

钝顶螺旋藻藻胆体的稳定性研究

张熙颖¹, 刘鲁宁¹, 陈秀兰¹, 张玉忠¹, 周百成^{1, 2}

(1. 山东大学 生命科学学院微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 根据室温荧光发射光谱表征, 研究了藻胆蛋白浓度、离子强度、pH 和葡聚糖等因素对钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 藻胆体的稳定性的影响。藻胆蛋白浓度为 0.6~1.2 g/L 时, 钝顶螺旋藻藻胆体的室温荧光发射峰在 676~681 nm 之间, 此时藻胆体的稳定性强, 不易解离。在低离子强度 (<0.75 mol/L) 条件下, 钝顶螺旋藻藻胆体易解离, 解离速度随离子强度的递减而加快。钝顶螺旋藻藻胆体在 pH 7 时稳定, 而在 pH 5, 6, 8, 9 时只有轻微解离, 表明藻胆体在较宽的 pH 范围内保持相对稳定。在钝顶螺旋藻藻胆体溶液中加入 10% 的葡聚糖, 保存 30 d 后藻胆体依然保持完整, 说明葡聚糖对藻胆体的稳定性有保护作用。

关键词: 钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*); 藻胆体; 荧光谱; 稳定性

中图分类号: Q586 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2004)08-0038-05

藻胆体是蓝藻和红藻的捕光器, 其主要功能是捕获光能并高效地传递给光系统 II, 推动光合作用的进行^[1]。钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 是一种重要的经济蓝藻, 它的藻胆体主要由 C-藻蓝蛋白、异藻蓝蛋白及连接蛋白构成, 呈典型的半圆盘 (hemidiscoidal) 状结构, 但扫描隧道显微镜观察的结果表明, 钝顶螺旋藻藻胆体的杆是放射状的^[2]。在螺旋藻藻胆体的内部, 能量传递的顺序是: C-藻蓝蛋白-异藻蓝蛋白-核膜连接蛋白 (Lcm) 或 a^{AP-B}^[3]。组成藻胆体的各种蛋白主要靠疏水作用相互维系, 在离体条件下易解离, 因而保证藻胆体的结构完整对于研究藻胆体结构、功能及其应用具有重要的意义^[4]。基于此, 作者针对藻胆蛋白浓度、离子强度和 pH 等多种因素, 对钝顶螺旋藻藻胆体的稳定性进行了研究, 同时也考察了多糖对钝顶螺旋藻藻胆体的稳定性的影响, 为钝顶螺旋藻藻胆体的提取、保存和利用提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 培养条件

钝顶螺旋藻用 3~4 L Zarrouk 培养基培养在 5 L 透明玻璃瓶中, 通气, 白炽灯照光 (光强 2 500 lx), 温度 30℃ ± 2℃。培养 7~10 d, 于对数生长期收集藻体,

用于分离藻胆体。

1.2 藻胆体的分离

据文献 [5], 以蔗糖密度梯度高速离心的方法制备钝顶螺旋藻藻胆体。离心完毕后, 取出蔗糖密度为 1 mol/L 层的蓝色藻胆体液, 对 1 mol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液 (pH 6.98, 含 1 mmol/L EDTA 和 0.2% NaN₃) 透析过夜去除蔗糖。

1.3 藻胆蛋白浓度的计算

测定藻胆体溶液在 615 nm 及 652 nm 光吸收值, 根据 Bennett 和 Bogorad^[6] 的公式计算藻胆蛋白浓度。

1.4 藻胆体溶液 pH 调节

用 6 mol/L HCl 和 5 mol/L NaOH 以 Thermo O-

收稿日期: 2004-02-05; 修回日期: 2004-05-29

基金项目: 国家高技术研究与发展计划 (863 计划) 项目 (2002AA302213) 和山东省科技发展计划项目 (031070113)

作者简介: 张熙颖 (1973-), 男, 山东章丘人, 博士, 主要从事藻胆蛋白及藻胆体的结构功能研究, E-mail: zxy-ma1@yahoo.com.cn; 张玉忠, 通讯联系人, E-mail: zhangyz@sdu.edu.cn

tion 868 型 pH 计监测, 分别调节藻胆体溶液的 pH 达到 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 10.5 和 11。

1.5 葡聚糖对藻胆体稳定性的影响

准确称量葡聚糖 (相对分子质量为 20 000, 国产), 加入到藻胆体溶液中溶解, 使终浓度达 10%, 20℃ 保存, 于不同保存时间测定藻胆体的荧光光谱。

1.6 光谱测定

吸收光谱用岛津 UV-3100 紫外可见分光光度计测定。荧光光谱用日立 F-4500 荧光分光光度计测定, 激发波长为 580 nm, 狭缝宽度为 5 nm, 扫描速度为 1 200 nm/min。

2 结果与分析

2.1 蛋白浓度对藻胆体稳定性的影响

以 1 mol/L Na₂HPO₄ - KH₂PO₄ 缓冲液稀释钝顶螺旋藻藻胆体溶液, 得到不同藻胆蛋白浓度的藻胆体溶液。在较高蛋白浓度范围 (≥0.4 g/L) 内, 钝顶螺旋藻藻胆体的室温荧光发射峰在 670~683 nm 之间 (图 1, 表 1), 说明藻胆体是完整的, 此时藻胆体发射能量末端受体 Lcm 或 a^{AP-B} 的荧光。在此浓度范围内, 随蛋白浓度的增加, 峰位置红移, 峰型愈加尖锐, 半带宽愈窄 (图 1), 表明藻胆体内部结合愈加紧密, 能量可以更高效地传递给末端受体。

