

裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 色素蛋白复合物的分离及光谱特性的初步研究*

刘洪艳 王广策^{†1)} 侯和胜^{††} 曾呈奎[†]

(天津科技大学海洋科学与工程学院 天津 300450;中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

[†](中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

^{††}(辽宁师范大学生命科学学院 大连 116029)

提要 以褐藻裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 为实验材料,采用蔗糖密度梯度超速离心的方法纯化类囊体膜;以去污剂 SDS 为增溶剂 (SDS:Chl = 20:1, 4℃ 增溶 20min),再用蔗糖密度为 60%、50%、40%、30%、20%、15% 和 10% 的梯度离心法,从裙带菜中成功地分离出 5 条含色素的蛋白质复合物带。离心结果显示在离心管顶部没有任何颜色,表明经过 SDS 增溶没有产生游离色素,纯化的类囊体膜和 5 条色素条带进行吸收光谱分析,显示了属于叶绿素 *a* (Chl-*a*) 的吸收峰:418、436 和 667 到 672nm。叶绿素 *c* (Chl-*c*) 的吸收峰:615 和 620nm。荧光发射最高峰位于 682 到 690nm 的区域。荧光激发光谱显示有 Chl-*a* 和 Chl-*c* 的激发峰,40% 层带所含有的色素复合物只有属于 Chl-*a* 的吸收峰。分析结果表明:10%、15% 层带所含有的色素复合物是褐藻的捕光色素复合物;20%、30% 层带所含有的色素复合物是浅绿色的 PS II 复合体(仍然含有捕光色素),40% 层带所含有的色素复合物是深绿色 PS I 复合体,50% 层带所含有的色素复合物是没有被增溶的类囊体膜。

关键词 裙带菜,色素蛋白复合物,光谱分析

中图分类号 Q949.28

褐藻的光合器官比较原始,类囊体膜在叶绿体内不堆叠成基粒;从系统发育角度来看,褐藻在光合生物进化阶段中处在比较的原始地位。褐藻富含胶质,对细胞的破碎有很大困难;常用的破碎方法不适合于褐藻,因此褐藻色素蛋白复合物的研究进展较慢。在国内,李爱芬等(2001)研究去污剂对电泳分离效果的影响,使褐藻色素蛋白复合物的研究有了一定的进展。国外研究者曾采用不同去污剂从褐藻类囊体膜上得到 3—5 种色素蛋白复合物,其中通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 技术最多分离到 4 种色素蛋白复合物 (Peyrider *et al.*, 1984)。与高等植物相比,不仅分离到的色素蛋白复合物种类少,不同研究者分离

到的色素蛋白复合物的种类和数目也不相同。一般都能分离出含有 P700 的 PS I 复合物,但这些 PS I 复合物在 Chl-*a*/P700 比值、色素组成、Chl-*a*/*c* 比值和 PS I 的低温荧光特征等方面往往不同,而且难以分离出 PS II 复合物 (Caron *et al.*, 1985)。

由于通过 PAGE 技术得到的色素蛋白复合物不能进一步进行光活性的测定,本实验利用超速离心的方法从裙带菜中分离出 PS I 和 PS II 复合物;为深入研究经济海藻裙带菜的 PS I 和 PS II 复合物的光化学特性奠定了基础。

1 材料与方法

裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 采自青岛太平角

* 国家自然科学基金重点资助项目,39890390 号;国家自然科学基金面上资助项目,30170499 号。刘洪艳,博士, E-mail: hongyanliu1214@163.com

1) 通讯作者,王广策, E-Mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2003-03-28,收修改稿日期:2003-09-02

汇泉湾低潮带。

1.1 类囊体膜的制备和增溶

类囊体膜的制备参照 Strbac 等(1994)。膜增溶液为 0.3mol/L Tris-HCl, pH = 8.0, 含 10% 甘油、1% SDS。SDS 与叶绿素的比例为 20:1 (W/W)。向裙带菜类囊体膜悬浮液中加入增溶液, 置 4℃ 黑暗中, 不停地振动增溶 20min。

