

钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白和多管藻 R-藻红蛋白的分离纯化及摩尔消光系数的测定*

王广策 周百成 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071)

提要 1993年11月~1994年1月用简单的羟基磷灰石柱层析法从多管藻中分离纯化了R-藻红蛋白和从钝顶螺旋藻中纯化了C-藻蓝蛋白,它们的纯度(指可见光部分的最大吸收与280nm处吸收值之比)可分别达到6(R-藻红蛋白)和5.5(C-藻蓝蛋白)。由于不同藻种的同种藻胆蛋白的摩尔消光系数不同,所以应用凯氏定氮法并结合可见光的吸收值测定了上述两种藻胆蛋白的摩尔消光系数,钝顶螺旋藻C-藻蓝蛋白为 $1.853 \times 10^6 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (620nm),多管藻R-藻红蛋白为 $1.796 \times 10^6 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (498nm),为藻胆蛋白的浓度测定提供了方便。

关键词 C-藻蓝蛋白,R-藻红蛋白,摩尔消光系数

本文报道了用较为简单的方法从钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)中纯化C-藻蓝蛋白和从多管藻(*Polysiphonia urceolata*)中纯化R-藻红蛋白,并测定了各自在可见光区域吸收峰位置的摩尔

* 实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第109号。
中国科学院海洋研究所调查研究报告第2652号。
收稿日期:1995年4月27日

消光系数,为研究和充分利用藻胆蛋白奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 所用试剂均为国产分析纯,羟基磷灰石为自制。

1.2 钝顶螺旋藻生长于修改的 Zarrouk 氏培养基中(其中 NaHCO_3 和 K_2HPO_4 均减半),室温、自然光照、通气培养。10d 后,离心收集藻体。

多管藻采自青岛沿海太平角海区。

1.3 离心收集钝顶螺旋藻(800g, 5min),蒸馏水洗藻体两次后,加入少量蒸馏水,反复冻融,离心去残渣(800g, 10min);上清液即为 C-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的粗提液。

海边采集的多管藻,自来水和蒸馏水各洗两遍后置大烧杯中,加入适量的蒸馏水(以将藻体浸没为准),4℃ 冰箱过夜,次日,离心(800g, 10min)弃残渣,上清液即为 R-藻红蛋白的粗提液。

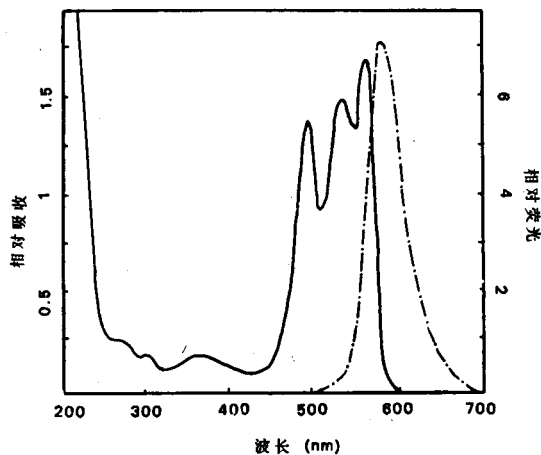


图 1 多管藻 R-藻红蛋白吸收光谱(——)和室温荧光发射光谱(---·---·)

激发波长 498nm,带宽 5nm

Fig. 1 Absorption (——) and emission (---·---·) spectra of *Polysiphonia urceolata* R-phycoerythrin at room temperature

Excitation wavelength at 498nm, bandpass is 5nm

在上述的两种藻胆蛋白粗提液中加入固体 NaCl 并使其终浓度为 0.2mol/L,随后将其滴加至已经过 0.001mol/L(pH6.8)磷酸盐缓冲液平衡过的羟基磷灰石柱上(1cm×2cm),在洗脱过程中不断增加洗脱液的离子强度,收集红色和蓝色组分,然后再分别过一次羟基磷灰石柱,洗脱的红色组分即为纯的 R-藻红蛋白,蓝色组分为纯的 C-藻蓝蛋白。

上述的磷酸盐缓冲液均含 0.2mol/L NaCl。

1.4 吸收光谱采用岛津 UV-240 型扫描式分光光度计测定,吸收池的光径为 1cm。室温荧光发射光谱用日立-850 型荧光分光光度计测定,激发光和发射光的狭缝均为 5nm。

