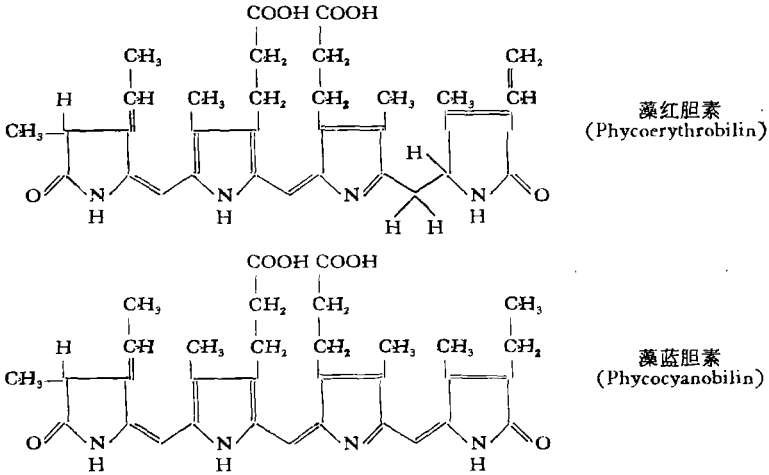


R-藻红蛋白的某些特性研究*

蒋丽金 马金石 何慧珠
曾繁杰 杨紫萱 刘颢颢
(中国科学院感光化学研究所)

在红藻 (Rhodophyta)、蓝绿藻 (Cyanophyta) 和隐藻 (Cryptophyta) 中有着不同的藻胆蛋白,它们是这些藻类在光合作用中的辅助色素。藻胆蛋白是藻红蛋白、藻蓝蛋白和变藻蓝蛋白等的总称。这些蛋白质以共价键方式连结着开链的四吡咯发色基团:



藻红蛋白依据吸收光谱特征进一步分为 R-, B-, b- 和 C- 藻红蛋白等。

本文系从我国青岛海滨采集的两种红藻——多管藻 (*Polysiphonia urceolata*) 和条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 中分离出纯的 R-藻红蛋白等光合作用辅助色素,并对其某些特性进行的研究结果。

一、分离和纯化^[9]

将新鲜的多管藻用水浸泡,水溶液依次用纱布和硅藻土过滤,离心滤液得红色溶液。加入硫酸铵饱和溶液,得红色沉淀,即为粗品。粗品用蒸馏水溶解,并经过从高到低不同饱和度的硫酸铵溶液,反复溶解和沉淀使之进一步纯化,然后用磷酸缓冲溶液 (pH 6.8) 作洗脱剂,通过 Sephadex G-100 凝胶柱过滤。红色收集液经 tris-盐酸缓冲溶液 (pH 8.4) 透析后,进行 DEAE-纤维素柱层析。

上述全过程反复二至四次,直到色素蛋白溶液的吸光度 A_{565} 对 A_{280} 的比值达到约

* 本文在 1981 年 11 月中美藻类学术讨论会(青岛)上报告过。
收稿日期: 1982 年 1 月 7 日。

4.5。最后,将色素溶液用双蒸水透析,冰冻干燥后便得 R-藻红蛋白。避光贮存于冰箱中。

所需 C-藻蓝蛋白是从条斑紫菜中分离和纯化的。在制备条斑紫菜的 R-藻红蛋白时,从蓝色层析带中得到 C-藻蓝蛋白,其分离和纯化方法与制备多管藻中 R-藻红蛋白的方法基本一样。

所需叶绿素 a 按常规方法,从“玻璃翠”(Impatiens sultanii Hook f.) 叶子中用乙醇抽提并纯化。

二、吸收光谱和荧光光谱观测

在下述条件下测定以上 R-藻红蛋白的吸收光谱和荧光光谱,结果见表 1。

1. 在中性介质中

荧光光谱峰为 578nm, 在比较浓的溶液中, 在 620nm 处有很弱的峰。不论用 498, 540 或 565nm 波长激发,其荧光发射光谱都是 578nm。

