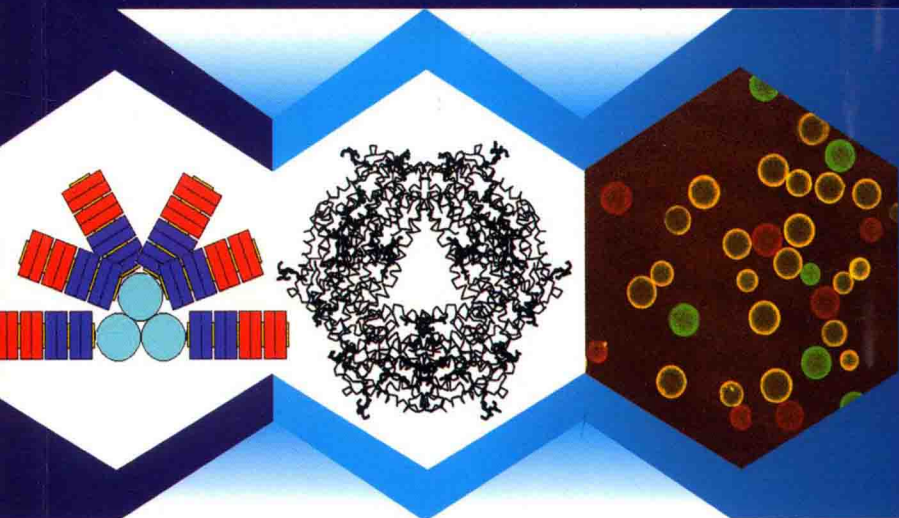


# 生物大分子藻胆蛋白<sup>①</sup>的

高效制备、活性构象及应用研究



颜世敢 朱丽萍 陈蕾蕾◎著



中国水利水电出版社  
www.waterpub.com.cn

# 生物大分子藻胆蛋白的高效 制备、活性构象及应用研究

颜世敢 朱丽萍 陈蕾蕾 著



中国水利水电出版社  
www.waterpub.com.cn

· 北京 ·

封面设计：张静

印刷：北京印刷厂

## 内 容 提 要

生物大分子研究方兴未艾,藻胆蛋白是一种古老的水溶性色素蛋白,属于生物大分子,具有独特的组成、结构、特性和功能,是研究生物大分子结构、活性构象、自组装、能量传递以及光合作用机理的理想材料。商品化的藻胆蛋白已经广泛用作天然色素、荧光试剂等,同时藻胆蛋白还显示出良好的药用价值,如抗氧化、抗病毒、肿瘤抑制、免疫增强等作用。但是,藻胆蛋白制备、交联难度大,导致试剂级的藻胆蛋白售价高,限制了藻胆蛋白的推广应用。本书作者对藻胆蛋白进行了十几年的不懈研究,在藻胆蛋白制备技术、交联技术等关键技术及应用方面取得了一些原创性成果,编写出一部关于藻胆蛋白的专著。本书囊括了藻胆蛋白的高效制备技术、活性构象、标记技术以及应用等方面的最新研究成果和研究进展,具有前沿性、新颖性、系统性、全面性等特点。

本书可作为从事生物大分子、蛋白质学、医学、藻类学、生物化学分析与制备、光合作用机理研究等研究领域的研究生、本科生及相关领域从业者的参考资料。

## 图书在版编目(CIP)数据

生物大分子藻胆蛋白的高效制备、活性构象及应用研究 / 颜世敢, 朱丽萍, 陈蕾蕾著. — 北京: 中国水利水电出版社, 2018. 12

ISBN 978-7-5170-7295-9

I. ①生… II. ①颜… ②朱… ③陈… III. ①生物大分子—藻胆蛋白—制备—研究 IV. ①Q503②Q949.2

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第290602号

责任编辑: 陈 洁

封面设计: 王 斌

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 书 名  | 生物大分子藻胆蛋白的高效制备、活性构象及应用研究<br>SHENGWU DAFENZI ZAODANDANBAI DE GAOXIAO ZHIBEI HUOXING<br>GOUXIANG JI YINGYONG YANJIU                                                                                                                                                                               |
| 作 者  | 颜世敢 朱丽萍 陈蕾蕾 著                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 出版发行 | 中国水利水电出版社<br>(北京市海淀区玉渊潭南路1号D座 100038)<br>网址: <a href="http://www.waterpub.com.cn">www.waterpub.com.cn</a><br>E-mail: <a href="mailto:mchannel@263.net">mchannel@263.net</a> (万水)<br><a href="mailto:sales@waterpub.com.cn">sales@waterpub.com.cn</a><br>电话: (010) 68367658 (营销中心)、82562819 (万水) |
| 经 售  | 全国各地新华书店和相关出版物销售网点                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 排 版  | 北京万水电子信息有限公司                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 印 刷  | 三河市元兴印务有限公司                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 规 格  | 170mm×230mm 16开本 13.5印张 240千字                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 版 次  | 2019年1月第1版 2019年1月第1次印刷                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 印 数  | 0001-3000册                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 定 价  | 58.00元                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

凡购买我社图书,如有缺页、倒页、脱页的,本社营销中心负责调换

版权所有·侵权必究

# 前 言

蛋白质等生物大分子的研究方兴未艾，特别是关于生物大分子的结构与功能、活性构象及应用方面一直是研究热点。

藻胆蛋白属于生物大分子，是藻类特有的一种古老的水溶性色素蛋白，具有独特的组成、结构、性质和功能，是研究光合作用机理、光能传递、藻类进化的好材料，同时也是研究生物大分子的结构、活性构象、功能、自组装的好材料。商品化的藻胆蛋白已经广泛用作食品和化妆品的天然色素、荧光检测试剂，藻胆蛋白还具有广泛的药用价值，可作为抗氧化剂、抗菌剂、抗病毒剂、肿瘤抑制剂、免疫增强剂等药物使用。

藻胆蛋白的性能独特、应用前景广阔，但是由于天然藻胆蛋白只存在于藻类中，而藻类细胞中含有大量的多糖、叶绿素、类胡萝卜素等成分，会严重干扰藻胆蛋白的制备过程，导致藻胆蛋白的分离纯化过程烦琐、得率低、纯度底、效率低、制造成本高，因而造成商品化的藻胆蛋白售价居高不下，限制了藻胆蛋白的应用。

藻胆蛋白与蛋白质的交联技术是限制藻胆蛋白在免疫荧光检测领域应用的另一个瓶颈技术。现有的技术还无法做到藻胆蛋白与抗体或另一种藻胆蛋白在位点和数量上的可控、精准交联，导致藻胆蛋白与抗体的交联效率低、质量低，限制了藻胆蛋白荧光检测应用。

本书作者围绕限制藻胆蛋白应用的关键技术进行了十几年的不懈研究，在藻胆蛋白的高效制备技术、活性构象、标记技术以及应用等方面取得了一些进展，也有很多经验教训和心得体会，于是萌生了出版专著，与同行进行学术交流的想法。

这是一部关于藻胆蛋白的专著，汇集了作者在藻胆蛋白方面十几年的研究成果。本书共分5章：第1章全面介绍了藻胆蛋白的种类、组成、结构、特性、功能及应用概况，以便使读者对藻胆蛋白有一个全面大致了解；第2章介绍了藻胆蛋白高效制备和批量制备的新技术及新方法、新应用，包括固氮菌消化、CHAPS、扩张床层析、双水相萃取、Rivanol-sulfate法、超滤法、阴离子交换pH梯度洗脱法等新型、高效制备方法，既包括天然藻胆蛋白的分离纯化方法又包括基因工程重组藻胆蛋白的制备方法，为

藻胆蛋白的高效制备奠定了基础；第3章介绍了藻胆蛋白的活性构象的研究方法和研究结果，包括pH值、温度、光、离子强度、化学交联剂等因素对藻胆蛋白的活性构象的影响，为藻胆蛋白的交联、应用及保存提供了技术保障；第4章是藻胆蛋白的交联技术及其研究进展，包括藻胆蛋白与抗体的交联、藻胆蛋白能量共振转移探针的研制技术等最新研究成果，打通了限制藻胆蛋白作为荧光检测试剂应用的瓶颈技术；第5章是藻胆蛋白的最新应用研究和进展，主要介绍了研究者应用藻胆蛋白进行免疫荧光检查和抗氧化性的研究成果。总之，本书囊括了藻胆蛋白的高效制备技术、活性构象、标记技术以及应用等方面的最新研究成果和研究进展，具有前沿性、新颖性、系统、全面等特点。

本书是由齐鲁工业大学（山东省科学院）的颜世敢教授、朱丽萍副教授和山东省农业科学院农产品研究所的陈蕾蕾研究员共同完成。具体分工为：朱丽萍副教授负责藻胆蛋白活性构象研究部分的编写，陈蕾蕾研究员负责藻胆蛋白抗氧化性研究部分的编写，颜世敢教授负责全书的构思、绝大部分研究内容的编写、统稿和校对工作。

研究成果来之不易，研究过程中得到了中国科学院海洋研究所的周百成研究员、山东大学的张玉忠教授的指导，周先生还在著作的撰写过程中提出了修改意见，在此表示诚挚的感谢！本书的出版还要感谢国家重点研发计划项目（项目编号2017YFC1601400）的资助。

本书可作为从事生物大分子、蛋白质学、生物化学分析与制备、藻类学、医学、光合作用机理等研究领域的研究生、本科生及相关领域从业者的参考书。

由于作者的研究水平和精力所限，著作中难免存在纰漏和错误，请读者在使用本书的过程中及时指出并告知作者，在此提前表示感谢！

作者

2018年10月

# 目 录

## 前言

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| 第1章 绪论                       | 001 |
| 1.1 藻胆蛋白的种类                  | 001 |
| 1.2 藻胆蛋白的组成                  | 005 |
| 1.3 藻胆蛋白的结构                  | 008 |
| 1.4 藻胆蛋白的性质                  | 016 |
| 1.5 藻胆蛋白的功能和应用               | 018 |
| 1.6 藻胆蛋白的鉴定方法                | 023 |
| 第2章 藻胆蛋白的高效制备                | 026 |
| 2.1 藻胆蛋白的制备工艺流程              | 026 |
| 2.2 原料藻的选择                   | 027 |
| 2.3 藻细胞破碎                    | 033 |
| 2.4 藻胆蛋白的粗提                  | 036 |
| 2.5 藻胆蛋白的分离纯化                | 041 |
| 2.6 多管藻中R-藻红蛋白、R-藻蓝蛋白的同时高效制备 | 054 |
| 2.7 钝顶螺旋藻C-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的同时高效制备 | 073 |
| 2.8 基因工程重组藻胆蛋白的制备            | 083 |
| 第3章 藻胆蛋白的活性构象研究              | 093 |
| 3.1 藻胆蛋白活性构象的研究方法            | 093 |
| 3.2 藻胆蛋白的摩尔消光系数和溶解温度的测定      | 095 |
| 3.3 温度对藻胆蛋白的活性构象的影响          | 099 |
| 3.4 pH值对藻胆蛋白活性构象的影响研究        | 103 |
| 3.5 光照对藻胆蛋白活性构象的影响           | 107 |
| 3.6 离子强度对藻胆蛋白活性构象的影响         | 107 |
| 3.7 化学交联剂对藻胆蛋白活性构象的影响        | 110 |

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 第4章 藻胆蛋白标记技术.....               | 112 |
| 4.1 藻胆蛋白化学交联研究 .....            | 112 |
| 4.2 藻胆蛋白与抗体的交联研究 .....          | 125 |
| 4.3 藻胆蛋白FRET探针的研制.....          | 142 |
| 第5章 藻胆蛋白的应用研究.....              | 151 |
| 5.1 藻胆蛋白在荧光检测中的应用研究进展 .....     | 154 |
| 5.2 藻胆蛋白荧光微球的制备及其在病毒检测中的应用..... | 159 |
| 5.3 藻胆蛋白的抗氧化性研究 .....           | 170 |
| 参考文献 .....                      | 181 |
| 符号说明 .....                      | 208 |

# 第1章 绪论

## 1.1 藻胆蛋白的种类

藻胆蛋白 (Phycobiliprotein, PBP) 是藻类特有的一类色素蛋白, 存在于蓝藻 (Cyanobacteria)、红藻 (Red algae)、隐藻 (Cryptophyceae) 和少数甲藻 (Pyrrophyceae) 等藻类中, 是一类古老的水溶性捕光色素蛋白。32亿年前, 藻胆蛋白就伴随着蓝藻出现在地球上, 是光合分子中的“活化石”。不同藻类中的藻胆蛋白的氨基酸序列及其核酸序列的差别, 成为藻类起源和进化研究以及光合作用机理研究的重要依据。

藻胆蛋白排布在藻细胞的类囊体膜的外表面, 不同种类的藻胆蛋白按照一定的顺序和比例自组装成具有特定构象的超分子复合物—藻胆体 (phycobilisomes), 构成藻类的捕光天线, 行使高效捕获和传递光能的功能 (图1-1)。

到目前为止, 利用电子显微镜和扫描隧道显微镜技术已经发现5种结构类型的藻胆体, 即维管束状 (bundleshaped)、半圆盘状 (hemidiscoidal)、半椭球状 (hemiellipsoidal)、块状 (blockshaped) 及放射状 (radial), 其中以半圆盘状藻胆体研究的最清楚 (图1-2)。半圆盘状藻胆体是由别藻蓝蛋白 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> 三聚体组成的核和藻红蛋白和藻蓝蛋白 ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> 六聚体组成的杆两部分构成。杆在核的周围, 呈半圆盘状排列在同一个平面内, 核附着在类囊体上, 六聚体之间通过连接蛋白联系在一起。藻胆体的能量传递有严格的顺序, 藻胆蛋白的发色基团被严密地固定和包装在盘状结构中, 这些盘顺次堆迭在一起, 构成高度有序的藻胆体, 加上连接蛋白的调节作用, 使能量只能单向传递。能量在光合作用系统内的传递顺序为 PE→PC→APC→Chla (Zilinskas & Greenwald, 1986; Rowan, 1989)。每个藻胆体通常含有300~800个藻胆蛋白。光能首先在不同的藻胆蛋白之间传递, 最后传递给位于类囊体膜上的反应中心的叶绿素分子Chla。能量在藻胆蛋白内部之间的传递则遵循着由能量高的色素体向能量低的色素体传递

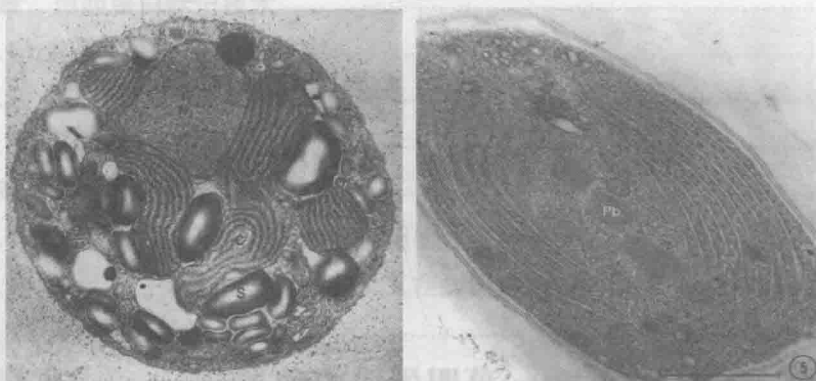


图1-1 红藻紫球藻细胞的电镜图

左图为完整的紫球藻细胞，N为细胞核；C为类囊体膜，其外表面分布有藻胆体和叶绿体；S为淀粉。右图为类囊体膜的局部放大

Fig1-1 Electron microscopy of red algae *Chlorella* cell

Left is the complete cell, N is the nucleus, C is the thylakoid membrane, with phycobilisomes and chloroplasts on the outer surface, and S is starch. Right is the local magnification of the thylakoid membrane.

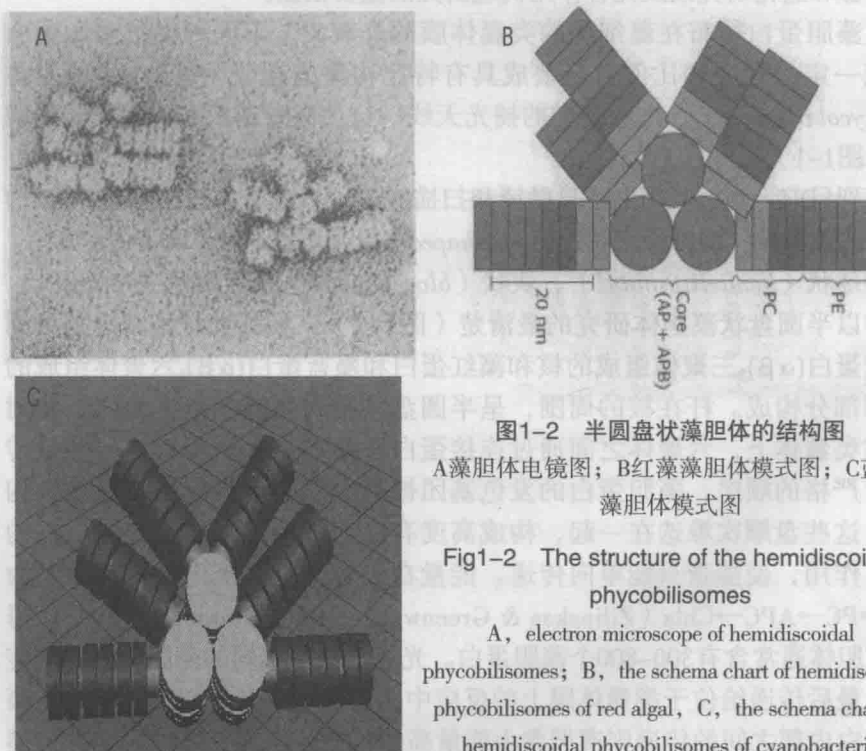


图1-2 半圆盘状藻胆体的结构图

A藻胆体电镜图；B红藻藻胆体模式图；C蓝藻藻胆体模式图

Fig1-2 The structure of the hemidiscoidal phycobilisomes

A, electron microscope of hemidiscoidal phycobilisomes; B, the schema chart of hemidiscoidal phycobilisomes of red alga, C, the schema chart of hemidiscoidal phycobilisomes of cyanobacteria

的规律,藻胆蛋白在藻体内的能量传递效率接近 100% (Glazer, 1984)。藻胆体的光能传递效率如此之高,是海洋藻类得以在深海中高效利用微弱光能而生存的保障。藻胆蛋白主要吸收蓝光和绿光,特别是海洋藻类,对蓝绿光吸收更多,而对红光吸收较少,这与大多数高等植物的吸光区正好互补。

半圆盘状藻胆体由三个圆柱形的核及多个杆组成。核是由别藻蓝蛋白组成,2个圆柱形核位于类囊体膜上,但第3个核不位于类囊体膜上。红藻的藻胆体的杆由藻红蛋白(红色)和藻蓝蛋白(蓝色)组成,蓝藻的藻胆体的杆全部由藻蓝蛋白组成。每个藻胆蛋白均为六边形的盘状结构,不同藻类的杆在盘的数量和藻红蛋白与藻蓝蛋白的比率上差异很大,取决于藻的种类及生长环境。

根据色基和光谱特征,藻胆蛋白可分为藻蓝蛋白(*Phycocyanin*, PC)、藻红蛋白(*Phycoerythrin*, PE)、藻红蓝蛋白(*Phycoerythrocyanin*, PEC)和别藻蓝蛋白(*Allophycocyanin*, APC)四大类。根据光谱特性及藻的来源,每种类型的藻胆蛋白又分为若干小类,分别冠以前缀B-(红藻红毛茛纲 *Bangiphyceae*)、C-(蓝藻门 *Cyanophyta*)和R-(红藻门 *Rhodophyta*) (周百成, 曾呈奎, 1990; Marsac, 2003)。即藻红蛋白(PE)分为R-PE、C-PE、B-PE和b-PE;藻蓝蛋白(PC)分为C-PC、R-PC。R-PE又细分为R-PE I、R-PE II和R-PE III;C-PE细分为C-PE I、C-PE II;R-PC细分为R-PC I、R-PC II。别藻蓝蛋白(APC)细分为APC I、APC II、APB。常见藻胆蛋白的光谱特征图见图1-3、图1-4。

根据抗原性不同,藻胆蛋白分为4个家族,分别是藻蓝蛋白家族、藻红蛋白家族、别藻蓝蛋白家族和连接蛋白(LcM)家族。藻红蓝蛋白的免疫学特性与藻蓝蛋白相似,但与藻红蛋白差距较大,因此藻红蓝蛋白被列为藻蓝蛋白家族中的一个亚族。每个家族内的各成员间能发生免疫交叉反应,但不同家族的成员间不能发生免疫交叉反应,而且每个成员的光谱特性密切相关,这表明藻胆蛋白分子的进化是一个非常古老的事件,藻胆蛋白分子表面的抗原表位变化非常缓慢(王广策等, 2000)。

从基因序列看,藻胆蛋白的亚基具有很高的保守性,可能来自同一祖先基因。藻胆蛋白的各亚基间也具有相似性。藻红蛋白的 $\beta$ 亚基比 $\alpha$ 亚基的基因保守, $\alpha$ 亚基倾向于小区域保守,而 $\beta$ 亚基倾向于大片段的保守。Kim等(1997a; b)报道紫菜的两个种:*Porphyra yezoensis* 和 *Porphyra tenera*, 其PE基因的核苷酸序列与其他属红藻的同源性达80%~89%,与蓝藻的同源性为64%~73%( $\alpha$ 亚基)和61%~71%( $\beta$ 亚基)。极大螺旋藻(*Spirulina maxima*)与其他蓝藻的别藻蓝蛋白基因的核苷酸序列和氨基酸序列存在同

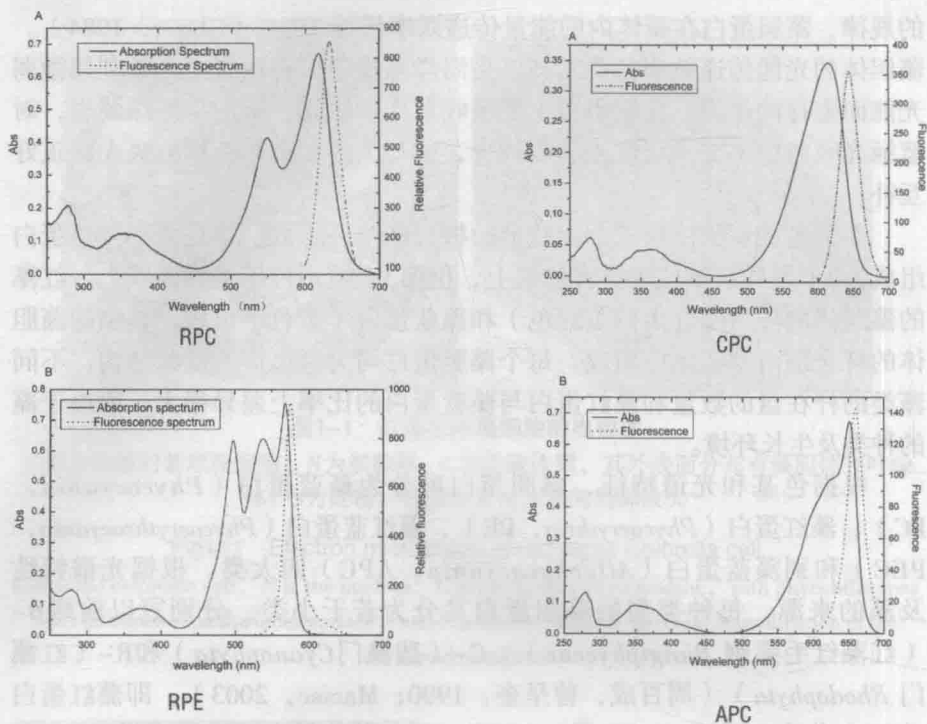


图1-3 常见藻胆蛋白的吸收光谱和荧光光谱图 (实线为吸收光谱, 虚线为荧光光谱)

Fig1-3 Absorption and fluorescence spectra of common phycobiliproteins ( solid line is absorption spectrum, dashed line is fluorescence spectrum )

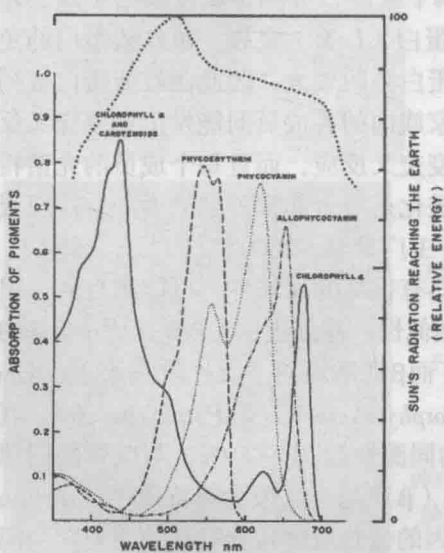


图1-4 常见的色素分子 (藻胆蛋白、叶绿素、类胡萝卜素) 的吸收光谱曲线

Fig1-4 Absorption spectra of common pigment molecules ( phycobiliproteins, chlorophyll, carotenoid )

源性,且 $\beta$ 亚基的保守性高于 $\alpha$ 亚基。Apt 等(1995)比较了100种藻胆蛋白的氨基酸序列,发现藻胆蛋白中存在许多高度保守的氨基酸残基,且藻胆蛋白的构象形成、色基的连接、 $\alpha$ 亚基与 $\beta$ 亚基间的相互作用以及藻胆体的装配等,都发生在保守残基上。藻胆蛋白的 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基是由同一蛋白质祖先协同进化而来。

藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白存在于所有种类的蓝藻和红藻中,藻红蛋白出现于所有种类的红藻和部分种类的蓝藻中,藻红蓝蛋白仅出现于某些种类的蓝藻中。光波长影响藻类合成藻胆蛋白的种类,绿光照射时藻类会累积更多的藻红蛋白,而红光照射时,会生产更多的藻蓝蛋白,这个过程称为互补色适应性,是藻细胞最大限度利用可见光进行光合作用的一种方式。

## 1.2 藻胆蛋白的组成

藻胆蛋白由脱辅基蛋白(*Apoprotein*)和作为辅基的藻胆素(*Phycobilins*)色基两部分组成。藻胆素的A或D环,或A、D两环同时与脱辅基蛋白的半胱氨酸残基通过硫醚键共价结合,只有用酸、碱或酶处理才能将二者分开。

藻胆素是链状四吡咯化合物,含有四个吡咯环,是环状四吡咯血红素的代谢产物,是藻光合作用重要的光感受器。藻胆素与血红素不同,不含金属离子,它与特定的半胱氨酸共价偶联。已知的藻胆素有四种类型:藻红胆素(*Phycoerythrobilin*, PEB)、藻蓝胆素(*Phycocyanobilin*, PCB)、藻尿胆素(*Phycourobilin*, PUB)和藻紫胆素(*Phycobiliviolin*, PXB)。四种藻胆素互为同分异构体,分子量约为0.6kDa,差异表现在 $\Delta 2, 3$ 、 $\Delta 4, 5$ 及 $\Delta 15, 16$ 的双键位置的不同。不同藻胆素的种类、连接位置及连接方式不同(图1-5)。共轭双键的数目不同是造成藻胆素颜色差异的分子基础。PEB、PCB、PUB、PXB四种藻胆色素共轭双键的数目分别为6、9、7、5个。藻胆素所含的共轭双键数目越多则其吸收波长越长。不同的色基具有不同的颜色和特定的吸收波长,如PEB的吸收波长为550nm,显红色;PCB的吸收波长为660nm,显蓝色;PUB的吸收波长为495nm,显黄色;PXB的吸收波长为590nm,显紫色。藻胆蛋白分子共价结合的色基数目较多,每个亚基上连接1~4个色基,而且藻胆蛋白分子可以结合不同种类的色基。色基种类和数量的不同决定了藻胆蛋白吸收波长和颜色的不同。藻红蛋白为亮红色,最大吸收波长为 $\lambda_{\max}=540\sim 570\text{nm}$ ,荧光发射峰为 $E_m=577\text{nm}$ ;藻蓝蛋白显蓝色, $\lambda_{\max}=610\sim 620\text{nm}$ , $E_m=637\text{nm}$ ;藻红蓝蛋白显橙色,

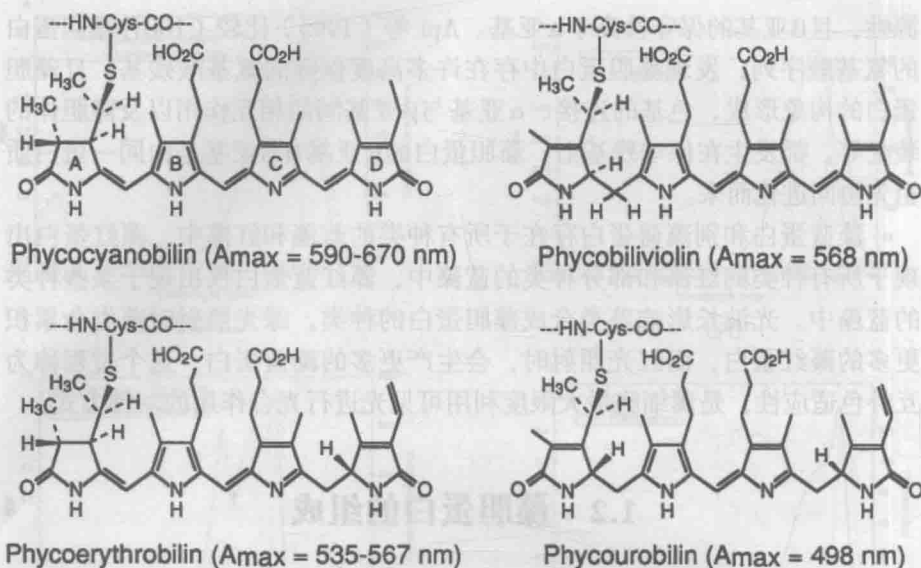


图1-5 藻胆素色基的结构

Fig1-5 Structures of the natural phycobilins.

$\lambda_{\max}=560\sim 600 \text{ nm}$ ,  $E_m=607 \text{ nm}$ ; 别藻蓝蛋白显天蓝色,  $\lambda_{\max}=650\sim 655 \text{ nm}$ ,  $E_m=660 \text{ nm}$ 。

藻胆蛋白分子含有两条结构相似的多肽链 $\alpha$ 和 $\beta$ , 即 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基, 是藻胆蛋白的基本结构单位。 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基分别含有160~180个氨基酸残基,  $\alpha$ 亚基的分子量为10~19kDa,  $\beta$ 亚基的分子量为14~21kDa, 每个亚基连接着1~4个色基, 使藻胆蛋白具有特定的吸收光谱 (Bennett & Bogorad, 1971; Glazer & Cohen-Bazire, 1971; O'Carra & Killilea, 1971; Gysi & Zuber, 1974)。两种亚基通常以1:1的比例构成藻胆蛋白的单体( $\alpha\beta$ ) (MacColl, 1998)。在藻红蛋白中还存在第三种亚基—— $\gamma$ 亚基, 它不仅是色基, 还发挥连接蛋白的作用 (Sun et al., 2003)。

藻胆蛋白亚基则由脱辅基蛋白和开链的四吡咯环发色团——藻胆素组成, 藻胆素通过硫醚键与脱辅基蛋白的具有保守性的半胱氨酸残基共价连接, 主要是通过四吡咯环中的A环上的乙烯基双键与相应的脱辅基蛋白特定的半胱氨酸残基共价偶联。各种亚基含有的氨基酸数目相差不大, 约170个氨基酸。

藻胆蛋白的单体( $\alpha\beta$ )倾向于形成更高的聚集体( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub>。一般来说, 藻胆蛋白的 $\alpha$ 亚基与 $\beta$ 亚基先形成稳定的单体( $\alpha\beta$ ), 再由单体聚合为多聚体( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub>。从蓝藻和红藻中分离的藻胆蛋白是三聚体( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>或六聚体( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> (Berns & Edwards, 1965; MacColl et al., 1971; 1980;

1981)。藻红蛋白因含 $\gamma$ 亚基,多以稳定的 $(\alpha\beta)_6\gamma$ 六聚体的形式存在(Gantt, 1990; Glazer & Hixson, 1977)。与PE、PC相比,APC聚合体的结构相似,但聚合程度不如PE紧密,其色基间的氢键连接也与PE、PC不同(Liu et al., 1999)。别藻蓝蛋白通常以三聚体的形式存在,但*Cyanidiumcaldarium*的别藻蓝蛋白主要以六聚体的形式存在(王广策, 2000a)。在弱酸性、硫氰盐的阴离子缓冲液或高氯酸盐溶液中能获得别藻蓝蛋白和C-藻蓝蛋白的单体(MacColl et al., 1971; 1980; 1981; 1983)。在各种变性条件下能获得 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基(MacColl & Guard-Friar, 1983)。但非变性条件下,要实现 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的分离是困难的(Bermejo et al., 1997)。

纯化的藻胆蛋白在溶液中的聚集态往往与藻胆蛋白的种类、蛋白浓度、溶液的pH值和离子强度等因素有关,在各聚集态之间存在着一定的动态平衡关系(Berns & MacColl, 1989; MacColl, 1998)。藻蓝蛋白在溶液中通常是单体、三聚体、六聚体的混合物(Chaiklahan et al., 2012),但通常以三聚体为主(Patel et al., 2005)。例如, CPC在接近其等电点( $pI=5 \sim 5.5$ )时,以六聚体 $(\alpha\beta)_6$ 为主要存在形式;而在pH值为6.8时,则以三聚体为主;在pH值为5.4,离子强为0.2,蛋白质浓度为0.6mg/mL时,存在六聚体与单体间的平衡;在pH值为6.8,蛋白浓度较低时,则存在着三聚体与单体间平衡;而当蛋白质浓度很高时,即使是pH值为6.8,仍以六聚体与单体间的平衡占优势。而藻红蛋白由于含有 $\gamma$ 亚基,在一个很宽的pH值范围内均以稳定的六聚体 $(\alpha\beta)_6\gamma$ 形式存在。藻胆蛋白不同的聚集态呈现不同的光谱表征(表1-1)。

