

# 紫球藻两种藻红蛋白特性的比较研究

## —— $\gamma$ 亚基在稳定藻红蛋白结构方面的作用\*

王广策 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 从紫球藻中分离纯化两种藻红蛋白(B-藻红蛋白和**b**-藻红蛋白),对它们的吸收光谱和电泳图谱进行比较研究。结果表明,尽管电泳图谱与文献报道的相同,但**b**-藻红蛋白的吸收光谱与文献报道的有较大的差别,表现在本研究发现**b**-藻红蛋白在 545nm 处有一吸收峰,在 565nm 处仅有一个吸收肩峰,而不是文献中报道的在 545nm 和 565nm 均有独立的吸收峰。通过比较 B-藻红蛋白和**b**-藻红蛋白在不完全变性条件下的电泳图谱,发现 B-藻红蛋白比**b**-藻红蛋白要稳定的多,进一步分析认为这主要是因为 B-藻红蛋白含有  $\gamma$  亚基,而**b**-藻红蛋白不含有  $\gamma$  亚基,因此认为  $\gamma$  亚基有稳定分子的作用。

**关键词** 紫球藻, B-藻红蛋白, **b**-藻红蛋白,  $\gamma$  亚基

**中图分类号** Q947

紫球藻(*Porphyridium cruentum*)是一种单细胞红藻,分布于海水、咸水和淡水中。它含有许多营养物质,例如不饱和脂肪酸等(李荷芳等, 1999),其中最引人注目的是它富含藻胆蛋白,其藻胆蛋白包括藻红蛋白、藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白。这些藻胆蛋白按照一定的次序组成高度有序的超分子复合物—藻胆体,作为光合作用捕光色素系统的功能单位(王广策等, 1998a)。

紫球藻的藻红蛋白可以分为 B-藻红蛋白(B-phycoerythrin, B-PE)和**b**-藻红蛋白(**b**-phycoerythrin, **b**-PE)两类。组成这两类藻红蛋白的 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基完全相同,不同之处在于 B-PE 含有  $\gamma$  亚基, **b**-PE 不含  $\gamma$  亚基,即 B-PE 的亚基组成为 $(\alpha\beta)_6\gamma$ , **b**-PE 的亚基组成为 $(\alpha\beta)_6$ 。目前,对红藻藻红蛋白  $\gamma$  亚基的一级结构以及它的功能均不是十分清楚,对它在寡聚体分子中的空间位置也无确切的定论(Ficner *et al*, 1992; 王广策等, 1998b)。因此,开展对藻红蛋白  $\gamma$  亚基的研究已成为藻胆蛋白研究的热点和难点。本文报道紫球藻两种藻红蛋白的分离以及对  $\gamma$  亚基在稳定寡聚体分子方面所具有的功能,以期为深入研究藻红蛋白  $\gamma$  亚基在藻胆体能量传递中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

所用的化学试剂和药品均为国产分析纯。羟基磷灰石为自制, Sephadex G-200 为 Pharmacia 公司进口分装。

\* 中国科学院创新课题, L008 号。王广策, 男, 生于 1965 年 12 月, 博士, 研究员, E-mail: gewang@ms. qdio. ac. cn

收稿日期: 2000-07-12, 收修改稿日期: 2001-05-19

吸收光谱采用岛津UV-240型扫描式分光光度计测定,吸收池光径为1cm。

## 1.2 方法

紫球藻用BLACK SEA培养基培养(Anderson *et al.*, 1997),室温,自然光照,通气培养,约15d后,离心收集藻体(1500g, 10min)。

离心收集的紫球藻,用蒸馏水洗涤两次后,再加入少量蒸馏水,反复冻融,离心去残渣(2000g, 15min)。上清液即为紫球藻藻胆蛋白的粗提液。在粗提液中,加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,使其在室温下饱和度为50%,离心(1000g, 15min)弃上清,沉淀溶于0.001mol/L磷酸盐缓冲液(含0.2mol/L NaCl, pH=6.8),并对此缓冲液透析过夜。经过透析的藻胆蛋白粗提液滴加至经上述缓冲液平衡过的羟基磷灰石柱上(1cm×3cm)以去除藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白(王广策等, 1996),所得的洗脱液为B-PE和b-BE的混合物。

