

盐泽螺旋藻藻胆蛋白的分离和特性研究*

刘其芳 王后乐 张宪孔

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

盐泽螺旋藻 (*Spirulina subsalsa*) 的水溶性色素粗提物经过硫酸铵沉淀和羟基磷灰石(HA)柱层析后可以分出两种藻胆蛋白, 即藻蓝蛋白(c-PC) 和别藻蓝蛋白(APC)。它们的纯度(指其在可见光部分的最大吸收与 280nm 处吸收之比)可分别达到 7.27 (c-PC) 和 6.55 (APC)。而一般认可的纯度标准, PC 为 5, APC 为 6。纯化后的 c-PC 和 APC 在聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 中仅见一条色带, 其最大吸收峰分别在 620nm 和 650nm, 其室温荧光发射峰分别为 642nm 和 657nm。

通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 无论胶浓度在 11.5% 或是在 7—15% 的梯度中, c-PC 均可分为 α 和 β 两个亚单位, 而 APC 除 α 和 β 两个亚单位外, 在 7—15% 梯度 SDS-PAGE 中还偶见一个 14kD 左右的无色多肽, 它可能与 APC 结合较紧密, 为藻胆体“核”亚结构的组分, 类似于 Glazer (1985)^[22] 报道的聚胞藻 (*Synechocystis*) 6701 中的 10kD 多肽。盐泽螺旋藻的 c-PC 和 APC 的亚单位分子量分别为: c-PC- α , 16.0kD; c-PC- β , 19.5kD; APC- α , 15.5kD; APC- β , 18.0kD。依此推算该藻的 c-PC 和 APC 的最小分子量应为 35.5 kD 和 33.5 kD。它与钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 相比显得稍低, 但又略高于其它几种蓝藻。

经等电泳法测定, 其 c-PC 和 APC 的等电点分别在 4.4 和 4.6, 它与以往报道的一些蓝藻大抵相当。

盐泽螺旋藻的藻胆蛋白占细胞干重的 28.4% 左右, 可望成为人类优良的蛋白源。

关键词 蓝藻 盐泽螺旋藻 藻胆蛋白 SDS-PAGE

藻胆蛋白为蓝藻、红藻和隐藻的主要捕获光能色素蛋白^[13,16,20]根据在可见光吸收范围内的最大吸收波长位置, 藻胆蛋白被分成 3 个主要大类^[21]: ① 藻蓝蛋白 其中有 c-PC (λ_{\max} 620nm, λ^F_{\max} 648nm)、R-PC (λ_{\max} 618, 555nm, λ^F_{\max} 636nm) 和隐藻的 PC-615、PC-630 和 PC-645 以及最近报道的存在于蓝色裸甲藻 (*Gymnodinium cyanum*) 中的 PC-645 和 PC-629^[1,2]; ② 别藻蓝蛋白: 有 APC (λ_{\max} 650nm; λ^F_{\max} 677nm) 和 APC-B (λ_{\max} 670, 618nm; λ^F_{\max} 680nm); ③ 藻红蓝蛋白: 包括 C-PE (λ_{\max} 564nm; λ^F_{\max} 577nm)、b-PE (λ_{\max} 563, 545nm; λ^F_{\max} 570nm) 和 B-PE (λ_{\max} 567, 540 和 498nm; λ^F_{\max} 578nm)。此外, 还有藻红蓝蛋白 (λ_{\max} 580nm)。

在 c-PC、APC 和 APC-B 中均包含了同样的藻蓝素发色团 (PCB); 在 R-PC 中除含有 PCB 外还含有藻红素发色团 (PEB); 在 c-PE 和 b-PE 中仅有 PEB, 而在 R-PE

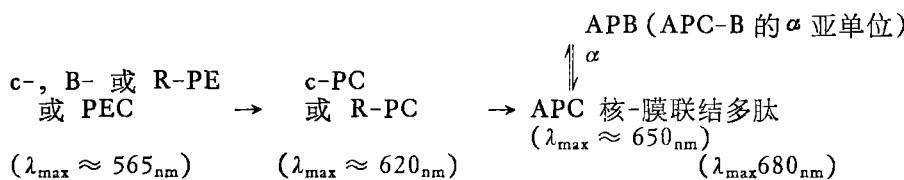
* 本工作承黎尚豪教授关心指导, 特此致谢!

