

几种红藻和蓝藻的光合作用色素^①

仵小南¹ 张锦东² 张学成² 臧汝波¹

(¹中国科学院海洋研究所开放实验室, 青岛 266071)

(²青岛海洋大学海洋生物系, 266003)

收稿日期 1991年11月20日

关键词 海藻, 光合作用, 色素, 光谱学

摘要 分离纯化出几种海产红藻和一种蓝藻的光合作用色素, 并测定了它们的化学性质和光谱学性质。这些藻类是3种红藻: 多管藻(*Polysiphonia urceolata*)、椴叶藻(*Phycodrys* sp.) 和条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*); 蓝藻: 钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)。用羟基磷灰石柱层析法从上述藻类中分离到几种不同的藻胆蛋白。经 SDS-PAGE 及光谱测定, 发现条斑紫菜中的藻红蛋白不同于其它两种红藻。而椴叶藻中存在的两条藻红蛋白也有差异, 条斑紫菜和钝顶螺旋藻中的两种别藻蓝蛋白之间也有区别。叶绿素分析表明, 钝顶螺旋藻中叶绿素 a 的含量高于红藻中叶绿素 a 的含量。

绿色植物(高等植物和绿藻)和褐藻以叶绿素(包括叶绿素 a, b, c, d)为主要光合色素, 其光系统则是由叶绿素和载体蛋白形成的复合物构成。而系统分类学上属于低等植物的蓝藻和红藻(以及一些甲藻和隐藻), 它们的光系统除含有上述叶绿素—蛋白质复合物外, 还含有一类重要的光合作用天线色素系统, 即藻胆蛋白(Phycobiliproteins)。藻胆蛋白起着吸收和传递光能的作用, 按其光谱性质分为3种类型: 藻红蛋白(Phycoerythrin)、藻蓝蛋白(Phycocyanin)和别藻蓝蛋白(Allophycocyanin)。近年来, 它们的性质、结构和功能受到许多人的重视, 得到愈来愈多的研究^[1, 2, 6, 7, 8]。

1 材料和方法

红藻条斑紫菜、椴叶藻和多管藻来自青岛海滨, 蓝藻钝顶螺旋藻为本室培养。

将藻体置容器中, 加蒸馏水浸没, 密封置冰箱中自溶提取。数日后, 将提取液低速离心(3 000r/min)5min, 上清液即为藻胆蛋白粗提液。采用羟基磷灰石柱层析分离藻胆蛋白^[3]。

SDS-PAGE 在室温下进行 3h(DF-C 型电泳仪)。管电流 3mA, 电泳后的胶条用 0.25%(v/v)考

① 国家自然科学基金资助课题。

PE——藻红蛋白, PC——藻蓝蛋白, APC——别藻蓝蛋白; SDS-PAGE——十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

马苏亮兰 R₂₅₀ 染色, 脱色液成分为甲醇:冰醋酸:水=40:7:53(v/v/v)。分子量标准蛋白为 Sigma 公司产品 (High molecular weight standard mixture)。

为了进一步了解蓝藻和红藻这两种藻类在系统学及光合生物进化中的地位和作用, 我们初步分离和鉴定了几种我国常见藻类中光合色素的组成, 旨在从光合生物进化的角度研究它们的性质。

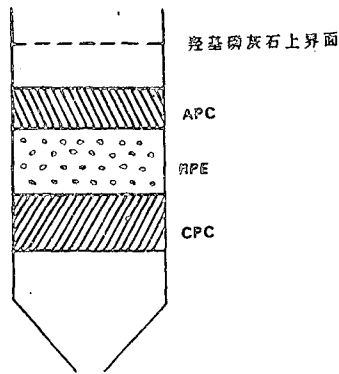


图 1 条斑紫藻藻胆蛋白在层析柱上成层

Fig. 1 Layers of *P. yezoensis* phycobiliproteins on the column of hydroxyapatite

