

Rhodosorus marinus 中藻红蛋白的纯化及其性质的研究

李邵蓉 林惠民

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

从 *Rhodosorus marinus* 中提取了藻红蛋白, 通过改进纯化方法, 得到了三种电泳纯的藻红蛋白: B-型藻红蛋白 1, B-型藻红蛋白 2 和 b-型藻红蛋白 (以下简称 B-PE₁, B-PE₂ 和 b-PE)。分别测定这三种藻红蛋白聚合体和亚单位的分子量。测定了它们的可见光的吸收光谱和荧光光谱。两种 B-PE 的可见光的吸收光谱比 b-PE 的多一个 498nm 的吸收峰。三种藻红蛋白的氨基酸组成以酸性氨基酸和疏水性氨基酸为主, 所以经等电聚焦测定的它们的等电点都是偏酸性的。

关键词 *Rhodosorus marinus*, 藻红蛋白

藻红蛋白存在于红藻和部分蓝藻、隐藻中, 是一种重要的光合色素。在红藻的捕光色素系统中, 藻红蛋白最先捕获光能, 首先传递给藻蓝蛋白, 进而递给别藻蓝蛋白, 最后传递给作用中心色素, 以驱动光合作用的进行。另外, 藻红蛋白是一种天然的红色素, 它的荧光活性较高, 近年来它被广泛地应用于食品、化工产品和荧光免疫技术等方面。

关于藻红蛋白的研究, 目前国内主要以大型的海生红藻为材料, 而国外的报道中以单细胞红藻为材料的也主要集中在紫球藻属 (*Porphyridium*) 和蔷薇藻属 (*Rhodella*)。迄今, 对 *Rhodosorus* 这一属的藻红蛋白的研究还未曾见到报道, 作者对 *Rhodosorus marinus* 的藻红蛋白的纯化及其性质进行探讨。

1 材料与方法

1.1 生物材料和培养方法

本实验以 *R. marinus* 为材料, 用 f/2 培养基^[1]进行培养。一级静置培养于 250ml × 7 的三角瓶内; 一周后扩大至 2L × 3 的玻璃瓶内进行二级培养, 3d 后全部倒入 30L 有机玻璃光生物反应器内进行半连续培养, 培养条件均为: 通空气 (起搅拌作用并补充 CO₂), 温

度 26℃ 左右, 光强为 3000lx, 连续光照。当每毫升藻培养液中细胞个数达 260×10^4 个时, 用离心法收获藻体。

1.2 藻胆蛋白的分离与纯化步骤

取离心收集的藻体 20g (湿重), 加入 200ml 蒸馏水, 在 -20℃ 下反复冻融三至四次 → 在冰浴中用超声波破碎细胞 → 进行高速离心 (11000r/min, 4℃, 15min) → 取上层紫红色液体进行硫酸铵沉淀 (50%), 静置过夜 → 高速离心 (11000r/min, 4℃, 15min) → 留紫色沉淀物用少量蒸馏水溶解 → 用蒸馏水充分透析得粗藻红蛋白 PE_r (2% BaCl₂ 检验透析度) → 对 Tris-HCl (PH8.4, 0.1mol/L) 的缓冲液充分透析 (所有缓冲液除特别表明外, 都含有 0.001mol/L 叠氮钠和 0.001mol/L 巯基乙醇) → 上 DEAE-52 纤维素柱 (2.5cm × 15cm), 用 Tris-HCl (PH8.4, 0.1mol/L) 的缓冲液充分平衡, 然后用 0.1mol/L、0.2mol/L 和 0.5mol/L 的 NaCl 溶液分步洗脱, 收集红色带 → 将收集的红色样品对 Tris-HCl (PH8.4, 0.1mol/L) 缓冲液充分透析 → 再通过一次同样的 DEAE-52 纤维素柱, 收集红色带 → 将收集到的红色样品对磷酸缓冲液 (0.1mol/L, PH6.6) 充分透析 → 上 Bio-gel p300 柱 (2.5cm × 20cm), 收集两条红色带 (后下来的红色带为纯度较高的一种藻红蛋白) → 将先下来的红色带再通过一次 Bio-gel p300 柱 (1.6cm × 60cm) → 再次收集到两条红色带, 为纯度较高的另外两种藻红蛋白。

作者还采用制备电泳的方法^[2], 分离纯化后两种藻红蛋白。

1.3 光谱测定

将上述分离纯化的三种藻红蛋白在室温下用岛津 UV-3000 紫外分光光度计 (狭缝 1nm) 测定其吸收光谱, 用 SFM-25 型荧光分光光度计 (狭缝 10nm) 测定其荧光发射光谱和荧光激发光谱。

