

藻红蛋白研究进展*

REVIEW ON PHYCOERYTHRIN RESEARCH

隋正红 张学成

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

* 高等植物的主要光合色素是叶绿素 a 和叶绿素 b, 而红藻、蓝藻和隐藻的光合色素是叶绿素 a 和藻胆蛋白。藻胆蛋白包括藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)、藻蓝蛋白(Phycocyanin, PC)、异藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)和藻红蓝蛋白(Phycoerythrocyanin, PEC)等, 氨基酸序列和免疫交叉反应结果显示 PEC 归于 PC 之中。它们各有自己独特的吸收光谱和荧光发射光谱。PE, PC, APC 在藻体类囊体膜上顺序排列, 加上连接蛋白构成藻胆体, 其结构如图 1 所示。藻胆蛋白能高效率地捕获光能并传递给光系统 II, 光能传递的方向为 PE → PC → APC → chl a。

对藻胆蛋白结构与功能的深入研究有助于阐明藻类光合作用机制及与生理、生态变化的关系, 对于弄清生物光合进化具有重要意义。

藻胆蛋白在不同藻类中种类、含量不同, 藻蓝蛋白和异藻蓝蛋白在所有蓝藻和红藻中都有, 藻红蛋白只出现于红藻和部分蓝藻中。对藻胆蛋白的研究由来已久, 尤其是藻红蛋白由于其重要的生理功能及在医药、食品等方面的应用价值, 更是引起了广泛的注意。本文对近期有关藻红蛋白研究进展情况做一介绍。

1 藻红蛋白基本性质

若将打碎的藻胆体离心分离, 可见 PE 条带位于 PC 和 APC 条带之间, 呈红色。藻红蛋白在藻体光能传递链中位于第一环, 是前级光色素。它同其他藻胆蛋白一样, 由脱辅基蛋白与开链四吡咯发色团经硫醚键共价结合而成, 可发出橙红色荧光。PE 的光吸收峰位于 490~570 nm, 程凌江等(1990)研究发现分离较纯的 R-PE 其 $A_{560}/A_{280} > 3.5$, 高纯的 R-PE 比值可达 8.0 以上。最初据 PE 来源的不同分为 R-PE, B-PE, C-PE 等, 其中 R-表示红藻纲(Rhodophyceae), B-表示红毛菜纲(Bangiphyceae), C-表示蓝藻纲(Cyanophyceae)。后来人们在不同类型的藻中发现光谱特性一致的 PE, 如在红藻中也存在 C-PE, 故现在

这些名称已不再有分类学上的意义, 仅表示其不同的特征吸收光谱, 而 PE 的分类也主要按其光谱特性。在 R-藻红蛋白中, 有的 PE 可产生两个吸收峰, 其特征是在可见光谱区的 498 和 565 nm 有吸收峰, 在 540 nm 有吸收肩, 称“双峰型”R-藻红蛋白, 有的能产生 3 个吸收峰, 其特征是在 498, 540, 565 nm 分别有吸收峰, 称“三峰型”R-藻红蛋白。通常把前者称为 I 型 R-藻红蛋白, 把后者称为 II 型 R-藻红蛋白(图 2、图 3)。通常认为含有 I 型 R-藻红蛋白的藻类比含有 II 型 R-藻红蛋白的具有较高的进化地位, 如周百成等(1974)发现原始红藻纲的条斑紫菜是两峰型的, 而真红藻纲的 PE 是三峰型的; 潘忠正等(1987a)比较了 30 种青岛海产红藻的 R-PE 后发现原始红毛菜纲的 9 种低等红藻全部是 I 型 R-藻红蛋白, 并推断在 R-PE 的进化过程中, I 型 R-PE 先出现, 以后逐渐演变到 II 型 R-PE。但是有报道发现在江蓠属龙须菜的不同藻株中存在着这两种不同的藻红蛋白^[1], 而这种现象只在实验诱发的情况下才可能出现, 对突变株的深入研究对阐明藻类进化的一些方面具有重要意义。

