

# 藻胆体稳定性的研究

## II. 低温对藻胆体稳定性的影响\*

于延利 路荣昭

(中国科学院植物研究所,北京)

**提要** 本文研究 10°C, 4°C, -4°C 和 -196°C 对藻胆体的室温和液氮温度荧光发射光谱的影响。根据 F686 和 F666, F686 和 F655 相对荧光强度的比值和室温荧光峰的波长位置来判断藻胆体的解离程度和完整性。研究表明,在 10—-4°C 温度范围内,藻胆体的解离随着温度的降低而加强;藻胆体在 -196°C 下很稳定;在 8 个月内未发生解离。

藻胆体是超分子色素聚合物,是红藻和蓝藻的主要光能捕获器<sup>[4]</sup>,起着收集光能的天线作用。它吸收 450—660nm 波长光。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,进行光合作用。

由于藻胆体是一种高效率光能传递的光能捕获器,因此,作为研究光能吸收、传递的对象,它日益受到人们的重视。藻胆体的完整性直接关系到它的光能吸收和传递的效率,但目前对此尚缺乏系统的研究。我们在研究了多变鱼腥藻 *Anabaena variabilis* 完整藻胆体和不完全藻胆体室温荧光、液氮温度荧光发射特性的基础上<sup>[5]</sup>,又开展了藻胆体的稳定性的研究<sup>[1]</sup>。目前普遍认为,藻胆体在室温(20°C)下稳定,在低温下不稳定<sup>[3,6]</sup>,但对此缺乏具体实验研究报道;对于藻胆体是否在任何低温下都不稳定呢,亦缺乏了解。本文对藻胆体稳定性与低温的关系进行了研究。

### 一、材料和方法

#### 1. 生物材料和培养方法

本实验以多变鱼腥藻(ATCC 29413)为材料,用 Allen 和 Arnon 为培养基<sup>[4]</sup>,在温度 25—30°C,通空气,日光灯连续光照下培养。当每毫升藻培养液的叶绿素 a 含量达到 5—6 $\mu$ g 时,用离心方法收获藻体。

#### 2. 分离藻胆体

根据 Gantt 等<sup>[2]</sup>和 Nies, Wehrmeyer<sup>[6,7]</sup>分离藻胆体的方法并加以改进<sup>[1]</sup>。以离心方法将收获的 1g 鲜重藻体用 pH 7.0, 0.9mol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液(以下简称磷酸缓冲液),洗两次。藻体悬浮在 10ml 磷酸缓冲液中,用 CPS-I 型超声波粉碎机破碎细胞 15—20min,在水浴中进行,每次破碎 2min,间歇 5min。在细胞悬浮液中加入 Triton X-100 溶液,并使其浓度达 2%,保温 20min,并不断搅拌。然后于 20°C 下,

\* 国家自然科学基金资助项目。张群、冯丽洁同志协助进行离心和测定工作。

收稿日期: 1987 年 7 月 31 日。

1) 于延利,路荣昭。藻胆体的浓度与藻胆体稳定性的关系。植物学集刊第四期。(在印刷中)

30000×g 离心 20min。取出离心管中部蓝色样品进行蔗糖密度梯度离心。用 0.9mol/L 磷酸缓冲溶液配制蔗糖溶液。蔗糖密度梯度的浓度自上而下依次为: 0.25, 0.40, 0.55, 0.70 和 0.85mol/L。在 0.25mol/L 蔗糖溶液上层加入待分离样品。于 20℃ 下, 用 Beckman L5-50B 离心机 VTi50 离心头, 144000×g, 离心 1.5h。取出 0.70mol/L 与 0.85mol/L 界面间深蓝色带, 此带为完整藻胆体<sup>[1]</sup>。

### 3. 不同低温处理藻胆体

将每毫升含 864 $\mu$ g 藻胆蛋白的藻胆体悬浮液分别在 10℃, 4℃, -4℃ 和 -196℃ 4 种温度条件下贮存。

### 4. 荧光测定

用日立 MPF-4 型荧光分光光度计测定。激发波长为 580nm, 激发和发射狭缝均为 5nm, 波长误差  $\pm 1$ nm。

## 二、结果和讨论

### 1. 不同低温对藻胆体液氮温度荧光发射光谱的影响

我们过去的研究曾提出 F686 和 F666, F686 和 F655 相对荧光强度比值是判断藻胆体完整性最灵敏的指标。同时, 认为藻胆体的室温荧光峰的波长位置亦可用来判断藻胆体的完整性<sup>[1]</sup>。