1.2 蔗糖密度梯度超速离心

将增溶后的类囊体膜铺在蔗糖梯度的最上层, 蔗糖梯度为: 60%、50%、40%、30%、20%、15%、10%。离心力为 140 000g, 4℃, 连续离心 15h。

1.3 光谱分析

类囊体膜悬浮液以及 15h 离心后分离所得到的各个层带, 在室温条件下, 用岛津 UV-240 型扫描式分光光度计测定吸收光谱, 样品池的半径为 1cm。荧光发射和激发光谱采用日立 850 型荧光分光光度计测定, 窄缝宽度为 5nm。

2 实验结果

2.1 类囊体膜的纯化及光谱鉴定

裙带菜类囊体膜经过 4h 的蔗糖密度梯度超速离心后, 停留在 50% 这一层带, 并且只有 50% 这一层有绿色条带, 说明破碎程度适宜, 获得了完整的类囊体膜。未破碎的细胞及其他膜碎片都沉到管底, 用长注射器将 50% 这一绿色层带的类囊体膜取出, 进行光谱分析。在吸收光谱中, 类囊体膜在 436nm、670nm 处有属于 Chl-*a* 的吸收峰, 在 460nm、620nm 处有属于 Chl-*c* 的吸收峰, 在 500—600nm 处有很高的墨角藻黄素吸收。在发射光谱中, 除了含有来源于 Chl-*a* 的 680nm 的发射峰外, 还有一个非常明显的 647nm 肩峰, 这个峰来源于 Chl-*c*, 没有发现 730nm 的荧光发射峰。在荧光激发光谱中可以看到 Chl-*c*、墨角藻黄素与 Chl-*a* 的能量偶联。

2.2 色素蛋白复合物的分离

裙带菜类囊体膜增溶液 15h 的蔗糖密度梯度超速离心结果为: 10%、15% 层带是褐色的捕光色素复合物, 20%、30% 层带是浅绿色的 PS II 复合体(仍然含有捕光色素), 40% 是深绿色 PS I 复合体, 50% 是没有被增溶的类囊体膜。

2.3 色素蛋白复合物的吸收光谱和荧光光谱分析鉴定

在吸收光谱中, 10%、15% 蔗糖层带色素蛋

白复合物除了含有 Chl-*a* 以外, 还显示出比其他层带高的 Chl-*c* 和墨角藻黄素, 吸收最高峰在 671nm 处, 可能是捕光色素复合物。20% 和 30% 蔗糖层带色素蛋白复合物的光谱中, 与其他层带相比, 有一个突出的 490nm 的肩峰, 属于类胡萝卜素的吸收峰; 418nm 处的吸收峰属于脱镁 Chl-*a*, 它的最大吸收峰在 667nm 处。这些色素蛋白复合物除了含有 Chl-*a* 以外, 也含有 Chl-*c* 和墨角藻黄素, 可能是带有捕光色素复合物的 PS II 复合体。40% 层带同样含有 Chl-*a*, 最大吸收峰在 668nm, 其 418nm 处的吸收峰属于脱镁 Chl-*a*, 可能是 PS I 复合体。

荧光发射光谱见图 1 和图 2。由图可知, 位于 10%、15% 和 20% 蔗糖层带色素蛋白复合物的最大荧光发射峰在 682nm。30% 层带色素蛋白复合物的最大荧光发射峰 690nm 处, 可以看到除了主峰以外, 在 647nm 处还有一个明显的荧光峰。当用 Chl-*c* 吸收峰的 450nm 光激发时, 发射主峰