分离所得的B-PE和b-PE混合物进一步经Sephadex G-200凝胶柱(2.5cm×50.0cm)分离,将B-PE和b-PE分开,光谱检测发现先流下来的组分为B-PE,后流下来的组分为b-PE。所用的洗脱液为0.001mol/L磷酸盐缓冲液(含0.2mol/L NaCl, pH=6.8)。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法参考卢圣栋(1993),其中分离胶浓度为10%,浓缩胶浓度为5%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 藻红蛋白的分离纯化

紫球藻藻红蛋白经一次羟基磷灰石柱层析分离已基本去除了R-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白。藻红蛋白(包括B-PE和b-PE)的纯度( $A_{545}/A_{280}$ )为4(图1)。进一步用Sephadex G-200凝胶柱层析,将B-PE和b-PE分开,各自的纯度均有所升高(图2)。这表明,只经过一次羟基磷灰石柱层析不能完全去除其他蛋白。从图1中可以看出,在620nm处还有一个极小的吸收峰,表明有少量的R-藻蓝蛋白的存在。用Sephadex G-200凝胶柱分离不仅可将B-PE和b-PE分开,而且可以去除一些其他杂蛋白,使纯度有所升高。

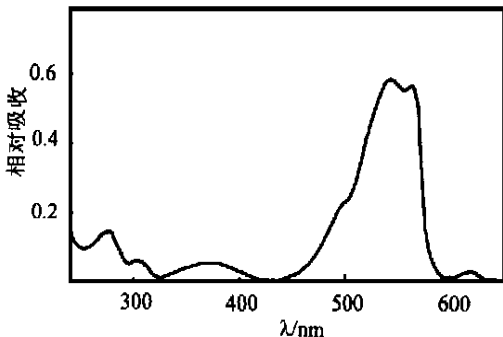


图1 经过一次羟基磷灰石柱层析的藻红蛋白吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of phycoerythrin purified through hydroxyapatite chromatography

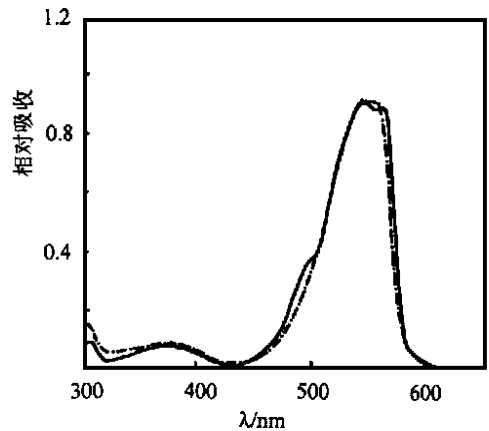


图2 B-藻红蛋白和b-藻红蛋白的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of B-phycoerythrin and b-phycoerythrin

实线为B-藻红蛋白,点虚线为b-藻红蛋

Solid line: B-PE; Dashed line: b-PE

## 2.2 藻红蛋白的光谱以及电泳鉴定

从图2的吸收光谱可以看出, B-PE 与 b-PE 有两点区别: (1) B-PE 在 498nm 处有一明显的吸收肩峰, 而 b-PE 则没有; (2) B-PE 在 545nm 和 565nm 处均有一个独立的吸收峰, 而 b-PE 只在 545nm 处有一吸收峰, 在 565nm 处仅有一个吸收肩峰。

