

红毛藻中多组分藻胆蛋白及其亚基的分离

郑江^{1,2}, 高亚辉¹, 王文星³, 黄水英³

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;
3. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要:采用 DEAE-52 离子交换柱对红毛藻 (*Bangia fuscopurpurea* Lyngb.) 中的藻胆蛋白进行分离, 依次洗脱出蓝色、紫色、深红色、红色和浅红色等几种组分的藻胆蛋白; 经光谱分析发现蓝色组分为 R-藻蓝蛋白, 紫色组分为 1 种三峰型的藻胆蛋白, 深红色组分和红色组分为 2 种不同但又非常相似的藻胆蛋白, 其中深红色组分可能与某些色素物质结合较为紧密, 而最后洗脱出的浅红色组分则为变性的藻胆蛋白。尿素洗脱结果表明, 蓝色组分的 R-藻蓝蛋白是由 2 种双峰型的亚基构成。本研究旨在揭示藻胆蛋白的能量传递机制提供理论和技术依据。

关键词:红毛藻; 藻胆蛋白; 亚基; 分离

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)04-0277-05

藻胆蛋白是红藻、蓝藻、隐藻和部分甲藻特有的捕光色素蛋白, 它包括藻红蛋白 (PE)、藻蓝蛋白 (PC) 和别藻蓝蛋白 (APC) 3 大类。在藻胆体中, 光能依次经 PE 和 PC 传递后, 最后经 APC 传递给光合作用中心色素叶绿素 a, 以实现光合作用^[1]。根据藻胆蛋白特征光谱的不同, PE 可再分为 R、B、b 和 C 型, PC 可再分为 C、R 型^[2], APC 则可再分为 APC I、II、III 和 APC B 型等^[3]。随着研究的深入, 又陆续发现了一些其他类型的藻胆蛋白, 如藻红蓝蛋白、r-PE^[4]、B-PE₁ 和 B-PE₂^[5]、R6β-PE^[6]、R-PE IV^[7] 等藻胆蛋白, 这些藻胆蛋白不仅在光谱上存在差异, 在发色团的组成和含量上以及能量的吸收和传递方面也存在差异。因而, 深入研究各类藻胆蛋白的结构和功能, 对于揭示藻胆蛋白中的能量传递机制及其在光合作用原初理论方面的作用都具有重要的意义。此外, 由于藻胆蛋白是一种天然色素, 又具有较强荧光活性, 因而在食品、化妆品、染料、医学诊断、免疫化学和生物工程领域中也都有重要的研

究和开发价值。同时, 藻胆蛋白及其标记物在国际上的售价相当高, 因而研究和开发藻胆蛋白在经济效益方面也有很好的前景。

红毛藻 (*Bangia fuscopurpurea* Lyngb.) 属红藻门, 红毛菜纲, 红毛菜目, 常生长在中、高潮带的岩礁、贝壳上, 在我国沿海均有分布, 为浙江、福建、香港沿海常见种, 系世界性泛暖温带性海藻^[8]。它颜色暗红, 富含藻胆蛋白, 有补血降压、滋阴降火和防止血管疾病的作用, 但由于其腥味较浓, 纤维较硬, 不符合人们的饮食习惯, 长期以来, 仅以干制品销往台湾地区。因而, 研究和开发红毛藻中的藻胆蛋白, 不仅具有重要的理论意义, 还会产生良好的经济效益。

本研究采用 DEAE-52 离子交换柱等分离纯化技术对红毛藻中的藻胆蛋白进行分离, 并用尿素梯度洗脱的方法对有关藻胆蛋白的亚基进行分离, 旨在进一步开发利用红毛藻, 揭示藻胆蛋白的能量传递机制提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

红毛藻干品 (*Bangia fuscopurpurea*) 为福建莆田南日岛人工养殖产品。

1.2 实验方法

收稿日期: 2002-09-04; 修订日期: 2002-12-18.