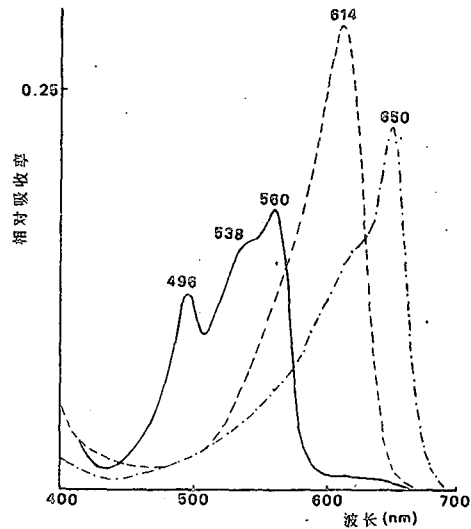


图 2 条斑紫藻藻胆蛋白吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of *P. yezoensis* phycobiliproteins
—PE₁; - - - PC₁; · · · · · APC

岛津 uv-240 分光光度计和日立-850 荧光分光光度计测定组分的吸收光谱和荧光光谱。

用 Arnon (1949) 法测叶绿素浓度, Bradford (1976) 法测蛋白质浓度, 以小牛胸腺白蛋白为标准蛋白。

2 结果

用羟基磷灰石柱层析法和合适浓度的磷酸洗脱液, 可以从藻胆蛋白粗提液中分离出较纯的组分。这些藻的藻胆蛋白在柱层析上被洗脱反映如下:

2.1 条斑紫藻

上样后, 样品迅速成层 (图 1)。用 0.001~0.005 mol/L 洗脱液 (0.001~0.2 mol/L 磷酸缓冲液, pH6.7, 含 0.2 mol/L NaCl) 可以先将 C-藻蓝蛋白分离出来; 接着用 0.05 mol/L 洗脱液可得到 R-藻红蛋白; 最后, 用 0.1~0.2 mol/L 洗脱液可将别藻蓝蛋白洗脱出来。

2.2 拟叶藻

用 0.1 mol/L 洗脱液可以分离出较红色的 R-藻红蛋白 PE₁; 然后, 用 0.2 mol/L 洗脱液可获得浅红色的 R-藻红蛋白 PE₂。

2.3 多管藻

R-藻红蛋白可用 0.1 mol/L 洗脱液洗脱。

2.4 钝顶螺旋藻

用 0.1 mol/L 洗脱液可先分离出蓝色的 C-藻蓝蛋白;淡孔雀蓝色的别藻蓝蛋白可用 0.2 mol/L 洗脱液洗脱。

用此法分离藻胆蛋白粗提液,可在 3h 内收集到全部组分。这时,柱近白色,说明分离得较完全。

藻胆蛋白粗提液经 SDS-PAGE 所显示的条带数目和颜色各不相同。条斑紫菜显示出 4 条带,自上而下,分别是孔雀蓝色的别藻蓝蛋白带、2 条红色的 R-藻红蛋白带、蓝色的 C-藻蓝蛋白带。橡叶藻显示出 2 条明显的 R-藻红蛋白带。多管藻中则有 1 条红色的 R-藻红蛋白带。钝顶螺旋藻只有 2 条带,上面的一条为孔雀蓝色的别藻蓝蛋白带,下面的一条为蓝色的藻蓝蛋白带。

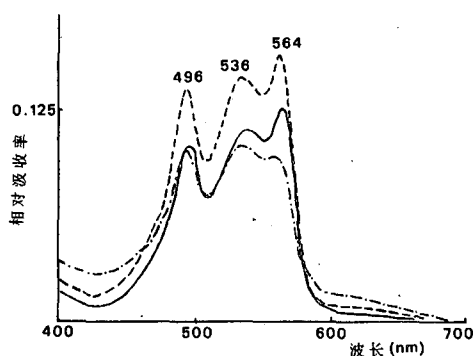


图 3 橡叶藻和多管藻藻胆蛋白吸收光谱
Fig. 3 Absorption spectra of phycoerythins from *Phycodryis* sp. and *P. Mrecolata*