紫球藻藻红蛋白的色基有两种, 即藻红胆素(PEB)和藻尿胆素(PUB)。组成紫球藻藻红蛋白的亚基有 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 亚基。 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基上只结合藻红胆素, 其中 $\alpha$ 亚基上共价结合2个藻红胆素, $\beta$ 亚基上共价结合3个藻红胆素, $\gamma$ 亚基上共价结合着2个藻红胆素和2个藻尿胆素, 而且紫球藻藻红蛋白545nm和565nm的吸收峰来源于藻红胆素的吸收, 498nm的吸收肩峰则来源于藻尿胆素的吸收。由于藻尿胆素完全结合在 $\gamma$ 亚基上, 因此498nm吸收肩峰的存在, 就可判定 $\gamma$ 亚基的存在与否。图2的结果表明, B-PE 上有498nm的吸收肩峰, 存在着 $\gamma$ 亚基; 而 b-PE 却没有 $\gamma$ 亚基的存在, 因而它的吸收光谱上没有498nm的吸收肩峰。这个结果与 Glazer 等(1997)所报道的基本一致。但是 Glazer 等(1997)报道的 b-PE 只是没有498nm的吸收肩峰, 在545nm和565nm处与 B-PE 一样, 也是两个独立的吸收峰, 这与图2所示的结果显然不同。同时, 根据 Glazer 等(1997)的报道, 紫球藻 B-PE 和 b-PE 含量相同, 即均占总藻胆蛋白量的42%, 然而作者的实验结果表明, 紫球藻 b-藻红蛋白远远低于 B-藻红蛋白, 表现在用 SephadexG-200 凝胶柱层析分离 B-PE 和 b-PE 时, B-PE 的带要比 b-PE 的带浓得多。这些差异的原因, 作者认为有二点: (1) 虽然 Glazer 等用的藻种也是紫球藻 (*Porphyridium cruentum*), 但与作者所用的可能不是同一个亚种; (2) 培养的条件不同, 这些条件包括培养基的营养组成、温度、光照等环境因子。

图3是 B-PE 和 b-PE 在加样缓冲液 (loading buffer) 中煮沸 10min 后的电泳图谱。从中可以看出, B-PE 在 30kD 处有一条带, 而 b-PE 在相应的位置上没有此带, 这个带即为 B-PE 的 $\gamma$ 亚基。在 18kD 处, B-PE 和 b-PE 皆有一个很粗的带, 此带为 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基, 这些实验结果与 Glazer 等(1997)的报道一致。

综上所述, 尽管本文所用的紫球藻藻红蛋白在吸收光谱上与 Glazer 等(1997)的报道有些差别, 但亚基的组成及分子量却没有差异。

## 2.3 在不完全变性条件下两种藻红蛋白电泳图谱的比较分析

图4电泳图谱反映的是 B-PE 和 b-PE 加入加样缓冲液 (loading buffer) 后没有进行煮沸的情况, B<sub>1</sub>—B<sub>4</sub> 是 B-PE 的电泳图, 加样量依次递增 (即 B<sub>1</sub> 为 1 $\mu$ l, B<sub>2</sub> 为 2 $\mu$ l, B<sub>3</sub> 为 4 $\mu$ l, B<sub>4</sub> 为 8 $\mu$ l); A<sub>1</sub>—A<sub>4</sub> 是 b-PE 的电泳图谱, 加样量依次递减 (即 A<sub>1</sub> 为 8 $\mu$ l, A<sub>2</sub> 为 4 $\mu$ l, A<sub>3</sub> 为 2 $\mu$ l, A<sub>4</sub> 为

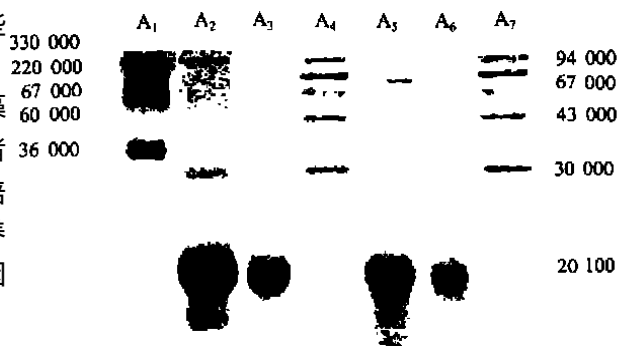
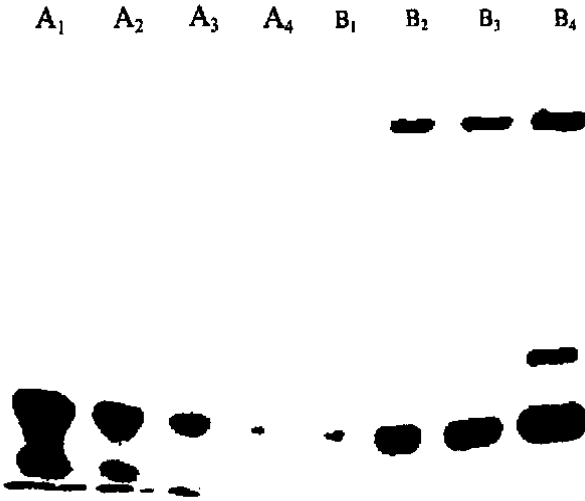