1986年10月13日收到。

和 B-PE 中还含有藻尿胆素 (PUB)；在藻红蓝蛋白 (PEC) 中更有一个未知结构的胆色素 (PXB)^[21]。所有已知结构的发色团都是开链的四吡咯环，当它们与天然蛋白的 α 和 β 亚单位通过酯键或硫醚键共价相连后便产生了捕获光能的作用^[24]。

蓝藻和红藻普遍包含 c-PC 或 R-PC 和 APC^[11]。在一些蓝藻和所有红藻中则含有 PE。大部分蓝藻和红藻还含有少量的 APC-B。此外，在部分缺乏 PE 而有异形胞的蓝藻中还存在 PEC。

藻胆蛋白以近乎 100% 的高效率把光能优先地传递给光系统 II (PSII) 反应中心叶绿素 a^[10,17]。其能量传递顺序为^[21]：



蓝藻的藻胆蛋白甚至占到细胞可溶性蛋白的 60% (干重的 20%)^[16]。每当氮饥饿时藻胆蛋白随之减少，因此藻胆蛋白可视为蓝藻的氮库^[4]。

盐泽螺旋藻生长快、蛋白含量高^[1]，作为人类蛋白的直接或间接来源是一个很有希望的材料^[2]。因而，无论是从探索光合作用光能捕获器的角度还是从寻求人类蛋白新来源的角度对盐泽螺旋藻藻胆蛋白的研究都是颇有意义的。作者另文对盐泽螺旋藻藻胆体的多肽组分和光谱特性作了报道^[3]；本文则是对其有色多肽部分(即藻胆蛋白)进行了分离、纯化及其特性研究的结果。

材料与方法

藻体培养：所用盐泽螺旋藻 (*Spirulina subsalsa* var.) 为南京大学赵英华老师赠送。生长于修改的 Zarrouk 氏培养基中 (其中 NaHCO₃ 和 K₂HPO₄ 均减半)。冷白荧光灯连续光照，光强约 150 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，温度在 30℃ 左右，通空气培养。一般生长 5 天后，于其对数生长后期离心收获。

藻胆蛋白粗提物的制备：将离心收集的藻体用蒸馏水离心洗涤两次后，重新悬浮于等体积的 0.001 mol/L (pH 7.0) 的磷酸盐缓冲液中，并置于液氮中冷冻。融化时尽量维持在 5℃ 左右。继以超声波破碎细胞 (JC-3 超声处理机，振幅 50，每超声 30 秒间隙 20 秒)，并辅以显微镜观察，直至几乎全部细胞破碎为止，随后离心 (40 000 × g, 30 分钟)，取蓝色上清液。其中的 c-PC 和 APC 浓度按《藻类学方法手册》^[23]中的公式计算。

藻胆蛋白的分离与纯化：先将上述离心所得的蓝色上清液用 50% (W/V) 饱和度的硫酸铵沉淀，然后离心 (10 000 × g, 10 分钟) 收集沉淀并溶于少量 0.001 mol/L (pH 7.0)

1) 赵英华等，1985。第二届藻类学会论文集。

2) 水生所第五研究室生化组工作报告。

的磷酸盐缓冲液中，随即对着 0.001 mol/L (pH 7.0) 的磷酸盐缓冲液彻底地透析至平衡（约更换缓冲液 3—4 次，至少 4 小时）。当离心 ($40\ 000 \times g$, 10 分钟) 除去变性蛋白后，其上清液直接上已用 0.001 mol/L (pH 7.0) 的磷酸盐缓冲液预平衡了的 HA 层析柱 ($1 \times 4\text{cm}$)。在洗脱过程中不断增加磷酸盐缓冲液的离子强度，并分别收集不同离子强度缓冲液的洗脱液。立即进行光谱测定或暂贮于低温冰箱。

所用的磷酸盐缓冲液均含有 0.2 mol/L NaCl (以利 HA 对蛋白的吸收)、0.001 mol/L 硫基乙醇和 0.001 mol/L 叠氮钠。全实验均在弱光和低温下进行。