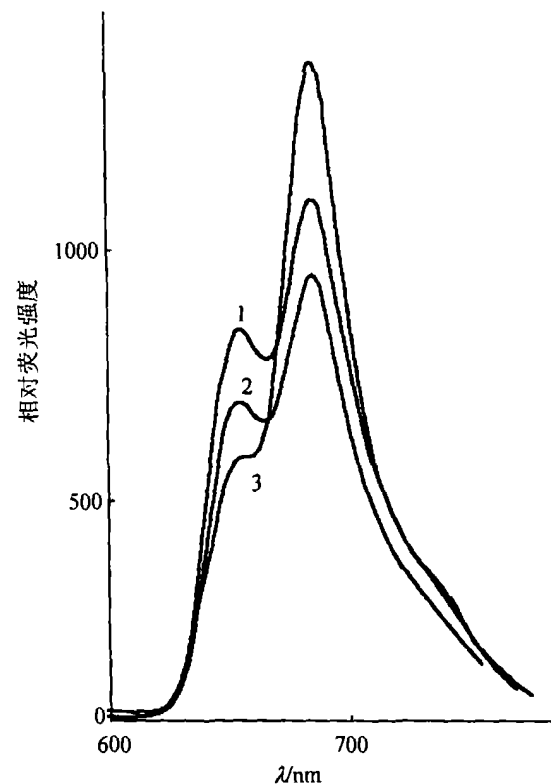


图 1 10%、15% 和 20% 层带色素蛋白复合物的荧光发射光谱

Fig.1 Fluorescence emission spectra of pigment-protein complexes on 10%, 15% and 20% sucrose layers
1 为 10% 层带; 2 为 15% 层带; 3 为 20% 层带。
激发波长为 450nm

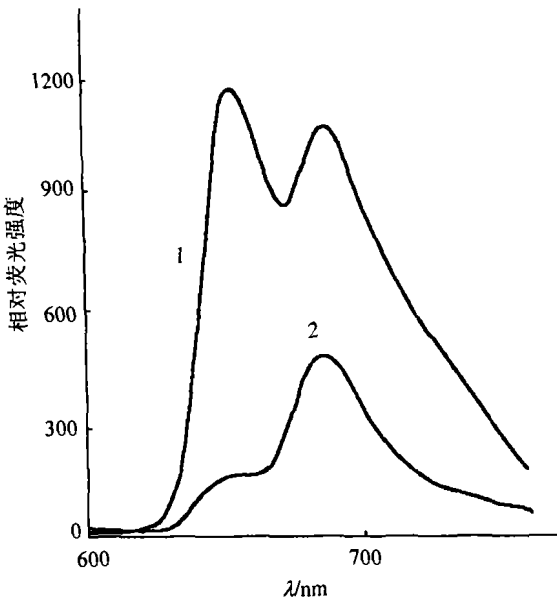


图2 30%和40%层带色素蛋白复合物的
荧光发射光谱

Fig.2 Fluorescence emission spectra of pigment-protein complexes on 30% and 40% sucrose layers
1 为 30% 层带; 2 为 40% 层带。激发波长为 450nm

变为 647nm, 而 Chl-*a* 的 682nm 的荧光峰变得低了, 说明 647nm 处的荧光峰是复合物中 Chl-*c* 发出的, 同时也可以看到从 Chl-*c* 到 Chl-*a* 的能量传递并非完全偶联, 一部分以 Chl-*c* 的本身荧光形式泄漏了。40% 蔗糖层带色素蛋白复合物的最大荧光发射峰在 685nm。

从激发光谱来看, 位于 10%、15% 和 20% 蔗糖层带色素蛋白复合物的荧光激发光谱中 500—550nm 有激发, 647nm 处有一个激发峰, 从中可以看到从辅助集光色素、Chl-*c* 到 Chl-*a* 之间的能量传递。30% 层带色素蛋白复合物的荧光激发光谱中有 Chl-*a* 的 420nm 激发峰, 有墨角藻黄素的 550nm 激发峰, 有位于 630nm 的 Chl-*c* 的激发峰。说明 Chl-*c* 和墨角藻黄素是和 Chl-*a* 能量偶联, 同时也说明通过蔗糖密度梯度并没有得到 PS II 中心复合物, 而是仍然含有捕光色素蛋白复合物。40% 蔗糖层带色素蛋白复合物的荧光激发光谱中只有属于 Chl-*a* 的激发峰, 其突出特点是缺少 Chl-*c* 和墨角藻黄素的激发峰, 同时其荧光产率比较低(图 3)。从光谱鉴定的角度看是得到了纯化的 PS I 中心复合物, 但是还需要进一步活性鉴定。

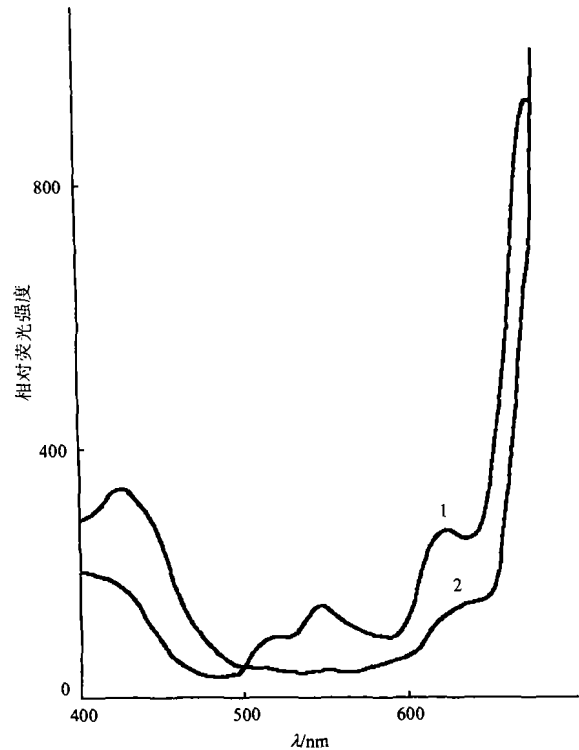


图3 30%和40%层带色素蛋白复合物的荧光激发光谱

Fig.3 Fluorescence excitation spectra of pigment-protein complexes on 30% and 40% sucrose layers
1 为 30% 层带; 2 为 40% 层带。发射波长为 685nm

3 讨论

3.1 Chl-*c* 的能量传递

从分离的裙带菜色素蛋白复合物各层带的荧光发射光谱中可以看出, 除了 40% 层带外, 其余层带都有 Chl-*c* 的自身荧光泄漏, 虽然激发光谱中有 Chl-*c* 和 Chl-*a* 的能量偶联, 但是能量偶联效率不完全, 有一部分以自身荧光泄漏。Alberte 等 (1981) 和 Passaquet 等 (1991) 也曾报道墨角藻黄素-Chl-*a/c*-蛋白质复合物也有 647nm 荧光峰, 认为这是捕光色素蛋白复合物中 Chl-*c* 吸收的光能没有完全传递给 Chl-*a* 而产生的。这与作者分离的 30% 层带中的捕光色素蛋白复合物非常相似。

对于 40% 层带, 从激发光谱中可以看出没有 Chl-*c* 和墨角藻黄素的激发峰, 这有两种可能: 一种是得到了比较纯化的 PS I 中心复合物, 不含有捕光色素; 另一种是 Chl-*c* 和墨角藻黄素的能量没有传递到 Chl-*a* 中心, 但从其发射光谱中并没有观察到荧光泄漏现象, 因此可以认为第一种可能性更大, 即 40% 层带是去除了捕光色素的 PS I 中心复合物。Alberte 等 (1981) 利用 SDS 增溶, Anderson 等 (1979) 利用 Triton-X 100 增溶, 采用 PAGE

技术分离出了 PS I 复合物,但都没有得到纯化的 PS I 中心复合物。

裙带菜的捕光色素复合物为墨角藻黄素-Chl-*a/c*-蛋白质复合物。经过蔗糖密度梯度超速离心后分离的色素蛋白复合物的 Chl-*a/c* 比值自 10% 层带开始下降,40% 层带的色素蛋白复合物的 Chl-*a/c* 比值最低。而且即使是 10% 层带,Chl-*a/c* 比值都小于类囊体膜的 Chl-*a/c* 比值,这可能是由于更多 Chl-*a* 集中在外周捕光色素复合物中。在接近反应中心或在反应中心里只有很少的 Chl-*a* 存在。Chl-*c* 更多地集中在内周捕光色素复合物中,这样更有利于能量的传递,充分利用光能,适应弱光的海洋环境。

