

## 条斑紫菜藻胆蛋白质性质的研究

### III. 不同环境条件下 R-藻红蛋白 吸收光谱类型的转变\*

杨紫萱 曾繁杰 蒋丽金 刘惠平

(中国科学院感光化学研究所, 北京 100101)

**提要** 条斑紫菜的 R-藻红蛋白在 pH: 5.8—8.4 的几种缓冲液中保存, 经过大约 4 个星期, 其吸收光谱由原有的双峰型转变为三峰型; 在 pH = 8.4 的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳后或在微量四甲基乙二胺作用下发生了同样的变化。但在变性剂 SDS 或尿素存在下, 吸收光谱中 540nm 和 565nm 的峰强度比逐渐改变, 直至 565nm 吸收峰消失, 始终没有从双峰型转变为三峰型的迹象。显然, 条斑紫菜 R-藻红蛋白吸收光谱类型的转变不是变性引起的。

**关键词** 条斑紫菜 R-藻红蛋白 吸收光谱 双峰型 三峰型

R-藻红蛋白(以下简称 R-PE)是红藻光合作用中捕获光能和传递光能的一种色素蛋白。依照它们吸收光谱的差别分为两种类型。低等红藻中存在双峰型 R-PE, 即其吸收光谱中在可见光区有 498nm 和 565nm 的吸收峰和在 540nm 处的吸收肩。高等红藻 R-PE 大多是三峰型, 除 498nm 和 565nm 的吸收峰外, 在 540nm 处也有尖锐的吸收峰。潘忠正等<sup>[2]</sup>和 Hirose 等<sup>[3]</sup>许多作者都对 R-PE 的两种光谱类型进行了讨论。我们发现, 低等红藻条斑紫菜的 R-PE 由于环境因素的影响, 其双峰型的吸收光谱可以转变为三峰型。

#### 一、双峰型吸收光谱转变为三峰型

##### 1. 8 种缓冲液对 R-PE 吸收光谱的影响

R-PE( $\lambda_{\max} = 565\text{nm}$ ,  $F_{\max} = 578\text{nm}$ ;  $A_{565\text{nm}}: A_{280\text{nm}} = 2:1$ ) 以不同的缓冲液配成 0.25mg/ml 的溶液, 密封于若干试管中, 在 4°C 暗处放置。在 1, 7, 28 和 56 天时各取出一支样品测定吸收光谱和荧光光谱。对照样品为多管藻 R-PE。表 1 列出所用的 8 种缓冲溶液, 光谱测定结果见图 1—4。

\* 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 37 号。  
国家自然科学基金资助项目。  
接受日期: 1991 年 3 月 15 日。

表 1 实验所用的 8 种缓冲溶液

Tab. 1 The eight kinds of buffer solution in the experiment

No.	缓冲液	pH	No.	缓冲液	pH
1	0.1mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	5.8	5	0.05mol/L Tris-HCl	6.8
2	0.1mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6.8	6	0.05mol/L Tris-HCl	7.5
3	0.1mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7.5	7	0.05mol/L Tris-HCl	8.4
4	0.1mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	8.5	8	0.09mol/L Tris- $\text{H}_3\text{BO}_3$ , Na EDTA	8.4

从图 1—3 可以看出, R-PE 在缓冲液 1, 2, 3, 5 中 1 天时其吸收光谱特征不变。在缓冲液 4, 6, 7, 8 中则失去原有特征。565nm 的吸收或成为肩峰或消失。但无论在哪一种缓冲液中, 当保存至 28 天时, 吸收光谱中都出现了三峰型特征。在同样条件下, 多管藻 R-PE 在可见光区保持原有的三个吸收峰, 仅各峰的相对强度稍有变化。

以上全部试样的荧光发射光谱形状不变, 但从图 4 可以看出, 各试样的荧光强度都有不同程度的变化, 尤以在缓冲液 4 和 8 中的变化最大。

## 2. 在聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳中吸收光谱的变化

使用 Pharmacia 梯度凝胶电泳方法, 用 4—30% 聚丙烯酰胺线性梯度凝胶薄板, 用  $\text{pH} = 8.4$ ,  $0.09\text{mol/L}$  的 Tris-硼酸缓冲液 (含  $0.93\text{g/L}$  EDTA Na) 作电极液。样品为经过粗分离的 R-PE。用 Pharmacia 成套的高分子量电泳校准蛋白, 在  $150\text{V}$  下电泳 17h, 然后用岛津 CS-900 色谱扫描仪测定胶板上的红色带 (只得到一条红色带) 的吸收光谱。对照样品多管藻 R-PE 电泳后也只得到一条红色带。测定结果表明, 条斑紫菜 R-PE 与多管藻 R-PE 在电泳中有相同的迁移距离, 并且其吸收光谱由双峰型转变为三峰型。根据与标准分子量蛋白的比较, 峰型转变后的 R-PE 的分子量为  $195\ 000$  道尔顿。电泳结果见图 5, 6。