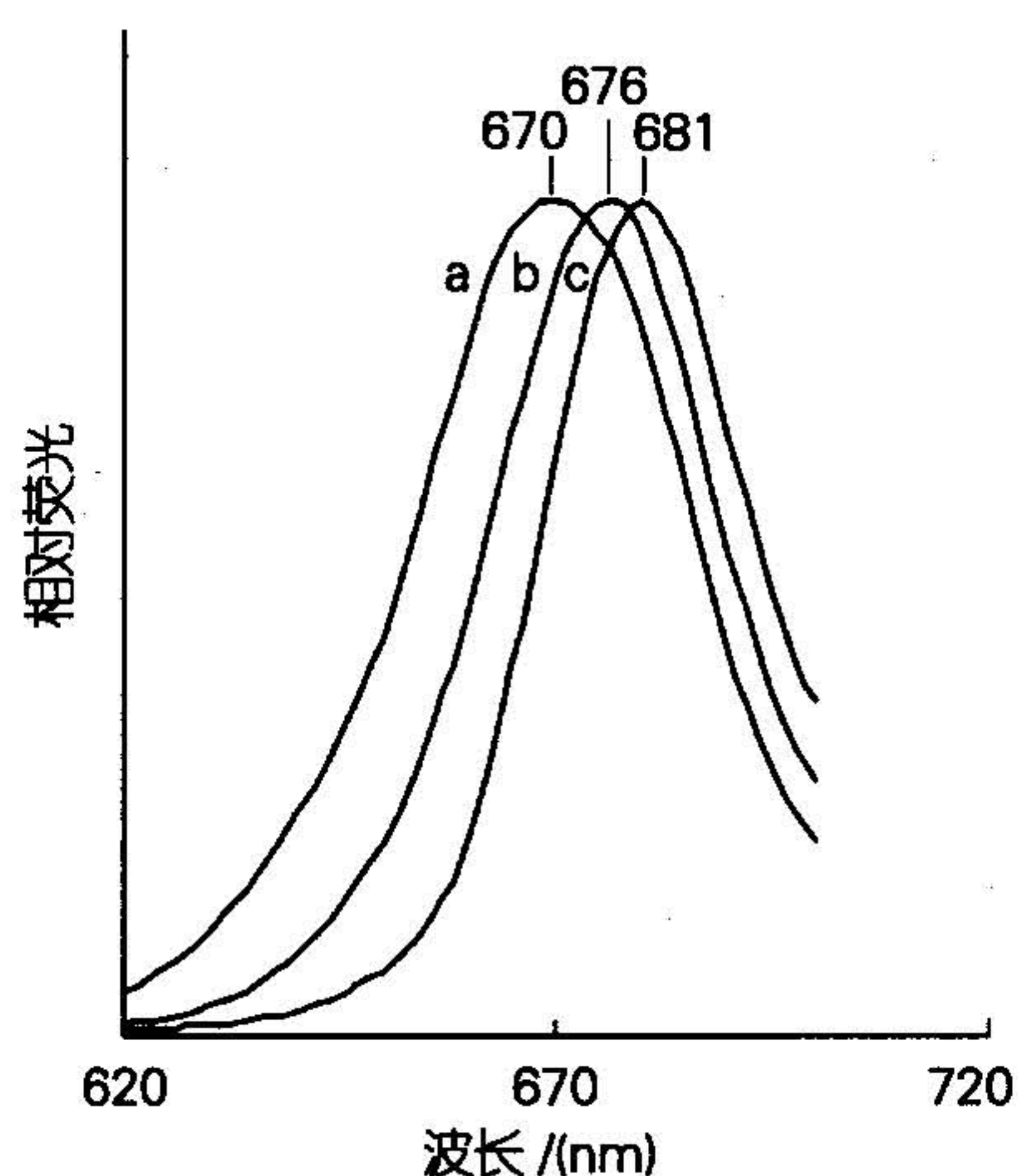


图 1 不同藻胆蛋白浓度藻胆体溶液的室温荧光发射光谱
a: 0.4 g/L, b: 0.6 g/L, c: 1.2 g/L

Fig. 1 The room temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes with different phycobiliprotein concentration

不同浓度的藻胆体在 20℃ 保存不同时间其室温荧光发射峰的位置变化见表 1。由表 1 可以看出, 在藻胆蛋白浓度低于 0.5 g/L 时, 藻胆体的室温荧光发射峰随蛋白浓度的降低逐渐蓝移至 660 nm 左右, 表现为异藻蓝蛋白的荧光, 说明能量末端受体 a^{AP-B} 或 Lcm 已经解离, 但在 C-藻蓝蛋白与异藻蓝蛋白间存在着能量的传递, 此时的藻胆体可以认为是相对完整的。但随着保存时间的延长, 这种相对完整的藻胆体的荧光发射峰在短时间内即可蓝移至 650 nm 左右, 表现为 C-藻蓝蛋白的荧光, 此时藻胆体已经解离, 藻胆体内部 C-藻蓝蛋白至异藻蓝蛋白间的能量传递被完全阻断。藻胆体溶液蛋白浓度越低, 其荧光发射峰蓝移的速度越快 (表 1), 而高浓度的藻胆体溶液其发射峰位置变化小, 说明它的稳定性好, 即使在较长的保存时间内依然可以维持完整的结构。这表明蛋白浓度是影响藻胆体稳定性的因素之一, 蛋白浓度越高, 藻胆体越稳定。但是蛋白浓度过高可引发荧光淬灭效应, 使得藻胆体的荧光强度大大减弱, 故本文采用 0.6 g/L 藻胆蛋白浓度的藻胆体作为完整藻胆体的标准, 此时藻胆体的室温荧光发射峰位于 676 nm。

表 1 不同藻胆蛋白浓度藻胆体溶液 20℃ 保存不同时间的室温荧光发射峰

Tab. 1 The room temperature fluorescence emission maxima of phycobilisomes with various phycobiliprotein concentrations stored different times under 20℃