2. 加入 8M 尿素或用 0.5N 盐酸调至 pH 3

在吸收光谱中, 540 和 565nm 峰合并成一个 556nm 峰。这可能是经过处理后,色素的构型或构象发生变化,使色素周围的蛋白质结构破坏所致。因为一般吸收光谱很容易受周围环境变化的影响。

从荧光光谱看出: 激发波长无论采用 498 或是 556nm, 结果都得到同一荧光发射。这就表明激发光

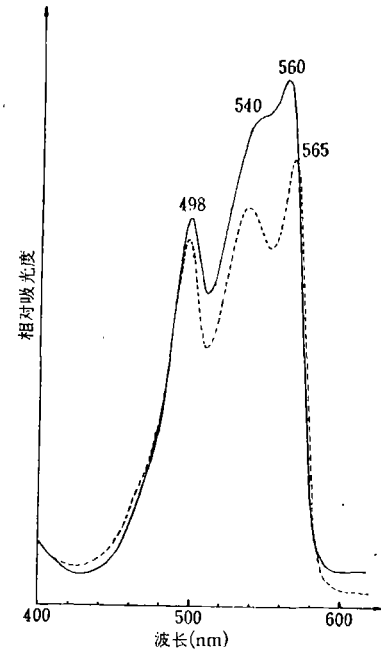


图 1 R-藻红蛋白的吸收光谱
—— 条斑紫菜; - - - - 多管藻。

能从藻尿胆素传到藻红胆素。虽然在这种条件下 498nm 吸收峰增高,但是荧光光谱带强度并不相对增加。这意味着吸收光谱强度增加的部分对光能的传递并无贡献。

表 1 不同条件下 R-藻红蛋白的吸收光谱和荧光光谱

条 件	吸收光谱 (nm)	荧光光谱 (nm)
中 性 介 质	498, 540, 565, 498, 540, 560 (条斑紫菜)*	578, 620 (在较浓溶液中荧光很弱)
8M 尿素,或 0.5N HCl, pH 3	498 和 556	578
0.5N KOH, pH 14	512, 547 和 589	520 和 604
Zn(OAc) ²⁻ ·水	512, 540, 565	520 (很弱), 578

* 除注明为自条斑紫菜中获得外,其他得自多管藻。

3. 加入 0.5N 氢氧化钾调至 pH 14

吸收光谱见表 1。用盐酸酸化使 pH 回到 pH 3 后,吸收光谱峰便可逆地出现 498 和 556nm 的吸收峰。这可能是由于某些氢键的破坏,导致吸收最大值,光谱形状和强度发生变化。这说明藻胆蛋白的周围环境发生了变化。出现了两个荧光光谱峰。激发波长 512nm, 产生 520 荧光发射峰(来自藻尿胆素)。激发波长 547 或 589nm 都产生 604nm 荧光发射峰(来自藻红胆素)。藻尿胆素(Phycourobilin)是不带蛋白质的一种藻胆色素,

结构未完全肯定, 根据文献 [13], R-藻红蛋白 (R-Phycocerythrin) 由二种藻胆色素组成, 一为藻尿胆素, 一为藻红胆素 (Phycocerythrobilin)。

在变性的藻红蛋白中, 光能不能从藻尿胆素传到藻红胆素。这结果证实了前人认为 R-藻红蛋白内存在藻尿胆素的论点^[13,2]。D. J. Chapman^[2] 曾否认藻尿胆素的存在, 他认为所谓藻尿胆素不过是蛋白质-藻红胆素复合物具有此吸收峰 (498nm) 而已, 但通过不同生物学家的实际验证, 已基本否定了 Chapman 的论点。