藻胆蛋白亚单位的分离：先将从 HA 层析柱洗脱下的已达到吸收光谱纯度的藻胆蛋白，用 7.5% PAGE 作进一步电泳鉴定^[14]。如为一条色带，再以 11.5% 或梯度为 7—15% 的 SDS-PAGE 分析其亚单位。凝胶配制和电极缓冲液系统基本按 Weber 等方法^[23]。电泳在 10 mA, 60 V 下进行，并维持在 10°C 左右。电泳后用考马斯亮蓝 G-250 染色，醋酸-甲醇-水褪色。测定分子量的标准蛋白为：牛血清蛋白 (68 000)、过氧化氢酶 (60 000)、卵白蛋白 (43 000)、狗铁蛋白单体 (18 500) 和溶菌酶 (14 300)。

等电点测定：采用 7.7% 聚丙烯酰胺凝胶等电电泳法。pH 范围 4—10。上槽液为 0.2% H₂SO₄，下槽液为 0.4% 乙二胺。

氨基酸分析：样品按常规处理。用日立 835-50 型氨基酸分析仪测定。

光谱分析：吸收光谱用日立 557 紫外分光光度计测定。室温荧光发射光谱用日立 MPF-4 型荧光分光光度计测定。狭缝 10 nm。激发波长 580 nm。

密度扫描：以 Chromoscan 200 型密度计测定。

蛋白测定：采用 Folin 酚试剂法。

结 果 与 讨 论

盐泽螺旋藻的水溶性粗提物先以 50% 饱和度的硫酸铵沉淀。经一次 HA 柱层析后，其 c-PC 和 APC 的纯度分别达到了 7.27 和 6.55。两者均超过了一般认可的纯度^[23]。其洗脱顺序为 c-PC 在前，APC 在后。两者被洗脱的离子强度分别约为 0.005 mol/L (c-PC) 和 0.10 mol/L (APC) 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0)。显然，盐泽螺旋藻的藻胆蛋白粗提物通过一次硫酸铵沉淀和一次羟基磷灰石层析柱是完全可以达到纯化的，其成败关键在于选择大小合适的 HA 粒度、降低层析柱的洗脱流速并在低温 (<10°C) 条件下进行。

纯化后的盐泽螺旋藻的 c-PC 和 APC 的最大吸收峰分别位于 620 nm 和 650 nm (图 1)；室温荧光发射峰分别位于 642 nm 和 657 nm (图 2)。这些和一般报道的蓝藻，诸如：鱼腥藻 (*Anabaena* sp.)、聚球藻 (*Synechococcus* sp.)、隐球藻 (*Aphanocapsa* sp.) 以及 钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*)^[18, 8, 9] 相近似。

通过 11.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (或在 7—15% 梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶板状电泳中) 可见 c-PC 由 α 和 β 两个亚单位组成，其分子量分别为 16 000 和 19 500；APC 亦由两个亚单位构成它们的分子量分别为 15 500 (α) 和 18 000 (β) (图 3.4)。若用 7—15% SDS-PAGE，染色后偶见 APC 带着一个小分子的无色多肽，分子量约为 14.0 kD，它可能与 APC 结合较紧密，为藻胆体“核”亚单位组分之一，类似于 Glazer 等^[22] (1985)

所报道的聚胞藻(*Synechocystis*)6701中的10kD多肽。由以上亚单位的分子量推算盐泽螺旋藻的c-PC和APC的最小分子量

分别为35.5kD和33.5kD,较钝顶螺旋藻(*S. platensis*)的PC和APC低(它们分别为44.0kD和38.0kD)。然而,盐泽螺旋藻的c-PC最小分子量与鱼腥藻(*Anabaena* sp., 36 000)相近,并高于层理鞭枝藻(*Mastigocladus laminosus*, 28 000)^[7];而其APC的最小分子量却又高于鱼腥藻(*Anabaena* sp., 29 600)并与聚球藻(*Synechococcus* sp., 33 000)^[9,12]相近。这些差异多半是种的不同造成,当然也不能排除实验条件的影响。

