

## pH 对两种光谱类型的 R-藻红蛋白的影响\*

潘忠正 周百成 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

**提要** 红藻中的 R-藻红蛋白 (R-PE) 在可见区的吸收光谱有三峰型和双峰型两种光谱类型。三峰型 R-PE 只存在于真红藻纲 (Florideophyceae) 的高等红藻中, 双峰型 R-PE 主要出现于红毛菜纲 (Bangiophyceae) 的低等红藻。用 pH 为 2.0—11.0 的磷酸缓冲液对上述两种类型的 R-PE 进行处理, 其结果是在生理 pH 范围内, 它们的吸收光谱和荧光光谱都是稳定的; 在 pH > 9.0 的情况下, 三峰型 R-PE 的吸收光谱和荧光光谱仍表现稳定, 而双峰型 R-PE 的吸收光谱则表现出明显的改变。在大约 540nm 波长处, 原来为吸收肩的位置上出现了一个类似吸收峰的弯曲。这表明两类 R-PE 在结构上确有着一定的差异, 是两类天然存在的产物, 这在红藻中具有分类学意义。

R-藻红蛋白 (R-PE) 是大量出现于红藻中的一种捕光色素蛋白。在红藻的捕光色素系统中, 它是光能的最先捕获者, 其所捕获的光能首先传递给藻蓝蛋白 (PC), 进而传递给异藻蓝蛋白 (APC), 最终传递给作用中心色素并为其所捕获, 以推动光合作用的进行。按吸收光谱, R-PE 有两种光谱类型: 一种是在 498, 540 和 565nm 波长处各有一个吸收极大值的三峰型 R-PE; 另一种是在 498 和 565nm 处各有一个吸收极大值, 而在 540 nm 处为一个吸收肩的双峰型 R-PE。胆蛋白的吸收光谱是判断胆蛋白的重要特征。早在 1887 年, Sorby<sup>[7]</sup> 就已经注意到胆蛋白的光谱特性与含有这些色素的藻类的分类地位之间存在着一定的关系。Hirose 和 Kumano<sup>[8]</sup> 根据对 56 种日本红藻粗提取液的吸收光谱的测定结果, 认为双峰型 R-PE (Hirose 文章中称为 IV 型 PE) 存在于真红藻纲海索面目 (Nemalionales) 以下的红藻中, 包括红毛菜纲的低等红藻和海索面目的部分低等种类; 三峰型 R-PE 出现于海索面目以上的高等红藻中, 其中包括海索面目一部分较高等的种类。作者等<sup>[9]</sup> 从中国青岛地区、加拿大大西洋沿岸和美国太平洋沿岸采集红藻共 64 种, 其胆蛋白经层析分离后进行吸收光谱测定的结果表明, 属红毛菜纲的 18 种红藻的 R-PE 全部都是双峰型 R-PE; 属真红藻纲的 46 种高等红藻, 有 7 种是双峰型 R-PE, 其余 39 种都是三峰型 R-PE。虽然我们与 Hirose 和 Kumano 测定的结果不完全一致, 但根据各自的测定, 都认为这两种光谱类型的 R-PE 在红藻中的分布与含有这两种 R-PE 的藻类的系统地位有关, 因而具有分类学意义。但 O'hEocha<sup>[11]</sup> 认为, 藻红蛋白吸收极大处的波长和相对消光不仅与分离的种类有关, 而且还与提取、分离的方法有关。另外, 很多研究者均注意到, 胆蛋白吸收光谱的形状和强度决定于其聚集态<sup>[1,3,4]</sup>, 而其聚集态又与胆蛋白浓度、介质的 pH 和离子强度等物理、化学环境密切相关<sup>[5,10]</sup>。因而要论证红藻中的这两种

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告 1161 号。收稿日期: 1985 年 2 月 28 日。