许多学者研究发现藻胆蛋白的光吸收特征受外界环境, 如所测定溶液的 pH 值、蛋白质浓度和介质的离子强度等物理、化学因素的影响。潘忠正(1987b)等测定了 PE 的光吸收特征受环境因素影响状况时发现, 正常生理 pH 下, 两种光谱类型的 R-PE 分别显示其三峰与两峰的吸收特征, 而在较高的 pH 下三峰型 R-PE 较两峰型 R-PE 有较高的稳定性, 这一方面显示测定时恒定环境条件的重要性, 以防止在利用光谱吸收特征进行分类研究时确认的偏差, 另一方面也显示了两类 R-PE 在结构上存在一定的差异。

PE 的荧光发射峰约在 580 nm。Klotz(1985)研究认为在 PE 中的发色团有藻红胆素(Phycoerythro-bilin, PEB)和藻尿胆素(Phycourobilin, PUB), 发色

* 国家自然科学基金资助项目 39670405 号。
收稿日期: 1997-06-03

团的种类决定了其光谱特征。程凌江等(1990)认为藻红蛋白的荧光发色团是藻红胆素,而藻尿胆素的作用是能量传递,它不直接发荧光。Lagarias(1979)指出,藻红胆素 A 环上的残基与脱辅基蛋白上的半胱氨酸共价结合,而藻尿胆素与脱辅基蛋白之间的连接方式不明,也许存在一个或两个硫醚键。

Glazer(1977, 1984) 等的工作证明 PE 由 α , β 或 α , β , γ 亚基组成,其中 α , β 亚基由质体基因组编码,它们分子量接近,含 160~180 个氨基酸。 α 亚基为 16~20 kD, β 亚基为 17~22 kD, γ 亚基基因在核基因组上,其分子量比 α , β 亚基大,约为 32 kD^[2]。R-藻红蛋白的 α , β 亚基在中性介质中稳定性较差,易发生不可逆凝聚而沉淀。有关 R-PE 的聚集态,研究报道结果不一,Glaze(1981)报道,在一个相当宽的 pH 范围内藻红蛋白以六聚体($\alpha\beta$)₃形式存在,如条斑紫菜^[2]。但也不完全如此,如喻玲华等(1990)报道,在多管藻(*Polysiphonia urceolata*)中的 R-PE 最稳定的聚集态是(α : β)₃ γ ;曾繁杰等(1985)报道多管藻中还存在(α : β)₅和($\alpha\beta$)₆等形式;杨紫萱(1987)报道,在条斑紫菜中可有($\alpha\beta$)₈和($\alpha\beta$)₂,也可能是几种聚集态的组合体。蒋丽金等(1983)用荧光猝灭实验发现在多管藻 R-PE 的周围排列有更易受碘离子攻击的一种聚集态分子。这些报道的 R-PE 的不同的聚集态可能与实验条件有关,在不同的缓冲体系下会产生不同聚集状态。杨紫萱等(1987)报道,不同条件从条斑紫菜中得到了八聚体、二聚体和单体的 R-PE,单体可能是由二聚体解聚而来,而单体又可重新聚集成二聚体。

PE 的等电点较低,如多管藻 PE 的等电点为 3.56,大多数红藻 PE 的等电点为 4.38~4.10。

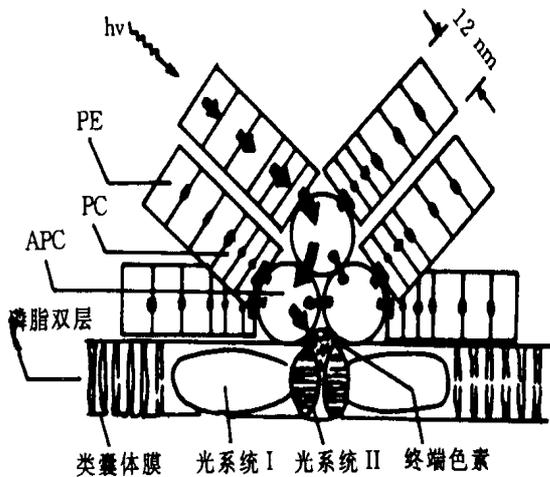


图1 藻胆体结构示意图

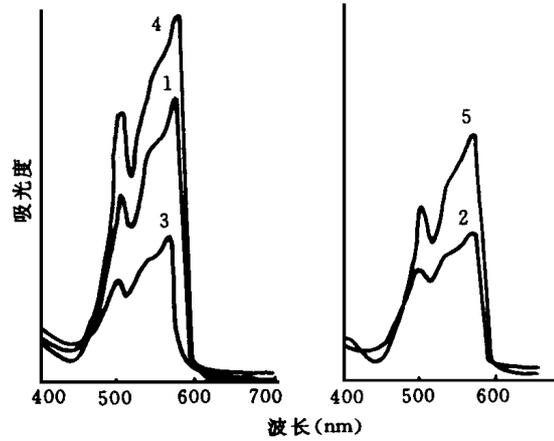


图2 I型R-藻红蛋白的吸收光谱

1. 华北半叶紫菜(*Porphyra katadai* var. *hemiphyllo*);
2. 红毛菜(*Bangia fuscopurpurea*);
3. 海索面(*Nemalion heinrichoides* (Valley) Batt. var. *vermiculare*);
4. 小珊瑚藻(*Corallina pilulifera*);
5. 叉节藻(*Amphiroa zonata*)

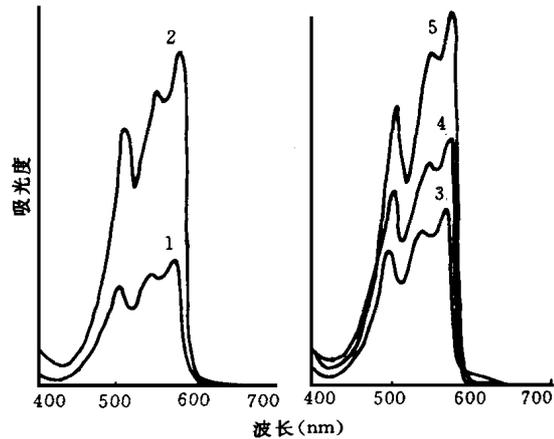


图3 II型R-藻红蛋白的吸收光谱

1. 异形石花菜(*Gelidium vagum*);
2. 亮管藻(*Hyalosiphonia cacspositosa*);
3. 角叉菜(*Condrus* sp.);
4. 金膜藻(*Chrysymenia wrightii*);
5. 日本异管藻(*Heterosiphonia japonica*)

2 藻红蛋白在藻体生理过程中的作用

藻胆体是一个吸收、传递光能的蛋白体。在这一光合作用器上,藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和叶绿素 a 顺序排列,构成能量传递链,其中 PE 位于藻胆体的外围,直接吸收光能,作为天线色素参与光合作用。PE 作为接收光能的组分,应该对光强的变化有所反应,事实也正如此。实验表明,当环境光照变化时,

PE 发生相应的变化。Talarico(1991, 1993)指出, 当光照强度降低时, 藻体的 PE 含量升高; 而 Ohki (1992)指出, 在不同波长光照射下, PE 的聚集状态发生改变, 在绿光下, PE 和 PC 对 APC 的比值为 3.5; 在红光下, 升至 11.5。Waaland(1974)指出, 在高光照条件下, *Griffithsia pacifica* 可减少藻胆体的数量, 降低 PE 与其他藻胆蛋白的比例, 而据 Kirk(1993)的观点, 在 *Aglaothamnion neglectum* 中, 在同样条件下 PE/PC/APC 的比例恒定, 但 PE mRNA 水平降低, 说明只是藻胆体的数目发生了改变。PE 聚集状态的变化可引起藻体色泽的变化。Amato(1993)等报道, 在紫菜培养过程中, 其叶片若脱水变干, 则将由绿色变成红棕色, 这时的叶片中将含较多的单体 PE 而非六聚体的 PE。据 Grossman(1993), Haeberlein(1992)报道, 除了光量外, 一些环境因子, 如营养供应等条件都将影响 PE 的结构及合成, 进而影响光能的传递。由这些现象可以看出, 由于 PE 在藻胆体复合结构中位于外端, 容易受环境因素的影响, 为了适应生态环境的生存竞争, 藻胆体必须不断调整自身结构, 包括 PE 的结构, 保证光能的高效传递。

PE 在藻胆体结构调整过程中作用至关重要, PE 的变化直接影响藻胆体的结构。Kursar(1983)报道 R-PE 的含量直接影响藻胆体的大小, 而在短暂的紫外光作用下, PE 出现了 3 种异构体形式, 这可能影响藻胆体, 使其能量传递受损, 说明 PE 的改变直接影响着藻体的光合作用。据 Algarra(1993)等报道, 在低氮环境下给予低光照, 藻胆体的数量及大小将增大, 若给予高光照, 藻胆体将变小, 藻胆体量的变化伴随着能量传递效率的变化, PE 在藻胆体的聚合-解体过程中起了重要的作用, 可见 PE 可通过自身结构及量的变化, 影响藻胆体的形成及结构, 使能量传递效率发生变化, 影响光合作用。