4. 加入醋酸锌

用激发波长 512nm 产生 520nm 荧光发射峰(很弱)。用激发波长 540nm 或 565nm 激发产生 578nm 荧光发射峰。

5. 用太阳光或白炽灯光照射

随照射时间延长, 吸收光谱 498nm 峰增强, 同时 565nm 和 540nm 峰减弱, 565nm 峰下降最快。最后, 光照试样不发射荧光。

三、激发能量传递

E. Gantt et al.^[4,5,6] 研究了紫球藻 (*Porphyridium cruentum*) 中色素蛋白的激发能量传递。并设计出在完整细胞中藻胆体的各种藻胆蛋白之间激发能量传递的模型(图 2)。Gantt 这个建议是根据色素释放的动力学, 伴随的能量解偶联和电镜的研究结果提出的。这个模型可以很成功地解释共振能量如何由外面的 B-藻红蛋白逐步传递给 R-藻蓝蛋白, 变藻蓝蛋白, 最后到叶绿素 a, 光能效率可达 95—99%。

我们通过几个藻胆蛋白和叶绿素 a 及 β -胡萝卜素, 比较这些辅助色素在水溶液中光谱的变化, 研究了条斑紫菜的激发能量传递, 结果如下。

1. R-藻红蛋白

激发波长 480nm 产生 578nm 的荧光发射峰。激发波长 540nm 或 565nm 同样产生 578nm 的荧光发射峰。这表明通过 480nm 波长照射后激发能量可以有效地传递。

2. R-藻红蛋白和 C-藻蓝蛋白的混合物

激发波长不论是 498, 540 或 565nm 都产生 578nm 的荧光发射峰。激发波长 618nm 产生 660nm 荧光发射峰, 亦是变藻蓝蛋白的荧光发射峰。而纯的 C-藻蓝蛋白的荧光发射峰则是在 648nm 处。因此, 所谓的 C-藻蓝蛋白也含有变藻蓝蛋白。换言之, 激发能量不能直接从 R-藻红蛋白传到变藻蓝蛋白。

上述现象表明激发能传递中断。

3. R-藻红蛋白和 C-藻蓝蛋白的混合物中加入含叶绿素 a 和 β -胡萝卜素的乙醇水溶液¹⁾。

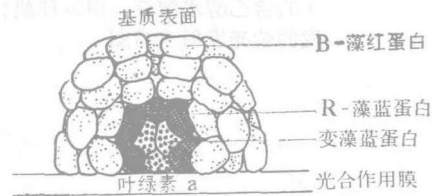


图 2 紫球藻的藻胆体模型^[6]

(在中心处靠近光合作用膜的是变藻蓝蛋白。R-藻蓝蛋白围绕着变藻蓝蛋白, 而 B-藻红蛋白组成外围。中间黑色的是藻胆体和类囊体所共有的蛋白质, 它可能用以将藻胆体固着于类囊体上)

1) 定性实验, 不计量(作者注)。

激发波长不论是 498nm 或是 565nm 都产生 678nm 荧光发射峰, 678nm 是叶绿素 a 的荧光发射波长。这就表明这种激发能量可以从藻尿胆素传到叶绿素 a, 但传递效率并不高。

由以上结果看来激发共振能量由 R-藻红蛋白(其中藻尿胆素, $\lambda_{最大}$ 498nm 传到藻

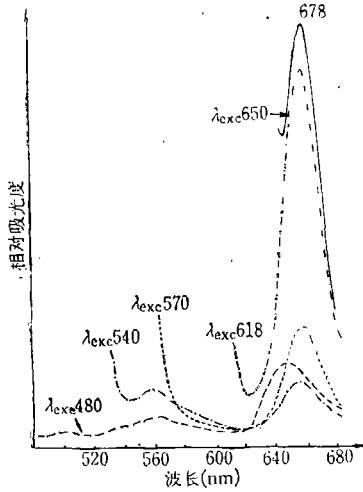


图 3 R-藻红蛋白,含变藻蓝蛋白的 C-藻蓝蛋白, β -胡萝卜素和叶绿素 a 的含乙醇水溶液,用各种波长激发的荧光发射光谱图

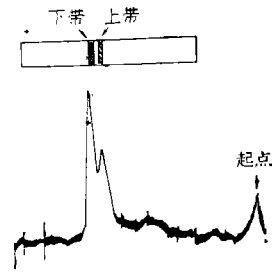


图 4 凝胶电泳与扫描图谱 (电泳后用 500nm 波长对凝胶进行扫描,记录速度是扫描速度的两倍)