1) 潘忠正等, 青岛海产红藻 R-藻红蛋白光谱特性的比较研究(待发表)。

光谱类型的 R-PE 究竟是天然存在的产物,抑或是分离过程中在不同的物理、化学环境影响下形成的,就需要研究以上所述的物理、化学环境因子对这两种不同光谱类型 R-PE 的影响。我们用真红藻纲的日本异管藻 *Heterosiphonia japonica* 和红毛菜纲的华北半叶紫菜 *Porphyra katadai* var. *hemiphylla* 中的 R-PE 为材料,来探讨这两类 R-PE 在保持胆蛋白浓度和介质离子强度不变的条件下,不同 pH 对它们的影响。

## 一、材料和方法

### 1. 胆蛋白的分离与纯化

三峰与双峰型 R-PE 分别从真红藻纲的日本异管藻和红毛菜纲的华北半叶紫菜中分离与纯化。这两种藻都是青岛沿海潮间带天然生长的常见海藻。新鲜藻体采回后用蒸馏水洗净,然后浸泡于稀的磷酸盐缓冲液或蒸馏水中提取胆蛋白。胆蛋白粗提液经过滤,去除藻体碎屑后,在羟基磷灰石 (Hydroxylapatite) 为吸附剂的层析柱上进行层析分离与纯化。做为实验样品的 R-PE,其纯度为  $A_{565}/A_{280} \geq 3$ 。

### 2. 溶液制备

用离子强度为 0.05 mol 的磷酸钾缓冲液制备胆蛋白浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pH 值分别为 2.0, 3.1, 4.0, 5.0, 6.7, 7.0, 7.5, 8.5, 9.6, 10.0 和 11.0 的两组胆蛋白溶液。一组是从日本异管藻中分离的三峰型 R-PE,另一组是从华北半叶紫菜中分离的双峰型 R-PE。两组溶液的 pH 值均用 Beckman  $\Phi$  71 型 pH 计测定。

### 3. 吸收和荧光光谱测定

吸收光谱采用岛津 UV-240 型扫描式分光光度计测定,吸收池的光径为 1cm。荧光发射与激发光谱用日立 850 型荧光分光光度计测定。所有测定都是在室温下进行。