1.4 分子量的测定

① 利用 Sephadex G-200 凝胶过滤柱 (床体积 1.5cm × 60cm) 测定三种藻红蛋白多聚体的分子量^[3]。

② 利用 SDS 凝胶电泳测亚基分子量^[4]。

1.5 等电点测定

采用陈冬兰等^[5]改进的聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦方法。

1.6 氨基酸分析

用 Waters PICO · TAG 型氨基酸自动分析仪测定。

2 结 果

2.1 藻红蛋白的分离和纯化

对前人所用的藻红蛋白分离提纯方法进行了改进, 得到了适合于 *R. marinus* 藻红蛋白的分离提纯方法, 经过不同的纯化步骤所得的纯度列于表 1。

2.2 光谱特性

纯化后的三种藻红蛋白的吸收光谱见图 1, 它们的吸收高峰分别为 ① 545nm > 563nm, ② 和 ③ 都是 563nm > 545nm > 498nm。由此推测: 其中 ① 是 b-PE; ②、

③分别为 B-PE₁、B-PE₂。三种藻红蛋白的荧光发射峰都在 575nm 左右(图 2),它们的荧光激发光谱都是三峰型,其中 b-PE 的荧光激发峰为 490nm>570nm>545nm, B-PE₁ 为 525nm>562nm>500nm, B-PE₂ 为 525nm>562nm>500nm。(图 3)

表 1 不同纯化步骤所得藻红蛋白的纯度

Tab.1 The purity of the phycoerythrins from different purifying step		
纯化步骤 Purifying step	A ₅₄₅ / A ₂₈₀	
粗提物	0.95	
50%硫酸沉淀	1.67	
第一次上 DEAE52 纤维素柱	1.90	
第二次上 DEAE52 纤维素柱	2.3	
第一次上 Bio-gel p300 柱	第一条红色带	2.7
	第二条红色带(b - PE)	4.7
第二次上 Bio-gel p300 柱	第一条红色带(B - PE)	4.6
	第二条红色带(B - PE)	4.1
电泳提纯	B - PE ₁	4.8
	B - PE ₂	4.2

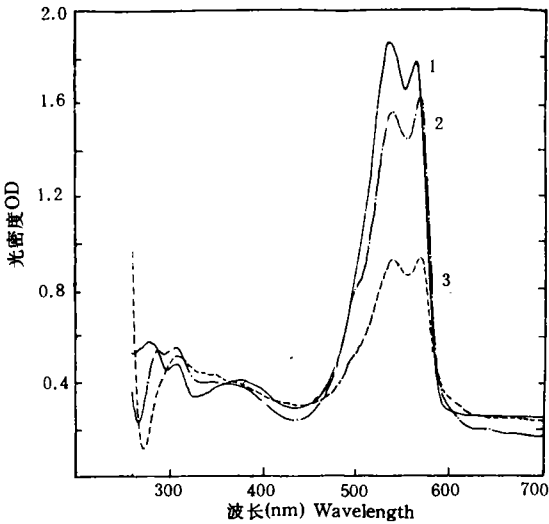


图 1 *R. marinus* 三种藻红蛋白的吸收光谱

Fig.1 The absorption spectra of three purified phycoerythrins from *Rhodospirillum rubrum*

1. b-PE; 2. B-PE₂; 3. B-PE₁

2.3 分子量

①根据 $K_{av} = -\lg M + c$ (K_{av} 为分配系数, M 为分子量, b, c 为常数)作出高分子量蛋

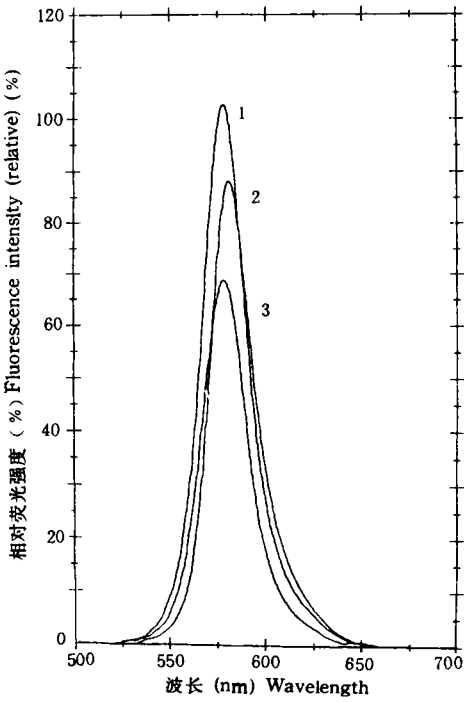


图2 *R. marinus* 三种纯化藻红蛋白的荧光发射光谱
Fig.2 Fluorescence-emission spectra of three purified phycoerythrins from *R. marinus* in 0.1mol / L phosphate buffer (PH7.0)
1. b-PE; 2. B-PE₁; 3. B-PE₂

