

# 条斑紫菜中 R-藻红蛋白的纯化 及其 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的分离与发色团 含量的测定\*

程凌江 蒋丽金 马金石

(中国科学院感光化学研究所, 北京)

**提要** 本文从条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 中提取了藻胆蛋白, 找到了一种新的简便有效的提纯 R-藻红蛋白的方法。用 Bio-Gel P300 柱进一步纯化后, 得到了高纯度的 R-藻红蛋白。用 Bio-Rex 70 柱分离 R-藻红蛋白, 得到了它的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基溶液。对亚基溶液进行的一些光谱分析表明亚基溶液具有 R-藻红蛋白的一些性质。本文对  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的发色团含量进行了测定:  $\alpha$  亚基含 2 个藻红胆素,  $\beta$  亚基含 3 个藻红胆素和 1 个藻尿胆素。

藻胆蛋白是藻类吸收光能进行光合作用的重要辅助色素。在藻细胞内, 藻胆蛋白吸收太阳光能后, 高效地将能量传递到叶绿素 a。藻胆蛋白的吸收光谱主要在 450—650 nm 之间, 正好填补了叶绿素 a 吸收不到的光谱空白。由于藻胆蛋白和叶绿素 a 的协同作用, 藻类可以更有效地利用光能进行光合作用<sup>[1]</sup>。

藻胆蛋白根据其光谱性质和来源主要分为藻红蛋白、藻蓝蛋白和变藻蓝蛋白等。根据光谱的差异, 藻红蛋白又可分为 R-, B-, b-, C-等<sup>[2]</sup>。我们对人工栽培条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 的藻胆蛋白进行了研究。

## 一、材料与方 法

### 1. R-藻红蛋白的制备

条斑紫菜粗蛋白的制备与多管藻 (*Polysiphonia urceolata*) 类似<sup>[3]</sup>。取未经加热或光照的条斑紫菜, 用水浸泡、过滤, 制得澄清的蛋白质溶液, 用硫酸铵沉淀此溶液中的蛋白质, 得到粗蛋白, 粗蛋白保存于 4°C 冰箱之中。将在 4°C 以下存放 20 天以上的粗蛋白沉淀与 15% 饱和度的硫酸铵溶液拌均、静置, 离心分离得到 R-藻红蛋白的红色沉淀。将沉淀溶于蒸馏水中, 测紫外-可见光谱, 表明此 R-藻红蛋白较纯 ( $A_{560\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 4.0$ )。

### 2. 凝胶过滤

样品在加样前用洗脱液透析至平衡。凝胶过滤在  $\phi$  5 cm  $\times$  75 cm Bio-Gel P 300 (Bio-Rad Corp., 400 mesh) 凝胶柱上进行。洗脱液为 pH = 6.8 的 0.1 mol/L 磷酸

\* 国家自然科学基金资助。曾繁杰先生对本文的修改提出了宝贵意见, 特此致谢。  
收稿日期: 1989年2月14日。

盐缓冲溶液(其中含 1 mmol/L 叠氮钠和 1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇),洗脱液流速在 15ml/h 左右,温度在 10℃ 左右。

### 3. 等电聚焦电泳

选用内径 2 mm、长 15 cm 的玻璃管作为电泳管。两性电解质采用 Pharmacia 公司生产的 Pharmalyte 两性电解质, pH 范围为 3—10, 4—6.5, 2.5—5, 混合比 1:2:2。凝胶浓度 5%, 交联度 5%, 两性电解质在凝胶中的总含量 1/16 (V/V), 体系中尿素浓度 8 mol/L。在 450 V 恒压下电泳 15 h。取出凝胶, 测量蛋白带的 pH 值。普通电泳, 依据文献[1]。