基金项目: 福建省重中之重项目资助; 集美大学校内基金资助 (F01023).

作者简介: 郑江 (1971-), 男, 讲师, 主要从事海藻生物活性物质的研究和开发. E-mail: jizheng@jmu.edu.cn

通讯作者: 高亚辉.

1.2.1 藻胆蛋白的粗提 准确称取一定量的红毛藻干品,加入0.002 5 mol/L、pH 6.89的磷酸缓冲溶液,用组织捣碎法对藻体细胞破碎10 min,3 000 r/min离心10 min取上层澄清液,用饱和度为60%的硫酸铵盐析2 h,离心,将沉淀物用磷酸缓冲液溶解得到藻胆蛋白粗提液。

1.2.2 多组分藻胆蛋白的分离 先用0.002 5 mol/L、pH 6.89的磷酸缓冲液平衡DEAE-52离子交换柱,再将透析过夜的藻胆蛋白粗提液上柱,用该缓冲液洗脱,直到能将各洗脱带较清晰地分离开,再分别收集各洗脱带。测定各洗脱带的吸收光谱。

1.2.3 亚基的分离 按文献[9]用尿素分离亚基的方法,将收集的各洗脱带再上DEAE-52离子交换柱,用8 mol/L尿素梯度洗脱,收集各洗脱带,分别测定它们的吸收光谱。

1.3 测定方法

藻胆蛋白纯度用 $A_{\max}/A_{280}$ 表示;吸收光谱用美国贝克曼-库尔特公司的Du640核酸蛋白分析仪测定。

2 结果与讨论

2.1 藻胆蛋白的洗脱曲线

图1显示了经DEAE-52离子交换柱后,藻胆蛋白各组分的洗脱顺序。先洗脱出的是蓝色的藻胆蛋白组分,之后是紫色组分,再接下来是深红色组分、红色组分,最后洗脱出的是浅红色组分,即各洗脱带的洗脱顺序分别为:蓝色→紫色→深红→红色→浅红色。

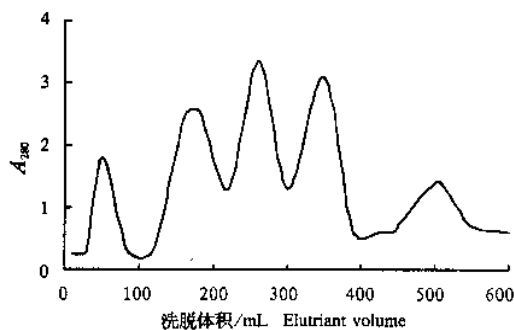


图1 藻胆蛋白洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of phycobiliproteins

2.2 蓝色组分及其亚基

2.2.1 蓝色组分 分离得到的蓝色组分经吸收光谱测定发现,在615 nm和553 nm处各有1个吸收

峰(如图2),为R-PC的典型特征吸收光谱^[1],其 $A_{615} = 1.1501$, $A_{553} = 0.8883$, $A_{615}/A_{553} = 1.29$ 。R-PC主要存在于高等红藻内,是漫长进化过程中的幸存组份,其含量很低并且不易得到,与其他的藻胆蛋白相比,目前对它的结构和功能的关系了解还较为有限^[10]。因此,红毛藻中是否存在有R-PC,不同文献资料显示有所不同。一些文献资料认为红毛藻中仅含有C-PC,而无R-PC^[1,11],曾繁杰^[12]研究了红毛藻中的藻胆体及其蛋白质后,发现红毛藻中存在有R-PC,本研究也表明红毛藻中确实存在R-PC。