1.5 根据吸收光谱确定藻胆蛋白在可见光区域的吸收峰位置。藻胆蛋白溶液分为两份,一份冷冻干燥后用作氮元素分析,另一份用于测定可见光区域吸收峰位置的吸收值。

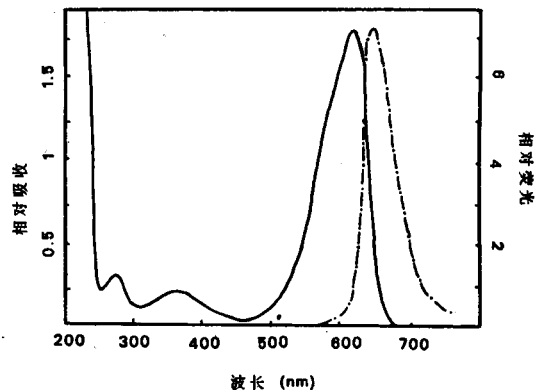


图 2 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白吸收光谱(——)和室温荧光发射峰(---·---·)

激发波长 620nm,带宽 5nm

Fig. 2 Absorption (——) and emission (---·---·) spectra of *Spirulina platensis* C-phycoerythrin at room temperature

Excitation wavelength at 620nm, bandpass is 5nm

氮元素分析采用凯氏定氮法。不同稀释度的藻胆蛋白溶液在可见光区域吸收峰位置的吸收值用 754-分光光度计测定。

2 结果与讨论

2.1 上述的藻胆蛋白粗提液分别过两次羟基磷灰石柱后,钝顶螺旋藻的 C-藻蓝蛋白的 $A_{620}/A_{280}=5.5$,多管藻 R-藻红蛋白的 $A_{565}/A_{280}=6$,均已超过了一般判定藻胆蛋白纯度的比例。即 C-藻蓝蛋白 $A_{620}/A_{280} \geq 4.0$,R-藻红蛋白 $A_{565}/A_{280} \geq 4.5$ ^[4]。

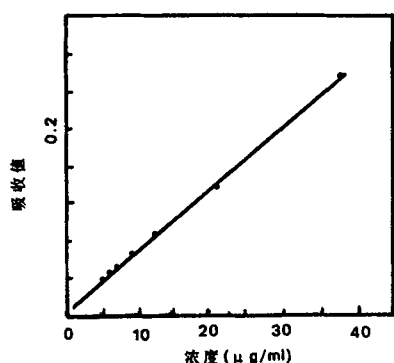


图3 多管藻 R-藻红蛋白溶液不同浓度的吸收曲线
Fig. 3 Relationship between absorbance and concentration of *Polysiphonia urceolata* R-phycoerythrin

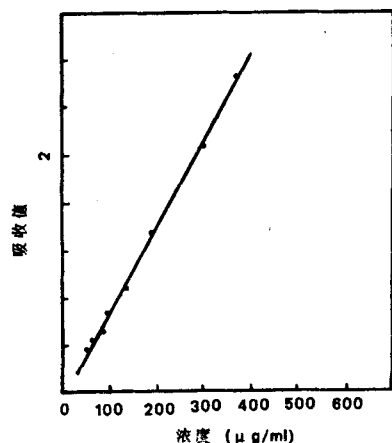


图4 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白溶液不同浓度的吸收曲线
Fig. 4 Relationship between absorbance and concentration of *Spirulina platensis* C-phycoerythrin

纯化后的 C-藻蓝蛋白最大吸收峰位于 620nm,R-藻红蛋白在可见光区域的吸收峰为 498nm,535nm 和 565nm(见图 1 和图 2)。

藻胆蛋白的分离过程应尽可能在弱光下进行,避免强光照射,否则有可能使可见光的最大吸收值与 280nm 处的吸收值之比降低。用羟基磷灰石分离藻胆蛋白简单方便而且纯度高,实验成败的关键在于所选用的羟基磷灰石,特别是其粒度的大小。作者自制的羟基磷灰石分离效果很好。