### 4. Bio-Rex 70 离子交换柱层析

Bio-Rex 70 是一种弱酸性阳离子交换树脂。在 pH 为 2.5 的条件下, 可以用它对变性的 R-藻红蛋白进行分离。R-藻红蛋白的变性是用冰醋酸将它的溶液调 pH 至 2.5。Bio-Rex 70 柱用 5% 的醋酸水溶液预平衡, 加 R-藻红蛋白样品后依次用从低到高的不连续尿素浓度梯度溶液淋洗 (pH = 2.5, 尿素的浓度分别是 4, 6, 7 和 8 mol/L)。在 6 和 8 mol/L 两个梯度分别得到  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基, 并将之用 Bio-Rex 70 柱在相同的条件下纯化, 其纯度用电泳和等电聚焦检查。

### 5. R-藻红蛋白的 $\alpha, \beta$ 亚基的浓度

采用文献[5]方法。用 Bio-Gel P 300 纯化过的 R-藻红蛋白透析除盐后冰冻干燥, 精确称重配制标准浓度的蛋白溶液, 制作标准曲线。用透析方法除尽亚基溶液中的尿素。在透析过程中, 使溶液的体积基本保持不变。

用 MPF-4 荧光分光光度计测荧光光谱, 用日立 340 型、日立 557 型或 Hewlett Packard 紫外-可见分光光度计测紫外-可见光谱, 均在室温测试。

## 二、结果和讨论

### 1. R-藻红蛋白的分离纯化

分离条斑紫菜中的 R-藻红蛋白与 C-藻蓝蛋白和变藻蓝蛋白是利用它们的物理性质的差异进行的。据文献报道, 各种藻胆蛋白在低浓度的硫酸铵溶液中可以缓慢地生成晶体, 但不同的藻胆蛋白生成晶体的条件是有差别的<sup>[6,10]</sup>。向条斑紫菜藻胆蛋白溶液中加入固体硫酸铵, 当溶液中硫酸铵的饱和度达到 45% 以上时, 溶液中的藻胆蛋白便凝聚而形成无定型沉淀。这种沉淀在 4℃ 下保存约 20 天以后, 又转化为晶型沉淀。对这种转化用 100 倍的显微镜观察表明, 微小晶体由单一的藻胆蛋白组成, 并且红色的微晶只由 R-藻红蛋白组成, 蓝色的微晶由 C-藻蓝蛋白组成。这说明, 形成晶型沉淀后, 已经实现了 R-藻红蛋白与 C-藻蓝蛋白和其他蛋白的分离。实验表明, R-藻红蛋白和 C-藻蓝蛋白微晶在浓度较低的硫酸铵溶液中的溶解性是有差异的: 最容易溶解的是结构比较松散的部分, 其主要成分是变藻蓝蛋白和杂蛋白, 其次是 C-藻蓝蛋白微晶, 溶解度最小的是 R-藻红蛋白微晶。因此, 选择适当浓度的硫酸铵溶解 C-藻蓝蛋白和无定型藻胆蛋白, 就可得到 R-藻红蛋白的微晶。实验表明, 所用硫酸铵溶液的饱和度以 15% 效果最佳。由此得到的藻红蛋白已有较高纯度 ( $A_{560\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 4.0$ ), 再在 Bio-Gel P 300 柱上进一步纯化, 可得到高纯 R-藻红蛋白 ( $A_{560\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 8.1$ ) (图 1)。与传统方法不同<sup>[1,3]</sup>, 本文方

法可以得到大量的藻红蛋白,不受仪器限制。

用此方法制备多管藻的 R-藻红蛋白,在类似的条件下也获得了成功。

## 2. R-藻红蛋白亚基的制备及其性质

电泳分析表明,条斑紫菜 R-藻红蛋白的  $\alpha$ ,  $\beta$  亚基具有相近的分子量和不同的等电点<sup>[3]</sup>。由于 R-藻红蛋白的亚基具有不同的电荷性质,可以利用离子交换树脂分离 R-藻红蛋白的亚基。Bio-Rex 70 可以用于分离条斑紫菜的 R-藻红蛋白的  $\alpha, \beta$  亚基(图 2)。 $\alpha$  亚基溶液为紫色,  $\beta$  亚基溶液为红色。在亚基溶液的紫外-可见光谱(图 3)的可见部分  $\alpha$  亚基只有一个吸收峰(555nm),  $\beta$  亚基有两个吸收峰(498 nm, 555 nm)。在 pH = 2.5 的尿素溶液中两个亚基都没有荧光。