## 二、结 果

两种光谱类型的 R-PE 的吸收光谱随 pH 值的变化示于图 1 和图 2。在 pH 为

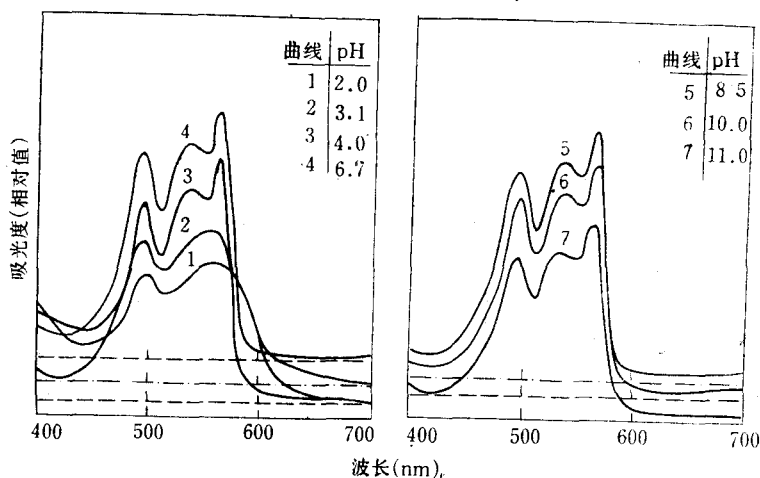


图 1 三峰型 R-PE 的吸收光谱随 pH 值的变化

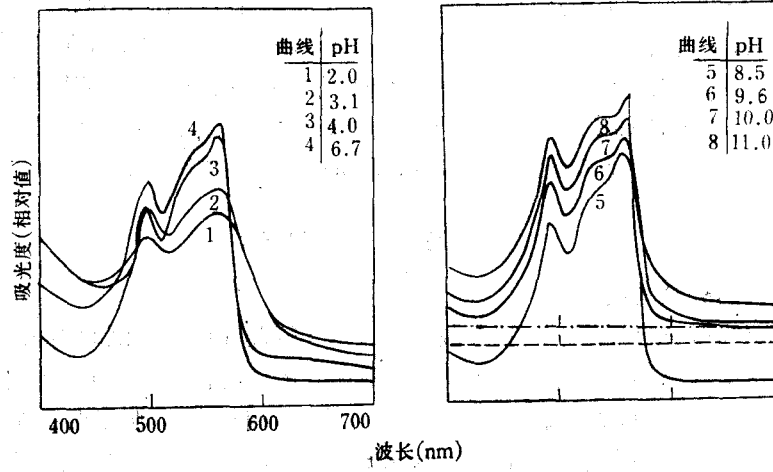


图2 双峰型 R-PE 的吸收光谱随 pH 值的变化

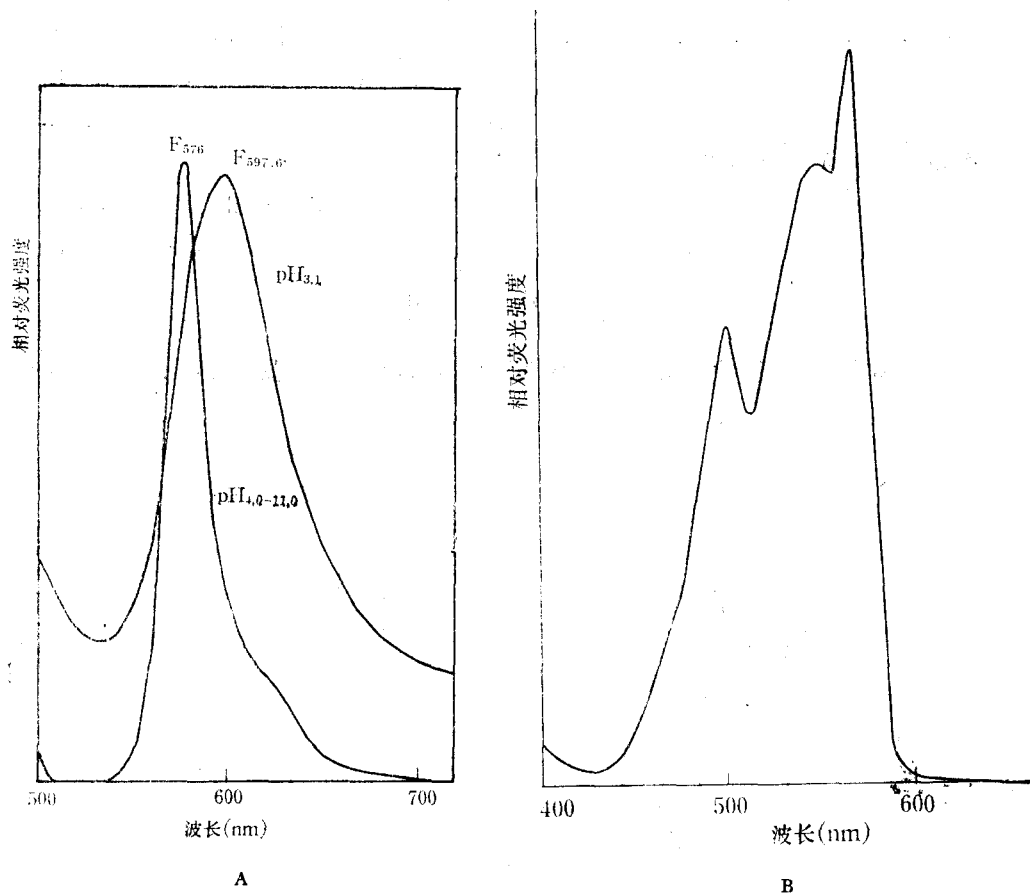


图3 三峰型 R-PE 的荧光光谱  
A. 荧光发射光谱; B. 荧光激发光谱。

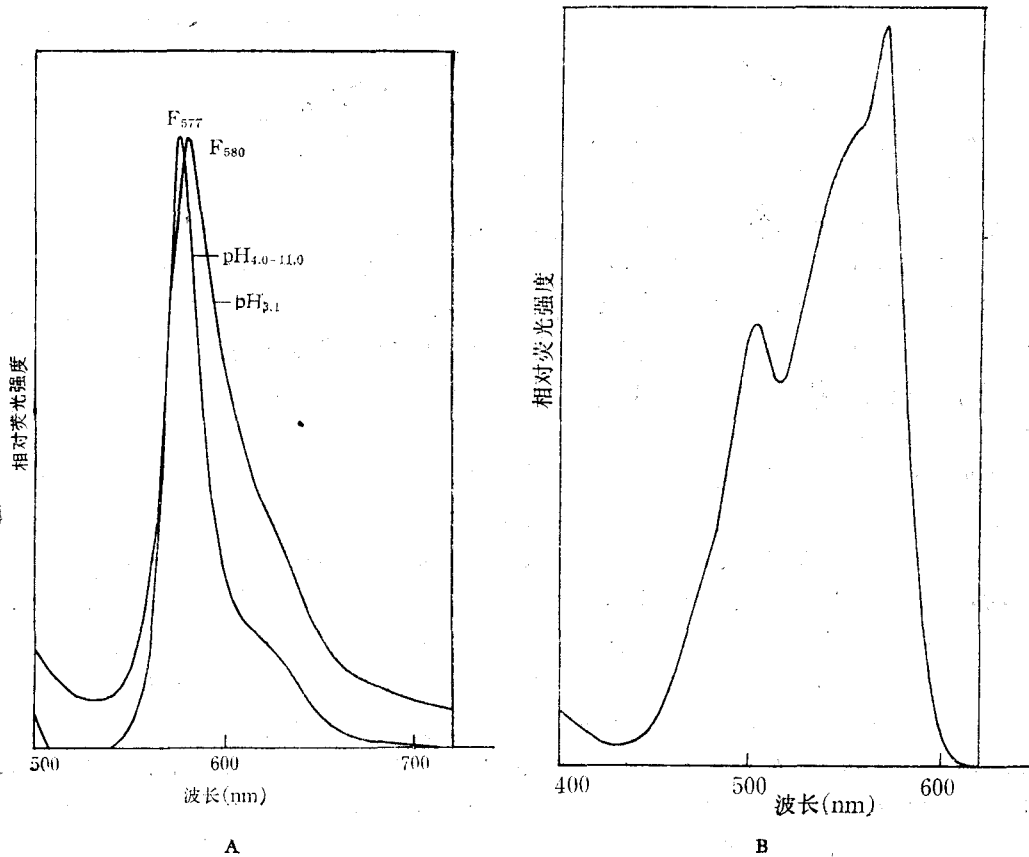


图 4 双峰型 R-PE 的荧光光谱  
A. 荧光发射光谱; B. 荧光激发光谱。

2.0 和 3.1 的低值时,两种光谱类型的 R-PE 的吸收光谱基本相似,都是变性 R-PE 的吸收光谱。在 pH 为 2.0 时,两个长波长吸收峰(双峰型 R-PE 其中一个为吸收肩)合并成一个宽的吸收带。在 pH 为 3.1 时,两个长波长吸收峰(肩)隐约可见,这是胆蛋白部分变性的结果。在 pH 为 4.0—11.0 的宽值范围内,三峰型 R-PE 吸收光谱曲线的形状基本保持不变(图 1),都显示中性 pH 下的光谱特征。双峰型 R-PE 在 pH 为 4.0—8.5 的范围内,表现为正常的双峰型吸收光谱;在 pH 为 9.6—11.0 的高值下,光谱曲线逐渐表现出明显的变化,即在大约 540 nm 波长处,原来为吸收肩的位置上逐渐向上弯曲形成类似吸收峰的形状(图 2)。图 3A, B 和图 4 A, B 分别示出三峰和双峰 R-PE 在不同 pH 值时的荧光发射与荧光激发光谱。在 pH 4.0—11.0 的范围内,两种 R-PE 的荧光发射与荧光激发光谱都不受 pH 变化的影响,都表现中性 pH 下的光谱形状。其荧光发射峰分别为 576nm 和 577nm。在 pH 3.1 时,双峰型 R-PE 的发射峰移到 580nm,三峰型 R-PE 移到 597.5nm,同时发射光谱的形状发生变化。