图3 B-藻红蛋白和 b-藻红蛋白完全变性后的电泳图谱  
 Fig. 3 Electrophoresis of the B completely denatured-phycoerythrin and b phycoerythrin

A<sub>1</sub>: 高分子量标准; A<sub>2</sub>: B-藻红蛋白, 加样量为 8 $\mu$ l; A<sub>3</sub>: B-藻红蛋白, 加样量为 4 $\mu$ l; A<sub>4</sub>: 低分子量标准; A<sub>5</sub>: b-藻红蛋白, 加样量为 8 $\mu$ l; A<sub>6</sub>: b-藻红蛋白, 加样量为 4 $\mu$ l; A<sub>7</sub>: 低分子量标准



14)。从图 4 中可以看出, B-PE 有 5 条带, 作者认为自上而下, 分别应该为  $(\alpha\beta)_6\gamma$ 、 $(\alpha\beta)_3$ 、 $(\alpha\beta)_2$ 、 $(\alpha\beta)$  以及  $\alpha$  和  $\beta$  ( $\alpha$  和  $\beta$  的分子量相近, 电泳的带非常靠近)。与 B-PE 电泳图谱相比, b-PE 的电泳图谱只有清晰的两条带。在 b-PE 电泳图谱中没有相对应于 B-PE 电泳图谱中代表完整藻红蛋白分子的带, 即 B<sub>1</sub>—B<sub>4</sub> 最上面的一条带。即使是加样量达到 8 $\mu$ l, b-PE 电泳图谱也无此带, 而在 B-PE 电泳图谱中, 加样量只有 1 $\mu$ l, 就有较为清晰的完整藻红蛋白分子的带。b-PE 电泳图谱中相应  $(\alpha\beta)_3$  和  $(\alpha\beta)_2$  位置的带也几乎没有, 只有在加样量达 8 $\mu$ l 时, 才有极为模糊的带出现。

图 4 B-藻红蛋白和 b-藻红蛋白不完全变性时的电泳图谱  
Fig. 4 Electrophoresis of the non-completely denatured B-phycoerythrin and b-phycoerythrin

A<sub>1</sub>—A<sub>4</sub>: b-藻红蛋白; A<sub>1</sub>, 8 $\mu$ l; A<sub>2</sub>, 4 $\mu$ l; A<sub>3</sub>, 2 $\mu$ l; A<sub>4</sub>, 1 $\mu$ l  
B<sub>1</sub>—B<sub>4</sub>: B-藻红蛋白; B<sub>1</sub>, 1 $\mu$ l; B<sub>2</sub>, 2 $\mu$ l; B<sub>3</sub>, 4 $\mu$ l; B<sub>4</sub>, 8 $\mu$ l

然而, 与 B-PE 电泳图谱相比, b-PE 电泳图谱中, 相应  $\alpha$  或  $\beta$  亚基位置的带却远比 B-PE 的清晰。

紫球藻 B-藻红蛋白晶体结构的解析表明,  $\alpha$  和  $\beta$  亚基聚合为单位  $(\alpha\beta)$ , 三个单体聚合为一个环形的三聚体  $(\alpha\beta)_3$ , 两个三聚体堆叠为规则的带有中央空洞的圆柱形六聚体  $(\alpha\beta)_6$ , 亚基与亚基之间, 单体与单体之间以及三聚体之间主要靠静电相互作用结合在一起的。 $\gamma$  亚基可能不具有内在的三重对称性, 所以仅能从电子密度图上大体推测它可能位于圆柱体六聚体的中央空洞中(Ficner *et al.*, 1992)。Ficner 等(1993)通过比较 B-PE 和 b-PE 的晶体结构, 发现 B-PE 圆柱体中央空洞的电子密度高于 b-PE, 所以认为  $\gamma$  亚基位于 B-PE 圆柱体的中央空洞中。然而, 常文瑞等(1995)对与紫球藻 B-PE 有相同的亚基组成和晶体结构的多管藻 R-藻红蛋白(R-phycoerythrin R-PE)晶体结构解析结果表明, 位于分子内的中央空洞的电子密度并不比分子外部的电子密度高, 因此, 对  $\gamma$  亚基存在于分子内部的中央空洞的这一结论有不同的看法。最近, 作者用蛋白酶部分酶切 B-PE 和 R-PE, 认为  $\gamma$  亚基存在于分子内部的中央空洞中(王广策等, 1998b)。对于  $\gamma$  亚基的功能, 目前主要有两种假说: (1)  $\gamma$  亚基起着稳定 B-PE 的功能; (2)  $\gamma$ -亚基上的藻尿胆素起着吸收 500nm 左右的光, 这在深海中有利于红藻有效地吸收光能。前一种假说的前提是  $\gamma$  亚基位于 B-PE 分子的中央空洞中, 象“铆钉”一样将两个三聚体  $(\alpha\beta)_3$  的盘紧紧铆在一起。通过对比分析 B-PE 和 b-PE 的结构稳定性也可以间接地证明这种假说。因为如果  $\gamma$  亚基有稳定藻红蛋白分子的作用, 含有  $\gamma$  亚基的 B-PE 应该比不含  $\gamma$  亚基的 b-PE 更稳定。