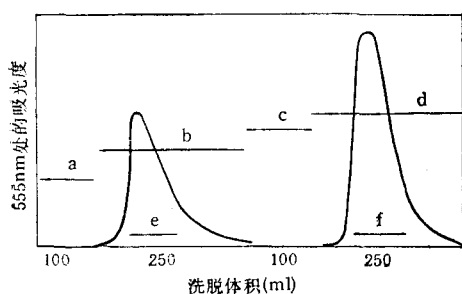


图 2 R-藻红蛋白在 Bio-Rex 70 柱上的淋洗图

Fig.2 The elution of R-phycoerythrin from Bio-Rex 70 column

(尿素浓度: a. 4mol/L; b. 6mol/L; c. 7mol/L; d. 8mol/L)

收集溶液: e.  $\alpha$  亚基; f.  $\beta$  亚基)

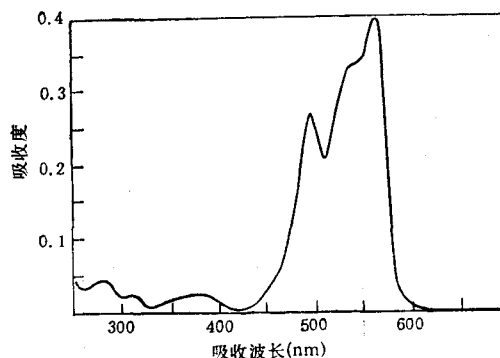


图 1 纯 R-藻红蛋白溶液 (pH = 6.8) 的光谱

Fig.1 The absorbance spectra of pure R-phycoerythrin solution (pH = 6.8)

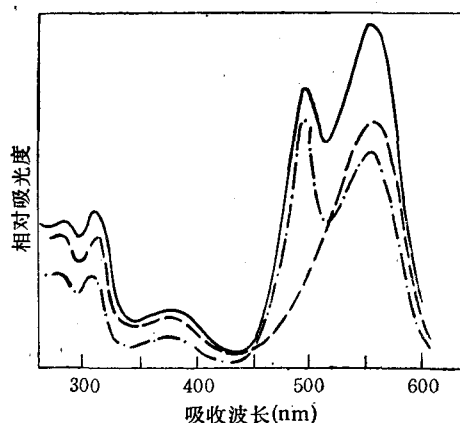


图 3 R-藻红蛋白、 $\alpha, \beta$  亚基的光谱 (pH = 2.5)

Fig.3 The absorbance spectra of R-phycoerythrin,  $\alpha, \beta$  subunits (pH = 2.5)

——R-藻红蛋白; ---- $\alpha$  亚基;  
 ..... $\beta$  亚基。

将亚基溶液分别对 0.1 mol/L 的碳酸氢钠溶液透析至 pH = 8.0, 亚基溶液恢复了一些 R-藻红蛋白的光谱性质。亚基的吸收光谱, 在 555 nm 处的吸收峰均有分裂成为 R-藻红蛋白在 pH 6.8 时 540 和 560 nm 两个峰的趋势(图 4), 同时  $\alpha, \beta$  两个亚基的溶

液可以检测到十分微弱的荧光(大约是 R-藻红蛋白溶液的千分之一),并且亚基溶液的荧光发射峰的形状与 R-藻红蛋白本身的荧光发射峰的形状十分相近(图 5)。可见,在中性介质中, R-藻红蛋白的亚基的肽与发色团之间的相互作用加强,亚基中的藻红胆素也有形成敏化-藻红胆素和荧光-藻红胆素的趋势。由于只有  $\beta$  亚基才含有藻尿胆素,而  $\alpha$ ,  $\beta$  亚基中均含有藻红胆素,图 5 更进一步证明 R-藻红蛋白的荧光发色团是藻红胆素,藻尿胆素的作用是能量传递,它不直接发荧光。R-藻红蛋白的  $\alpha$ ,  $\beta$  亚基在中性介质中的稳定性较差,易发生不可逆凝聚而沉淀。