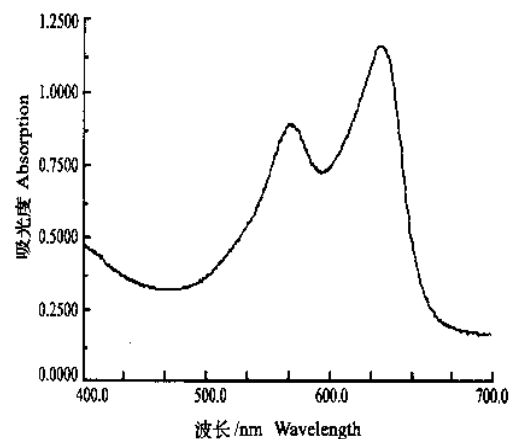


图2 蓝色组分(藻蓝蛋白)的吸收光谱

Fig.2 Absorption spectrum of blue component (phycocyanin)

2.2.2 亚基 由于尿素是一种变性剂,它能打断蛋白质中的一些次级键,使结合松散的亚基脱离出,因而将上述蓝色的R-PC用尿素梯度洗脱可得到2条蓝色洗脱带,先洗脱出的为 α 亚基,后洗脱出为 β 亚基,其吸收光谱分别见图3、4。从图中可看到,2亚基都为双峰形,在615 nm和553 nm处各有1个吸收峰,亚基 α 的615 nm吸收峰比553 nm的吸收峰高, $A_{615}/A_{553} = 1.21$,而亚基 β 则在两处的吸收峰值较为接近,615 nm吸收峰比553 nm的吸收峰略低, $A_{615}/A_{553} = 0.997$,这与高洪峰报道的从坛紫菜中分离出的2个R-PC亚基有明显不同^[13]。

2.3 紫色组分

紫色组分的藻胆蛋白的吸收光谱如图5,在498 nm、564 nm、615 nm处均有圆弧形吸收峰,呈3吸收峰型。将其用8 mol/L尿素梯度洗脱可得到图6的紫色带,也为圆弧形峰形,二者峰形有相似之处,但紫色带只在498 nm、564 nm有吸收峰,在615 nm无

吸收峰。紫色藻胆蛋白因为在 498 nm、564 nm、615 nm 处均有吸收峰,估计其应含有藻红胆素、藻蓝胆素和藻尿胆素等发色团,而紫色带只在 498 nm、564 nm 有吸收峰,估计只含有藻红胆素和藻尿胆素等发色团。如果用尿素洗脱出的该紫色带是紫色藻胆蛋白组分的一个亚基,则从光谱上分析,该紫色藻胆蛋白至少应该还含有一个亚基,且该亚基至少应含有藻蓝胆素,但在本实验条件下并未发现,一种可能是由于该亚基与 DEAE-52 纤维素离子交换柱结合较紧密,未能将其洗脱下来;还有一种可能,就是该紫色组分有可能是藻红蛋白与藻蓝蛋白聚集而成的复合体,而用尿素洗脱下来的紫色带则可能是结合力较弱、在尿素作用下又发生变性的藻红蛋白。关于这种三吸收峰型的藻胆蛋白或藻胆蛋白复合体,目前尚未见报道,相关的结构、性质和功能,还有待进一步的分析研究。

