

莱茵衣藻 Nfr-4 突变株中类胡萝卜素含量的变化及其对藻生长的影响

徐田枚¹, 张洪涛¹, 吾甫尔·米吉提^{1,*}, 艾山江·阿不都拉^{1, 2}

¹ 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046; ²

199034,

摘要: 文章对相同条件下培养的莱茵衣藻野生型 CC-137 和八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)基因突变株 Nfr-4 的生长进行分析;并用反相高效液相色谱分析总有色类胡萝卜素以及叶绿素含量变化,结果表明两者生长的差异明显;Nfr-4 突变株的单细胞叶绿素和总有色类胡萝卜素含量高于野生型 CC-137 的。

关键词: 莱茵衣藻; Nfr-4 突变株; 类胡萝卜素

Change in Carotenoid Contents of *Chlamydomonas reinhardtii* Mutant Strain Nfr-4 and Its Effect on Alge Growth

XU Tian-Mei¹, ZHANG Hong-Tao¹, Ghopur MIJIT^{1,*}, Hasanjan ABUDULA¹, CHUNAEV AS²

¹ Collage of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; ² Department of Genetics and Breeding, Saint Petersburg State University University, Saint Petersburg 199034, Russia

Abstract: The differences of the growth curves and total contents of coloured carotenoid and chlorophyll between *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type CC-137 and mutant strain Nfr-4 were analyzed respectively. The changes in contents of carotenoid and chlorophyll were detected by reverse phase-HPLC. It was demonstrated that the total amount of chlorophyll and total coloured carotenoid were higher in mutant Nfr-4 than those in wild-type CC-137 under identical growth conditions, and the growth curves of the two strains were evidently different.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; mutant strain Nfr-4; carotenoid

莱茵衣藻为单细胞真核生物,隶属于绿藻门等鞭毛纲团藻目衣藻属(*Chlamydomonas*)。衣藻结构简单,培养条件简单且标准,生长周期短,生长迅速,光合效率高,因而具有“绿色酵母”之称。其光合色素和光合器官的结构与高等植物非常相似,以之得到的研究结果可以直接用于解释高等植物光合作用机制。因此,它已成为光合遗传研究中的模式生物。

类胡萝卜素是植物、藻类、真菌和细菌合成的四萜类化合物(四十碳类异戊二烯)的前体。类胡萝卜素在保护光合生物免受光氧化损伤中起作用。类胡萝卜素生物合成途径的研究已经比较深入,其中各种酶的基因也基本上得到克隆。高等植物番茄(Pecker 等 1992)、拟南芥(Wetzel 和 Rodermeil 1998)、大豆(Bartley 等 1991)和烟草(Fester 等 2002)及低等植物蓝藻(Chamovitz 等 1993)的八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)基因已经克隆。但至今尚未见有关 PDS 基因

发生突变的莱茵衣藻突变株的报道(McCarthy 等 2004)。

Nfr-4 是对达草灭(norflurazon)有抗性的莱茵衣藻突变株,与其它突变株不同的是在该突变株中不积累 PDS 的底物八氢番茄红素(phytoene) (吾甫尔·米吉提等 2003a)。对达草灭具有抗性的 7 个莱茵衣藻突变株(Nfr-1~Nfr-7)进行遗传学分析的结果表明,其抗性性质均由核基因发生突变导致的,且为隐型突变。生化遗传性质分析显示,除 Nfr-4 突变株外,其余 6 个抗性突变株积累八氢番茄红素(吾甫尔·米吉提等 2003b)。生化遗传分析也表明 Nfr-4 突变株为 PDS 基因突变株(吾甫尔·米吉提等 2003a),且为启动子突变(待发表资料)。McCarthy 等(2004)的报道中说没有找到莱茵衣藻

收稿 2006-11-15 修定 2007-05-23

资助 国家自然科学基金(30470917)。

* 通讯作者(E-mail: gmijit2001@yahoo.com.cn; Tel: 0991-8583063)。

PDS 基因突变的突变株, 他们推测莱茵衣藻 *PDS* 基因突变可能是致死突变, 迄今为止也未见到其它有关莱茵衣藻 *PDS* 基因突变株的报道。本文对莱茵衣藻野生型 CC-137 和 Nfr-4 突变株中各种类胡萝卜素、总有色类胡萝卜素以及叶绿素含量的变化差异作了对比实验。

材料与方法

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 野生型 CC-137 由圣彼得堡国立大学分子生物所提供, Nfr-4 突变株为我们课题组获得的达草灭抗性突变株。

培养莱茵衣藻的 TAP 培养基、L₂min 基本培养基、L₂min N⁻ 培养基的配制和培养均按照 Harris (1989) 书中的方法。

将 2 个品系 CC-137 和 Nfr-4 以相同的接种量 (约 5×10^6 个细胞) 接种到液体 TAP 培养基中, 光照条件 (光照度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下置于室温 18~22 的摇床上培养 ($120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。从接种当天开始, 每天于 15:00~16:00 之间对两品系的生物量进行血球板细胞计数。连续计数 10 d, 重复 3 次。

在固体 TAP 培养基中活化品系 3~5 d 后, 用液体 TAP 在试管内稀释少量藻体。将试管内的悬浮液用移液管移到含有 40~50 mL 液体 TAP 培养基的三角瓶中, 置于摇床中光照培养 3~4 d, 如用 L₂min 基本培养基培养则需要 4~5 d。用血球板细胞计数求得处于对数生长期的细胞浓度, 并从两品系的培养液中各取约 5×10^6 个细胞; 以 $3580 \times g$ 离心收集细胞, 用 95% 的二甲基甲酰胺将细胞悬浮, 并置于暗处 5 min; 以 $5370 \times g$ 离心 5 min, 取上清液; 用分光光度计分析上清液中叶绿素和总有色类胡萝卜素的含量。按计算公式: 总有色类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) = $[\text{OD}_{461} - (0.046 \times \text{OD}_{664})]$ 和叶绿素含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) = $\text{OD}_{664} \times 11.92$ 计算 (Chamovitz 等 1993)。

用反相高效液相色谱仪分析叶绿素和各种类胡萝卜素。实验方法和色谱条件按照文献 (McCarthy 等 2004) 的方法进行, 各色谱峰的鉴别分别根据保留时间以及各吸收峰的特征吸收光谱进行鉴定。

实验结果

1 莱茵衣藻的生长进程

图 1 表明, 野生型 CC-137 在第 6 天达到最高细胞浓度 7.35×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 此后细胞开始衰老, 细胞浓度降低。而此时 Nfr-4 突变株的细胞浓度高达 10.22×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 且细胞浓度继续升高, 最高细胞浓度 12.35×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 出现在第 8 天, 此后细胞浓度持续下降。

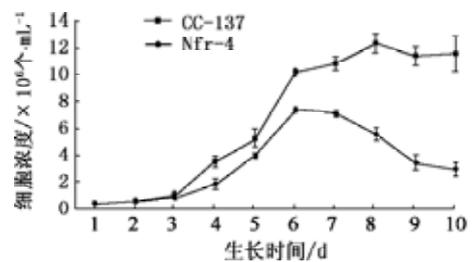


图 1 莱茵衣藻野生型 CC-137 和 Nfr-4 突变株的生长进程
Fig.1 The growth curves of *C. reinhardtii* wild-type CC-137 and mutant Nfr-4

2 莱茵衣藻的叶绿素和总有色类胡萝卜素总量的变化

相同的细胞浓度下, Nfr-4 突变株比野生型 CC-137 的颜色明显更绿一些, 这显示野生型 CC-137 与 Nfr-4 突变株的叶绿素和类胡萝卜素含量可能存在差异。色素含量的检测结果 (图 2) 表明, 相对于野生型 CC-137 而言, Nfr-4 突变株的叶绿素和总有色类胡萝卜素的含量都更高。野生型的叶绿素与总有色类胡萝卜素的比值为 1.514; 而突变株

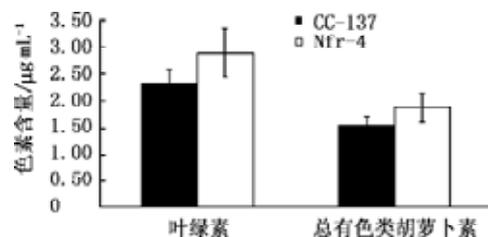


图 2 莱茵衣藻野生型 CC-137 与 Nfr-4 突变株中叶绿素和总有色类胡萝卜素含量的比较
Fig.2 Comparison of total coloured carotenoid and total chlorophyll in *C. reinhardtii* wild-type CC-137 and mutant Nfr-4