经密度扫描,染色后的c-PC和APC的SDS-PAGE胶片明显可见

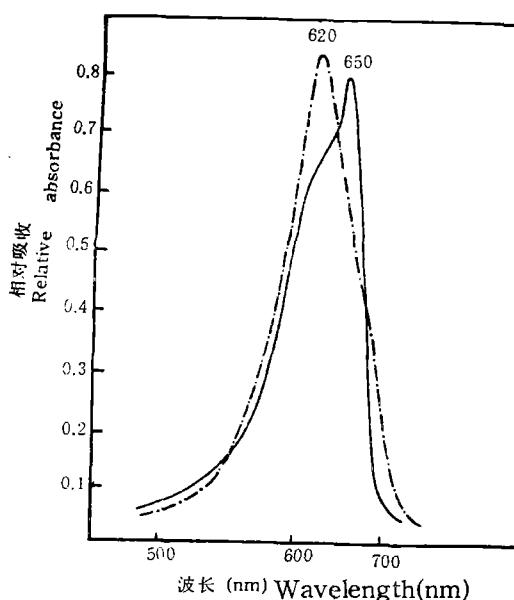


图1 盐泽螺旋藻的藻蓝蛋白(—·—·—)和别藻蓝蛋白(——)的吸收光谱(分别在0.005 mol/L(pH 7.0)和0.1 mol/L(pH 7.0)的磷酸盐缓冲液中)

Fig. 1 Absorption spectra of phycocyanin (---) and allophycocyanin (—) isolated from *Spirulina subsalsa* var., in 0.005 mol/L and 0.1 mol/L K-Phosphate-0.2 mol/L NaCl buffer (pH 7.0), respectively

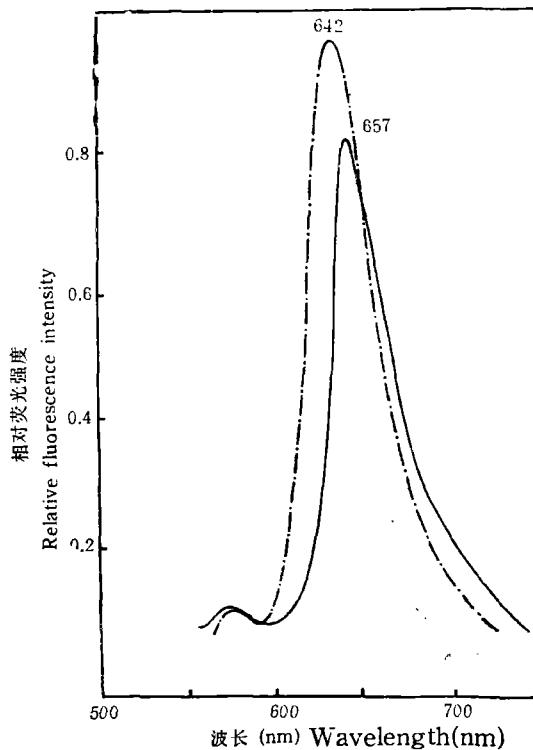


图2 盐泽螺旋藻的藻蓝蛋白(—·—·—)和别藻蓝蛋白(——)的室温荧光发射光谱。分别在0.005 mol/L 和 0.1 mol/L (pH 7.0) 的磷酸盐缓冲液中。激发波长580nm, 狹缝10nm

Fig. 2 Room-fluorescence emission spectra of *Spirulina subsalsa* var. phycocyanin(---) and allophycocyanin (—) in 0.005 mol/L and 0.1 mol/L K-phosphate-0.2 mol/L NaCl buffer, pH 7.0, respectively. Excitation wavelength was 580nm. The excitation and emission monochromator slits were 10 nm bandpass

c-PC的 α 和 β 亚单位和APC的 α 和 β 亚单位以及一个约14.0kD的无色多肽(图5)。

通过等电电泳法测得盐泽螺旋藻的c-PC和APC的等电点(IEP)分别为4.4和

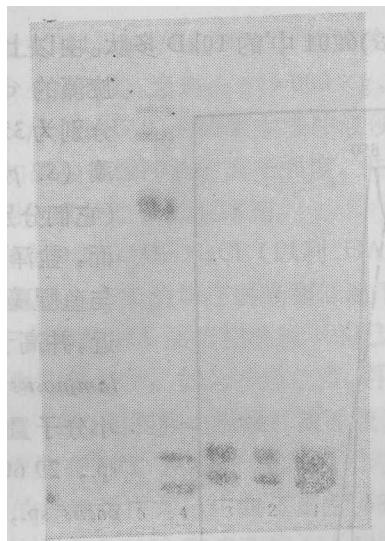


图3 盐泽螺旋藻的藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白 SDS-PAGE 图谱。1. 粗提物；2, 3. 藻蓝蛋白；4. 标准蛋白；5, 6 别藻蓝蛋白