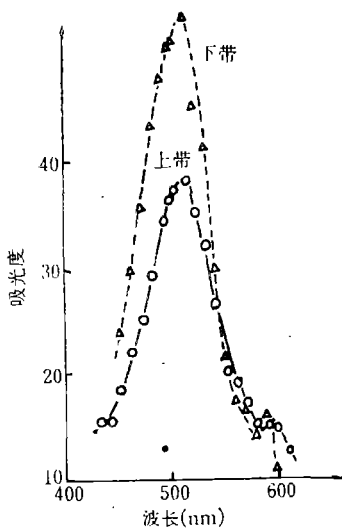


图 5 电泳后直接测定凝胶上两条红色谱带的吸收光谱图
—— 上带; - - - - 下带。

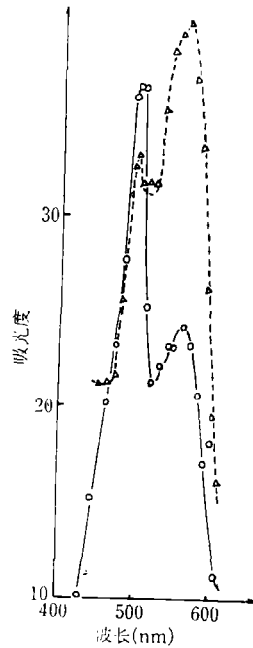


图 6 用 15% 三氯乙酸浸泡 15 小时后测量凝胶上两条红色带的吸收光谱图
—— 上带; - - - - 下带。

红胆素, $\lambda_{\text{最大}}$ 540, 565nm) 传到 C-藻蓝蛋白 ($\lambda_{\text{最大}} \sim 618\text{nm}$) 再传到变藻蓝蛋白 ($\lambda_{\text{最大}} \sim 650\text{nm}$), 最后到叶绿素 a ($\lambda_{\text{最大}} \sim 670\text{nm}$)。

但在含醇水溶液中, 很难像 Gantt 模型那样保持各藻胆蛋白彼此间的整齐排列, 因而能量传递效率不高。

四、亚基测定^[9]

应用 SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳, 研究了多管藻中 R-藻红蛋白分子的亚基。小孔胶的浓度是 13%, 可以将这种色素蛋白分成有明显区别的两条红色谱带 (图 4)。

用色谱扫描器扫描凝胶上的这两条谱带, 发现吸收峰极大值都移至 510nm 处 (图 5)。510nm 波长峰是两种色素在变性状态下的吸收峰。

将凝胶浸泡在 15% 三氯乙酸中过夜后, 用色谱扫描器对它们再进行吸收光谱测量, 发现 510nm 谱带的吸收光谱特征又回复到它们各自的发色基团的峰 (图 6)。这是由于在不同 pH 的介质中吸收峰不同 (表 1)。可以设想, 上带的吸收光谱峰是藻红胆素和藻尿胆素这两者所构成; 下带则主要是藻红胆素所构成。

五、亚基的分子量^[9]

依据用已知分子量的标准蛋白同时进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳得到的结果, 上带 (重亚基) 的分子量是 19,400dalton; 下带 (轻亚基) 的分子量是 17,800dalton (图 7)。

电泳后, 用考马氏蓝对凝胶上的两个亚基染色, 再用色谱扫描器测量这两个亚基染色后的光密度。假定染色后的蛋白质 (重亚基对轻亚基) 光密度正比于相应的蛋白质含量。测出了这两个亚基的覆盖面积之比是 1:1.7。若在 R-藻红蛋白分子中, 重亚基对轻亚基的个数之比为 1:2, 那么其分子量之比应为

$$19,400:(17,800 \times 2) = 1:1.8。$$

这个推论与测量值十分接近, 所以其聚集体可能是 $(\alpha_2\beta)_n$ 或 $(\alpha, \beta, \gamma)_n$ 。用 8M 尿素的凝胶等电聚焦电泳, 也只得到两条红色的分离带。因此, 我们可以设想多管藻中 R-藻红蛋白的“吸收单位” (R-藻红蛋白的最小单位) 是 $\alpha_2\beta$ 。而它们的聚集体分子组成可能是 $(\alpha_2\beta)_n$ 。文献中曾报道了不同藻类 R-藻

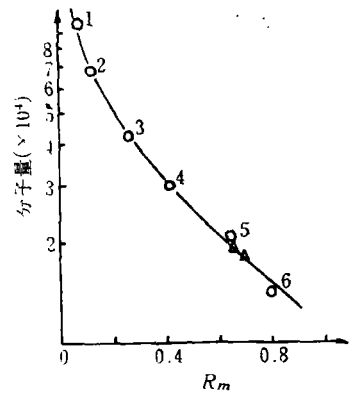


图 7 用 SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳测量多管藻 R-藻红蛋白的亚基分子量

表 2 两个亚基与标准蛋白的分子量和 R_m 值的关系

	蛋 白	分 子 量	R_m 值		蛋 白	分 子 量	R_m 值
1	磷酸化酶 B	94,000	0.07	5	大豆胰酶抑制剂	21,000	0.64
2	牛血清白蛋白	68,000	0.11	6	溶菌酶	14,300	0.80
3	卵清白蛋白	43,000	0.26	△	重亚基	19,400	0.64
4	碳酸酐酶	30,000	0.41	▲	轻亚基	17,800	0.69

红蛋白聚集体有 $(\alpha\beta)_6^{[13]}$, $(\alpha\beta)_6\gamma^{[7,8]}$, $(\alpha_2)_6^{[14]}$ 等不同形式。

六、聚集体的分子量

通过 Sephadex G-200 凝胶过滤方法^[1], 发现从多管藻中分离出的 R-藻红蛋白有两个分子量不同的聚集体(图 8)。这两个聚集体分子量分别为大约 332,000 和 500,000dalton (图 9)。依据亚基分子量计算和上述可能的亚基组成的结构, 这两个聚集体分子组成是 $(\alpha_2\beta)_6$ 和 $(\alpha_2\beta)_9$ 。在实验中还发现有分子量更大的 R-藻红蛋白聚集体, 尚有待进一步确证。

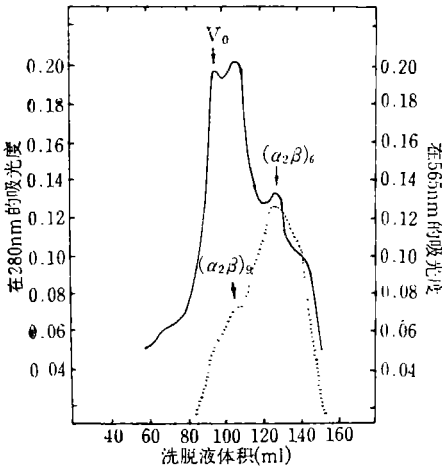


图 8 多管藻中 R-藻红蛋白通过 Sephadex G-200 凝胶过滤

—— 色素蛋白的 280nm 吸收;
 色素蛋白的 565nm 吸收。
 Sephadex G-200 柱以 0.05M tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 含 0.1M KCl) 平衡及洗脱, 凝胶柱 $2.6 \times 58\text{cm}$, 洗脱速度 6ml/h, 在 4°C 进行。

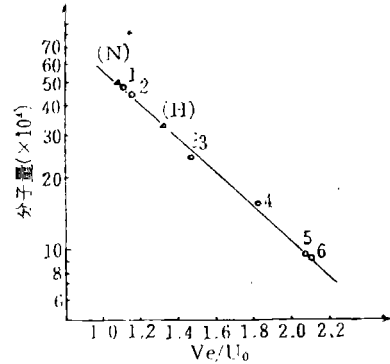


图 9 用 Sephadex G-200 ($2.6 \times 58\text{cm}$) 凝胶过滤法^[13]测定分子量(外水体积 V_e 用蓝聚糖-2000 测定)

○ —— 标准分子量蛋白: 1. 脲酶; 2. 铁蛋白; 3. 过氧化氢酶; 4. 醛缩酶 5. 伴刀豆球蛋白 A; 6. 乳过氧化物酶。
 △ —— R-藻红蛋白: (N) $(\alpha_2\beta)_6$; (H) $(\alpha_2\beta)_9$ 。

应用 Andrews 提出的方法^[11], 将作标志用的球蛋白的洗脱体积对扩散系数倒数 $10^{-6}/D$ 作图, 求出上述两种聚集体 $(\alpha_2\beta)_6$ 和 $(\alpha_2\beta)_9$ 的扩散系数 $D_{20,w}$ 分别为 $3.65 \times 10^{-7}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ 和 $3.31 \times 10^{-7}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ 。

七、N-端氨基酸^[9]

应用 Edman 降解法测定了多管藻中 R-藻红蛋白的 N-端氨基酸, 发现只有蛋氨酸一种。O'Carra^[12] 报道所有藻红蛋白 N-端氨基酸都是蛋氨酸, 我们的结果符合这种论断。

八、R-藻红蛋白的荧光猝灭

文献中业已报道藻胆蛋白在溶液中存在着各种形式的聚集体, 其分子量依据蛋白质

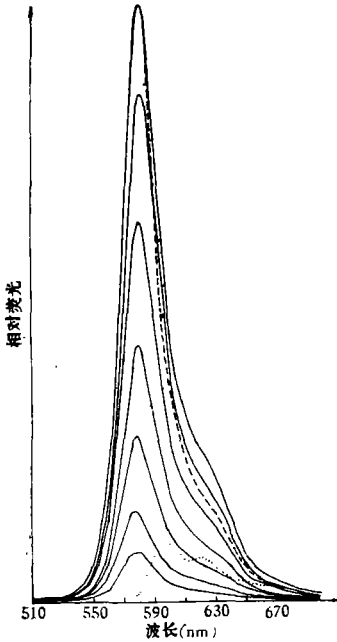
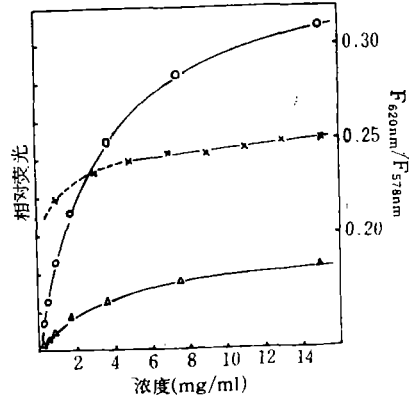


图 10 不同浓度 (15, 7.5, 3.7, 1.8, 0.9, 0.45, 0.23mg/ml) 下的 R-藻红蛋白的荧光发射光谱 (激发波长为 498nm)

----- 最低浓度的荧光光谱在 578nm 归一化到与最高浓度的荧光光谱强度所得到的谱线;
 最高浓度谱线与最低浓度归一化所得谱线之差的光谱,得600nm和620nm的峰。