## 3. 在微量四甲基乙二胺作用下吸收光谱的变化

R-PE 粗品经 Sephadex G-200 凝胶柱层析 (洗脱液为  $\text{pH} = 6.8$ ,  $0.05\text{mol/L}$  的磷酸钠缓冲液), 再经羟基磷灰石柱层析 ( $\text{pH} = 6.8$ ,  $0.02\text{mol/L}$  磷酸钠缓冲液洗脱) 后, 在  $40000\text{g}$  离心  $30\text{min}$ , 得到纯的 R-PE ( $A_{565}:A_{280} = 8:1$ )。

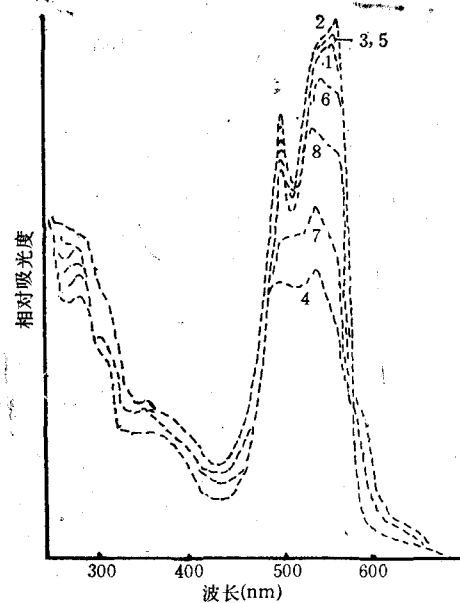


图 1 R-PE 在 8 种缓冲液中 1 天时的吸收光谱

Fig. 1 The absorption spectra of R-PE in eight kinds of buffer solution for one day  
图 1, 2, 4 中数字为缓冲液代号, 参见表 1。

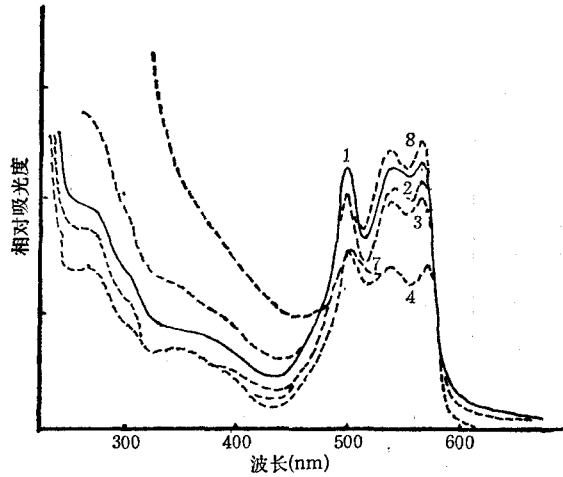


图 2 R-PE 在 6 种缓冲液中 28 天时的吸收光谱

Fig. 2 The absorption spectra of R-PE in six kinds of buffer solution for 28 days

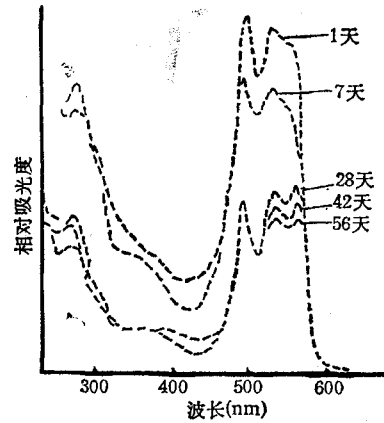


图 3 R-PE 在 Tris-硼酸缓冲液中 1—56 天的吸收光谱

Fig. 3 The absorption spectra of R-PE in Tris-Boric acid buffer solution from 1 to 56 days