Fig. 3 SDS slab gel electrophotograms of the purified phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina subsalsa* var. Lane 1, crude extract; Lane 2 and 3, α and β subunits of phycocyanin; Lane 4, standard protein markers of known molecular weight; Lane 5 and 6, α and β subunits of allophycocyanin

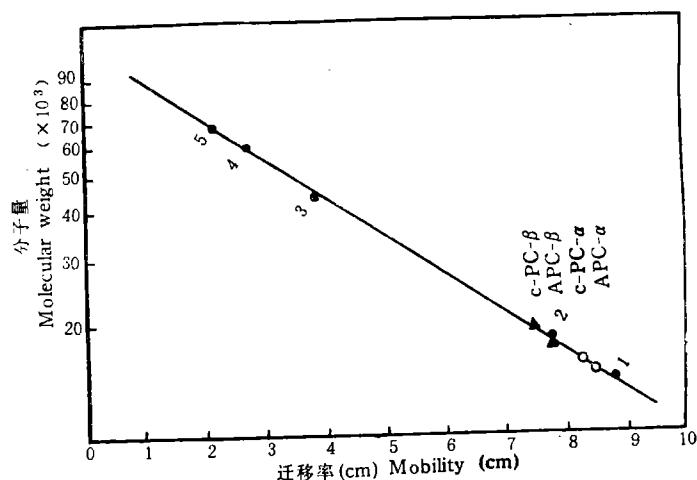


图4 盐泽螺旋藻藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白亚单位的分子量

Fig. 4 Calibration line for the molecular weights of the phycocyanin and allophycocyanin subunits from *Spirulina subsalsa* var. and markers. The molecular weight of the subunits were as follow: C-PC- α 16 000; C-PC- β , 19 500; APC- β , 15 500; APC- α , 18 500. The molecular weights of the known markers were: 1, lysozyme, 14 000; 2, apoferritin monomer, 18 500; 3, ovalbumin, 43 000; 4, catalase, 60 000; 5, bovine serum albumin, 68 000

4.6。两者的差别和其所含的二羧基氨基酸及碱性氨基酸的不同比例相关。由表1可见 C-PC 所含的二羧基氨基酸（天冬氨酸和谷氨酸）与碱性氨基酸（赖氨酸、精氨酸和组氨酸）之比略高于 APC，因此其 IEP 稍低于 APC。这与鱼腥藻 6411 (*Anabaena* sp. 6411)

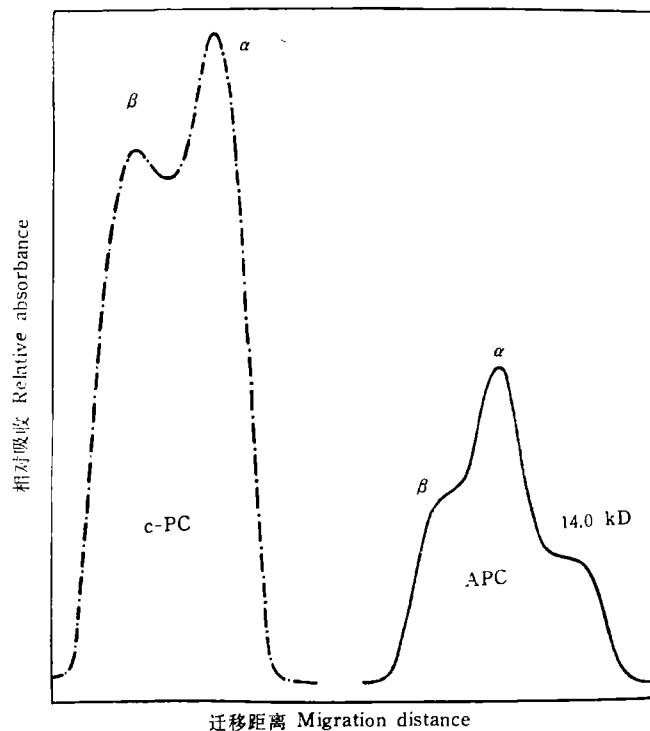


图5 盐泽螺旋藻的藻蓝蛋白(·—·—·)和别藻蓝蛋白(——)的SDS-PAGE胶片的密度扫描
Fig. 5 Densitometric scan of c-PC (----) and APC (—) subunits from *S. subsalsa* var. on a SDS-PAGE gel