本研究将多变鱼腥藻藻胆体分别贮存在 10℃, 4℃, -4℃ 和 -196℃ 条件下, 每隔 7 天测定它们的液氮温度荧光发射光谱, 共测 5 次。图 1 为在贮存后第 7 天的藻胆体的

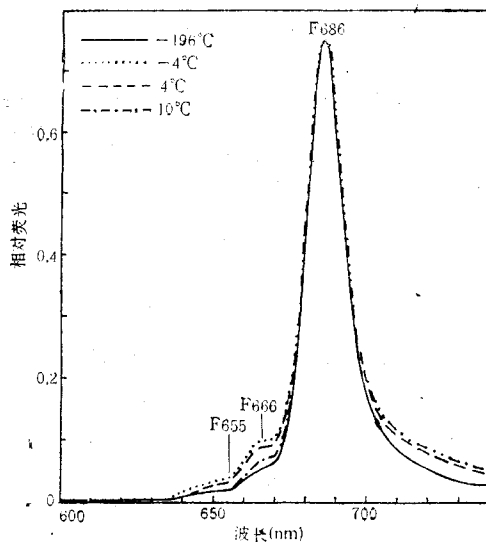


图 1 在不同低温贮存 7 天的藻胆体的液氮温度荧光发射光谱

Fig. 1 The liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes stored at different low temperatures for 7 days

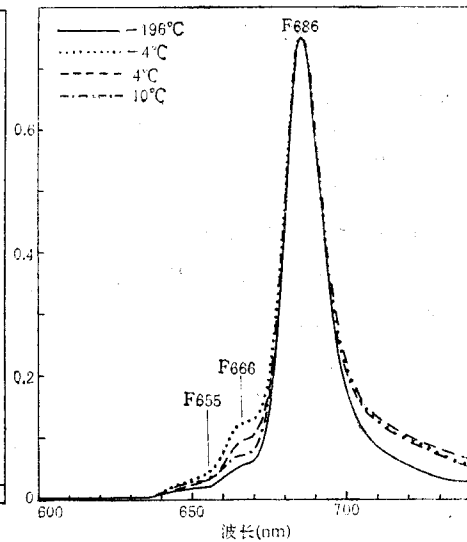


图 2 在不同低温贮存 14 天的藻胆体的液氮温度荧光发射光谱

Fig. 2 The liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes stored at different low temperatures for 14 days

液氮温度荧光发射光谱。在  $-196^{\circ}\text{C}$  下,藻胆体的荧光光谱与新制备的藻胆体一致;在  $10^{\circ}\text{C}$  下,藻胆体的 F666 增加;在  $4^{\circ}\text{C}$  和  $-4^{\circ}\text{C}$  下,藻胆体的 F666 和 F655 都有增加。从贮存后第 14, 21, 28 和 35 天的藻胆体液氮温度荧光发射光谱(图 2, 3, 4 和 5)中可以看出,在  $-196^{\circ}\text{C}$  下,藻胆体的荧光光谱没有变化, F666 和 F655 没有增加; F686 和 F666, F686 和 F655 的相对荧光强度比值没有变化。在  $10, 4$  和  $-4^{\circ}\text{C}$  下贮存的藻胆体的液氮温度荧光发射光谱中, F 666 和 F 655 不断地随着贮存时间的延长而增加, F 686 和

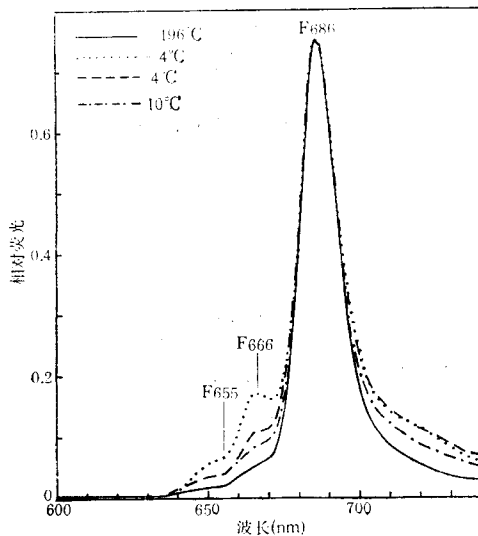


图 3 在不同低温贮存 21 天的藻胆体的液氮温度荧光发射光谱

Fig. 3 The liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes stored at different low temperatures for 21 days