### 三、讨 论

在有关胆蛋白光谱特性的文献中所报道的一些胆蛋白,在可见光区的吸收极大值和

荧光发射极大值的资料,通常都是在接近中性 pH 下的稀盐溶液或缓冲溶液中测定的结果。在此条件下,红藻中的 R-PE 视其光谱在 540nm 波长附近的吸收是“峰”或是“肩”而区分成三峰型和双峰型两种光谱类型。但据 Frackowiak<sup>[3]</sup>和 Murakami<sup>[10]</sup>等学者的研究,如果改变测定胆蛋白吸收光谱的上述条件,胆蛋白在可见光区的光谱特性就会发生变化。他们的研究证明,胆蛋白吸收光谱的特性与所测定溶液的 pH 值、蛋白质浓度和介质的离子强度等物理、化学环境有密切的关系。因而要用光谱学的方法来描述某种胆蛋白的特性时,说明所测定溶液的物理、化学环境是极其重要的。据 Krasnovskii 等<sup>[9]</sup>和作者的研究,在胆蛋白浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,介质的离子强度为 0.05 mol 的条件下,两种类型的 R-PE 在接近中性 pH 值时,在可见光区都显示正常的“三峰”与“双峰”的吸收光谱。本文在探讨不同 pH 值对两种光谱类型的 R-PE 影响的研究中,胆蛋白的浓度和介质的离子强度采用了以上的数值。

根据我们的测定结果,由日本异管藻中分离的三峰型 R-PE,在 pH 4.0—11.0 的范围内的吸收光谱除吸光度稍有改变外(图 1),光谱曲线的形状基本没有变化。我们的这一测定结果与 Krasnovskii<sup>[9]</sup>从一种绢丝藻 *Callithamnion rubosum* 和 Frackowiak<sup>[3]</sup>从仙菜 *Ceramium rubrum* 分离的 R-PE 的测定结果相同。以上两位学者分别在 pH 3.6—10.0 和 pH 3.0—10.0 的范围内测定了上述两种高等红藻三峰型 R-PE 的吸收光谱。上述结果说明,三峰型 R-PE 的吸收光谱在一个很宽的 pH 值范围内不受 pH 的影响或影响微弱。另据 Eriksson-Quensel<sup>[2]</sup>和 Vaughan<sup>[12]</sup>报道,在一个相当宽的 pH 范围内,三峰型 R-PE 都是以  $(\alpha\beta)_2\gamma$  的聚集态存在。Frackowiak 也指出,在 pH 3.0—10.0 的范围内,三峰型 R-PE 的分子量随 pH 的变化甚微。因此可以认为,三峰型 R-PE 能够在在一个相当宽的 pH 范围内保持着比较稳定的  $(\alpha\beta)_2\gamma$  结构而不受 pH 的影响。