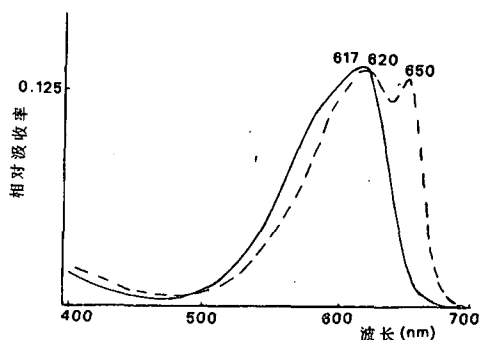


图 4 钝顶螺旋藻藻胆蛋白吸收光谱
Fig. 4 Absorption spectra of phycobiliproteins from *S. platensis*
—PC, ---APC

经羟基磷灰石柱层析纯化的藻胆蛋白 SDS-PAGE,除条斑紫菜 R-藻红蛋白 2 条色带外,其余组分都只有 1 条色带。

与标准蛋白 SDS-PAGE 结果相对照,得到各种藻胆蛋白的分子量:

两种红藻 条斑紫菜和橡叶藻 C-藻蓝蛋白的分子量分别为 49.3KD 和 49.0KD;钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的分子量为 46.0KD。3 种红藻的 R-藻红蛋白的分子量为:条斑紫菜分别是 47.0KD 和 42.1KD,多管藻是 47.9KD,橡叶藻中 PE₁ 和 PE₂ 的分子量分别是 47.0KD 和 46.1KD。

光谱分析结果表明:条斑紫菜、橡叶藻和钝顶螺旋藻的藻蓝蛋白属 C 型藻蓝蛋白,在 615~620nm 间有一个吸收峰(图 2、图 4)。

根据 R 型藻红蛋白的分类,吸收光谱为 2 峰—肩型的 R-藻红蛋白为 I 型,3 峰型的 R-藻红蛋白属 II 型。条斑紫菜的 R-藻红蛋白属 I 型,其吸收光谱有两个峰(496nm、561nm)和 538nm 处一肩峰(图 2)。橡叶藻和多管藻中 R-藻红蛋白在 496nm、536nm 和 564nm 处各有一峰,因而属 II 型

(图 3);且橡叶藻中存在着两种不同分子量的 R-藻红蛋白 PE₁ 和 PE₂,两者吸收光谱峰一致,但波形不同,反映出藻红胆素和藻尿胆素含量不同。

条斑紫菜和钝顶螺旋藻的别藻蓝蛋白在光谱性质上也有不同。条斑紫菜的别藻蓝蛋白在 65nm 处有一个吸收峰(图 2),而钝顶螺旋藻的别藻蓝蛋白则在 620nm 和 650nm 处各有 1 吸收峰,且 A₆₂₀>A₆₅₀(图 4)。

3 种红藻的 R-藻红蛋白的荧光发射峰为 583nm 或 584nm;荧光激发峰,条斑紫菜为 506nm 和 571nm,另两种为 505nm 和 573nm 或 574nm。

条斑紫菜的 C-藻蓝蛋白的荧光发射峰为 647nm,激发峰为 605nm;钝顶螺旋藻的 C-藻蓝蛋白的荧光光谱差别不太,其发射峰为 652nm,激发峰为 632nm。这两种藻的别藻蓝蛋白的荧光特性也有些区别。条斑紫菜别藻蓝蛋白的发射峰为 670nm,钝顶螺旋藻的为 667nm;激发峰则分别为 658nm 和 668nm。

条斑紫菜和钝顶螺旋藻的总蛋白量和藻胆蛋白含量见表 1。条斑紫菜中藻胆蛋白以 R-藻红蛋白为主,因而藻体泛红。钝顶螺旋藻中 C-藻蓝蛋白多于别藻蓝蛋白。

表 1 几种藻中总蛋白量和藻胆蛋白含量

Tab. 1 Total protein and phycobiliprotein contents of

| 藻种 | 胆蛋白质 总胆蛋白质 (%) | | | 总胆蛋白质 总蛋白质 (%) |
|-------|-------------------|------|------|-------------------|
| | PE | PC | APC | |
| | 条斑紫菜 | 42.6 | 29.7 | |
| 钝顶螺旋藻 | / | 73.9 | 26.1 | 10.2 |

表 2 几种藻中的叶绿素 a 含量

Tab. 2 Chlorophyll a contents of species

| 藻种 | 叶绿素 a 含量 | | |
|-------|------------------|------------------|----------------|
| | µg Chl/g (鲜重) | µg Chl/g (干重) | nmol/g (鲜重) |
| 橡叶藻 | 29.8 | 248.3 | 33.41 |
| 条斑紫菜 | 33.37 | 333.7 | 37.41 |
| 钝顶螺旋藻 | 236.6 | 1 281.1 | 208.5 |

几种藻的叶绿素 a 含量见表 2。蓝藻门的钝顶螺旋藻的叶绿素 a 含量大大高于红藻门的多管藻和橡叶藻的叶绿素 a 含量,因而钝顶螺旋藻呈蓝绿色。

3 讨论

本实验用羟基磷灰石柱层析成功地分离出 4 种藻的藻胆蛋白。分离条件诸如羟基磷灰石颗粒大小、洗脱液浓度、各组分洗脱顺序、时间等视不同藻种而有区别。因此,适当地选用合适条件是十分重要的。只有当条件合适时,才能达到良好的分离效果。用 SDS-PAGE 分析,发现用羟基磷灰石分离的组分,除条斑紫菜的 R-藻红蛋白在电泳行为上呈两条带外,其余所有的组分都只呈现一条带,说明这种分离方法速度快、简便易行、藻胆蛋白纯度好、效果佳,是提取较多量藻胆蛋白的有效途径。

分子量分析,发现红藻中 C-藻蓝蛋白的分子量基本接近,但它们与蓝藻 C-藻蓝蛋白的分子量大小有一定的区别。而几种 R-藻红蛋白的分子量则较为复杂。这些与其他作者所得的结果既有相似之处^[7],也有差距较大的^[6]。这些区别的原因尚不清楚。

3种C-藻蓝蛋白的吸收最大值略有差异,从612nm~616nm不等,这些数据与kursar等(1983)的结果相似,但与Gantt(1981)和Glazer(1985)的结果比较则相对蓝移,可它们的荧光发射最大值则比其他人的结果(Gantt, 1981; Glazer, 1985; Kursar, 1983)要大大红移。从上述结果,我们推测这些差异可能反映了不同来源的C-藻蓝蛋白结构上的微细区别。

条斑紫菜的别藻蓝蛋白的吸收最大值与他人的结果相似,但钝顶螺旋藻的则相差较大。和其他作者的结果(Gantt, 1981; Glazer, 1985; Kursar, 1983)相比,我们所获得的别藻蓝蛋白的荧光发射最大值红移约10nm,这也许是测试所用缓冲液的组成、离子强度及pH值的差异造成。