○ 在578nm △ 在620nm × F_{620nm}/F_{578nm}
 图 11 R-藻红蛋白荧光光谱中 578nm 峰(○)和 620nm 峰(△)的荧光强度随浓度的变化图

—×—×— F_{620nm}/F_{578nm} 对浓度作图;
 —○—○— 578nm 峰;
 —△—△— 620nm 峰。

在溶液中的浓度而发生变化^[10,11]。

我们在 0.01M pH 6.8 磷酸缓冲溶液中测定了不同浓度的 R-藻红蛋白的荧光光谱 (图 10)。578nm 处的荧光峰归结为 R-藻红蛋白吸收单位 (单体或寡聚物), 而 620nm 处的荧光峰归结为某种形式的聚集体。将各种浓度的荧光谱带在 578nm 归一化时, 就能看出 620nm 峰的强度随溶液浓度增加而增强。而 R-藻红蛋白浓度增加时, 620nm 峰的强度的相对增加率比 578nm 峰者要快。这就表明这两个荧光峰是从两种形式的 R-藻红蛋白产生的。

600nm 吸收波长的峰与变性的蛋白相近, 此变性蛋白推想是在测定过程中产生的。

将 578nm 和 620nm 荧光峰强度对相应的溶液浓度分别作图, 便得到两条曲线。将 620nm 与 578nm 峰强度间的比值 F_{620nm}/F_{578nm} 对 R-藻红蛋白浓度作图, 在发生浓度猝灭后便得到具有微小斜率的直线 (图 11)。

荧光发射涉及激发单重态荧光。荧光猝灭剂就是使用一种化学试剂以猝灭某一激发单重态的荧光使其恢复到基态。使用“荧光猝灭”的现象以分辨单体与聚集体或不同聚集体的存在。因为一个荧光猝灭剂对单体和不同聚集体的猝灭效率是不同的。

碘离子是一个常用的荧光猝灭剂^[3]。由于它是一种带电荷的、较大的 (2.16 Å) 水合

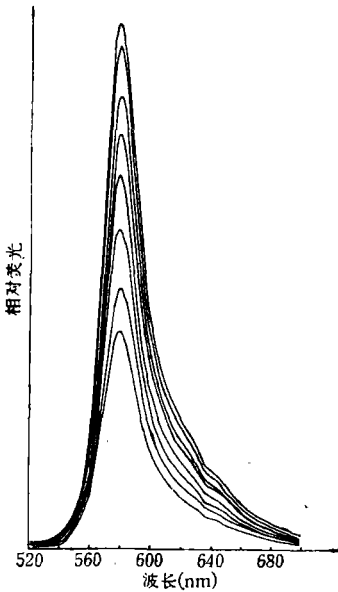


图 12 用碘化钾猝灭 R-藻红蛋白的荧光光谱

(R-藻红蛋白浓度为 5mg/ml, 每次加入 60mg KI 避光放置 15 分钟后进行测定)

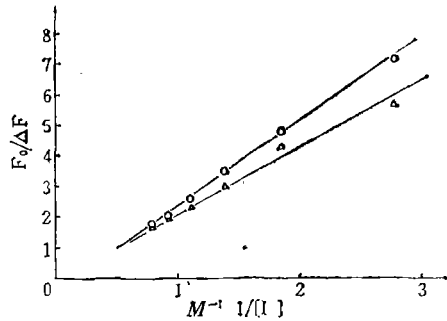


图 13 用碘离子猝灭 R-藻红蛋白荧光的改进 Stern-Volmer 图

—○—○— 578nm 峰;
—△—△— 620nm 峰。

性离子,因而它是一种很好的 R-藻红蛋白猝灭剂。

将不加碘离子时的荧光强度 (F_0) 同不加碘离子时对加碘离子时的荧光强度之差 (ΔF) 的比值 $F_0/\Delta F$ 对碘离子浓度的倒数作图,结果得到一条服从 Stern-Volmer 规则的直线(图 13)。