表1 盐泽螺旋藻藻蓝蛋白(c-PC)和别藻蓝蛋白(APC)的氨基酸组成。

Tab. 1 Comparison of the amino acid compositions of C-PC and APC from *S. subsalsa* var. Values obtained from three analyses. Average values for 24h hydrolysates as % of recovered amino acid

氨基酸	c-PC	APC
天冬氨酸 ASP	3.33	5.68
苏氨酸 Thr	1.41	2.01
丝氨酸 Ser	2.55	3.31
谷氨酸 Glu	3.0	5.21
甘氨酸 Gly	1.66	2.98
丙氨酸 Ala	2.0	4.16
胱氨酸 Gys	4.43	4.17
缬氨酸 Val	3.64	4.73
蛋氨酸 Met	7.88	7.11
异亮氨酸 Ile	2.88	3.27
亮氨酸 Leu	3.48	4.52
酪氨酸 Tyr	—	—
苯丙氨酸 Phe	10.39	9.40
赖氨酸 Lys	2.92	2.65
组氨酸 His	—	—
精氨酸 Arg	—	3.27
脯氨酸 Pro	—	—
色氨酸 Try	未测	未测

和多变鱼腥藻 (*A. variabilis*) 的情况类似, 即 APC 的 IEP 高于 PC, 但盐泽螺旋藻的 c-PC 和 APC 的等电点低于以上两种鱼腥藻, 它们分别为 4.92 和 5.18 以及 4.76 和 4.92^[9]。若同聚球藻 (*Synechococcus* sp.) 和隐球藻 (*Aphanocapsa* sp.) 比较, 盐泽螺旋藻 APC 的 IEP 显得较高, 它们分别为 4.22 和 4.26, 而其 PC 的 IEP 却又低于上述两种藻(分别为 4.76 和 4.54)^[19]。

盐泽螺旋藻的 c-PC 和 APC 的氨基酸组成列于表 1。两者的苯丙氨酸和蛋氨酸均较高。在 APC 中未测出脯氨酸和酪氨酸, 在 c-PC 中未测出脯氨酸、酪氨酸、精氨酸和组氨酸很可能是含量较低所致。在 APC 中缺乏组氨酸与一般报道相一致。

盐泽螺旋藻所含藻胆蛋白占细胞干重的 28.4%, 与一般蓝藻相比是较高的, 可望成为人类新兴的蛋白源。

参 考 文 献

- [1] 胡鸿钧、俞敏娟、张宪孔, 1980。蓝裸甲藻藻胆素的发现和意义。科学通报, 25(4): 651—653。
- [2] 张宪孔、刘梅、刘其芳、王后乐、黎尚豪, 1982。蓝裸甲藻藻蓝素的初步分离和光谱特性。科学通报, 27(2): 115—117。
- [2] 刘其芳、王后乐、张宪孔, 1987。盐泽螺旋藻藻胆体的研究。植物生理学报,(待发表)。
- [4] Allen, M. M. and Smith, A. J., 1969. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch. Microbiol.*, 69: 114—120.
- [5] Bennett, A. and Bogorad, L., 1971. Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. *Biochemistry*, 10: 3625—3634.
- [6] Binder, A. Wilson, K. and Zuber, H., 1972. C-PC from the thermophilic blue-green alga *Mastigocladus laminousus*. *FEBS. Lett.*, 20: 111—116.
- [7] Boussiba, S. and Richmond, A. E., 1979. Isolation and characterization of phycocyanin from the blue-green alga. *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.*, 120: 155—159.
- [8] Bryant, D. A. Glazer, A. N. and Eiserling, F. A., 1976. Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp., *Arch. Microbiol.*, 110: 61—75.
- [9] Bryant, D. A. Gugliem, G., Tandeau de Marsac, N., Casters, A. M. and Cohen-Bazire, G., 1977. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch. Microbiol.*, 123: 13—27.
- [10] Bryant, D. A., Gugliem, G., Tandeau de Marsac, N., Casters A. M. and Cohen-Bazire, G., 1977. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model *Arch. Microbiol.*, 123: 13—27.
- [11] Chapman, D. J., 1973. Bioprotein and bile pigments. In: the Biology of Blue-Green Algae, N. G. Carr, B. A. Whitton, ed, pp. 162—185. Berkley-Losangeles: University of California press.
- [12] Cohen-Bazire, G., Beguin, D. M., Rimon, S., Glazer, A. N. and Brown, D. M., 1977. Physicochemical and immunological properties of allophycocyanins. *Arch. Microbiol.*, 111: 225—238.
- [13] Cohen-Bazire, G. and Bryant, D. A., 1982. Phycobilisome structure and composition. In: N. G. Carr, Whitton, B. A., eds, The Biology of Cyanobacteria. University of California Press, pp. 143—190.
- [14] Davis, B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 121: 404—427.
- [15] Erhard, M., Koller, K. and Wehymeyer, W., 1980. Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea* electron microscopical and biochemical analyses of C-phycocyanin and allophycocyanin aggregates. *Arch. Microbiol.*, 125: 51—53.
- [16] Gantt, E., 1975. Light-harvesting pigment complexes. *Biosciences*, 25: 781—787.
- [17] Gantt, E., 1981. Phycobilisomes: a model. *Arch. Rev. Plant Physiol.*, 32: 327—347.
- [18] Glazer, A. N. and Cohen-Bazire, G., 1971. Subunits structure of phycobiliproteins of blue-green algae. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 68: 1798—1801.
- [19] Glazer, A. N. and Fang, S., 1973. Formation of hybrid proteins from the subunits of phycocyanins of unicellular and filamentous blue-green algae. *J. Biol. Chem.*, 248: 663—671.
- [20] Glazer, A. N., 1983. Comparative biochemistry of light-harvesting systems. *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 125—157.
- [21] Glazer, A. N., 1984. Phycobilisome, a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochi-*