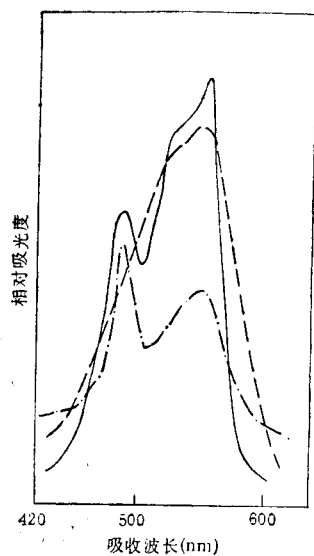


图 4 R-藻红蛋白、 $\alpha$ ,  $\beta$  亚基在 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液中的吸收光谱  
Fig. 4 The absorbance spectra of R-phycoerythrin,  $\alpha$ ,  $\beta$  subunits in 0.1 mol/L sodium hydrogen carbonate solution  
—R-藻红蛋白; ---- $\alpha$  亚基; -·-·- $\beta$  亚基

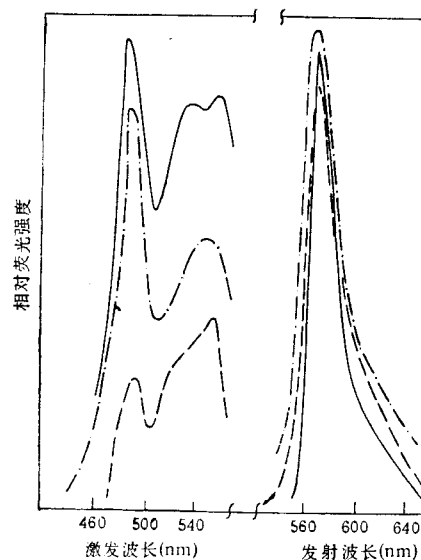


图 5 R-藻红蛋白、 $\alpha$ ,  $\beta$  亚基在 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液中的荧光光谱  
Fig. 5 The fluorescence spectra of R-phycoerythrin,  $\alpha$ ,  $\beta$  subunits in 0.1 mol/L sodium hydrogen carbonate solution  
—R-藻红蛋白; ---- $\alpha$  亚基; -·-·- $\beta$  亚基  
(相对于 R-藻红蛋白,亚基的荧光强度放大 1000 倍)

### 3. $\alpha$ , $\beta$ 亚基的发色团含量

R-藻红蛋白是一种有色蛋白,它的摩尔消光系数很大。Glazer 等曾对藻胆色素的性质进行了较多地研究,并且确定了与蛋白质或多肽链键连的发色团在  $\text{pH} = 2.2$  介质中的摩尔消光系数<sup>[7,8]</sup>。在 R-藻红蛋白溶液中,由于酸及变性试剂的作用, R-藻红蛋白的多肽链之间的相互作用破坏,发色团与多肽链间的相互作用也变得微弱。在此状态下的发色团与带小肽链的发色团性质相似。因此,可以利用亚基的这一性质依据文献数据<sup>[7,8]</sup>对亚基的发色团进行测定。 $\alpha$  亚基只含藻红胆素,吸收峰 555 nm;测定溶液  $A_{555 \text{ nm}}$  值计算该溶液中藻红胆素的摩尔浓度;测定该溶液的蛋白浓度,可以得到  $\alpha$  亚基中藻红胆素的含量。多个  $\alpha$  亚基样品重复测量,  $\alpha$  亚基中含 2 藻红胆素。 $\beta$  亚基中含藻红胆素和藻尿胆素,吸收峰为 555 nm 和 498 nm (图 3)。如果发色团在溶液中的浓度分别用  $C_{\text{PEB}}$