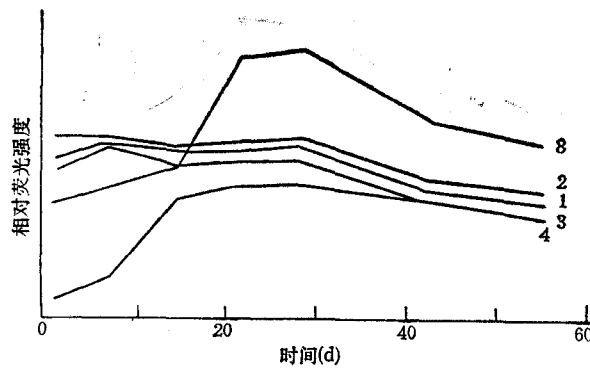


图 4 R-PE 在 5 种缓冲液中保存时荧光强度的变化

Fig. 4 The change of fluorescence strength of the R-PE during the storage period in five kinds of buffer solution

取纯 R-PE 各 3ml, 分别加入 1% 的四甲基乙二胺 (TEMED) 若干 ml (此时各试样的 pH 值均低于 8.0), 于密封的试管中在 55—60°C 水浴中加热 5 分钟, 迅速冷却至室温, 分别测定吸收光谱和荧光光谱。

由图 7, 8 可见, 条斑紫菜 R-PE 的双峰型吸收光谱当加入 5  $\mu$ l TEMED 时已发生变化, 至加入 10—20  $\mu$ l TEMED 时, 转变为三峰型。它在 280nm 的吸收明显增强, 并在 595nm 处出现一吸收肩, 峰型变化后的 R-PE 的荧光发射光谱不变, 但其激发光谱与变化前相比, 540nm 处的强度稍大。

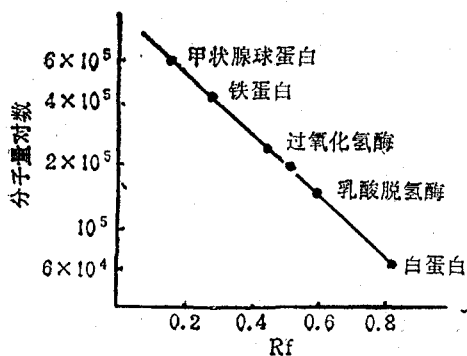


图 5 用 Pharmacia 成套校准蛋白在 4—30% 凝胶板上测定条斑紫菜三峰型 R-PE 的分子量  
Fig. 5 The molecular weight of triade type of R-PE from *Porphyra yezoensis* determined with Pharmacia sets of calibrated protein in 4—30% gradient gel ●校准蛋白; ○R-PE。

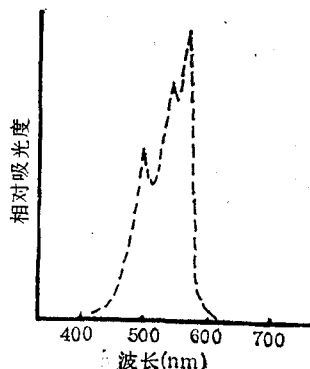


图 6 电泳后条斑紫菜 R-PE 的吸收光谱  
Fig. 6 The absorption spectra of *Porphyra yezoensis* R-PE after electroforesis

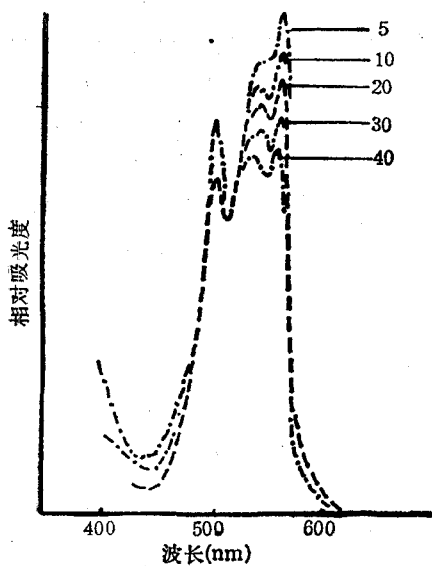


图 7 加入不同量 TEMED 后吸收光谱的变化(单位:  $\mu\text{l}$ )  
Fig. 7 The change of absorption spectra of R-PE after adding different amount TEMED(unit:  $\mu\text{l}$ )