构成藻胆蛋白的 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 亚基的分子量分别为12~20、14~21、30kDa,因此三聚体藻胆蛋白 $(\alpha\beta)_3$ 的分子量为78~120kDa,六聚体藻胆蛋白 $(\alpha\beta)_6$ 或 $(\alpha\beta)_6\gamma$ 的分子量为156~270kDa(Bernard et al., 1992; Galland-Irmouli et al., 2000; Glazer, 1989)。例如,紫球藻中的B-藻红蛋白的六聚体结构为 $(\alpha\beta)_6\gamma$ ,分子量为263 kDa。

表1-1 藻胆蛋白不同聚集态的光谱特性

Table1-1 Spectral characteristic of different aggregation states of phycobiliproteins

| 藻胆蛋白<br>phycobiliproteins | 聚集态<br>Aggregation states | 最大吸收波长/nm<br>Absorption maximum ( nm ) |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| APC                       | $(\alpha\beta)$           | 614                                    |
|                           | $(\alpha\beta)_3$         | 650                                    |

续表

| 藻胆蛋白<br><i>phycobiliproteins</i> | 聚集态<br>Aggregation states                                       | 最大吸收波长/nm<br>Absorption maximum ( nm )                                                                                          |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CPC                              | ( $\alpha\beta$ )                                               | 614                                                                                                                             |
|                                  | ( $\alpha\beta$ ) <sub>3</sub>                                  | 621                                                                                                                             |
| CPC <sup>a</sup>                 | ( $\alpha\beta$ ) <sub>3</sub> +27 kDa linker                   | 638                                                                                                                             |
|                                  | ( $\alpha\beta$ ) <sub>3</sub> +32.5 kDa linker                 | 629                                                                                                                             |
| APC <sup>b</sup>                 | ( $\alpha\beta$ ) <sub>3</sub> +8.9 kDa linker(L <sub>c</sub> ) | 652                                                                                                                             |
| CPC                              | 3 bilins on $\alpha\beta$                                       | $\beta$ 155 600 <sup>c</sup> 596 <sup>d</sup> 598-600 <sup>e</sup><br>$\alpha$ 84 624 618 616-618<br>$\beta$ 84 628 625 622-624 |

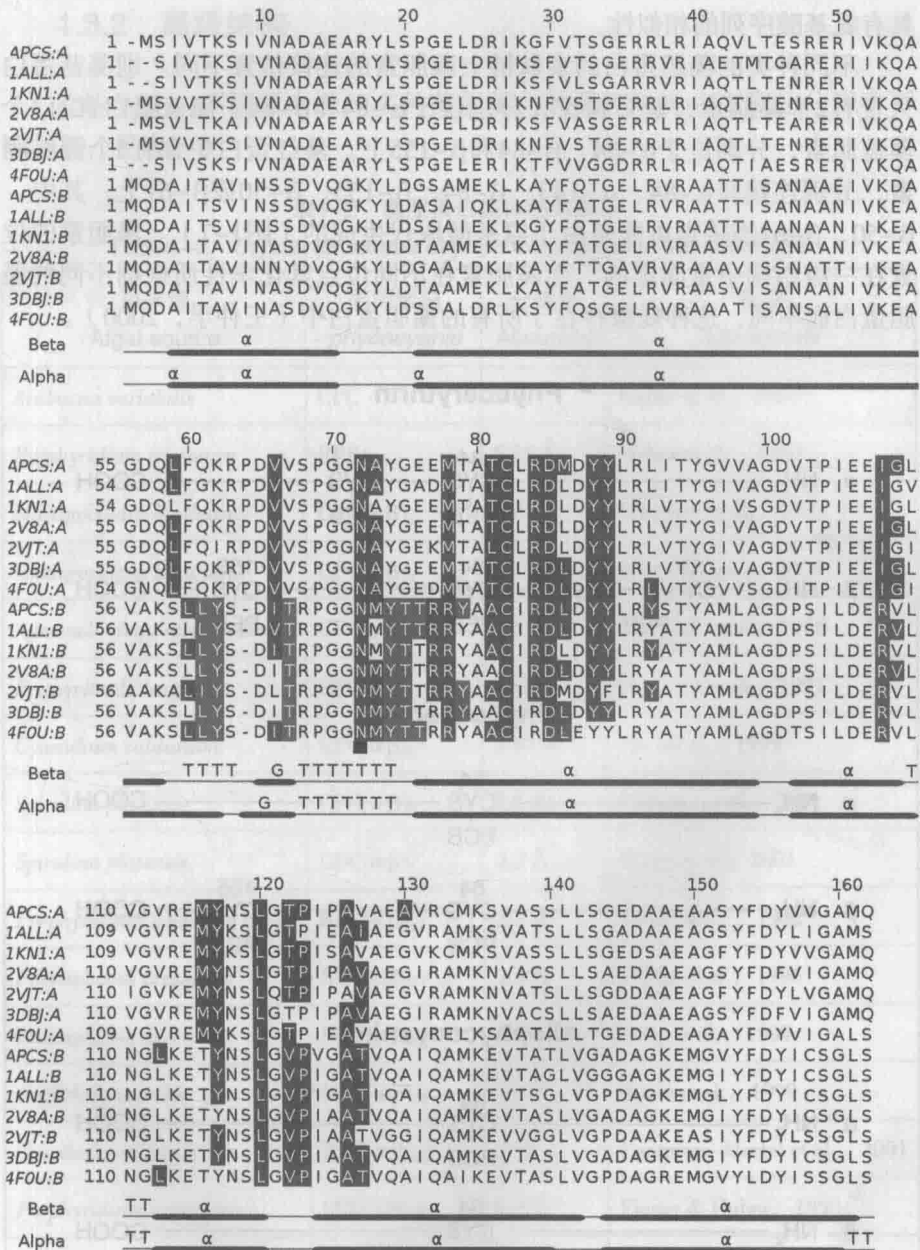
注: a, Yu et al., 1981; b, Fuglistaller et al., 1987; c, Debreczeny et al., 1993; d, Demadov & Mimuro, 1995; e, Siebzehnruhl et al., 1987

