

中国产紫菜属藻胆蛋白的研究*

潘忠正 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 本研究以羟基磷灰石 (Hydroxylapatite) 为吸附剂的柱层析法分离和纯化了中国产紫菜属 (*Porphyra*) 6种紫菜——条斑紫菜 (*P. yezoensis*)、少精紫菜 (*P. oligospermatangia*)、华北半叶紫菜 (*P. katadai* var. *hemiphylla*)、甘紫菜 (*P. tenera*)、坛紫菜 (*P. haitanensis*) 和边紫菜 (*P. marginata*)——中的藻胆蛋白。吸收光谱测定的结果显示, R-藻红蛋白 (R-phycoerythrin) 和变藻蓝蛋白 (Allophycocyanin) 存在于所研究的6种紫菜中, 而C-藻蓝蛋白 (C-phycoyanin) 只出现于甘紫菜、条斑紫菜、少精紫菜和华北半叶紫菜中, 而R-藻蓝蛋白 (R-phycoyanin) 则只出现于坛紫菜和边紫菜中。

在蓝藻、红藻、隐藻和某些甲藻中^[2]可以观察到有发出强烈荧光的蓝色、红色和紫色的蛋白质, 这些有色蛋白质即是藻类中的藻胆蛋白, 它们是藻类中一类特有的光合作用天线色素, 在光合作用中吸收和传递光能。根据吸收光谱之特性, 藻胆蛋白可以分为三种类型, 即红色的藻红蛋白 (PE), 蓝、紫色的藻蓝蛋白 (PC) 和孔雀蓝色的变藻蓝蛋白 (APC)。其中每一种类型又有两种或几种不同的形式, 现已发现的藻胆蛋白有十几种之多。有关这方面的研究最早可以追溯到1836年。在此之后的一百多年间, 特别是在最近十几年来, 对藻胆蛋白的功能和结构研究都取得了很大进展, 但对各种藻类中究竟各含有哪几种藻胆蛋白的系统研究还不很多。其原因不仅因为分离大量藻类中的藻胆蛋白枯燥而繁杂, 而且还因为某些藻类中的某一种或两种藻胆蛋白含量微少, 分离工作相当困难。在红毛菜纲 (Bangiophyceae) 紫菜属的种类中, 已研究过藻胆蛋白的有孔紫菜 (*P. perforata*)^[6]、甘紫菜^[4-6]、脐形紫菜 (*P. umbilicalis*)^[9] 和条斑紫菜^[8]等。我国紫菜种类很多, 但除对人工栽培的条斑紫菜做过活体吸收光谱^[1]和藻红蛋白的吸收光谱外^[3], 对其他紫菜中的藻胆蛋白都还没有进行过研究。从1980年起, 我们先后把天然生长于青岛潮间带的几种紫菜和人工栽培的条斑紫菜与坛紫菜中的藻胆蛋白进行了提取、分离和纯化, 并测定了其吸收光谱, 现将测定结果报道如下。

一、材料和方法

1. 材料

所用材料为条斑紫菜 (*P. yezoensis*)、少精紫菜 (*P. oligospermatangia*)、华北半叶紫菜 (*P. katadai* var. *hemiphylla*)、甘紫菜 (*P. tenera*)、坛紫菜 (*P. haitanensis*) 和边紫菜 (*P. marginata*)。其中条斑紫菜和坛紫菜分别采自青岛栈桥和广东汕头珠池海区人工

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告 1217 号。本工作得到周百成、郑宝福同志的支持和帮助, 在此一并表示感谢。

收稿日期: 1984年10月5日。

养殖筏,其他几种紫菜是生长于青岛地区潮间带的自然苗,分别采自汇泉湾、湛山湾和太平角等处。

2. 藻胆蛋白的提取

材料采集后尽快带回实验室,首先除去杂藻,用蒸馏水把材料洗净,然后装入玻璃瓶中,加适量蒸馏水置冰箱中保存(约 4°C),自溶提取。为抑制瓶内霉菌的生长,在加过蒸馏水后,可在材料表面加几滴二甲苯。约经一个星期左右的时间,藻体内的藻胆蛋白便由于细胞破裂而释放于蒸馏水中,成为紫红色的溶液,此有色溶液即藻胆蛋白的粗提取液。该粗提取液经脱脂棉过滤,或离心约 10 分钟 (3×10^3g),去除藻体碎片后即可用来做分离、纯化的样品。