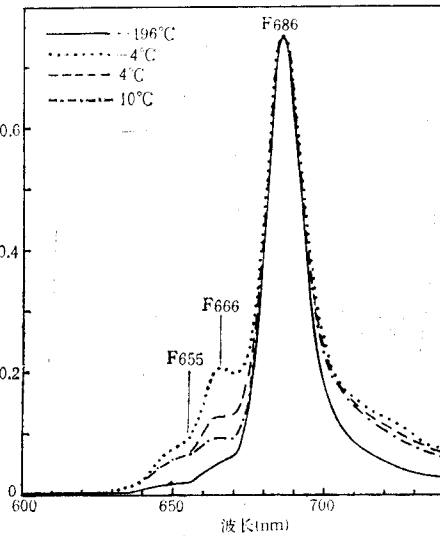


图 4 在不同低温贮存 28 天的藻胆体的液氮温度荧光发射光谱

Fig. 4 The liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes stored at different low temperatures for 28 days

F666, F686 和 F655 的比值也随之不断下降。而且 F666 和 F655 随着藻胆体的贮存温度降低而增加; F686 和 F666, F686 和 F655 的比值随着温度的降低而降低。

F666 和 F655 的不断增加表明藻胆体在不断解离,其完整性不断地受到破坏。这是由于在解离的藻胆体中, C-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白所捕获的光能不能全部有效地传递给别藻蓝蛋白-B, 而发射出 686 nm 荧光;将这一部分未能传递出去的光能以 C-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的荧光发射出来,其结果是 F655 和 F666 增强。实验结果说明,在  $10-4^{\circ}\text{C}$  温度范围内,可以导致藻胆体能量传递解偶联,其解离程度和速度随着贮存温度的降低而增强。

## 2. 不同低温对藻胆体室温荧光发射光谱的影响

藻胆体在  $10^{\circ}\text{C}$  贮存 0, 7, 21 和 35 天,其室温荧光峰分别位于 678, 677, 676 和 675 nm, 发射峰向短波长位移 3nm (图 6)。在  $4^{\circ}\text{C}$  贮存时,分别位于 678, 677, 675 和 673 nm, 向短波长位移 5nm (图 7)。在  $-4^{\circ}\text{C}$  贮存时,分别为 678, 676, 674 和 671nm, 向短波长位移 7nm (图 8)。在  $-196^{\circ}\text{C}$  下,藻胆体室温荧光峰波长位置没有向短波长位

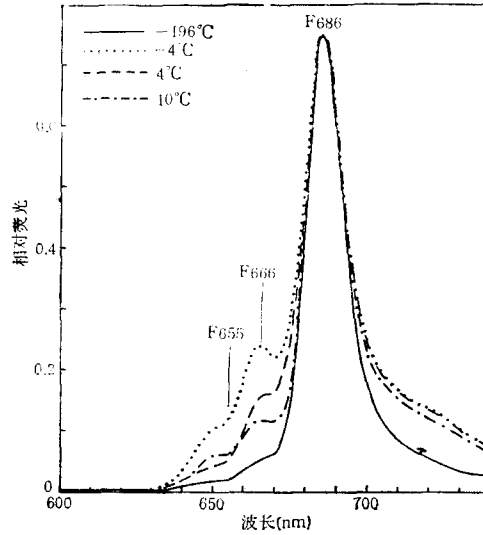


图5 在不同低温贮存35天的藻胆体的液氮温度荧光发射光谱

Fig. 5 The liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes stored at different low temperatures for 35 days

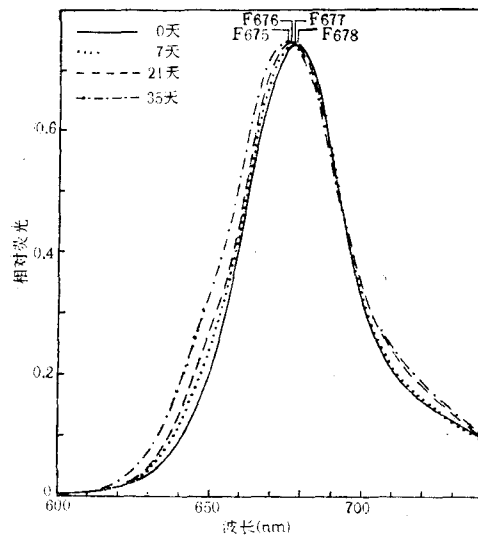


图6 在10°C下贮存的藻胆体的室温发射光谱

Fig. 6 The room temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes stored at 10°C