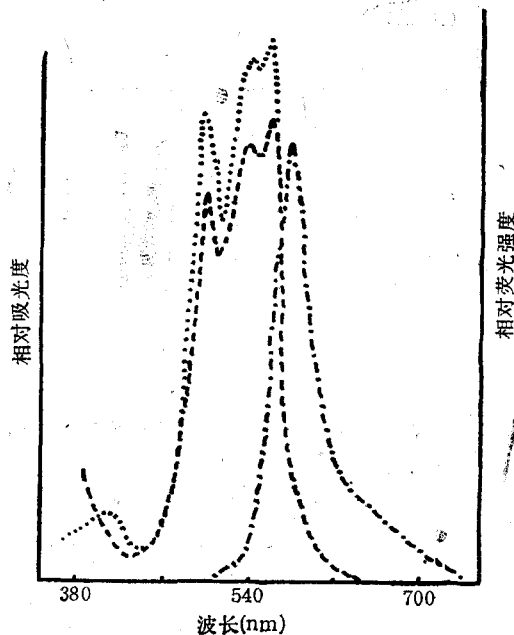


图 8 加入 20 $\mu\text{l}$  TEMED 后的吸收光谱(---)、发射光谱(-·-·-·-)和激发光谱(·····)  
Fig. 8 The absorption spectra(-----), fluorescence emission(-·-·-·-) and excitation spectra(·····) of R-PE after adding 20 $\mu\text{l}$  TEMED

## 二、R-PE 在 SDS 和尿素溶液中吸收光谱的变化

### 1. R-PE 在 SDS 溶液中吸收光谱的变化

分别取 1% 的 SDS 水溶液若干 ml, 各加入蒸馏水至体积 4ml。在各份溶液中分别加入纯的 R-PE 40 $\mu$ l, 摇匀, 在室温下放置 30min 后测定吸收光谱。对样品为 R-PE 水溶液。图 9 为不同浓度 SDS 溶液中 R-PE 吸收光谱的比较。在 SDS 浓度为 0.006% 和 0.012% 时, R-PE 吸收光谱形状不变。当浓度增至 0.060% 以至达到 1% 时, 在 565nm 处形成一吸收肩, 且 498nm 和 280nm 的吸收相对增强。

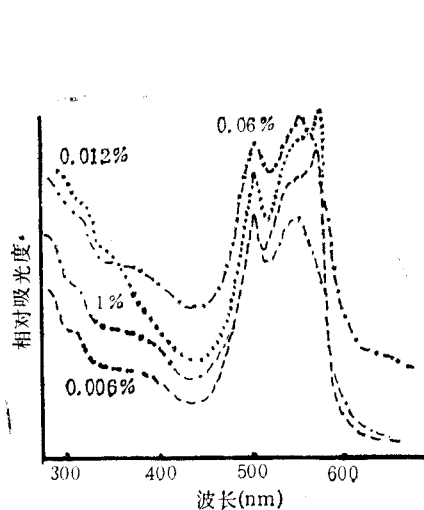


图 9 不同浓度 SDS 溶液中 R-PE 吸收光谱的比较

Fig. 9 The absorption spectra of R-PE in different SDS concentrations

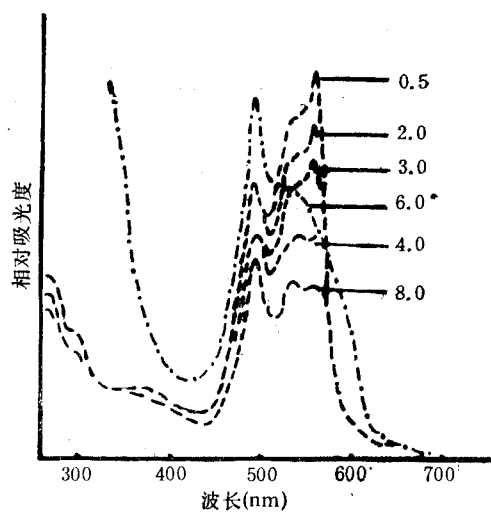


图 10 不同浓度尿素溶液中 R-PE 吸收光谱的变化

Fig. 10 The absorption spectra of R-PE in different urea concentrations  
\*6.0mol/L 尿素同时加热 2min。