参 考 文 献

- 李爱芬,陈敏,周百成,2001. 去污剂对裙带菜色素蛋白复合物电泳分离效果及其性质的影响. 海洋与湖沼, 32(4): 394—401
- Alberte R S, Frideman A L, Gustafson D L, 1981. Light-harvesting system of brown algae and diatoms: Isolation and characterization of chlorophyll *a/c* and chlorophyll *a*/fucoxanthin pigment-protein complexes. *Biochim Biophys Acta*, 635: 304—316
- Anderson J M, Barrett J A, 1979. Chlorophyll Protein Complexes of Brown Algae: P700 Reaction Center and Light Harvesting Complexes. In: *Chlorophyll Energy Transfer in Photosynthesis*. Ciba Foundation Symposium, Elsevier, 61: 81—104
- Caron L, Dubacq J P, Berkaloff C *et al*, 1985. Subchloroplast fraction from the brown alga *Fucus serratus*: phosphatidylglycerol contents. *Plant Cell Physiol*, 26: 131—133
- Passaquet C, Thomas J C, Caron L *et al*, 1991. Light-harvesting complexes of brown algae: biochemical characterization and immunological relationships. *FEBS Letter*, 280: 21—26
- Peyriere M, Caron L, Jupin J, 1984. Pigment complexes and energy transfer in brown algae. *Photosynthetica*, 18: 184—191
- Strbac D, Marcoarelio A R, Cesar P *et al*, 1994. Chloroplast isolation from *Laminaria digitata*: A reproducible methodology yielding photosynthetically active chloroplasts. *Planta*, 195: 138—141

SEPARATION AND SPECTRAL ANALYSIS OF PIGMENT-PROTEIN COMPLEXES FROM BROWN ALGAE *UNDARIA PINNATIFIDA*

LIU Hong-Yan, WANG Guang-Ce[†], HOU He-Sheng^{††}, ZENG Cheng-Kui (C. K. Tseng)[†]

(Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, 300450;

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

[†](Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

^{††}(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, 116029)

Abstract The technique of separating light active pigment-protein complexes from brown algae *Undaria pinnatifida* was developed in this paper. Five pigment-protein complexes were isolated by centrifugation on discontinuous sucrose density gradient of the SDS-treated thylakoid membrane. The method for thylakoid membrane isolation was based on appropriate isolation buffers and removal of mucilage, and it may be applicable to other macroalgae with large amounts of mucilage. The best separation was obtained with detergent SDS (SDS:Chl = 20:1, solubilized 20min at 4°C), and sucrose density gradient (10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% W/W). After centrifugation, no color was found at the tip of the vials in upper part gradient, indicating that no pigment released during the solubilization by SDS. Thus the pigment composition of the discrete bands observed on the gradient can be considered to be representative of the native state of the complexes. The absorption and fluorescence emission spectra of the purified thylakoids and five pigment-protein complexes isolated from *U. pinnatifida* were examined. The light fractions were recovered on the 10% and 15% sucrose layers, besides Chl-*a*, they presented high Chl-*c* and fucoxanthin levels compared to the other fractions. They showed absorption maxima at 671nm due to the presence of Chl-*a* and fluorescence emission maxima at 682nm. The fractions, observed on the 20% and 30% sucrose layers, possessed Chl-*a*, a low amount of Chl-*c* and a small amount of fucoxanthin. Their maximum absorption peak was at 667nm and their fluorescence emission were characterized by maxima at 682nm, 690nm. The heavy fraction, appeared on the 40% sucrose layer, possessed essentially Chl-*a* and very little Chl-*c* and fucoxanthin. The absorption maximum at 668nm and fluorescence emission maximum at 685nm, it lacked the 730nm characteristic emission peak which is regarded as a symbol of PS I in high plants. The fluorescence excitation spectra showed excitation maxima associated with Chl-*a* and Chl-*c* absorption and energy transfers from fucoxanthin to Chl, but not on 40% sucrose layer in which pigments were disconnected. The separated complexes on 10% and 15% sucrose layers that had excitation peak in the 500 to 550nm region due to fucoxanthin showed efficient energy coupling between the accessory pigment and Chl-*a*, and were proposed to function in light-harvesting, identified as LHCP. The separated complexes on 20% and 30% sucrose layers that had several excitation peaks due to Chl-*a*, fucoxanthin and Chl-*c*, were identified as composed of PS II particles. The separated complex on 40% sucrose layer having only one excitation peak due to the presence of Chl-*a* represented rather pure PS I complex.

Key words *Undaria pinnatifida*, Pigment-protein compounds, Spectral-analysis