从图 13 看出, 620nm 峰的猝灭效率比 578nm 峰的猝灭效率要高。这意味着 R-藻红蛋白的周围排列有更易受碘离子攻击的一种形式的聚集态分子。这结果也是 R-藻红蛋白有聚集体存在的另一个证据。

参 考 文 献

- [1] Andrews, P., 1965. The Gel-filtration Behavior of Proteins related to their molecular Weights over a Wide Range. *Biochem. J.* **96**: 596—606.
- [2] Chapman, D. J., W. J. Cole and H. W. Siegelman, 1968. A Comparative Study of the Phycoerythrin Chromophore *Phytochem.* **7**(10): 1831—35.
- [3] Einarsson, Roland, 1977. Quenching of Tryptophan Fluorescence in Human Antithrombin III by Iodide Ion. *Int. J. Peptide Protein Res.* **10**(5): 342—48.
- [4] Gantt, E., 1975. Phycobilisomes: Light-Harvesting Pigment Complexes. *BioScience* **25**: 781—88.
- [5] Gantt, E., C. A. Lipschultz and B. Zilinskas, 1976. Further Evidence for a Phycobilisome Model from Selective Dissociation Fluorescence Emission, Immunoprecipitation and Electron Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* **430**: 375—88.
- [6] Gantt, E., 1981. Phycobilisomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**: 327—47.
- [7] 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**(1): 32—42.
- [8] Hixson, C. S., 1977. Characterization of Rhodophyten Biliproteins. *Dissertation Abstracts, International B., The Sciences and Engineering* **37**(10): 5037.
- [9] Ma, Jinshi et al., 1981. Separation and Characterization of R-Phycocerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Kexue Tongbao* **26**(10): 933—38.
- [10] MacColl, R. et al., 1971. Protein Aggregation in C-Phycocyanin. *Biochem. J.* **122**: 421—26.
- [11] Neufeld, G. J. et al., 1969. Aggregation Properties of C-Phycocyanin from *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **181**: 234—43.
- [12] O'Carra, P., 1965. Purification and N-Terminal Analyses of Algal Biliproteins. *Biochem. J.* **94**: 171—74.
- [13] O'Carra, P. and C. O'hEocha, 1976. Algal Biliproteins and Phycobilins. In: "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (T. W. Goodwin ed.), 2nd ed. Academic Press, New York. 1: 328—76.
- [14] Tadarico, L. and V. Kesovel, 1978. Properties and Ultrastructure of R-Phycocerythrin from *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Florideae) (huds.) Papenfuss. *Photosynthetica* **12**(4): 369—74.

SOME PROPERTIES OF R-PHYCOERYTHRIN

Jiang Lijin (Li-Chin Chiang), Ma Jinshi, He Huizhu, Zeng Fanjie,

Yang Zixuan and Liu Yongyong

(Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica)

ABSTRACT

The absorption and fluorescence spectra of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* in neutral, acidic, alkaline aqueous solutions and in presence of zinc acetate were measured. The excitation energy transfers, in aqueous solutions, through R-phycoerythrin, C-phycocyanin, Allo-phycocyanin (isolated from *Porphyra yezoensis*), Beta-carotene and chlorophyll a (isolated from *Impatiens sultanii* Hook. f.) were observed.

The molecular weights of the two subunits and the ratio of the two subunit contents were determined by SDS-Discontinuous Polyacrylamide Gel Electrophoreses. The n's of the aggregate composition $(\alpha_2\beta)_n$, in neutral buffer, were determined to be both 6 and 9 through Sephadex G-200 Gel Filtration.

The concentration effects of the fluorescence spectra of R-phycoerythrin in solutions of various concentrations were observed. The quenching effect on the fluorescence of R-phycoerythrin by iodide ion was measured. When $F_0/\Delta F$ was plotted against $I/[I^{-1}]$, a straight line was obtained. Through the quenching test, the presence of different aggregate forms was further proved.