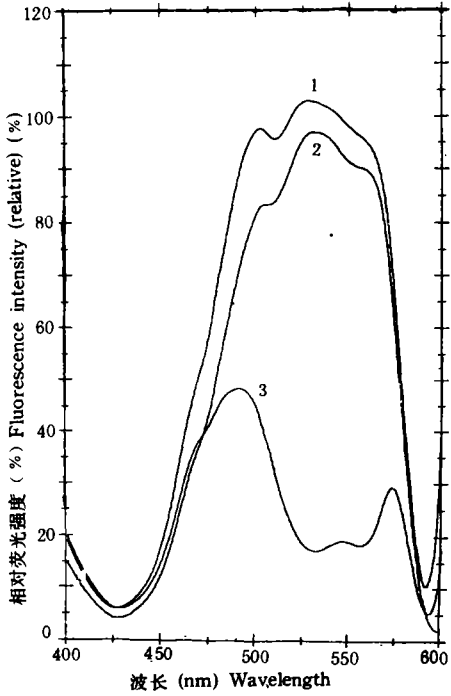


图3 *R. marinus* 三种纯化藻红蛋白的荧光激发光谱
Fig.3 Fluorescence-excitation spectra of three purified phycoerythrins from *R. marinus* in 0.1mol / L phosphate buffer (PH7.0)
1. B-PE₁; 2. B-PE₂; 3. b-PE

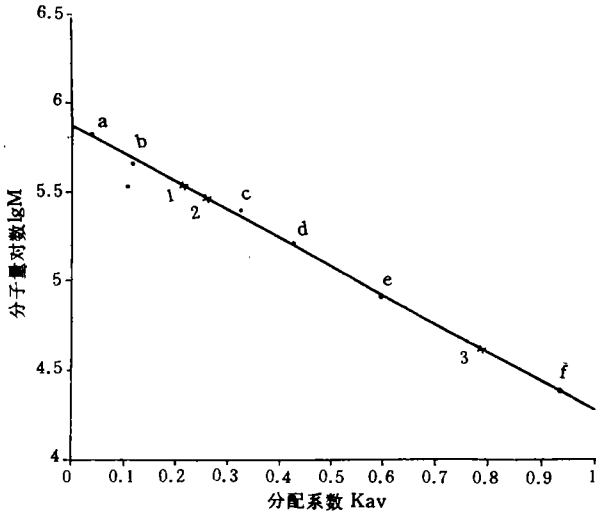


图4 高分子量蛋白质的标准曲线(Sephadex G-200)
Fig.4 The standard curve obtained by using gel filtration on Sephadex G-200
a. 甲状腺球蛋白 (Thyroglobulin); b. 铁蛋白 (Ferritin); c. 过氧化氢酶 (Catalase);
d. 醛缩酶 (Aldolase); e. 肌酸激酶 (Myokinase); f. 细胞色素丙 (Cytochrome C)
1. B-PE₁; 2. B-PE₂; 3. b-PE

白质的标准曲线(图 4),由此测得 b-PE、B-PE₁ 和 B-PE₂ 多聚体的分子量依次为: 42KD, 330KD 和 280KD。

②将小分子量标准蛋白与三种纯化的藻红蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果发现, b-PE 分成两条带即 α 和 β 亚基, B-PE₁ 和 B-PE₂ 均分成三条带,即 α 、 β 和 γ 亚基。根据 $1gM=a-bR_f$ (M 为分子量, R_f 为迁移率, a、b 为常数)作标准曲线(图 5),测得 b-PE 的 α 、 β 亚基分别为 18KD, 24KD; B-PE₁ 的 α' 、 β' 和 γ' 亚基分别为 10.5KD, 29KD 和 22KD; B-PE₂ 的 α^n 、 β^n 和 γ^n 亚基分别为 10.5KD, 24KD 和 18KD。