浓度 (g/L)	室温荧光发射峰 (nm)						
	1 h	24 h	3 d	7 d	10 d	15 d	20 d
1.2	681	681	681	679	678	678	678
0.6	676	676	676	674	673	673	671
0.5	673	673	673	671	671	669	667
0.1	666	666	666	664	664	657	652
0.03	662	661	659	658	653	644	644
0.003	661	658	649	646	644	644	644

2.2 离子强度对藻胆体稳定性的影响

取在 1 mol/L Na₂HPO₄ - KH₂PO₄ 缓冲液的钝顶螺旋藻藻胆体 (0.6 g/L), 用去离子水稀释, 使磷酸缓冲液的浓度分别为 0.1, 0.125, 0.25,

0.5, 0.75 mol/L, 分别于不同的处理时间测定上述缓冲液浓度下的藻胆体的室温荧光发射光谱。

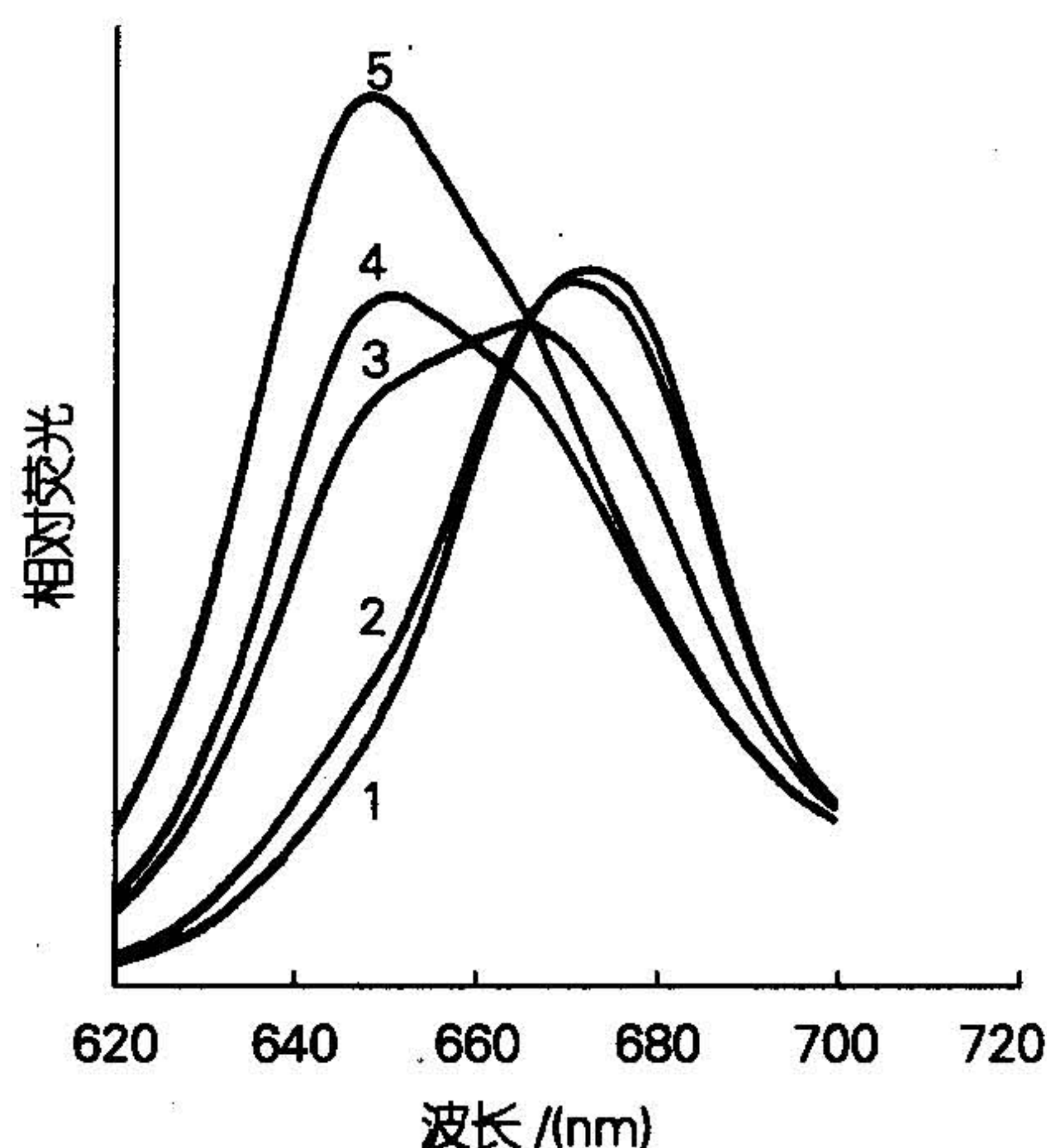


图2 藻胆体在不同浓度的磷酸缓冲液中处理 1 h 的室温荧光发射光谱

Fig.2 The room temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes treated in various concentrations of phosphate buffer for 1 hour

曲线 1~5 的磷酸缓冲液浓度分别为: 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1 mol/L

the concentration of curve 1~5 was 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1 mol/L, respectively

图 2 是藻胆体在不同浓度的磷酸缓冲液中处理 1 h 后的室温荧光发射光谱。图 2 显示随磷酸缓冲液浓度的减小, 藻胆体的室温荧光发射峰逐渐蓝移。在此过程中, 随离子强度的减小, 藻胆体荧光发射主峰由 676 nm 渐变为 665 nm, 而 650 nm 肩峰随之出现, 半带宽也明显加宽(曲线 3), 接着 665 nm 主峰演变为肩峰, 650 nm 成为主峰(曲线 4, 5)。荧光发射峰位置的变迁, 反映了能量末端受体与藻胆体间的解离及 C-藻蓝蛋白与异藻蓝蛋白间的解离这两种过程。由曲线的变化趋势看, 这两种解离可能同时进行, 但由于能量末端受体的数量少, 表观上能量末端受体与藻胆体间的解离对离子强度更为敏感。可由 $V = F_{676 \text{ nm}} / F_{650 \text{ nm}}$ 反映藻胆体的解离程度, V 值越大, 藻胆体越完整, V 值越小, 藻胆体的解离程度越大。在不同浓度磷酸缓冲液中藻胆 V 值随处理时间的变化趋势见图 3。由图 3 可以看出, 离子强度越小, V 值降低的速度和幅度越大, 说明藻胆体越不稳定。而在 0.75 mol/L 的磷酸缓冲液中的藻胆体, 其 V 值在所考查的时间