2.2 各取 1ml 纯化的 R-藻红蛋白和 C-藻蓝蛋白溶液冷冻干燥后称重并进行氮元素分析,其中 C-藻蓝蛋白的含氮量为 14.375%,R-藻红蛋白的含氮量为 9.780%。此冷冻干燥的样品包括藻胆蛋白和一些无机盐。根据蛋白质含氮量为 16% 计算,R-藻红蛋白溶液的浓度为 378.975 $\mu\text{g}/\text{ml}$,C-藻蓝蛋白溶液的浓度为 3773.438 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。将上述的 C-藻蓝蛋白溶液稀释 20 倍后测 $A_{620}=1.3246$,R-藻红蛋白溶液稀释 10 倍后测 $A_{498}=0.2521$,再进行不同的稀释后测其吸收值,它们均成线性关系(见图 3,4)。已知钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的最小分子量为 44KD^[3]($\alpha\beta$),完整的 C-藻蓝蛋白的亚基组成为 ($\alpha\beta$)₆^[5,6],所以其分子量为 264KD。按照多管藻 R-藻红蛋白晶体密度计算其分子量为 270KD。根据 Lambert-Beer 定律将其换算成摩尔消光系数,多管藻 R-藻红蛋白为 $1.796 \times 10^6 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (498nm),钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白为 $1.853 \times 10^6 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (620nm)。

将上述的结果与已发表的其他藻类中同种藻胆蛋白相比较,多管藻 R-藻红蛋白的摩尔消光系数与之相差较小,而钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白则相差较大。例如,倒卵圆形隐丝藻(*Cryptomonas obovata*)的 R-藻红蛋白在 498nm 处的摩尔消光系数为 $3.013 \times 10^6 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$,集胞藻 6301 (*Synechocystis* sp.) 六聚体的 C-藻蓝蛋白在 621nm 处的摩尔消光系数为 $3.331 \times 10^6 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ^[4]。其原因可能是不同种间的同种藻胆蛋白其分子量大小有别,亚基的聚集态各不相同,同时,藻胆蛋白所溶解的缓冲液对其摩尔消光

系数也有影响,例如作者测定的藻胆蛋白均溶解在 0.03mol/L(pH6.8)磷酸盐缓冲液中,而文献中的测定条件是:倒卵圆形隐丝藻 R-藻红蛋白溶解在 0.01mol/L(pH7.0)醋酸铵缓冲液中,集孢藻 6301 的 C-藻蓝蛋白溶解在 0.025mol/L(pH6.8)醋酸缓冲液中。

参考文献

[1] 常文瑞、万柱礼、宋海卫、张季平等,1995。中国科学 B 辑 25(1):49~53。

- [2] Binder, A., Wilson, K., Zuber, H., 1972. *FEBS Let.* 20, 111-116.
- [3] Boussiba, S. and Richmond, A. E., 1979. *Arch. Microbiol.* 120, 155-159.
- [4] Glazer, A. N. ed. M. D. Hatch, N. K. Boardman, 1981. *The Biochemistry of Plants*, New York, Academic 8(51), 521.
- [5] Schirmer, T., Bode, W., Huber, R., Sidler, W. & Zuber, H., 1985. *J. Mol. Biol.* 184, 257-277.
- [6] Schirmer, T., Huber, R., Schneider, M., Bode, W., Miller, M. & Hackert, M. L., 1986. *J. Mol. Biol.* 188, 651-676.

PURIFICATION OF C-PHYCOCYANIN FROM *Spirulina platensis* AND R-PHYCOERYTHRIN FROM *Polysiphonia urceolata* AND DETERMINATION OF THEIR MOLAR EXTINCTION COEFFICIENT

Wang Guangce, Zhou Baicheng and C. K. Tseng

(*Experimental Marine Biological Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Received: Apr. 27, 1995

Key Words: C-phycoyanin, R-phycoerythrin, molar extinction coefficient

Abstract

From Nov. 1993 to Jan. 1994, C-phycoyanin with purity of 5.5 (A_{620}/A_{280}) and R-phycoerythrin with purity of 6 (A_{565}/A_{280}) were separated from *Spirulina platensis* and *Polysiphonia urceolata* with the method of hydroxylapatite chromatography. The molar extinction coefficient of the phycobiliprotein which is extracted from different algae is different, so we combine Kjeldahl method to the absorbance at visible region to determine the molar extinction coefficients of *Polysiphonia urceolata* R-phycoerythrin and *Spirulina platensis* C-phycoyanin at visible region. Their molar extinction coefficients are $1.853 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (C-phycoyanin at 620 nm) and $1.796 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (R-phycoerythrin at 498nm).