## 2. R-PE 在不同浓度尿素溶液中吸收光谱的变化

取 0.5, 2, 4 和 8mol/L 的尿素溶液各 3ml, 分别加入 30 $\mu$ l R-PE, 室温下放置 4h 后测定各试样的吸收光谱, 得到图 10。图 10 表明随尿素浓度增加, R-PE 在可见光区的吸光度逐渐降低, 280nm 吸收增强。至 8mol/L 尿素时, 540nm 和 565nm 的吸光度相同, 498nm 的相对强度明显增大。将不同尿素浓度的 R-PE 溶液在 65 $^{\circ}$ C 加热 2min, 可见 R-PE 在 565nm 的吸光度逐渐低于 540nm 的; 至 6mol/L 尿素时, 565nm 的吸收峰消失; 在 540nm 附近形成一宽阔的吸收肩。

## 三、讨 论

条斑紫菜的 R-PE 经过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 其双峰型的吸收光谱转变为三峰型。此时它的荧光发射光谱与电泳前的相同。根据与标准分子量蛋白的比较, 它的分子量与同时电泳的多管藻 R-PE 的分子量相同, 都是 195000 道尔顿, 说明它是 R-PE 的多聚体。

在用四甲基乙二胺处理 R-PE 时, 试样的 pH 值保持在 8.0 以下, 基本避免了碱

性条件下导致的蛋白变性。当四甲基乙二胺的量加到  $20\mu\text{l}$  并在  $65^\circ\text{C}$  加热  $1\text{min}$  后, R-PE 吸收光谱中  $540\text{nm}$  处的吸收肩变为一明显的吸收峰。此时它的荧光发射光谱不变,而激发光谱中  $540\text{nm}$  处的强度稍变大。

在电泳条件和在微量胺作用下 R-PE 吸收光谱的变化,都是在短时间内发生的,而 R-PE 在 8 种缓冲溶液中保存了较长的时间,根据其吸收光谱和荧光强度的变化,可以探讨其变化过程。

由实验结果可见,作为对照样品的多管藻 R-PE,始终保持了它的三峰型的光谱特征,表明此种类型的 R-PE,具有较稳定的构象。

条斑紫菜 R-PE 在 8 种缓冲溶液中起始的吸收光谱表现为两大类。一类,在 1,2,3,5 的四种缓冲液中保持原有特征不变;另一类,在 4,6,7,8 的四种缓冲液中失去原有光谱特征,在  $565\text{nm}$  处的最大吸收或形成肩峰或基本消失,但它们在可见光区与紫外光区的最大吸收的比值保持在 1 左右,说明溶液中变性的 R-PE 不多。当 R-PE 在 8 种缓冲溶液中保存至 28 天以后,溶液中都出现了与多管藻的 R-PE 类似的吸收光谱。它们在可见光区与紫外光区的最大吸收的比值仍保持在 1 左右,表明 R-PE 的吸收光谱在由双峰型转变为三峰型的过程中,也没有明显的变性发生。

从 R-PE 在 5 种缓冲液中保存期间荧光强度的变化曲线可见,在 28 天内,1,2,3 的三种(特别是在 2 中)荧光强度变化较小,这与它们的特征吸收光谱的保持是相一致的。在 28 天以后,也即在光谱中出现了  $540\text{nm}$  的明显吸收后,它们的荧光强度以缓慢的速度逐渐降低,至 56 天实验结束时为止,前后的荧光强度变化缓慢,始终未发生一个陡变的过程。而在缓冲液 8 中,保存 14 天以后,荧光发射突然增强,保持一周以后再缓慢下降,但至 56 天时仍比起始的强度大许多。这一过程正是 R-PE 多聚体发生解聚的过程<sup>[1]</sup>。在前一类情况下未观察到荧光发射的突然增强,表明没有明显的解聚发生。据此二种现象可以估计,吸收光谱由双峰型向三峰型的转变,可以发生于多聚体,也可以发生于低聚体或单体。聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果证明了三峰型 R-PE 多聚体的存在。

R-PE 在缓冲液 4 中的吸收光谱变化最大( $565\text{nm}$  吸收峰消失,同时出现  $610\text{nm}$  的吸收),与此相应,其荧光强度的变化也最明显。虽然其发射光谱形状不变,但起始时发生了荧光猝灭现象。至保存一周后,强度逐渐上升。从第 2 周至第 8 周变化不大。这一现象似乎表明,在缓冲液 4 的条件下,起始只有少数 R-PE 分子保持了其特征构象,因而只有很弱的荧光发射。此时大部分 R-PE 的构象处于不断变化之中并逐渐地向着较稳定的构象——三峰型 R-PE 的构象变化。从第 28 天至 56 天实验结束时为止,基本处于三峰型的较稳定的构象中。故此阶段内其荧光强度回升并基本保持不变。