3 藻红蛋白作为氮库

PE 是一种水溶性蛋白, 在一些类群中它可占藻体中水溶性蛋白的一半, 因此可以作为氮源贮备库, 为细胞生长发育提供必需成分。在一种隐藻中, 只要提供无机氮, PE 便可在藻体中累积, 达到 15 pg/细胞; 而培养基中氮源缺乏, PE 迅速分解, 含量降低至 0.05 pg/细胞以下^[4]。鉴于其高蛋白含量, 已经有报道开展富含 PE 藻的养殖^[5, 6], 提供氮源。

O'carra(1965)报道所有 PE N 端的氨基酸为蛋氨酸, 据蒋丽金(1983)报道, 测定多管藻中的 N 端氨基酸也是蛋氨酸。

另外据李邵蓉等^[3]报道, 在红藻 *Rhodospira marinus* 中的 PE 含的酸性氨基酸量大于碱性氨基酸量, 其中含有人体必需的 7 种氨基酸, 但色氨酸含量少。

4 藻红蛋白的应用

据 Kaixian(1993), Rodriguez(1991)报道, 由于 PE 有鲜艳的颜色, 可作为天然色素用于食品、化妆品工业, 不会造成人为伤害, 是理想的安全的添加剂。前面作者已经提到 PE 可吸收特定波长的光, 利用这一特征光吸收可检测出相应的浮游藻, 如 Cowles(1993)等报道, 用一种光度计可直接探测水体中的含 PE 的浮游植物。由于藻体中存在着 PE 及其他色素体或特征细胞器, 如液泡, 它们的种类及含量不同可产生不同的荧光发射光谱或产生不同的光学特征而得到区分, 因而可在水中直接检测水华、赤潮^[7], 大大方便了操作, 提高了检测的准确性和速度。另外据 Iqbal(1993)等报道, 还可将 PE 用作固定藻细胞生物活性的指标; 而目前 PE 色彩特性最大的用途是在荧光免疫学、诊断用荧光标记、生物医学研究等方面, 由于 PE 含有众多的藻胆素, 故有极高的吸收系数, 作为荧光探针, 用于免疫荧光检测、荧光显微、组织化学, 而将 PE 与其他物质结合, 可进行特异检测。如解放军总医院(1990)用 R-PE 和免疫球蛋白结合, 可检测胃癌细胞和白血病细胞表面抗原。另外据 Li(1988, 1989)报道, 可利用 PE 荧光特性通过流式细胞仪快速分拣、分离不同的藻细胞。

PE 作为荧光剂有很多优越性, 由于 PE 有较宽的吸收光谱, 而发射光谱区域较窄, 故比较容易选择合适的激发波长, 从而得到高效荧光发射, 且激发时有特异的荧光发射峰; PE 常与其他色素蛋白构成稳定多聚体, 可相互传递能量, 故少受其他荧光物质的干扰, 而且它是带负电, 近中性物质, 不会与细胞产生非特异性吸附。