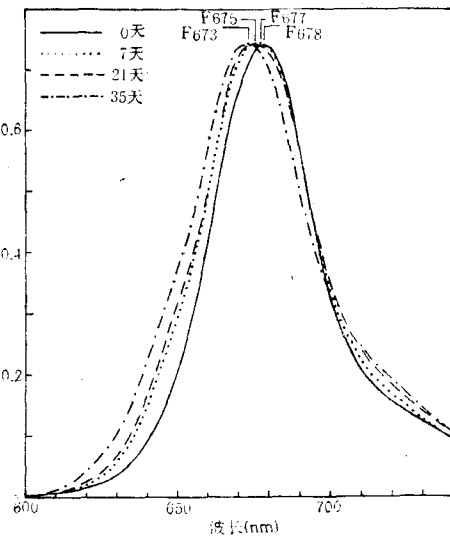


图7 在4°C下贮存的藻胆体的室温发射光谱

Fig. 7 The room temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes stored at 4°C

移。室温荧光峰向短波长位移,是由于藻胆体解离后光能传递效率降低,因此长波长荧光(别藻蓝蛋白-B 荧光)减少而短波长荧光(C-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白荧光)增加。室温荧光峰向短波长偏移值越大,说明藻胆体解离越严重。在10—4°C 温度范围内,藻胆体室温荧光峰向短波长位移值随着贮存温度的降低而增加。

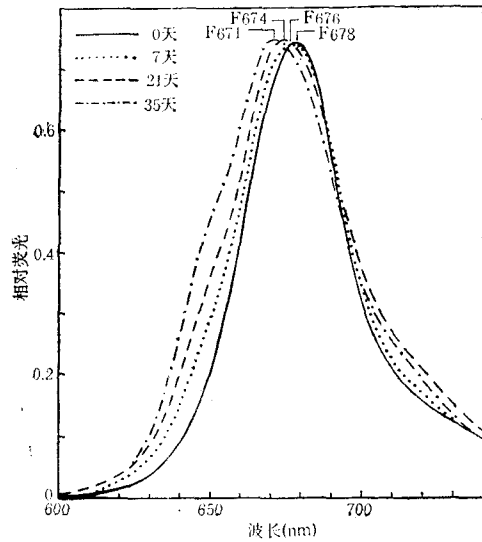


图8 在 $-4^{\circ}\text{C}$ 下贮存的藻胆体的室温  
发射光谱

Fig. 8 The room temperature fluorescence  
emission spectra of phycobilisomes  
stored at  $-4^{\circ}\text{C}$

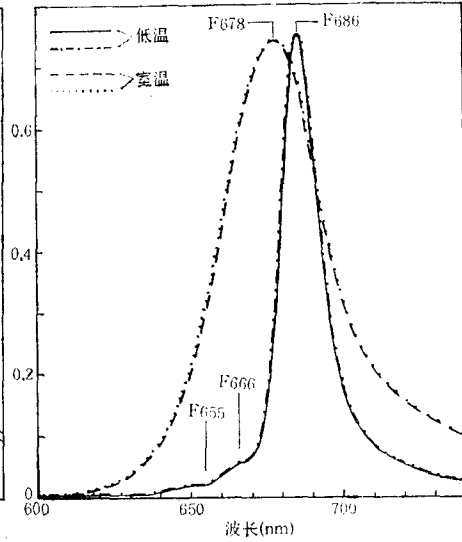


图9 在 $-196^{\circ}\text{C}$ 下贮存8个月的藻胆  
体的室温和液氮温度荧光发射光谱

Fig. 9 The room temperature and  
liquid nitrogen temperature fluores-  
cence emission spectra of phycobil-  
isomes stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  for 8 months