3. 藻胆蛋白的分离与纯化

经过滤或离心后的粗提取液以羟基磷灰石 (Hydroxylapatite) 为吸附剂进行柱层析。吸附剂按 Siegelman 等^[10]的方法制备。层析柱为自制的直径 1cm、长约 10cm 末端拉细的玻璃小柱。柱的下端用玻璃棉或脱脂棉堵塞。吸附剂采用湿法装柱。待分离、纯化的样品每次 1—2ml,用细长玻璃管沿管壁小心加入,以免破坏柱表面的平整。柱内样品进入吸附剂的长度一般不应超过吸附剂长度的三分之一。洗脱剂为 0.005—0.25 M 的磷酸钾缓冲液 (pH6.7, 0.2M NaCl),从低浓度到高浓度对层析柱进行梯度洗脱,洗脱液用试管进行收集。

4. 吸收光谱测定

分离、纯化后的藻胆蛋白样品,如短时间内测定吸收光谱,可在测定前进行一次离心 (1.2×10^4g),如短时间内不能测定,则需用硫酸铵进行沉淀后,置冰箱内保存。待测定时用蒸馏水进行透析,再经离心后测定吸收光谱。测定都是在 pH6.7 的磷酸钾缓冲液中进行。测定用的仪器是岛津 UV-240 扫描式分光光度计,在室温下测定。

二、结 果

图 1 所示为条斑紫菜和坛紫菜中的藻胆蛋白在羟基磷灰石层析柱上的成带。其中,上

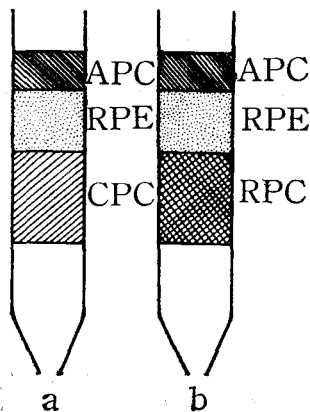


图 1 条斑紫菜和坛紫菜中的藻胆蛋白在层析柱上的成带

a. 条斑紫菜; b. 坛紫菜。

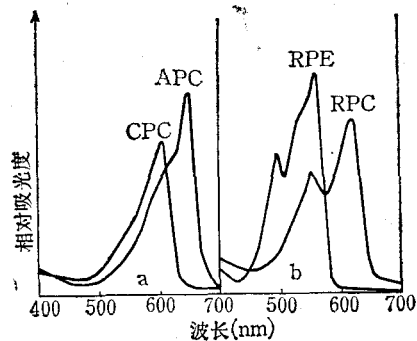


图 2 条斑紫菜和坛紫菜中藻胆蛋白的吸收光谱

a. 条斑紫菜中的 CPC, APC; b. 坛紫菜中的 RPE, RPC (在 pH6.7 的磷酸钾缓冲液中)

面相对应的两条带颜色相同,顶部的一条带呈孔雀蓝色,为变藻蓝蛋白 (APC), 另一条带呈红色,为 R-藻红蛋白 (RPE)。两个柱中最下面的一条带颜色不同,条斑紫菜的呈蓝色,为 C-藻蓝蛋白 (CPC); 坛紫菜的呈紫色,为 R-藻蓝蛋白 (RPC)。把柱上这几种藻胆蛋白用不同浓度的磷酸钾缓冲液洗脱下来,洗脱液即发出不同颜色的荧光。R-藻红蛋白发橙红色荧光,C-和 R-藻蓝蛋白以及变藻蓝蛋白全都发红色荧光。4 种洗脱液在可见光区的吸收光谱如图 2 所示。

在测定的其他 4 种紫菜中,少精紫菜、华北半叶紫菜和甘紫菜中的藻胆蛋白在羟基磷灰石柱上的成带与吸收光谱和条斑紫菜相同,边紫菜与坛紫菜相同。现将中国产 6 种紫菜中的藻胆蛋白总结如表 1。

表 1 中国产 6 种紫菜中的藻胆蛋白

	藻 胆 蛋 白		
	RPE	CPC	APC
条斑紫菜	RPE	CPC	APC
少精紫菜	RPE	[CPC	APC
华北半叶紫菜	RPE	[CPC	APC
甘紫菜	[RPE	CPC	APC
坛紫菜	RPE	RPC	APC
边紫菜	RPE	[RPC	APC

三、讨 论

在本实验中,作者以羟基磷灰石为吸附剂的柱层析法成功地分离了 6 种中国产潮间带常见紫菜中的藻胆蛋白。实验表明,这种分离、纯化方法与常规方法相比有如下优点:(1) 可以省去预纯化步骤,缩短分离、纯化时间,节约化学药品;(2) 各种藻胆蛋白在层析柱上成带清楚、整齐,分离完全,易于制备纯的制品;(3) 不仅能做定性鉴定,也可较大量地制备样品。因此,这种方法是制取藻胆蛋白较为理想、方便的方法。