- mica et *Biophysica Acta*, **768**: 29—51.
- [22] Glazer, A. N., Chan, C. Williams, R. C. Sheila, W. Y. and Clark, J. H., 1985. Kinetics of energy in the phycobilisome core. *Science*, **230**: 1051—1054.
- [23] Siegelman, H. W. and Kycia, J. H., 1978. Algal biliprotein. In: *Handbook of Phycological Method*. Edited by Johan. A. H., Cambridge University Press, pp. 72—78.
- [24] Scheer, H., 1982. Phycobiliproteins: Molecular aspects of a photosynthetic antenna system. *Molec. Biol. Biophys.*, **35**: 7—45.
- [25] Weber K. Osborn, M., 1969. The reliability of molecular determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406—4412.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF PHYCOBILIPROTEIN OF *SPIRULINA SUBSALSA* VAR.

Liu Qifang, Wang Houle and Zhang Xiankong

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

Two types of phycobiliproteins, C-PC and APC, were separated just after crude phycobiliproteins from *S. subsalsa* var. were precipitated in 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and then loaded on a 1×4 cm hydroxyapatite column.

The C-PC with a purity of 7.27 (A_{620}/A_{280}) possesses absorption maximum at 620 nm and a room fluorescence emission at 642 nm, while the APC with a purity of 6.55 (A_{650}/A_{280}) have an absorption maximum at 650 nm and a room fluorescence emission at 657 nm.

When the purified C-PC and APC were electrophoresed under non-denaturing PAGE condition, only one band was observed (data not shown). Under denaturation (by means of 11.5% SDS-polyacrylamide slab gels or 7—15% SDS-polyacrylamide slab gels), C-PC yielded two coloured polypeptides with the molecular weights of 16.0 and 19.5 kD for its α and β subunits, respectively; whereas APC comprised two slightly coloured polypeptides of molecular weights of 15.5 and 18.0 kD for its α and β subunits, respectively. Sometimes APC had a colorless polypeptide band with a molecular weight of 14.0 kD which was probably a core component of phycobilisome as discussed by Glazer in 1985 for *Synechocystis* 6701. According to these data, the minimum molecular weights (C-PC, 35,500; APC, 33,500) of phycobiliproteins from *S. subsalsa* var. are smaller than those from *S. plantensis*. The amino acid composition and isoelectric points of C-PC and APC were also determined.

The total content of phycobiliproteins was estimated at 28.4% of dry weight of *S. subsalsa* var. Thus it is higher than that of other blue-green algae.

The above results show that *Spirulina subsalsa* var. is an ideal source for edible protein.

Key words Blue green algae, *Spirulina subsalsa*, Phycobiliprotein, SDS-PAGE