在前一类缓冲液中,起始虽无光谱特征的改变,但 28 天后,溶液中也出现了三峰型的吸收光谱。至此应提出一个问题,就是双峰型和三峰型吸收光谱差别的实质是什么?根据上面的工作,作如下的推论。

据文献报道,有处于不同蛋白环境的、不同构象的藻红胆素发色团<sup>[4]</sup>。吸收峰在  $540\text{nm}$  的称为 S-发色团,处于  $565\text{nm}$  的是 f 发色团。根据实验中经过变化的 R-PE 的吸收光谱看,两种类型光谱的差别不仅仅是  $540\text{nm}$  与  $565\text{nm}$  吸收强度之比的差别,实质可能是双峰型 R-PE 中有两种 S-发色团。其一的吸收峰在  $540\text{nm}$ ,另一个的吸收波长

稍有红移。这两种 S-发色团的吸收谱交盖后表现为一个具有一定宽度的较平滑的峰,也就是形成了在 540nm 处的吸收肩。而三峰型 R-PE 只有 540nm 的一种 S-发色团,表现为一个尖锐的峰。

在上面实验的几种条件下,双峰型 R-PE 经历了一些复杂的变化,其中可能包括了具有较大吸收波长的 S-发色团的构象转变为 540nm 吸收的 S-发色团构象的这种变化。

条斑紫菜的 R-PE 在变性剂 SDS 或在尿素的作用下,可以得到 540nm 处吸光度不同的吸收光谱。但不论 540nm 和 565nm 吸光度比值如何变化,在 540nm 处总表现为一个较宽的、平滑的峰,同时 565nm 的吸收峰发生明显的变化,始终未得到一个三峰型的吸收光谱。这一情况说明, R-PE 吸收光谱由双峰型变为三峰型的过程和它在变性剂作用下的变化过程不完全相同。这也证明了在本文实验条件下吸收光谱类型的转变不是变性,但是要阐明两种光谱类型的 R-PE 的差别,还需要进行更深入的研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 杨紫萱等,1987,条斑紫菜中的藻胆蛋白研究 II. 条斑紫菜的 R-藻红蛋白的聚集-解聚现象,中国科学 B 辑, 4: 371—376.
- [2] 潘忠正等,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.
- [3] Hirose, H., 1975, Photoreactive pigments of algae and algal phylogeny, *In* Advance of phycology in Japan, VEB Gustav Fischer Verlag Japan, pp. 52—65.
- [4] Zickendraht-Wendelstadt, B. et al., 1980, Spectral characterization of monomeric C-phycoerythrin from *Pseudanabaena* W1173 and its  $\alpha$  and  $\beta$  subunits: Energy transfer in isolated subunits and C-phycoerythrin, *Photochem and Photobiol.*, 31: 367—376.

## STUDY OF PHYCOBILIPROTEINS IN *PORPHYRA* *YEZOENSIS*

### III. THE TRANSFORMATION OF ABSORPTION SPECTRA TYPE IN R-PHYCOERYTHRIN UNDER THE CONDITION OF DIFFERENT ENVIRONMENTS

Yang Zixuan, Zeng Fanjie, Jiang Lijin(Li-Chin Chiang) and Liu Huiping  
(Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100101)

#### ABSTRACT

During the storage period of the R-phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* in various buffer solutions at pH 5.8—8.4, the absorption spectra lost the original characteristic diade type at the very beginning and changed to triade type after an elapse of about four weeks. After the polyacrylamide gradient gel electrophoresis at pH 8.4 or under the action of trace amount of tetramethylethylenediamine, the same change of types took place. However, in the presence of the denaturing agent SDS or urea by varying the concentrations of the denaturing agent, the ratio of the strengths of the peaks 540nm and 565nm in the absorption spectra gradually underwent alternation until the disappearance of the 565nm peak, there was no indication at all about the transformation from diade to triade type.

It is apparent that the changes of types of the absorption spectrum of R-phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* in comparison with the results obtained from the action of denaturing agent are of different mechanisms, in other words, the change from diade to triade is not due to denaturation.

An explanation for the cause of the transformation from diade to triade will be given when more experimental facts are obtained.

**Key words :** *Porphyra yezoensis*, R-phycoerythrin, Absorption spectra, Diade type, Triade type.

\* No. 37 of research report from Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao.