠至终浓度为 1 %, 室温下保存。

图 1 是螺旋藻藻胆体的吸收光谱。吸收光谱峰位于 615 nm, 在 650 nm 处有一肩峰, 这说明藻胆体溶液中同时有 C-PC 和 APC, 但没有 Chla 的特征吸收峰, 说明藻胆体溶液中不含有 Chla。加水解离后, 峰值红移到 620 nm; 加入褐藻酸钠后, 峰值没有变化。

用 580 nm 波长的光激发, 螺旋藻藻胆体室温荧光发射峰位于 681 nm (图 2a), 这与文献报道的一致^[2]。用 436 nm 波长激发, 荧光发射光谱与 580 nm 激发时相同, 没有出现 Chla 的特征荧光峰, 证明藻胆体溶液中不含有 Chla(图 2b)。螺旋藻藻胆体的荧光激发

光谱表明, F680 有两个峰, 分别位于 638 nm 和 650 nm, 前者是 C-藻蓝蛋白的峰, 后者是异藻蓝蛋白的峰。F720 的荧光激发光谱与 F680 相似, 没有出现 Chla 的峰, 进一步证实分离得到的藻胆体中不含有 Chla, 并且初步断定藻胆体是完整的。

将藻胆体用蒸馏水稀释 2 倍, 室温下解离 24 h, 然后测定荧光光谱(图 2)。解离后, 藻胆体的荧光发射峰蓝移至 655 nm (Ex580), F655 激发光谱只在 638 nm 处出现一个峰值, 即 C-藻蓝蛋白的峰, 异藻蓝蛋白 650 nm 的峰消失, 说明能量已不能从 C-藻蓝蛋白传至异藻蓝蛋白。解离实验也证实用上述快速简便的方法制备的藻胆体是完整的。

本文在前人工作的基础上, 对分离方法进行了改进, 省去蔗糖密度梯度超速离心, 用常规离心方法 30 m in 即可分离得到了不含 Chla 的完整藻胆体, 从而大大简化了完整藻胆体的制备方法。用这种简易方法可对不同进化类型、不同生态类型的多种藻类的藻胆体进行快速制备, 为藻胆体的结构、功能与进化的研究奠定了方法学基础。

2.2 褐藻酸钠对螺旋藻藻胆体完整性的保护作用

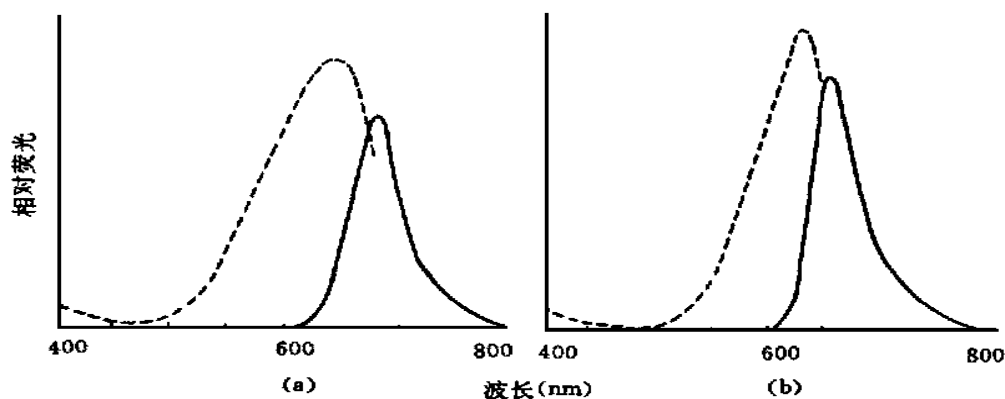


图 3 藻胆体溶液中加入 1 % 褐藻酸钠后室温荧光光谱的室温荧光光谱

(a) 完整藻胆体室温保存 15 d; (b) 室温保存 15 d 后再加水解离

荧光发射光谱——(a) Ex580; (b) Ex580

荧光激发光谱----(a) F680; (b) F655

Fig. 3 Fluorescence spectrum of phycobilisomes in 1% sodium alginate buffer solution at room temperature