内几乎没有变化, 表明藻胆体在此条件下的稳定性好。

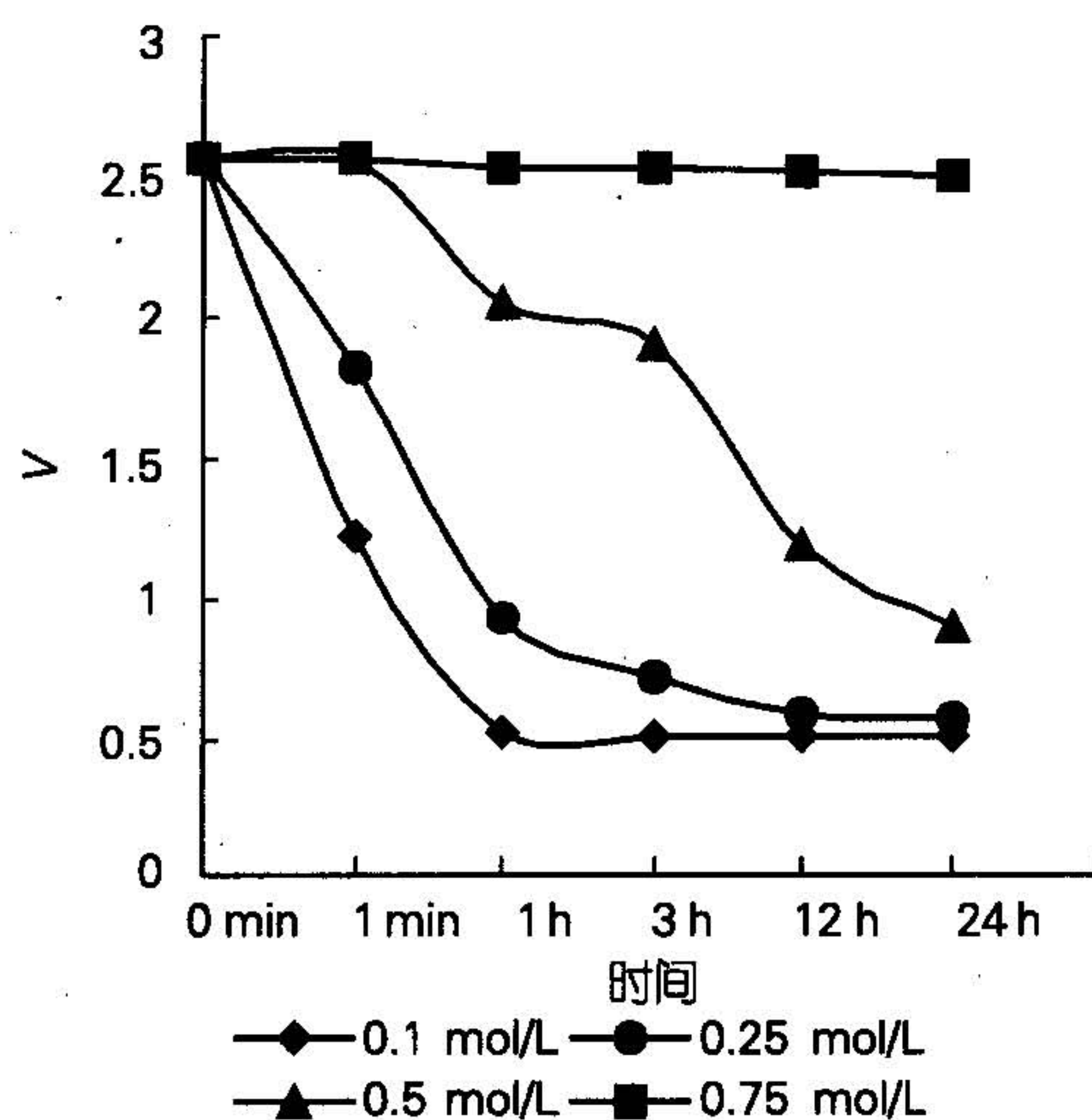


图3 不同浓度磷酸缓冲液中藻胆体 V 值的变化

Fig.3 The changes of V -value of phycobilisomes in various concentrations of phosphate buffer at different treatment times

2.3 pH 对藻胆体稳定性的影响

不同 pH 条件下钝顶螺旋藻藻胆体的室温荧光发射光谱见图 4, 发射峰的位置及其相对荧光强度值见表 2。钝顶螺旋藻藻胆体在 pH 7 的荧光发射峰位于 676 nm, 此时藻胆体处于稳定状态, 不易解离。由图 4 和表 2 可知, 从 pH 7 至 3.5, 随 pH 下降, 藻胆体荧光发射峰位置不断蓝移, 光谱半带宽逐渐增加, 说明藻胆体的解离程度越来越大。在 pH 3.5 时, 发射峰移至 665 nm, 此时能量末端受体已完全解离。而从 pH 7 至 11, 随 pH 的增加, 发射峰也发生蓝移, 至 pH 10.5 时发射峰位于 672 nm, 而且出现明显的 650 nm 左右的肩峰, 这表明已有部分的 C-藻蓝蛋白解离。由图 4 可以看出, pH 5, 6, 8, 9 藻胆体的荧光光谱与 pH 7 藻胆体荧光光谱相近, 这反映藻胆体在弱酸, 弱碱的条件下都处于较稳定状态。pH 对藻胆体的荧光强度影响较大(表 2), pH 3.5 或 pH 10.5 时的荧光强度只有 pH 为 7 时的 1/4 左右, pH 越接近 7, 荧光强度的降低越小。图 5 显示, 与 pH 7 藻胆体相比, pH 的变化, 导致了藻胆体的吸收光谱的改变, 藻胆体在紫外区的吸收明显增高, 而在 600~650 nm 区明显降低。