的叶绿素与总有色类胡萝卜素的比值为 1.536, 两者差异不大。

3 莱茵衣藻中叶绿素和各类胡萝卜素含量的变化
为了证实色素定性的正确性, 我们对各色素

的特征吸收光谱与文献中发表的吸收光谱(Rodrigo 等 2004)进行对比分析(表 1)。

Nfr-4 突变株的新黄质(neoxanthin)、叶黄素(lutein)和玉米黄质(zeaxanthin)的含量显著高于野生

表 1 莱茵衣藻中各类胡萝卜素和叶绿素的鉴定

Table 1 Identification of various carotenoid and chlorophyll in *C. reinhardtii*

| 色素 | 实测的吸收峰值 /nm | | | 保留时间 /min | 文献中的吸收峰值 /nm (Rodrigo 等 2004) | | |
|---------------|-------------|-----|-----|-----------|-------------------------------|-----|-----|
| | 吸收峰 | 吸收峰 | 吸收峰 | | 吸收峰 | 吸收峰 | 吸收峰 |
| 新黄质 | 414 | 436 | 466 | 7.3 | 412 | 434 | 464 |
| 紫黄质 | 418 | 441 | 471 | 8.0 | 418 | 440 | 470 |
| 花药黄质 | 421 | 444 | 470 | 9.2 | | | |
| 叶黄素 | 424 | 448 | 476 | 10.4 | 422 | 446 | 474 |
| 玉米黄质 | 424 | 452 | 477 | 11.6 | 424 | 452 | 478 |
| β -胡萝卜素 | 427 | 453 | 478 | 18.6 | 427 | 454 | 478 |
| 叶绿素 a | | | | 15.6 | | | |
| 叶绿素 b | | | | 14.6 | | | |

型 CC-137 的, 分别高出 56.25%、80.24% 和 183.33%; Nfr-4 突变株中的叶绿素 a 和叶绿素 b 也明显提高 20.36% 和 60.59%; 而紫黄质(violaxanthin)在 Nfr-4 突变株中含量只比野生型 CC-137 提高 6.42%。所测定的 8 种色素中只有 Nfr-4 突变株中的花药黄质(antheraxanthin)和 β -胡萝卜素的含量比野生型 CC-137 的低, 分别降低 4.03% 和 52.28%。

叶绿素和各类胡萝卜素在两品系中所占的比例也有变化。新黄质在野生型 CC-137 中占 11.03%, 在 Nfr-4 突变株中的比例为 13.67%; 叶黄素、玉米黄质和叶绿素 b 的比例在野生型 CC-137 中分别为 8.95%、0.84% 和 13.50%, 在 Nfr-4 突变株中分别升高到占总含量的 12.79%、1.89% 和 17.18%。野生型 CC-137 中紫黄质、花药黄质和叶绿素 a 的比例均比 Nfr-4 突变株中的高, 变化最显著的是 β -类胡萝卜素, 野生型 CC-137 占总量的 16.20%, 而 Nfr-4 突变株中只占 6.13%。

讨 论

有关莱茵衣藻叶绿素和类胡萝卜素生物合成的结构基因研究的报告已很多, 但莱茵衣藻类胡萝卜素生物合成过程中的关键酶基因——PDS 基因的表达调控及其突变对类胡萝卜素生物合成途径

造成的影响的研究尚未见报道(McCarthy 等 2004)。

我们的实验初步证明, 莱茵衣藻 Nfr-4 突变株为 PDS 的启动子突变株(待发表资料), 此种突变造成 PDS 表达水平的升高, 因而对该突变株的类胡萝卜素生物合成造成影响, 以致叶绿素和类胡萝卜素的含量明显有变化, 其中变化最为显著的是各种叶黄素的含量。

从本文结果可知, 在 Nfr-4 突变株中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量都明显升高, 并且其叶黄素循环库(紫黄质+花药黄质+玉米黄质)的含量也明显升高, 但相对于野生型 CC-137 而言, (紫黄质+花药黄质+玉米黄质)/叶绿素 a 和叶黄素/叶绿素 a 的比值却有所下降, 这可能是 Nfr-4 突变株中叶绿素 a 含量升高的幅度比紫黄质+花药黄质+玉米黄质和叶黄素的大造成的(表 2)。而在相同条件下新黄质/叶绿素 a 的比值却升高, 其原因可能是 PDS 的启动子突变造成 PDS 表达水平升高, 从而引起细胞中的 PDS 含量增加所致。因为 PDS 是多种类胡萝卜素生物合成的限速酶之一, 其含量的增加会促进其生物合成速率。新黄质和隐黄质分别是类胡萝卜素生物合成途径中 α -胡萝卜素分支与 β -胡萝卜素分支上的 2 个最终叶黄素产物, 叶黄素与叶黄素循环中的 3 种叶黄素都为类胡萝卜素生物合成途径的中间产物, 它们作为上游底物的