图 4 的电泳图谱清楚地表明, B-PE 要比 b-PE 稳定。因为在相同的处理条件下, B-PE 的电泳图谱显示有完整的 B-PE 分子存在, 而 b-PE 的电泳图谱显示 b-PE 则没有完整分子

的存在。因此, 作者认为  $\gamma$  亚基位于 B-PE 的中央空洞中, 将两个三聚体紧紧地粘合在一起, 起着稳定藻红蛋白结构的作用。

### 参 考 文 献

- 王广策, 周百成, 曾呈奎, 1996. 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统的测定. 海洋科学, 1: 52—55
- 王广策, 曾呈奎, 1998a. 钝顶螺旋藻 C- 藻蓝蛋白分子内不同基团间能量传递的研究. 海洋与湖沼, 29(5): 471—476
- 王广策, 周百成, 曾呈奎, 1998b. B- 藻红蛋白和 R- 藻红蛋白  $\gamma$  亚基的分离、特性及其在分子中空间位置分析. 中国科学(C 辑), 28(1): 36—41
- 卢圣栋主编, 1993. 现代分子生物学实验技术(第一版). 北京: 高等教育出版社, 381—386
- 李荷芳, 周汉秋, 1999. 海洋微藻不饱和脂肪酸组成的比较研究. 海洋与湖沼, 30(1): 34—40
- 常文瑞, 万柱礼, 江 涛等, 1995. 0.5nm 分辨率多管藻 R- 藻红蛋白的晶体结构. 自然科学进展——国家重点实验室通讯, 5(2): 181—190
- Anderson R A, Morton S L, Sexton J P, 1997. Provasoli-Guillard national center for culture of marine phytoplankton—1997 list of strains. J Phycol, 33(6) (Suppl): 1—75
- Fiener R, Huber R, 1993. Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23nm resolution and localization of the  $\gamma$  subunit. Eur J Biochem, 218: 103—106
- Fiener R, Lobeck K, Schmidt G *et al.*, 1992. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from red algae *Porphyridium sordidum* at 2.2A resolution. J Mol Biol, 228: 935—950
- Glazer A N, Hixson C, Subunit A, 1997. Structure and chromophore composition of *Rhodophytan phycoerythrin*. J Biol Chem, 252(1): 32—42

## COMPARATIVE STUDY ON THE PROPERTIES OF TWO DIFFERENT KINDS OF PHYCOERYTHRIN FROM *PORPHYRIDIMUM CRUENTUM*

WANG Guang-Ce, ZENG Cheng-Kui (C. K. Tseng)

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

**Abstract** Two kinds of phycoerythrin, B-phycoerythrin and b-phycoerythrin, were isolated and purified from *Porphyridium cruentum*, and the characterization of the two kinds of the phycoerythrin was studied using both spectral analysis and electrophoresis. In comparison with the result reported by Glazer *et al.*, the electrophoresis is very similar, while spectral properties of b-phycoerythrin had some difference, which means that besides a peak at 545nm just a should not an absolute peak at 565nm was showed in the absorption spectrum of b-PE. Through comparing the results of electrophoresis at the none-completely denatured condition between B-PE and b-PE, it was found that B-PE is much more stable than b-PE. Further studying indicates that  $\gamma$  subunit has the function to stabilize the structure of phycoerythrin.

**Key words** *Porphyridium cruentum*, B-phycoerythrin, b-phycoerythrin,  $\gamma$  subunit