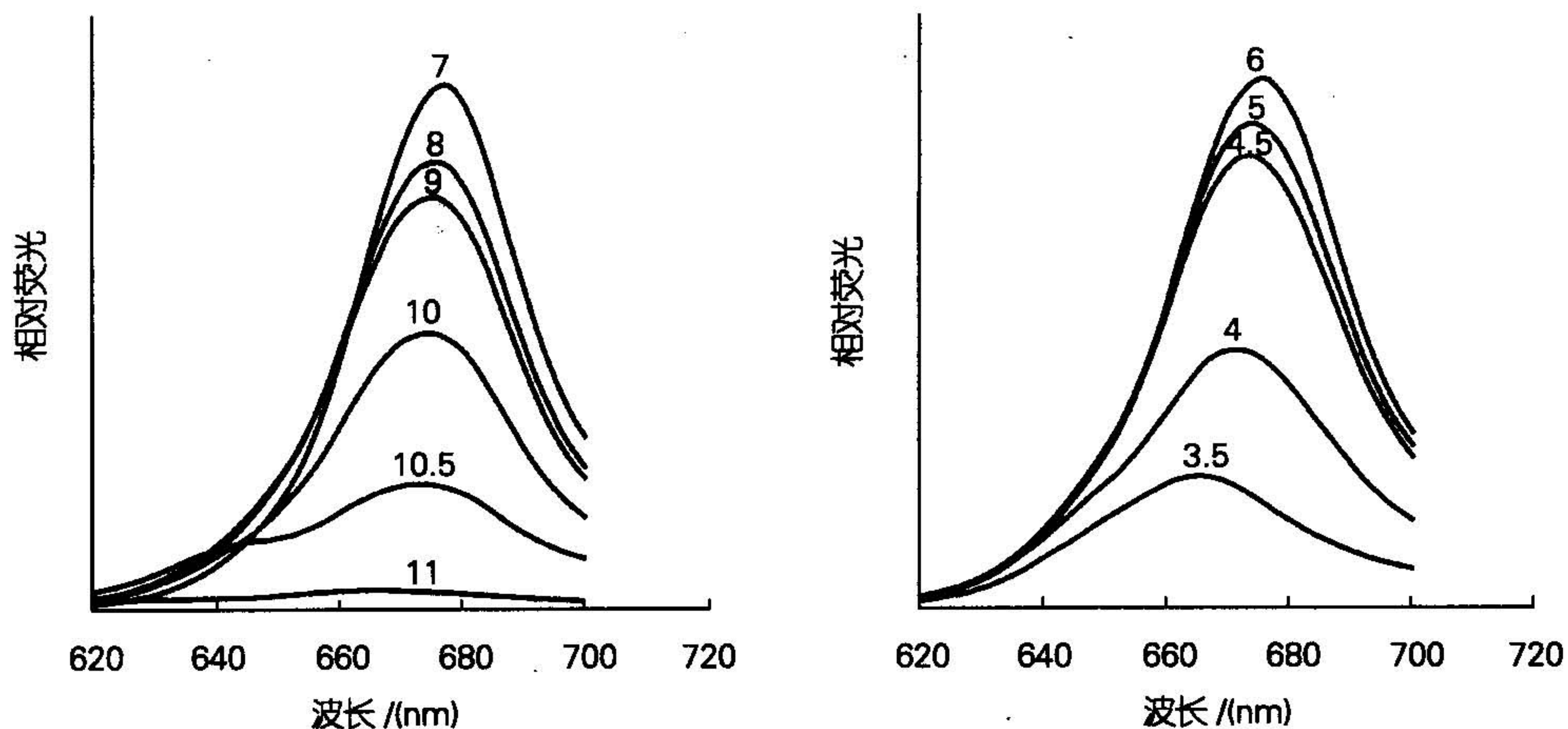


图 4 藻胆体在不同 pH 条件下的室温荧光发射光谱

Fig. 4 The room temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes under different pH conditions

曲线上方数字是该曲线代表的 pH 值

the figure above each curve was the pH value of the curve

表 2 不同 pH 条件下藻胆体的荧光发射峰位置及其相对荧光强度

Tab.2 The wavelengths and the relative fluorescence intensity of emission maxima of phycobilisomes under different pH conditions

pH	3.5	4	4.5	5	6	7	8	9	10	10.5
荧光峰 (nm)	665	671	672	674	675	676	675	674	673	672
相对荧光	0.25	0.5	0.87	0.92	1.02	1	0.85	0.79	0.52	0.24