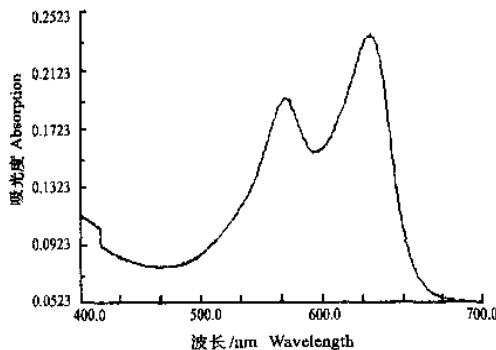


图3 藻蓝蛋白的 α 亚基吸收光谱

Fig.3 Absorption spectrum of phycocyanin's subunit α

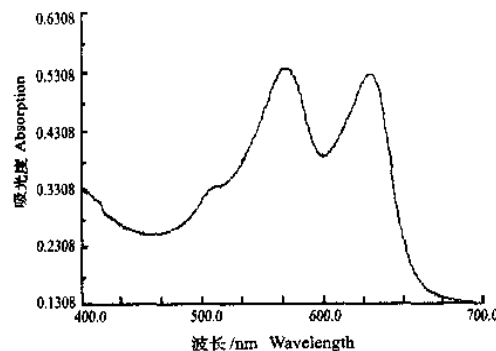


图4 藻蓝蛋白的 β 亚基吸收光谱

Fig.4 Absorption spectrum of phycocyanin's subunit β

2.4 深红色组分和红色组分

图7比较了紫色、深红色、红色与浅红色等4种组分的吸收光谱,其中深红色组分(图7中①)在

564 nm、498 nm 处有吸收峰,在 546 nm 处有一吸收肩,与图8的纯化的藻红蛋白整体上较为相似,但深红色组分在 530 ~ 570 nm 间形成的是锯齿峰,并在 573 nm 处有一明显的小肩峰。另外本研究还发现,未经盐析的藻胆蛋白粗提液的吸收光谱,在 530 ~ 570 nm 间也出现小的剧烈波动的锯齿峰,在 573 nm 处也有一明显的小肩峰(文中未附谱图)。因此,根据本研究推测,在红毛藻中可能存在一些色素物质,在相应波长范围有吸收,并与该组分的藻红蛋白结合较紧密,盐析过程中随着该组分的藻红蛋白一起沉淀,所以该洗脱带整体呈现出藻红蛋白的峰形,但在有些波长范围出现一些小的波动形成锯齿峰、小肩峰。

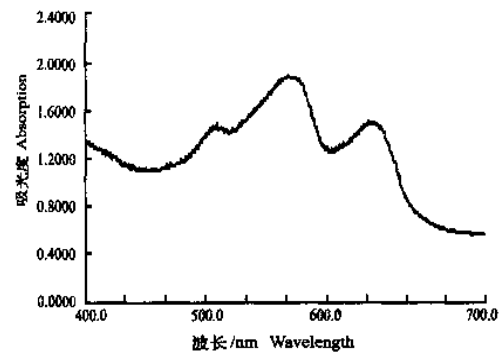


图5 紫色组分的吸收光谱

Fig.5 Absorption spectrum of purple component

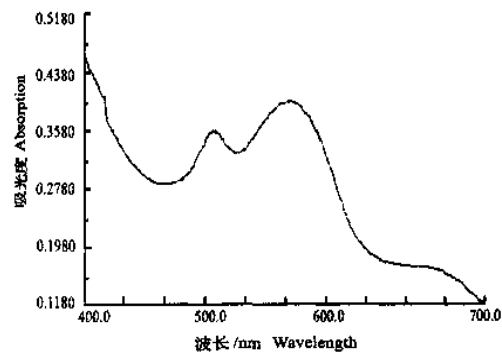


图6 紫色组分被尿素洗脱下来的紫色带的吸收光谱

Fig.6 Absorption spectrum of purple part eluted from purple component by urea

红色组分(图7中②)则在 564 nm、498 nm 处有吸收峰,在 536 nm 处有一吸收肩,与图8纯化的藻红蛋白峰型也非常相似。但与深红色组分相比,它在 530 ~ 570 nm 间没有锯齿峰,在 573 nm 处也没有小肩峰,吸收肩的位置也有所不同,说明深红色组

分和红色组分为2种不同、但又较为相似的藻红蛋白。黄岩等^[4]曾研究过红毛藻中的藻红蛋白,发现存在有2种吸收光谱极为相似的藻红蛋白:R-PE、r-PE,二者在吸收光谱上的差别仅仅是吸收肩所处的波长位置略有不同,因而本研究估计深红色和红色这2种组分的藻红蛋白可能就是R-PE和r-PE,二者在颜色上有微小差异,在峰形上也略有不同,另外在与某些色素物质的结合力上也存在差异。因此有理由相信二者可能在光能的吸收和传递上也存在差异,在光合作用能量传递上发挥不同的作用。