和  $C_{PUB}$  表示, 摩尔消光系数分别用  $\epsilon_{PEB}^{555nm}$ ,  $\epsilon_{PUB}^{555nm}$ ,  $\epsilon_{PEB}^{498nm}$ ,  $\epsilon_{PUB}^{498nm}$  表示, 吸收池厚度为 1 cm, 依据 Lambert-Beer 定律,  $\beta$  亚基溶液在 555 nm, 498 nm 处的吸收表示为:

$$A_{555nm} = C_{PUB}\epsilon_{PUB}^{555nm} + C_{PEB}\epsilon_{PEB}^{555nm}$$

$$A_{498nm} = C_{PUB}\epsilon_{PUB}^{498nm} + C_{PEB}\epsilon_{PEB}^{498nm}$$

测定  $\beta$  亚基溶液的 555 nm, 498 nm 处的吸光度, 可得溶液中藻红胆素、藻尿胆素的摩尔浓度, 测该溶液中的蛋白浓度, 比较, 分别得到藻红胆素和藻尿胆素的含量。多个  $\beta$  亚基样品重复测量,  $\beta$  亚基上含 3 个藻红胆素和 1 个藻尿胆素。用胆色素锌络合物光谱滴定的方法, 也得到了一致的结果<sup>1)</sup>。

本工作从条斑紫菜中提取藻胆蛋白, 找到了一种较传统方法优越的方法, 分离得到较高纯度的 R-藻红蛋白。此方法对研究 R-藻红蛋白时, 制备较大量 R-藻红蛋白具有十分重要的意义。本文研究了 R-藻红蛋白的  $\alpha, \beta$  亚基的一些性质, 为对 R-藻红蛋白及其亚基和发色团的更进一步地研究打下了基础。

### 参 考 文 献

- [1] 马金石等, 1981. 多管藻中 R-藻红蛋白的分离和结构特征. 科学通报 4: 240—242.
- [2] 杨苍珍、马金石、蒋丽金, 1988. R-藻红蛋白的光谱分析. 生物物理与生物化学进展 15(3): 200—203.
- [3] 曾繁杰等, 1986. 条斑紫菜藻胆蛋白的研究 I, R-藻红蛋白的物理和免疫化学性质. 中国科学 (B 辑) 4: 364—368.
- [4] 蒋丽金, 1983. 生物光化学. 有机化学 2: 83—91.
- [5] 蔡武城, 袁厚积, 1982. 生物物质常用化学分析法. 科学出版社, 93—95 页.
- [6] Fujiwara, T. et al., 1955. Studies on chromoproteins in Japanese Nori. *J. Biochem.* 42: 411—417.
- [7] Glazer, A. N. and S. Fang, 1973. Chromophore content of blue-green algal phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.* 248: 659—662.
- [8] Glazer, A. N. and C. S. Hixson, 1977. Subunit structure and chromophore composition of Rhodophytan phycoerythrins. *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin and b-phycoerythrin. *J. Biol. Chem.* 252: 32—42.
- [9] O'Carra, P. and C. O'hEocha, 1976. Algal biliproteins and phycobilins. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Ed by T. W. Goodwin. Academic Press, New York, pp. 328—376.
- [10] Schirmer, T. et al., 1985. X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycoanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastibocladus laraminosus* and its resemblance to globin structures. *J. Mol. Biol.* 84: 257—277.

1) 将在 *Photochem. Photobiol.* 上发表。

**PURIFICATION OF R-PHYCOERYTHRIN IN *PORPHYRA*  
*YEZOENSIS* AND SEPARATION, CHROMOPHORE  
DETERMINATION OF ITS  $\alpha$  AND  $\beta$  SUBUNITS**

Cheng Lingjiang, Jiang Lijin (Li-Chin Chiang) and Ma Jinshi

(*Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica, Beijing*)

ABSTRACT

A new, simple and efficient method for separating R-phycoerythrin from biliproteins extracted from *Porphyra yezoensis* has been developed. After being purified by filtrating through Bio-Gel P300 column, the R-phycoerythrin was obtained with high purity ( $A_{560\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 8.1$ ). The subunits were separated through Bio Rex 70 column in urea solution (pH=2.5). The spectroscopic analyses of the subunit solutions manifested that the subunits were similar in some properties to R-phycoerythrin. The chromophore compositions of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits were determined to be 2 phycoerythrobilins in  $\alpha$  subunit and 3 phycoerythrobilins and 1 phycourobilin in  $\beta$  subunit.