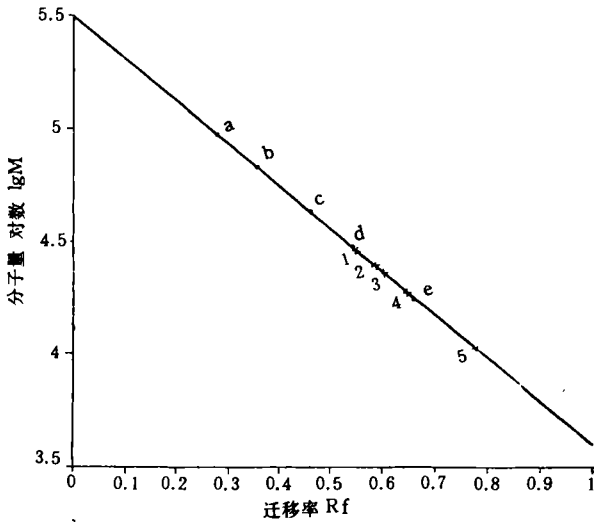


图 5 低分子量蛋白质标准曲线(SDS)

Fig.5 The standard curve obtained by using polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulphate (10% acrylamide)

a. 磷酸化酶 B(Phosphorylase B); b. 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin);

c. 肌红蛋白(Myoglobin); d. 碳酸酐酶(Carbonic anhydrase); e. TMV 外壳蛋白(TMV Capsid)

1. β' 2. β 和 β^n 3. γ' 4. α 和 γ^n 5. α' 和 α^n

2.4 等电点

等电聚焦的结果,小分子量的藻红蛋白 b-PE 只有一条红色带:PI 为 5.0,两个大分子藻红蛋白 B-PE₁ 和 B-PE₂ 均出现两条红色带:PI 分别为 5.0 和 6.18。大分子形式的 B-PE 出现两个等电点,可能是聚胶过程中发生了解聚的结果。

2.5 氨基酸组成

三种纯化的藻红蛋白的氨基酸组成列于表 2。

其中酸性氨基酸 (Asp+Glu) 占有所有氨基酸的比例为: b-PE (21.8%), B-PE₁ (19.4%), B-PE₂ (23.3%); 碱性氨基酸 (Lys+Arg) 占有所有氨基酸的比例为: b-PE (12.5%), B-PE₁ (12.2%), B-PE₂ (12.7%)。而且三种藻红蛋白中除色氨酸待定外,其它七种人体必需氨基酸都存在。

表 2 *R. m* 的三种藻红蛋白的氨基酸组成 (mg/l)Tab.2 Amino acid composition of three kind of phycoerythrins from *R. marinus*

氨基酸 (Aa) Amino acid	b-PE	B-PE ₁	B-PE ₂
天冬氨酸 (Asp)	5.8	29.6	25.3
谷氨酸 (Glu)	4.9	30.7	23.3
丝氨酸 (Ser)	2.8	19.9	17.1
甘氨酸 (Gly)	1.7	12.1	14.0
组氨酸 (His)	0.95	2.3	1.5
精氨酸 (Arg)	4.1	28	13.5
苏氨酸 (Thr)	3.2	12.9	12.5
丙氨酸 (Ala)	5.4	33.6	10.8
脯氨酸 (Pro)	1.2	11.3	3.3
酪氨酸 (Tyr)	3.7	27.8	6.45
缬氨酸 (Val)	3.1	22.1	19.4
蛋氨酸 (Met)	1.2	1.6	3.6
胱氨酸 (Cys)	0.5	1.8	1.53
异亮氨酸 (Ile)	4.2	25.6	16.8
亮氨酸 (Leu)	3.3	30.6	24.1
苯丙氨酸 (Phe)	1.6	10.6	13.2
赖氨酸 (Lys)	2.1	9.95	12.8

3 讨 论

本实验所采用分离提纯 *R. marinus* 藻红蛋白的方法是在总结前人纯化方法的基础上加以改进得到的。作者曾采用马金石等^[6]介绍的经硫酸铵沉淀后,用 Sephadex G-100 和 DEAE-纤维素进行 4 次柱层析的方法;和程凌江等^[7]介绍的经硫酸铵结晶后,用 Bio-gel P300 进行一次柱层析的方法,发现用这两种方法只能从 *R. marinus* 中提出一种藻红蛋白,而且其纯度很低 ($A_{545}/A_{280} < 2.5$),但作者从这两种方法中受到启发,加以改进后得到本实验所采用的方法,并认为这种方法对提取 *R. marinus* 中的藻红蛋白非常适用。