在分离的藻胆体样品中加入 1 % 褐藻酸钠, 然后在室温下贮存, 蓝色的藻胆体沉降在试管的底部, 上清液澄清。保存 15 d 后依然如此, 上清液中没有出现白色的絮状物。相反, 未加入褐藻酸钠的藻胆体样品在室温下保存 15 d 后, 溶液中出现了大量的白色絮状

物, 表明藻胆蛋白已经变性。图 3a 在室温下保存 15 d 后的荧光光谱。从中可以看出, 加入 1 % 褐藻酸钠的样品室温保存 15 d 后, 荧光发射光谱及荧光激发光谱与刚分离的藻胆体相比基本上没有变化, 荧光发射峰在 680 nm, F680 的两个激发峰分别位于 538 nm 和

650 nm。在上述样品中加入重蒸水,使藻胆体解离,荧光发射峰蓝移至 655 nm, F655 荧光激发峰只有 638 nm, 650 nm 的峰消失(图 3b),从而证实加入褐藻酸钠贮存的藻胆体是完整的。

分离之后的藻胆体在 0~4℃ 下最不稳定, 20~25℃ 比较稳定,然而即使在室温下藻胆体也很难长时间保存^[8]。本文结果表明,加入 1% 褐藻酸钠的藻胆体在室温下保存 15 d 后,藻胆体依然完整(藻胆体在室温下保存如此长的时间尚未见报道),表明褐藻胶对藻胆体完整性具有一定的保护作用。其机制可能是褐藻酸钠吸附于藻胆体的周围,使藻胆体免受溶液中水分子的作用;同时褐藻酸钠本身也能够吸附大量水分子,使得藻胆体溶液中水分子的活度降低,从而阻止藻胆体的解离。此外,褐藻酸钠对藻胆蛋白分子本身也可能具有保护作用,使其保持天然状态,因此,在藻胆体的分离液中,加入一定浓度的褐藻酸钠,可以延长完整保存藻胆体的保存时间,这将有助于深入研究藻胆体的结构与功能。

参考文献

- [1] Gantt, E. and Lipschultz C. A., 1972. *J. cell biol.* 54: 313-324.
- [2] Gantt, E. Lipschultz C. A., 1979. *Plant Physiol.* 63: 615-620.
- [3] Glazer, A. N. *et al.*, 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 6162-6165.
- [4] Glazer, A. N., 1984. *Biochim Biophys. Acta* 768: 29-51.
- [5] Koller, K. P., *et al.*, 1977. *Arch. Microbiol.* 112: 61-66.
- [6] Rigbi, M. *et al.*, 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 1961-1966.
- [7] Rosinski, J., *et al.*, 1981. *Ann. Bot.*, 47: 1-12.
- [8] Rowan, K. S., 1989. *Photosynthetic pigments of Gae*, Cambridge University Press, 167.

ISOLATION OF PHYCOBILLSMES IN *Spirulina platensis* WITH A SIMPLE METHOD AND ROLE OF SODIUM ALGinate IN PROTECTION OF PHYCOBILISOME STABILITY

Zhang Yuzhong, Zhou Baicheng and Tseng C. K.

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Dec. 2, 1996

Key Words: *Spirulina platensis*, Phycobilisomes, Fluorescence, Sodium alginate

Abstract

The phycobilisomes in *Spirulina platensis* were isolated with a simple method, the maximum fluorescence emission of the phycobilisomes at room temperature was at 681 nm, 655 nm after dissociation in water, which indicated that the isolated phycobilisomes were intact. Moreover, there was no Chla in the phycobilisome solution. When 1% sodium alginate was added into the phycobilisome solution and was stored for 15 days at room temperature, there were no changes in the fluorescence spectra, which suggested that the phycobilisomes still kept intact. The results showed that 1% sodium alginate in the phycobilisome solution was helpful to prevent phycobilisome dissociation, and the mechanism was also discussed.