与高等红藻中的三峰型 R-PE 不同,从低等红藻华北半叶紫菜中分离的双峰型 R-PE,在 pH 4.0—11.0 的范围内,并不总是保持其“双峰”的吸收特征。在 pH 为 9.6 以上,约在 540 nm 波长附近出现了一个类似吸收峰的弯曲。双峰型 R-PE 在较高 pH 下出现的这种现象,迄今尚未见报道。关于这种现象出现的原因,是否有可能是蛋白质变性的结果呢?为此,我们仔细观察了胆蛋白溶液在 pH 9.6—11.0 下的颜色和荧光发射与激发光谱。变性 R-PE 的颜色呈紫色且有沉淀发生,而上述 pH 下的 R-PE 溶液颜色正常,看不出变色的迹象,更没有沉淀发生。同时,其荧光发射与荧光激发光谱(图 4A,B)也都正常,与中性 pH 相同。因而不像是胆蛋白变性导致的结果。由于胆蛋白在可见光区的吸收光谱的形状对蛋白质的聚集态非常敏感<sup>[1,4-6]</sup>,而 pH 又是影响蛋白质聚集态的重要因子<sup>[3,10]</sup>,那么,双峰型 R-PE 在较高 pH 下的这种光谱变化是否是蛋白质聚集态发生变化的结果呢?这个问题尚需进一步进行研究。然而从测定的结果可以清楚地看出,在正常生理 pH 下,两种光谱类型的 R-PE 分别显示其三峰与双峰的吸收特征,而在较高 pH 下三峰型 R-PE 较双峰型 R-PE 有较高的稳定性,从而显示出两类 R-PE 在结构上确系存在着一定的差异。因此我们认为,这两类 R-PE 无疑是红藻中两种天然存在的产物。由于它们主要分别存在于红毛菜纲和真红藻纲中,因而它们在红藻中具有明显的分类学意义。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Bennett, A. and L. Bogorad, 1971. Properties of subunits aggregated of blue-green algae biliproteins. *Biochem.* 10: 3625—3635.
- [ 2 ] Eriksson-Quensel, I. B., 1938. *Biochem. J.* 32: 585—589.
- [ 3 ] Frackowiak, D., 1979. Spectral properties of phycoerythrin. *Photosynthetica.* 13(1): 21—28.
- [ 4 ] Glazer, A. N., S. Fang and D. W. Brown, 1973. Spectroscopic properties of C-phycoyanin and of its  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *J. Biol. Chem.* 248: 5679—5685.
- [ 5 ] Grazer, A. N., 1981. Photosynthetic accessory proteins with bili prosthetic groups. In: *The Biochemistry of Plant.* Ed. by Hatch, M. D. and N. K. Boardman, Academia press, New York, vol. 8, pp. 51—92.
- [ 6 ] Hattori, J., H. L. Crespi and J. J. Katz, 1965. Association and dissociation of phycocyanin and the effect of deuterium substitution on the processes. *Biochem.* 4: 1225—1236.
- [ 7 ] Haxo, F. T. and C. O'hEocha, 1960. Chromoproteins of algae. In: *Encyclopedia of Plant Physiology.* Ed. by Ruhland, W., Springer-Verlag, Berlin, vol. 5, pp. 497—510.
- [ 8 ] Hirose, H. and S. Kumano, 1966. Photoreactive pigments of algae and algal phylogeny. In: *Advance of Phylogeny in Japan.* Ed. by Tokada. Veb Gustav Fischer verlag Jena, pp. 52—56.
- [ 9 ] Krasnovskii, A. A., V. B. Evstigneev and G. P. Brin, 1952. Isolation of phycoerythrin from red algae and its spectral and photochemical properties. *Dok. Akad. Nauk. SSSR* 82(6): 947—950.
- [ 10 ] Murakami, A., M. Mimuro and K. Ohki et al., 1981. Absorption spectrum of allophycocyanin isolated from *Anabaena cylindrica*: variation of the absorption spectrum induced by change of physicochemical environment. *J. Biochem.* 89: 79—86.
- [ 11 ] O'hEocha, C., 1962. Phycobilin. In: *Physiology and Biochemistry of Algae.* Ed. by Lewin, R. A., Acad. Press, New York and London, pp. 421—435.
- [ 12 ] Vaughan, M. H. Jr., 1964. Ph. D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge.

## THE EFFECT OF pH ON BOTH SPECTRAL TYPES OF R-PHYCOERYTHRIN

Pan Zhongzheng, Zhou Baicheng and Zeng Chengkui (C. K. Tseng)

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

### ABSTRACT

There are two spectral types of R-phycoerythrin (R-PE) in red algae. One is the triple peak type R-PE with absorption maxima at 498, 540 and 565 nm. The other is the double peak type R-PE with absorption maxima at 498 and 565 nm, and an absorption shoulder at 540 nm. The former is present only in higher classes of the more advanced Florideophyceae, the latter occurs chiefly in the Bangiophyceae. When these two types of R-PE are treated with buffer solutions with a broad pH range from 2.0—11.0, their absorption and fluorescence spectra keep unchanged within the range adjacent to neutral pH. At pH values higher than 9.6, the absorption and fluorescence spectra of triple peak type R-PE remain stable, but the absorption spectra of double peak type R-PE produce gradually a protrusion similar to an absorption peak at about 540 nm. This phenomenon shows that there are certain differences in structure between these two types of R-PE. Both types of R-PE are naturally occurring products showing taxonomic significance in red algae.