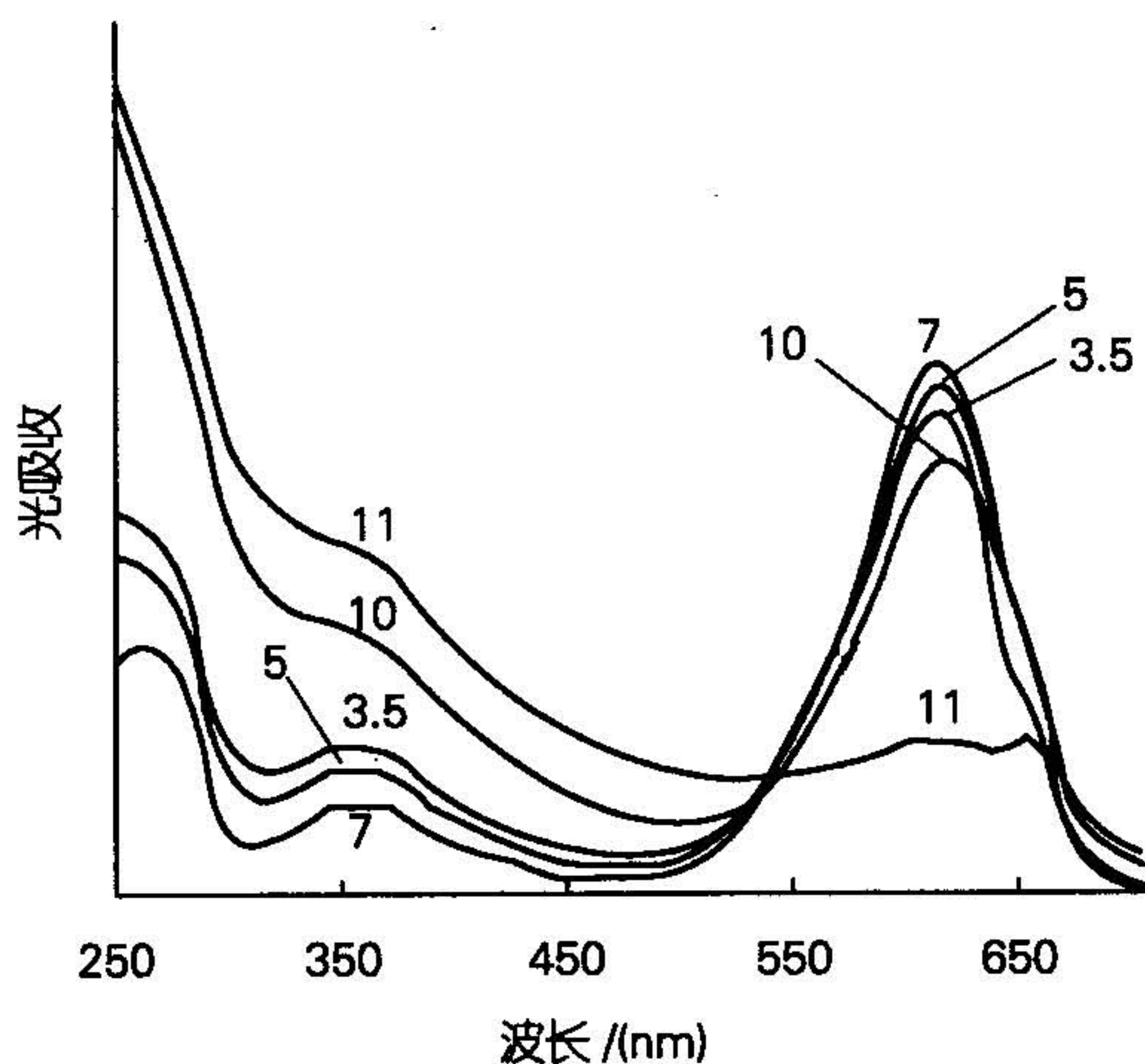


图 5 藻胆体在不同 pH 条件下的吸收光谱

Fig. 5 The absorption spectra of phycobilisomes under different pH conditions

曲线上方数字是该曲线代表的 pH 值

the figure above each curve was the pH value of the curve

不同 pH 条件下藻胆体吸收光谱及荧光光谱的不同说明 pH 的变化影响了藻胆蛋白的脱辅基蛋白的构象, 而脱辅基蛋白构象的变动进而又影响了被它所保护的色素基团的光化学性质。作为一种极端的情况, 在 pH 11 时, 藻胆蛋白已变性, 钝顶螺旋藻藻胆体的吸收光谱及荧光光谱已完全失去了藻胆体在 pH 7 时的特征谱形(图 4, 图 5)。

2.4 葡聚糖对藻胆体稳定性的保护作用

葡聚糖的加入, 使得钝顶螺旋藻藻胆体 (0.6 g/L) 的 V 值增加, 说明葡聚糖使藻胆体结合得更为紧密(图 6)。在 30 d 的考查期(于 1 mol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中, pH 7, 20℃ 保存)内, 与对照藻胆体相比, 加入葡聚糖的藻胆体的 V 值始终大于对照组相应的 V 值, 而且保存过程中 V 值的降低量较小。保存 30 d 后, 加入葡聚糖的藻胆体的荧光发射峰位置变化不大, 由 676 nm 蓝移至 671 nm, 且在 650 nm 左右未出现肩峰, 而对照藻胆体已出现明显的 650 nm 左右的肩峰, 荧光发