### 1.3 藻胆蛋白的结构

目前利用X-射线晶体衍射技术已经确定了多种藻胆蛋白的高级结构,也测定了它们的氨基酸序列。

#### 1.3.1 一级结构

各种藻胆蛋白一级结构的差别在于脱辅基蛋白的氨基酸序列、聚集态和色基种类、数量、连接位置等不同。不同藻胆蛋白的氨基酸数量不同,一般情况下, $\alpha$ 亚基含有161~164个氨基酸, $\beta$ 亚基含有161~177个氨基酸, $\gamma$ 亚基含有317~319个氨基酸(图1-6)。六聚体PE含有34个色基,三聚体的CPC、APC含有9个色基,六聚体的PEC、CPC含有18个色基。CPC、APC中只含有PCB,PE中不含有PCB,PVB只出现在PEC中,RPC是唯一同时含有PEB和PCB的藻胆蛋白。在藻胆蛋白的进化过程中,一般认为藻红蛋白比藻蓝蛋白高级,RPC是介于二者之间的过渡态。

图1-6 别藻蓝蛋白的 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基的一级结构Fig1-6 Primary structure of  $\alpha$  and  $\beta$  subunit of allophycocyanin

组成藻胆蛋白的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基之间以及 $\alpha$ 、 $\beta$ 与藻胆蛋白的其他亚基之间具有氨基酸序列的相似性。

不同种类的藻胆蛋白的多肽链上藻胆素的连接位置不同。别藻蓝蛋白只含有2个藻胆素，数目较少，分别位于 $\alpha$ -84和 $\beta$ -84。藻蓝蛋白含有3个藻蓝胆素，分别位于 $\alpha$ -84、 $\beta$ -84和 $\beta$ -155上。藻红蛋白中含有5个藻红胆素，分别连接在 $\alpha$ -84、 $\alpha$ -143、 $\beta$ -84、 $\beta$ -155、 $\beta$ -50或 $\beta$ -61上，其中， $\beta$ -50、 $\beta$ -61连接点可能是由于氨基酸取代生成的（图1-7）。藻胆素的位置在一级结构中是固定的，而藻胆素在不同位点其化学性质根据不同的藻胆蛋白而不同，这种现象存在于所有的藻胆蛋白中（王仲孚，2000）。

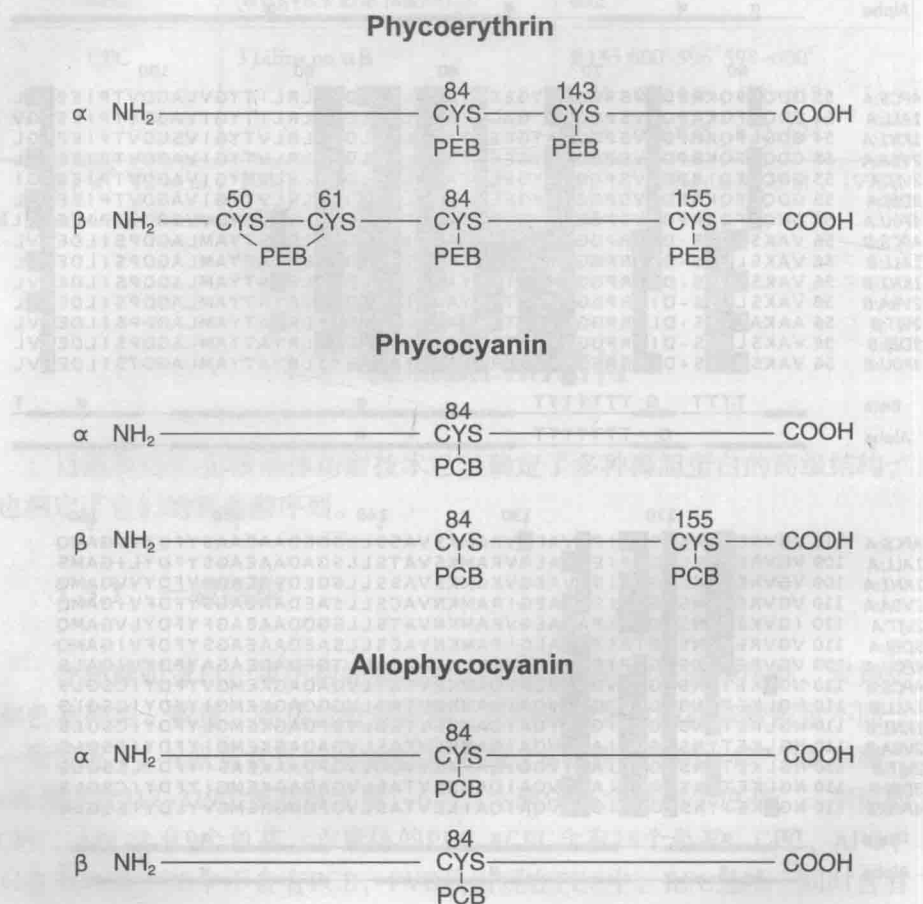


图1-7 藻胆蛋白中藻胆素与脱辅基蛋白的连接位置及方式

Fig1-7 Positioning of phycobilins in the amino acid sequences of certain phycobiliproteins