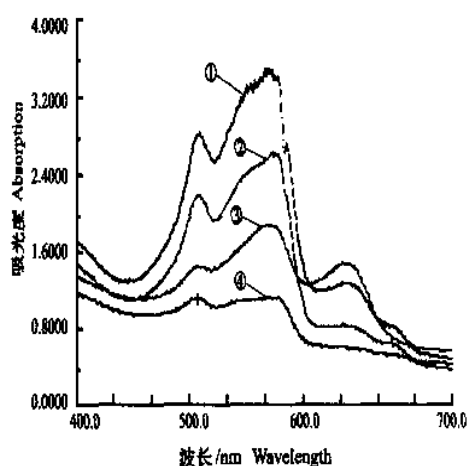


图7 DEAE柱用缓冲液洗脱下的4条不同带

Fig. 7 Absorption spectra of four components through DEAE eluted by buffer

① - 深红组分, ② - 红色组分, ③ - 紫色组分, ④ - 浅红色组分

① - dark red component, ② - red component, ③ - purple component,

④ - light red component

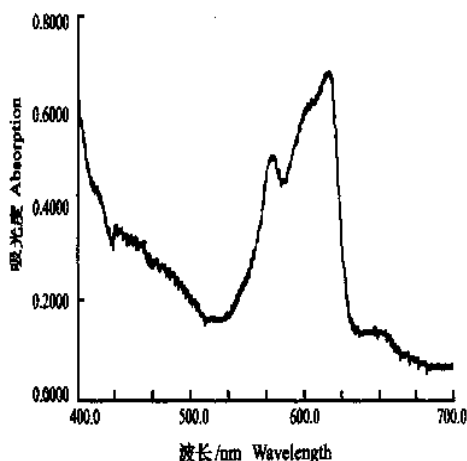


图8 较纯的藻红蛋白吸收光谱图

Fig. 8 Absorption spectra of pure phycoerythrin

2.5 浅红色组分

最后洗脱出来的第4条带为浅红色组分(图9),在498 nm、564 nm有吸收峰,与纯化的藻红蛋白(图8)相比,峰形有一定相似之处,但564 nm的吸收峰明显较低。将深红色组分和红色组分藻红蛋白用8 mol/L尿素梯度洗脱时,在洗脱最后也出现了类似该种吸收光谱的洗脱带。尿素是一种弱的蛋白质变性剂,它既能破坏蛋白质中的次级键使相应的亚基得到分离,也会造成相应蛋白质的变性,因而用尿素洗脱深红色组分和红色组分藻红蛋白,在洗脱后期出现的这种吸收光谱很可能是由于尿素长时间的作用后发生了变性的藻红蛋白。而用水洗脱出的该浅红色组分则可能是因为红毛藻干品中的藻红蛋白在光照、受热、加工过程中发生了变性的缘故,因此,最后洗脱出来的浅红色组分应为变性的藻红蛋白。

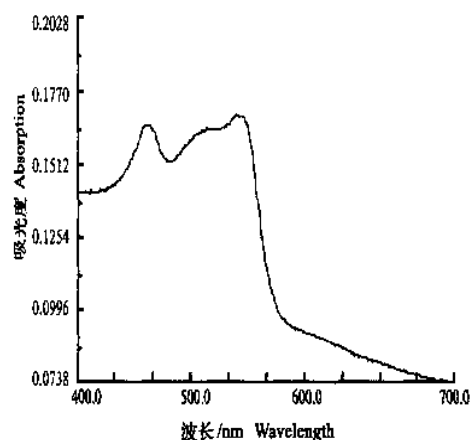


图9 浅红色组分的吸收光谱

Fig. 9 Absorption spectrum of light red component

3 结论

红毛藻中的藻胆蛋白存在有多种组分,有蓝色的R-藻蓝蛋白、紫色的三吸收峰的藻胆蛋白、深红色和红色的藻红蛋白以及浅红色的变性的藻红蛋白。各组分的藻胆蛋白不仅在颜色、吸收光谱上有所不同,在结构、光合作用的能量传递上也可能有所差异,其中深红色的藻红蛋白与一些色素物质结合较紧密,可能在光合作用能量传递中有一定特殊功能。

参考文献:

- [1] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 485-506.
- [2] O'Carra P, O'hEocha C. Algal biliproteins and phycoobilins[A].

- Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments [C]. New York: Academic Press, 1976. 328-376.
- [3] Cansani O D, Elisabeth Gantt. Circular dichroism and polarized fluorescence characteristics of blue-green algal allophycocyanins [J]. Biochem, 1980, 19; 2 950-2 956.
- [4] 黄岩, 秦利, 朱晋昌, 等. 红毛藻中两种不同分子量的 R-藻红蛋白的性质比较 [J]. 生物物理与生物化学, 1993, 25 (7): 434-440.
- [5] 李邵蓉, 林惠民. *Rhodospirillum rubrum* 中藻红蛋白的纯化及其性质的研究 [J]. 水生生物学报, 1996, 20 (9): 257-264.
- [6] Jean-Claude Thomas, Chantal Passaquet. Characterization of a phycoerythrin without α -Subunits from a unicellular red alga [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (4): 2 472-2 482.
- [7] MacColl R, Eisele E, Williams C, et al. The discovery of a novel R-phycoerythrin from an antarctic red alga [J]. J Biol Chem, 1996, 271 (29): 17 157-17 160.
- [8] 浙江省水产厅, 上海自然博物馆. 浙江海藻原色图谱 [M]. 杭州: 浙江科学出版社, 1983. 47.
- [9] 喻玲华, 曾繁杰, 蒋金丽, 等. 海洋多管藻的 R-藻红蛋白的亚基组成和发色团含量 [J]. 生物化学和生物物理学报, 1990, 22 (5): 221-229.
- [10] 张建平, 张景民, 赵井泉, 等. R-藻蓝蛋白的分离及其结构表征 [J]. 生物物理学报, 1997, 13 (6): 173-178.
- [11] Honsell E, Kosovel V, Talarico L. Phycobiliprotein distribution in Rhodophyta: studies and interpretations on the basis of their absorption spectra [J]. Bot Mar, 1984, 27: 1-16.
- [12] 曾繁杰. 红毛藻藻胆体的分离和蛋白质的组成 [J]. 科学通报, 1991, 18: 1 410-1 413.
- [13] 高洪峰, 曹文达, 纪明侯. 坛紫菜 R-藻蓝蛋白和变藻蓝蛋白的亚基组成和发色团含量 [J]. 海洋学报, 1993, 15 (6): 99-104.

Separation of multiple-phycobiliproteins and its subunits from *Bangia fusco-purpurea*

ZHANG Jiang^{1,2}, GAO Ya-hui¹, WANG Wen-xing³, HUANG Sui-ying³

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. School of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. School of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The dry sample of *Bangia fusco-purpurea* Lyngb was collected from a cultural farm in Fujian. By means of DEAE-52 column chromatography, the blue, purple, dark red, red and light red components of phycobiliprotein were eluted from the *B. fusco-purpurea* in proper order. By absorption spectrum analysis, the results show that the blue component is R-phycobiliprotein (R-PC); the purple component is a tri-peak phycobiliprotein; the dark red and red components are two kinds of resemblance phycoerythrins while the dark red component can be closely united with some pigments and the light red component, which is eluted at the last, is the denaturalized phycoerythrin. By analysis on the urea elution result, the blue R-PC is composed of two kinds of double-peak subunits. The purpose of this study is to understand the mechanism of energy transportation in phycobiliprotein.

Key words: *Bangia fusco-purpurea*; phycobiliprotein; subunit; separation

Corresponding author: GAO Ya-hui.