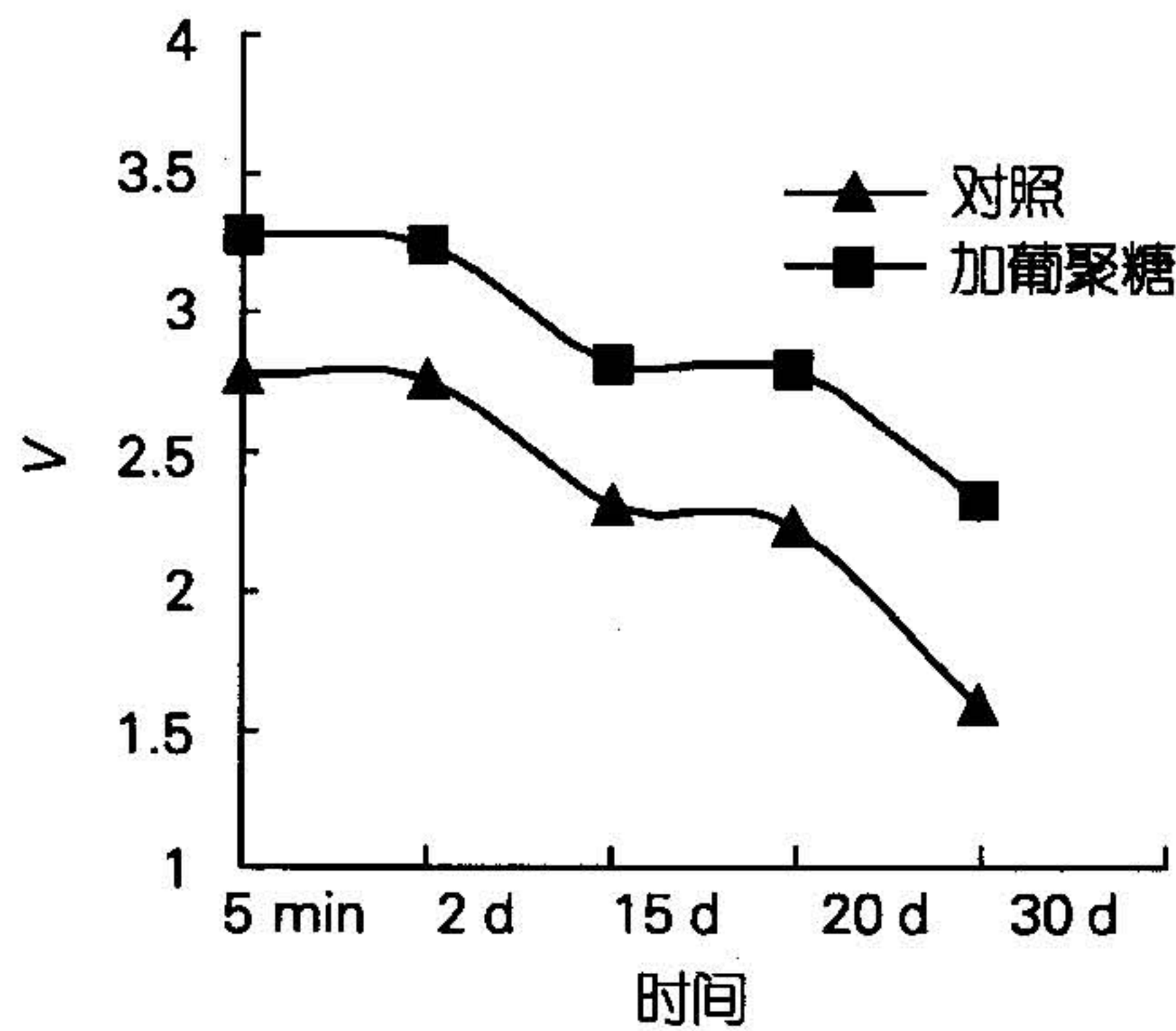


图6 加入葡聚糖后藻胆体 V 值随保存时间的变化
Fig. 6 The changes of V-value of phycobilisomes with addition of dextran during different store times