表2 莱茵衣藻 Nfr-4 突变株与野生型 CC-137 的各种色素之间比率

Table 2 Ratios of various pigment contents in *C. reinhardtii* mutant Nfr-4 and wild-type CC-137

| 品系 | 叶绿素 a/ 叶绿素 b | (紫黄质 + 花药黄质 + 玉米黄质)/ 叶绿素 a | 叶黄素 / 叶绿素 a | 新黄质 / 叶绿素 a |
|--------|--------------|----------------------------|--------------|-------------|
| CC-137 | 2.434±0.08 | 0.4866±0.001 | 0.3946±0.002 | 0.325±0.002 |
| Nfr-4 | 1.874±0.004 | 0.4551±0.007 | 0.2658±0.002 | 0.422±0.002 |

实验重复 4 次。

积累程度不及终产物的积累水平高。

Nfr-4突变株的叶绿素和总有色类胡萝卜素含量都明显高于野生型, 大约分别为野生型的 1.53 倍和 1.54 倍。但两者的叶绿素与总有色类胡萝卜素的比值几乎没有什么变化, 这可能是叶黄素和叶绿素是按一定的比例结合到光系统 I (PS I) 的捕光复合体 I (LHC I) 和光系统 II (PS II) 的捕光复合体 II (LHC II) 中的缘故。一般认为, 组装主要 LHC II 大约需要 7 个叶绿素 a、6 个叶绿素 b、2 个叶黄素和 1 个新叶黄质(Hobe 等 2000)。相对于主要 LHC II 言, 次要 LHC II 上结合的叶绿素较少, 叶绿素 a/ 叶绿素 b 的比值较高并且富含紫黄质。一般认为, 所有的 LHC 蛋白都至少含有 3 个类胡萝卜素结合位点, 这些结合位点偏向于与叶黄素、紫黄质和新黄质结合(Croce 等 1999)。叶黄素除了与叶绿素紧密相连, 是辅助捕光色素以外, 还能保护 LHC 免受光氧化损伤, 因而使突变株中的 LHC 量增多, 表现出相同细胞浓度的 Nfr-4 突变株颜色比野生型 CC-137 深。同时在相同的培养条件下两品系的生长明显不同, Nfr-4 突变株生长时间长, 细胞浓度高; 而野生型生长期较短, 细胞浓度相对较低。这些也证明各种类胡萝卜素具有极佳的保护作用, 这对光合生物生长显然是有利的。

莱茵衣藻 Nfr-4 突变株中类胡萝卜素总含量升高, 叶绿素含量也同时升高。叶绿素含量升高可能是类胡萝卜素特别是各种叶黄素含量升高的结果。叶黄素含量变化可能是类胡萝卜素生物合成途径中的关键酶基因 *PDS* 的启动子发生突变和提高该基因表达水平的结果。迄今, 人们对类胡萝卜素生物合成途径中的基因调控问题还知之甚少, 尚须深入探讨。

参考文献

- 吾甫尔·米吉提, Zayadan BK, 艾尔肯·热合曼, Chunaev AS (2003a). 达草灭对莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) 品系遗传后效应的研究. 新疆大学学报(自然科学版), 20 (2): 191~194
- 吾甫尔·米吉提, Zayadan BK, 艾尔肯·热合曼, Chunaev AS (2003b). 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) *nfr* 基因的显隐性突变性质及其与叶绿体 *psbA* 基因之间的相互作用分析. 遗传学报, 30 (7): 646~652
- Bartley GE, Viitanen PV, Pecker I, Chamovitz D, Hirschberg J, Scolnik PA (1991). Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 6532~6536
- Chamovitz D, Sandmann G, Hirschberg J (1993). Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis. J Biol Chem, 268: 17348~17353
- Croce R, Weiss S, Bassi R (1999). Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants. J Biol Chem, 274: 29613~29623
- Fester T, Schmidt D, Lohse S, Walter MH, Giuliano G, Bramley PM, Fraser PD, Hause B, Strack D (2002). Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. Planta, 216: 148~154
- Harris EH (1989). The *Chlamydomonas* Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego: Academic Press, 25~29
- Hobe S, Niemeier H, Bender A, Paulsen H (2000). Carotenoid binding sites in LHCIIb: relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. Eur J Biochem, 267: 616~624
- McCarthy SS, Kobayashi CM, Niyogi KK (2004). White mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* are defective in phytoene synthase. Genetics, 168: 1249~1257
- Pecker I, Chamovitz D, Linden H, Sandmann G, Hirschberg J (1992). A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to ζ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. Proc Natl Acad Sci USA, 89: 4962~4966
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Zacarias L (2004). Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. J Agric Food Chem, 52: 6724~6731
- Wetzel CM, Rodermeil SR (1998). Regulation of phytoene desaturase expression is independent of leaf pigment content in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol, 37: 1045~1053