从吸收光谱的最大值看,所有的R-藻红蛋白具有相似的结果,但仍有一定区别。如橡叶藻中存在着两种光谱性质有差别的藻红蛋白。柱层析上缓冲液的浓度不同,收集液颜色也不同:先洗脱下的藻红蛋白更红些。从光谱特性来看,虽然它们的吸收峰值一致,但峰形不同:先洗脱下的藻红蛋白PE₁在562nm处峰形最高且尖,534nm处峰形次之且较钝,494nm处峰形最低且尖;而后洗脱下的藻红蛋白PE₂,最高峰值位于534nm处且峰形较钝,494nm处次之且峰形较尖,最低的是562nm处且峰形较钝。从荧光光谱中,也可见两者的差异:先洗脱下的藻红蛋白PE₁的最大荧光发射峰在584nm处,激发峰分别是505nm、(553nm)、573nm;后洗脱下的藻红蛋白PE₂的最大荧光发射峰位于583nm处,小于前者1nm,激发峰分别是505nm、(550nm)、574nm,也不同于前者。从上述橡叶藻藻胆蛋白粗提液电泳结果中见到两条红色色带,这说明橡叶藻中存在两种不同的Ⅱ型藻红蛋白。这种情况于其它藻类也有类似报道,其原因尚需进一步实验揭示。

光谱性质是藻胆蛋白的重要特性,反映了藻胆蛋白的差别。各种不同的藻类在藻胆蛋白光谱特性上的区别正反映了各物种本身的差异性,这与其进化地位密切相关。这种相关性在红藻、蓝藻中具有分类学的意义。

在钝顶螺旋藻的藻胆蛋白中,C-藻蓝蛋白占藻胆蛋白总量的73.9%,而别藻蓝蛋白占26.1%,二者的比率大约为3:1;而条斑紫菜中R-藻红蛋白、C-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的比率大约为4:3:3,和Kursar(1983)用海产红藻江篱(*Gracilaria tikvahiae*)做的结果(PE:PC:APC=3:2:1)有差异。

除藻胆蛋白外,叶绿素a的含量在不同藻种中亦有差异,但红藻和蓝藻间的差异明显。如钝顶螺旋藻中叶绿素a的含量为每克鲜重208nmole,而橡叶藻中仅为37nmole。这种差异也许表明了叶绿素a在光合作用机理中所处的不同地位。

参考文献

- [1] 曹茂林,1990.藻胆蛋白.植物生理学通讯 5:72~78.
- [2] 曾繁杰、杨紫萱、蒋丽金,1985.多管藻中R-藻红蛋白的性质和趋微结构.生物化学与生物物理学报 17(1):97~101.
- [3] 潘忠正、周百成、曾呈奎,1987.青岛海产红藻R-藻红蛋白光谱特性的比较研究.海洋与湖沼 18(5):419~425.
- [4] Aron, D. I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- [5] Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- [6] Gantt, E., 1981. Phycobilisomes. *Ann Rev Plant Physiol.* 32:327-347.
- [7] Glazer, A. A., 1985. Light harvesting by phycobilisomes. *Ann Rev Biophys Biophys. Chem.* 14: 47-77.
- [8] Kursar, T. A., J. Van der Meer and R. S. Albert, 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. J. Biochemical analyses of pigment mutations. , *Plant Physiol.* 73:353-360.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS FROM RED AND BLUE-GREEN ALGAE

Wu Xiaonan¹, Zhang Jindong², Zhang Xuecheng² and Zang Rubo¹

(¹EMBL, Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao, 266071)

(²Ocean University of Qingdao, 266003)

Received: Nov. 20, 1991

Key Words: Blue-green algae; Red algae; Photosynthetic pigments

Abstract

The photosynthetic pigments three marine red algae and one blue-green alga have been isolated and characterized. These algae are of *Polysiphonia urceolata*, *Phycodrys* sp., *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), and *Spirulina platensis*. By column chromatography of hydroxyapatite, C-phycoerythrin, R-phycoerythrin and allophycoerythrin were purified. C-phycoerythrin from *P. yezoensis* and *Phycodrys* sp. were similar each other, but different from that of the blue-green alga *S. platensis* in molecular weights, absorbance and fluorescence properties. Allophycoerythrin from *P. yezoensis* and *S. platensis* were a little distinct from each other in absorbance and fluorescence spectra. Five R-phycoerythrin with different molecular weights were compared in their absorbance and fluorescence characterization. Chlorophyll *a* in *S. platensis* is much more than that in *P. yezoensis* and *Phycodrys* sp.