甘紫菜中的藻蓝蛋白是 C-藻蓝蛋白还是 R-藻蓝蛋白,前人报道的结果不甚一致。在 Kilasoto^[7] 和 Svedberg 与 Katsurai^[11] 进行的早期工作中,曾报道为 R-藻蓝蛋白。其后, Fujiwara^[4], Haxo 等^[6]和 Hattori 与 Fujita^[5]分别报道为 C-藻蓝蛋白。我们测定的结果也是 C-藻蓝蛋白。

吸收光谱清楚地显示,这 6 种紫菜中的藻红蛋白全部是双峰型的 R-藻红蛋白。这一测定结果与 Fujiwara^[4] 报道的甘紫菜, Haxo 等^[6]报道的孔紫菜, o'Carra^[9] 报道的脐形紫菜以及 Kikuchi^[8] 报道的野生型条斑紫菜中的 R-藻红蛋白的吸收光谱完全相同。迄今为止,在有关紫菜属种类的藻红蛋白的报道中,都是双峰型 R-藻红蛋白(即在 498 和 565 nm 波长处各有一个吸收最大值,而在 540nm 处只是一个肩峰),未见有三峰型的。这同真红藻纲 (Florideophyceae) 中的藻红蛋白多数是三峰型的情况相比较,反映了紫菜属在红藻中系统地位的原始性。

另外,在这一测定中,一个值得注意的结果是坛紫菜和边紫菜中的藻蓝蛋白。这两种

紫菜中的藻蓝蛋白与其它4种不同,是R-而不是C-藻蓝蛋白。据报道孔紫菜^[6]和脐形紫菜^[8]中的藻蓝蛋白也是R-藻蓝蛋白。根据C-藻蓝蛋白出现于蓝藻和红藻,而R-藻蓝蛋白只出现于红藻中的事实,是否可以认为紫菜属内两种藻蓝蛋白的出现是紫菜属内的一种进化现象,值得进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 周百成、郑舜琴、曾呈奎, 1974。几种绿藻、褐藻和红藻的吸收光谱的比较研究。植物学报 16 (2): 145—155。
- [2] 胡鸿钧、俞敏娟、张宪孔, 1980。蓝裸甲藻(新种) (*Gymnodinium Cyaneum* Hu sp. nov) 藻胆素的发现及其意义。科学通报 41: 651—653。
- [3] 路荣昭、王淑芝、杨万晶、周百成, 1980。条纹紫菜藻红蛋白的制备。海洋科学 4: 32—33。
- [4] Fujiwara, T., 1955. Studies on chromoproteins in Japanese Nori (*Porphyra tenera*) I. A new method for the crystallization of phycoerythrin and phycocyanin. *J. Biochem.* 42: 411—417.
- [5] Hattori, A. and Y. Fujita, 1955. Spectroscopic studies on the phycobilin pigments obtained from blue-green and red algae. *J. Biochem.* 43: 903—909.
- [6] Haxo, F. T., C. O'hEocha and P. Norris, 1955. Comparative studies of chromatographically separated phycoerythrin and phycocyanins. *Arch. Biochem. Biophys.* 54: 162—173.
- [7] Kitasoto, Z., 1925. Biochemische Studien Über Phykoerythrin und Phykocyanin, *Acta Phytchim.* 2: 75—79.
- [8] Kikuchi, R. et al., 1979. Phycobilin in different colortype of *Porphyra yezoensis* Ueda. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45(11): 1461—1464.
- [9] o'Carra, P., 1965. Purification and N-terminal analysis of algae biliproteins. *J. Biochem.* 94: 171—174.
- [10] Siegelman, H. W. and J. H. Kycia, 1978. In: J. A. Hellebust and J. S. Craigie eds. Handbook of Phycological and Biochemical Methods. Cambridge Univ. Press, pp. 72—79.
- [11] Svedburg, T. and T. Katsurai, 1929. The molecule weight of phycocyanin and phycoerythrin from *Porphyra tenera* and of phycocyanin from *Aphanizomenon flosaquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 51: 3573—3583.

STUDIES ON PHYCOBILIPROTEINS OF *PORPHYRA* FROM CHINA*

Pan Zhongzheng and Zeng Chengkui (C. K. Tseng)
(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

Phycobiliproteins were separated and purified from six species of *Porphyra*, *P. yezoensis*, *P. oligospermatangia*, *P. tenera*, *P. katadai* var. *hemiphylla*, *P. haitanensis* and *P. marginata*, by the hydroxylapatite column chromatography. Their absorption spectra were measured with Shimadzu UV-240 spectrophotometer.

It was found that R-phycoerythrin and allophycocyanin are present in all the species investigated, whereas C-phycoerythrin is present only in *P. tenera*, *P. yezoensis*, *P. oligospermatangia* and *P. katadai* var. *hemiphylla*, and R-phycoerythrin only in *P. marginata* and *P. haitanensis*.

*Contribution No. 1217 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.