根据以上室温和液氮温度荧光发射光谱的测定结果,可以认为藻胆体不宜在 $10^{\circ}\text{C}$ 和 $-4^{\circ}\text{C}$ 下保存,特别不应在 $-4^{\circ}\text{C}$ 下保存,因为在此温度下藻胆体的解离大于在 $10^{\circ}\text{C}$ 和 $4^{\circ}\text{C}$ 下贮存的藻胆体。这与贮存叶绿体显然不同。藻胆体在 $-196^{\circ}\text{C}$ 下很稳定,在液氮温度中贮存8个月,其液氮温度和室温荧光发射光谱没有发生变化(图9),说明藻胆体可以长期贮存在液氮中供实验研究之需。

### 参 考 文 献

- [1] 路荣昭,于延利,1984。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。水生生物学集刊 8: 427—433。
- [2] Gantt, E., C. A. Lipschultz and J. Grabowski, et al., 1979. Phycobilisomes from blue-green and red algae. Isolation criteria and dissociation characteristics. *Plant Physiol.* 63: 615—620.
- [3] Gantt, E., 1980. Structure and function of phycobilisomes: Light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. *Int. Rev. Cyt.* 66: 45—80.
- [4] Gantt, E., 1981. Phycobilisomes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 327—347.
- [5] Lu Rong-zhao and Yu Yan-li, 1984. Spectral changes in fluorescence of phycobilisomes in the course of dissociation. *Photosynthetica* 18: 179—183.
- [6] Nies, M., W. Wehrmeyer, 1980. Isolation and biliprotein characterization of phycobilisomes from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus Laminosus* Cohn. *Planta.* 150: 330—337.
- [7] Nies, M., W. Wehrmeyer, 1981. Biliprotein assembly in the hemidiscoidal phycobilisomes of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus Laminosus* Cohn. Characterization of dissociation products with special reference to the peripheral phycoerythrocyanin-phycoerythrin complexes. *Arch. Microbiol.* 129: 374—379.
- [8] Staehelin, L. A. and C. J. Arntzen, 1986. Photosynthetic membranes and light harvesting systems. *Encycl. Plant Physiol. New Ser.* 19: 260—268.

## STUDIES ON THE STABILITY OF PHYCOBILISOMES II. THE EFFECTS OF LOW TEMPERATURES ON THE STABILITY OF PHYCOBILISOMES

Yu Yanli and Lu Rongzhao

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing*)

### ABSTRACT

The room temperature and liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes stored at 10°C, 4°C, -4°C, and -196°C were determined once every seven days. The intactness and dissociation of phycobilisomes were identified according to the ratios of the relative fluorescence intensity of F686 to F666 and F655 in liquid nitrogen temperature fluorescence spectra, and the wavelength locations of room temperature fluorescence emission maxima.

1. Effects of low temperature on liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectra.

The liquid nitrogen temperature fluorescence spectrum of control phycobilisomes had only one fluorescence emission band, it was located at 686 nm. There were three fluorescence emission bands in that of dissociated phycobilisomes, they were located at 655 nm, 666 nm and 686 nm, characteristic of C-phycoerythrin, allophycocyanin and allophycocyanin-B respectively. In the liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectra of phycobilisomes stored at 10°C, 4°C and -4°C, 655 nm and 666 nm fluorescence were increased as storage temperature was decreased and storage time was longer. The liquid nitrogen temperature fluorescence emission spectrum of phycobilisomes stored at -196°C for 8 months was the same as that of control phycobilisomes.

2. Effects of low temperature on the wavelength locations of room temperature fluorescence emission maxima.

The maximum of room temperature fluorescence of control phycobilisomes (stored at room temperature for 0 day) was located at 678 nm; those of phycobilisomes stored at 10°C were at 677 nm, 676 nm and 675 nm, at 7th, 21th and 35th day respectively; those of phycobilisomes stored at 4°C were at 677 nm, 675 nm and 673 nm; and those of phycobilisomes stored at -4°C were shifted to 676 nm, 674 nm and 671 nm. The wavelength of room temperature fluorescence emission maximum of phycobilisomes is shorter, the dissociation of phycobilisomes is greater. The room temperature fluorescence emission maximum of phycobilisomes stored at -196°C for 8 months wasn't changed, it was still located at 678 nm.

Our research results indicated that the dissociation of phycobilisomes increased as storage temperature decreased from 10°C to -4°C. The phycobilisomes stored at -196°C were stable.