从 *R. marinus* 中分离出三种藻红蛋白 b-PE、B-PE₁ 和 B-PE₂。它们的吸收光谱相似,都有 563nm 和 545nm 两个主要吸收峰,但两种 B-PE 的吸收光谱中还有一个 498nm 的肩峰(图 1),这是 B-PE 和 b-PE 的主要不同点,与 *Porphyridium cruentum* 中的 B-PE 和 b-PE 的吸收光谱类似。这三种 PE 的吸收峰位置、吸收强度上的差别均反映了它们所含发色团和它们的不同量,以及发色基团所联结的蛋白环境不同。563nm 和 545nm 的吸收是由与蛋白以共价键相联结的藻红胆素引起的,498nm 的吸收是由藻尿胆素引起的。由图 2 可见,三种藻红蛋白的荧光发射光谱相同,都是单峰型,最大发射峰都在

575nm。而且它们的荧光激发光谱又都是三峰型(图 3), 其中两种 B-PE 的峰型相同, 但与 b-PE 的峰型相差较大。

b-PE 与两种 B-PE 不仅在吸收光谱和荧光光谱上有所不同, 而且他们的分子量和亚基组成也相差很大。b-PE 是只有两个亚基(α 、 β)组成的低分子量蛋白质(约 40KD), 而两种 B-PE 都是六聚体, 且有三个亚基(α 、 β 、 γ)组成的高分子量蛋白质(约 280KD 和 330KD)。关于 *R. marinus* 藻红蛋白的各种亚基以及它们的化学结构还有待于进一步深入研究, 才能得到较确切的结论。

R. marinus 的三种藻红蛋白的氨基酸组成有较大的共性, 即它们所含的酸性氨基酸总量大于碱性氨基酸, 因而它们的等电点都是偏酸性的。而且三种藻红蛋白中除色氨酸待定外, 其它七种人体必需氨基酸都存在。表明这三种藻红蛋白都有较高的营养价值, 为其在日常生活中的应用提供理论依据。

综上所述, *R. marinus* 的 b-PE 与 B-PE 有着既不同又相关的关系, 两者在光合作用中都起着吸收光能的作用, 但它们之间的关系如何, 至今还不清楚。有人^[8]认为 b-PE 和 B-PE 所含的“s”发色团和“f”发色团的比例不同, 也许 b-PE 起着聚集藻胆体结构, 使其最大效率地传递能量的作用。但也有人^[9]认为低分子量的 b-PE 可能是高分子量 B-PE 的解聚产物, 是藻体中色素蛋白吸收光的功能单位。关于这些论点还有待于进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Stein, R. J., Culture Methods and Growth Measurements. New York: the Press Syndicate of the University of Cambridge. 1973.
- [2] 莽克强、徐乃正、方荣祥编, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 北京: 科学出版社, pp. 48—54 1975.
- [3] 赵永芳, 生物化学技术原理及其应用, 武汉: 武汉大学出版社, pp: 48—54. 1988.
- [4] 郭尧君, SDS电泳技术的实验考虑及最新进展, 生物化学及生物物理进展 1991, 18(1): 32—37.
- [5] 陈冬兰、吴有梅, 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦测量蛋白质等电点, 植物生理通讯, 1981, 4: 48—52.
- [6] 马金石、何惠珠、甄珍等, 多管藻中R-藻红蛋白的分离和结构特征, 科学通报, 1981, 4: 240—242.
- [7] 程凌江、将丽金、马金石, 条斑紫菜中R-藻红蛋白的纯化及 α 和 β 亚基的分离与发色团含量的测定, 海洋与湖沼, 1990, 21(4): 337—342.
- [8] Dale, R.E. and Teale, F. W. J. Number and distribution of chromophore types in nature phycobiliproteins. *Photochem. Photobiol.* 1970, 12: 99—117.
- [9] Ohki, K. et al, A comparative study of quantitative relationship between phycobiliproteins and photosystem II in cyanobacteria and red algae plancell. *Physiol.* 1987, 28: 1219—1226.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHYCOERYTHRIN FROM *RHODOSORUS MARINUS*

Li Shaorong and Lin Huimin

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

Three phycoerythrins ie B-phycoerythrin1 (B-PE₁), B-phycoerythrin 2 (B-PE₂) and b-phycoerythrin (b-PE) from *Rhodospirillum rubrum* were purified to electrophoresis purity. The molecular weights of the three phycoerythrins and their subunits were determined. The absorption spectra and the fluorescence spectra of the three phycoerythrins were measured. The absence or presence of an absorption peak at 498nm represents the major difference between the b-PE and B-PE. The amino acid compositions from the three phycoerythrins are relatively rich in aliphatic and acidic amino acid. This is the reason why the isoelectric point of the three phycoerythrins tends to acidity.

Key words *Rhodospirillum rubrum*, Phycoerythrin