5 藻红蛋白分子生物学及其在光合生物进化中的地位

藻胆体是藻类光合作用的必要结构, 光合生物的进化首先应该表现为光合作用器的进化, 追踪藻胆蛋白的变化趋势, 在某种程度上可能阐明光合进化过程。

早在 70 年代, Bogorad(1975)就用免疫化学的方法证实了红藻和蓝藻的藻胆蛋白有密切的关系, 近年

来分子生物学的文献资料也表明,藻红蛋白亚基基因序列是很保守的。Apt 等人通过对 PE 氨基酸序列的研究发现,PE 的色基附着区、 α β 亚基相互作用组成 PE 的组装区保守性很强^[8], Kirk (1993) 发现 *Aglaothamnion neglectum* 的 α , β 亚基 C 末端的变异较大,据 Maid(1990),红藻在第三位密码子有 > 80% 的 A 或 T 的偏倚性,这与高等植物及其他藻类质体基因的情况相似;据 Houdard(1988),Lamont(1990) 的报告,从其碱基序列来看,红藻间与蓝藻有 65% ~ 80% 的相似性,但 Jenkins(1990) 认为与隐藻差异较大;据 Roell(1993) 在多管藻的研究中得出,PE 序列中有一个与原核细胞核糖体结合位点一致的序列,而其启动子与原核蓝藻的近似。来自 PE 的证据都支持有关红藻源于蓝藻,而与隐藻关系较远的假说。有的红藻 PE 其 β 亚基中有内含子,进一步的研究有利于解释质体基因组进化的一些问题。Gray(1989) 认为从 PE 序列来看,红藻间的相似性虽高于它与原核生物之间的,但这两类生物间如此之高的相似性支持了红藻质体的内共生起源说。据 Apt(1993),藻红蛋白亚基基因序列作为光合进化的标志及其在研究进化问题中的作用已得到认同。

而藻红蛋白的光谱特性变化也与光合生物进化有关。蒋丽金等(1983)发现在低等红藻中 R-藻红蛋白的吸收峰是单峰或双峰型,而在高等红藻中却转化为三峰型;喻玲华等(1990)却发现从单细胞红藻经低等红藻向真红藻纲(Florideophyceae)的高等红藻遗传进化过程中,高等红藻的 R-PE 中藻尿胆素的相对含量出现增加的趋势,即 PEB/PUB 的比值降低。PE 光谱特性的变化显示了它作为进化标志的价值。曾呈奎(1983)指出,不同红藻中 PE 种类的变化也显示出了进化的痕迹。

PE 中基因的排列方式与 PC 中的相同为 $\beta\alpha$,而在隐藻 *Cryptomonas* 中 PE 的 α , β 亚基分别转录。据 Kirk(1993)报道,蓝藻中的 PE 的连接多肽并不与 PC 的或 APC 的一样与之紧密连锁,在真核生物中也是如此,据信它们在红藻中由核基因编码。

利用基因克隆、测序和定位诱变等方法研究藻类天线色素系统的报道多集中于 PC, APC, 在 PE 中的

还不多见,有关技术在 PE 中的应用必将促进对其结构与功能深入了解,推动藻类资源的开发。

总之,PE 作为藻胆体的一个重要组成部分,在藻体生理代谢中起了重大作用,有关它的理论研究多集中于蛋白结构、光谱特性和光能传递方面,有关其基因结构、分子进化则多在原核蓝藻中进行,对真核红藻 PE 的研究较少,而真核藻类 PE 的研究有深远的意义。我们知道,PE 的光吸收区位于叶绿素 a 不能吸收的蓝绿光区(498 ~ 565 nm),可利用高等植物不能利用的光能。藻红蛋白的研究对于构建高效光合作用器具有重要的意义:如能通过藻红蛋白基因的导入而将高等植物的光合作用器加以改造,使其光吸收范围扩大,可以更好、更充分地利用光能,将可能大大地促进高等植物的生长发育。件小南(1993a, 1993b) 等将藻胆体与绿藻和菠菜类囊体进行重组后的能量传递实验证实了藻胆体作为绿藻和高等植物捕光器的可能性,为经济藻类或植物的光能利用指明了新的途径。利用发酵生产藻红蛋白,提供食用和饲料蛋白,及利用藻胆蛋白基因对大型经济海藻蛋白质性状进行基因工程改良,都需要藻胆蛋白基因结构和功能研究的进展和突破,其理论和实践意义都是不言而喻的。

参考文献

- 1 张学成等。青岛海洋大学学报,1996,26(3): 318~ 326
- 2 伍华菊等。生物化学与生物物理学报,1994,26(5): 491~ 497
- 3 李邵蓉等。水生生物学报,1996,20(3): 257~ 264
- 4 Eriksen, N. T. and Iversen, J. J. L. . 3Rd International Marine Biotechnology Conference: Program, Abstracts and List of Participants. 1994: 116~ 119
- 5 Dupre, C. and Guary, J. C. et al. . *Biotechnology Techniques*, 1995, 9(3): 185~ 190
- 6 Moreno, J. and Rodriguez, H. et al. . *Journal of Applied Phycology*, 1995, 7(1): 17~ 23
- 7 Subramaniam, A. and Carpenter, E. J. . *Int. J. Remote Sens.*, 1994, 15(8): 1 559~ 1 569
- 8 Apt, K-E and Collier, J. L. . *Journal of Molecular Biology*, 1995, 248(1): 79~ 96