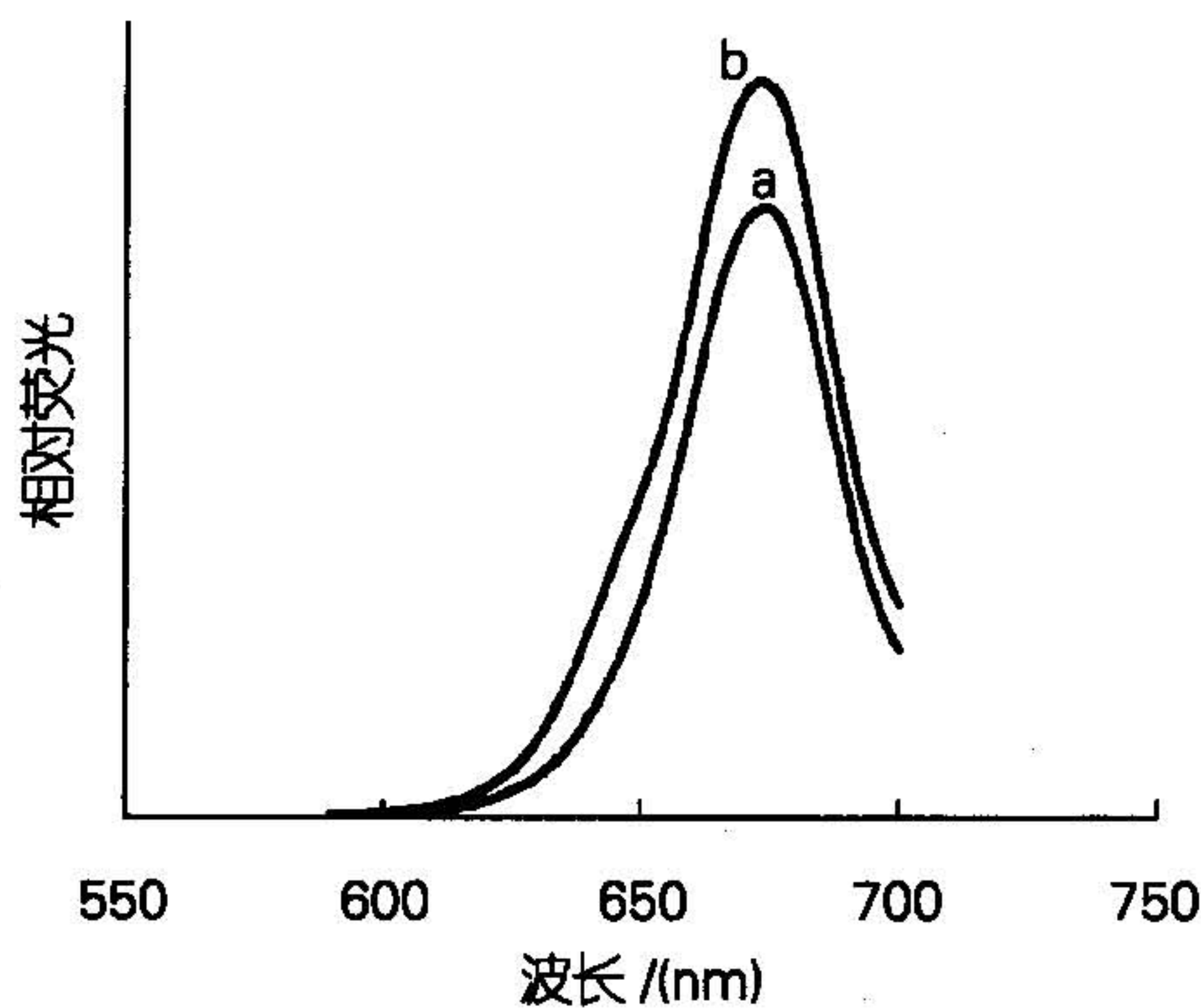


图7 加葡聚糖(a)及未加葡聚糖对照(b)藻胆体保存 30 d 的室温荧光发射光谱
Fig. 7 The room temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes with addition of (a) 10% dextran and (b) 0% dextran buffer solution in 30 days

射主峰亦蓝移至 668 nm(图 7)。

外观上看,保存 30 d 后,加葡聚糖的藻胆体形成蓝色沉淀沉降在试管底部,上清液澄清,而对照组藻胆体蓝色溶液已出现较多的白色絮状沉淀,说明已有少量藻胆蛋白变性。这些结果说明葡聚糖对藻胆体的稳定性有明显的保护作用。

3 讨论

钝顶螺旋藻藻胆体在较宽的蛋白浓度及 pH 范围内可以保持相对稳定,但对离子强度却较敏感,离子强度的少量降低即可引发明显的解离,这说明藻胆体在体外纯化状态下,离子强度是影响藻胆体稳定性的关键因素,这主要是因为藻胆体各组成蛋白间靠弱疏

水作用力结合的缘故。但是,在蓝藻的类囊体基质内,不可能有像分离介质(1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液)这样高的离子强度,因而体内藻胆体完整结构的维持可能是由于其它因素共同作用的结果。藻胆体在类囊体膜表面的排列异常紧密,藻胆蛋白含量也非常高^[7],造成单位体积藻胆体的浓度非常高,势必将水分子外排。同时基质内各种可溶性的蛋白、糖类及其它有机物质的浓度也比较高,它们与水易形成高度水合的化合物,实际上类囊体基质是处于溶胶状态,这又进一步降低了藻胆体周围基质中水的含量及活度,从而使得藻胆体在体内非常稳定^[4]。因此,在离体条件下,提高溶液中藻胆蛋白的浓度也能提高藻胆体的稳定性。葡聚糖富含羟基,容易吸附水分子,它的加入降低了藻胆体溶液中水的活度,可以认为是在模拟体内藻胆体所处的微环境,因此葡聚糖对藻胆体的结构完整性有一定的保护作用。在以前的研究中,作者也曾观察到了褐藻胶对钝顶螺旋藻藻胆体稳定性的保护现象^[8],因此多糖对藻胆体完整结构的保护可能是一种普遍的现象。葡聚糖等多糖类化合物为长期保存藻胆体提供了一种简便有效的方法,这将有助于藻胆体结构、功能和进化的研究。

参考文献:

- [1] MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes [J]. *J Stru Biol*, 1998, 124: 311 - 334.
- [2] 张玉忠,陈秀兰,周百成,等.钝顶螺旋藻中一种新的模型藻胆体 [J]. *中国科学(C辑)*, 1999, 29(2): 145 - 150.
- [3] Glazer AN. Phycobilisome: a macromolecular complex optimized for light energy transfer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 768(1): 29 - 51.
- [4] Katoh T. Phycobilisome stability [J]. *Meth in Enzymol*, 1988, 167: 313 - 318.
- [5] Gantt E, Lipschultz C A, Grabowski J, et al. Phycobilisomes from blue-green and red algae: isolation criteria and dissociation characteristics [J]. *Plant Physiol*, 1979, 63 (6): 615 - 620.
- [6] Bennett A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga [J]. *J Cell Biol*, 1973, 58: 419 - 435.
- [7] Gantt E. Phycobilisomes [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1981, 32: 327 - 347.
- [8] 张玉忠,周百成,曾呈奎.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 [J]. *海洋科学*, 1997, 21(6): 39 - 42.

(下转第 46 页)

(上接第 42 页)

The study of the stability of phycobilisomes in algae, *Spirulina platensis*

ZHANG Xi - ying¹, LIU Lu - ning¹, CHEN Xiu - lan¹, ZHANG Yu - zhong¹, ZHOU Bai - cheng^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China; 2. Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Feb., 5, 2004

Key words: *Spirulina platensis*; phycobilisomes; fluorescence spectra; stability

Abstract: The effects of ionic strength, phycobiliprotein concentrations, pH and dextran on the stability of the phycobilisomes in *Spirulina platensis* were studied by room temperature fluorescence emission spectra measurement. The phycobilisomes with 0.6~1.2 g/L phycobiliprotein concentrations exhibited high stability and did not easily dissociate. The fluorescence emission maxima were between 676 nm and 681 nm. The phycobilisomes were unstable and readily dissociated into various subparticles under low ionic concentration (< 0.75 mol/L). The speed and the degree of dissociation were increased with the decrease of the ionic concentration. Phycobilisomes in buffer solution at pH 7 were stable and slightly dissociated. But at pH 5, 6, 8 or 9, it showed that phycobilisomes exhibited stable within broad pH range. When 10% dextran was added into the phycobilisomes solution, the phycobilisomes could keep intact for 30 days at 20°C, it could be concluded that dextran had protection effect on the stability of phycobilisomes.

(本文编辑:张培新)