

环境因子和变性剂作用下 B-藻红蛋白的光谱与荧光特性

胡金梅¹, 魏东^{1*}, 郭祀远¹, 陈峰^{1, 2}

1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640

2. 香港大学植物学系, 香港

摘要 文章系统研究了 B-藻红蛋白在环境因子和变性剂作用下的特征吸收光谱和荧光发射强度的变化规律, 结果表明: B-藻红蛋白分别在 pH 4.5~9.5、温度在 25~60 °C 和日光灯照射下(光强 2 800 lx)24 h 以内相对稳定, 其荧光发射强度和特征吸收光谱变化不大; 分别在 0.5%~3% SDS 和 0.25%~1% β -巯基乙醇作用下 B-藻红蛋白的光谱特性发生了显著变化, 荧光发射强度严重衰减, 特征吸收峰消失; 在 10%~70% 乙腈或 2~8 mol · L⁻¹ 脲作用下, 荧光发射强度有所衰减, 但特征吸收光谱峰形未变化, 只是峰强度略有减小。简要分析了环境因子和变性剂引起 B-藻红蛋白的构象变化的可能原因。

关键词 藻红蛋白; 环境因子; 变性剂; 吸收光谱; 荧光

中图分类号: O657.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)12-2258-06

引言

藻红蛋白(phycoerythrin, PE)是藻胆蛋白(Phycobiliprotein)中的一大类, 是红藻中的主要捕光色素蛋白。根据特征吸收峰出现的位置和峰型, PE 可分为 B-PE, C-PE, R-PE 和 b-PE 四种^[1]。B-PE 主要存在于海产单细胞红藻紫球藻(Porphyridium)中, 其发色团有藻红胆素 PEB($\lambda_{\max} = 592$ nm)和藻尿胆素 PUB($\lambda_{\max} = 494$ nm)2 类。因其量子产率高、斯托克位移大等优点, 可作为荧光探针和光敏剂用于肿瘤光动力学治疗^[2, 3], 还可作为天然红色素用于食品和化妆品工业。

光谱特性是 B-PE 的主要特性, 光谱法是研究其结构和功能的最重要的方法之一。B-PE 的稳定性以及环境因子影响下的变性和复性问题是其结构和功能研究的重要方面。天然聚合和解聚以及变性状态下 B-PE, 其光谱和荧光特性可能发生较大改变, 而上述特性的改变反映了 B-PE 在结构和组成上的变化^[4, 5]。因此, 系统研究 B-PE 在不同环境因子和变性剂作用下的光谱和荧光特性的变化, 对 B-PE 的稳定性、变性与复性以及构象的研究将提供重要的科学依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

UV-2102PC 紫外-可见分光光度计; Fluostan Galaxy 高

效多功能微板测定仪; 截留分子量为 10 K 超滤膜包购自德国 Sartorius 公司; 30 L 全自动气升式光生物反应器为瑞士比欧公司产品; 高速冷冻离心机为德国 Sigma 公司产品。

色谱纯乙腈为美国 Tedia 公司产品, SDS(十二烷基磺酸钠)购自 Sigma 公司, 醋酸钠、 β -巯基乙醇和脲为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 试验材料

海洋紫球藻(Porphyridium cruentum)藻种由中国科学院海洋研究所(青岛)藻种库提供。采用 John's 人工海水培养基^[6], 在 30 L 全自动光生物反应器中培养并获得紫球藻藻体^[7]。

1.2.2 B-PE 的分离纯化

紫球藻藻体悬浮于 1 mol · L⁻¹ 醋酸钠缓冲液(pH 5.5)中, 充分混匀, 经超声波破碎, 4 °C 下 10 000 r · min⁻¹ (r: rotation)离心 30 min, 收集上清液。采用文献方法^[8]对上清液中的 B-PE 进行分离纯化, 获得的样品经紫外-可见吸收光谱和荧光光谱证实为 B-PE, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析达到电泳纯, 纯度 $A_{545 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} > 5.0$ 。纯化后的 B-PE 经超滤膜浓缩至 1 g · L⁻¹ 备用。

1.2.3 环境因子对 B-PE 特征吸收光谱和荧光发射强度的影响

方法如下: (1)温度: 将 B-PE 溶液用 0.25 mol · L⁻¹ 醋酸钠缓冲液(pH 5.5)稀释至相同浓度($A_{545 \text{ nm}}$ 为 0.1~0.6),

收稿日期: 2005-11-08, 修订日期: 2006-02-28

基金项目: 广东省自然科学基金项目(5006524)和广东省科技攻关项目(2005B20301017)资助

作者简介: 胡金梅, 女, 1976 年生, 华南理工大学轻工与食品学院博士研究生 * 通讯联系人

分别在 25~90 °C 恒温水浴中各保温 30 min; (2) pH: 用 1 mol·L⁻¹ HCl 或 1 mol·L⁻¹ NaOH 调节 0.25 mol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液(pH 5.5)的 pH 值至 2.0~12.5, 分别稀释 B-PE 溶液至相同浓度($A_{545\text{ nm}}$ 为 0.1~0.6); (3) 光照: 将 B-PE 浓缩液用 0.25 mol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液(pH 5.5)配成 200 mL 溶液($A_{545\text{ nm}}$ 为 0.1~0.6), 放置在 250 mol·L⁻¹ 三角瓶中, 室温下用 2 支 40 W 日光灯管连续照射, 灯管与液面的距离为 30 cm(光照强度约为 2 800 lx), 定时取样 5 mL, 直至退色为止。上述处理的样品分别测定其特征吸收光谱和荧光发射强度。

1.2.4 变性剂对 B-PE 特征吸收光谱和荧光发射强度的影响

选择 4 种常用的蛋白质变性剂, 用蒸馏水配成不同浓度的系列溶液各 5 mL 如下: (1) 0.5%, 1%, 2% 和 3% (ρ) SDS 溶液; (2) 2, 4, 6 和 8 mol·L⁻¹ 脲溶液; (3) 10%, 30%, 40%, 50%, 60% 和 70% (φ) 乙腈溶液; (4) 0.25%, 0.50%, 0.75% 和 1.0% (φ) β -巯基乙醇溶液。分别加入 20 μ L B-PE 溶液, 4 °C 下避光放置 2 d, 再测定其特征吸收光谱和荧光发射强度。

1.2.5 分析与测试

(1) 特征吸收光谱

室温下用紫外-可见分光光度计在 450~650 nm 波长下扫描经上述处理的样品, 获得不同处理条件下的 B-PE 特征吸收光谱曲线, 并记录 $A_{545\text{ nm}}$ 。

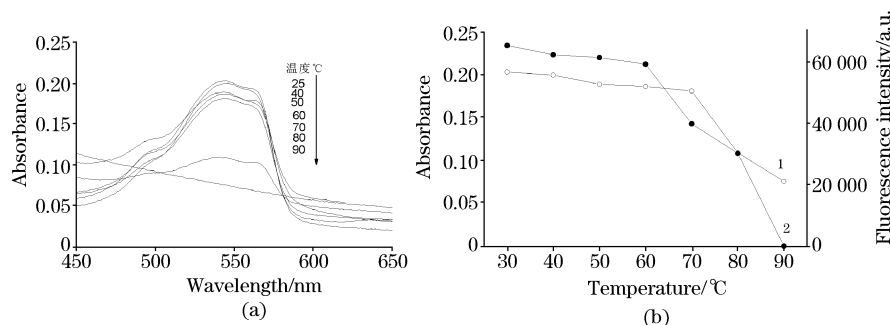


Fig. 1 Effect of temperature on specific absorption spectra and fluorescence emission intensity of B-PE

(b) 1: $A_{545\text{ nm}}$; 2: $Em_{590\text{ nm}}$

有研究^[11-13]报道了不同温度对 B-PE 和 R-PE 的稳定性和荧光发射强度的影响, 研究结果都表明, 其荧光强度在 60 °C 以下缓慢减小, 70 °C 以上出现大幅度衰减, 与本研究结果基本一致。可能是高温使 PE 变性, 破坏了维护色基藻红胆素和藻胆素与亚基结合的稳定结构域, 致使荧光发射峰和特征吸收峰均消失。

2.1.2 pH

由图 2 可知, $A_{545\text{ nm}}$ 和 $Em_{590\text{ nm}}$ 值在 pH 4.5~9.5 变化很小, 基本稳定。酸性条件下, pH 4.0 时 B-PE 溶液出现轻微沉淀, $A_{545\text{ nm}}$ 值变化不大, 但 $Em_{590\text{ nm}}$ 值衰减严重; pH 3.5 时 B-PE 溶液完全沉淀, 545 和 563 nm 处特征吸收峰消失, 变成 1 个位于 555 nm 处很弱的吸收峰; pH 2.0 时特征吸收峰和荧光消失。碱性条件下, pH 10.5 时特征吸收值和荧光强度急剧下降; pH 12.5 时特征吸收峰和荧光都消失, 变成在

(2) 荧光发射强度

在专用 96 孔板上每孔加入 200 μ L 上述处理的样品, 用高效多功能微板测定仪在室温下测定, 选用 544 nm 波长激发, 在 590 nm 波长下(仪器可选波长)测定样品的荧光发射强度。

2 结果与讨论

2.1 环境因子对 B-PE 特征吸收光谱和荧光发射强度的影响

天然构象的 B-PE 在 563 和 545 nm 处有 2 个主要吸收峰, 在 498 nm 处有一肩峰; 在 498~563 nm 下激发, 575 nm 处可产生强烈的荧光发射峰。当外界环境发生改变时, 发色团之间的相互作用随之改变, 发色团的构象亦发生变化, 最终导致光谱和荧光特征的变化^[9, 10]。

2.1.1 温度

由图 1 可见, 在 25~60 °C 范围内, B-PE 特征吸收光谱基本不变, 但峰强度有所降低图 1(a)。同时, $A_{545\text{ nm}}$ 和 $Em_{590\text{ nm}}$ 值略有减小图 1(b)。当温度高于 60 °C 时 $A_{545\text{ nm}}$ 值急剧下降, 70 °C 以上 $Em_{590\text{ nm}}$ 出现大幅度衰减, 80 °C 时 498 nm 处肩峰不明显, $A_{545\text{ nm}}$ 值大幅度减小; 90 °C 时特征吸收峰和荧光均消失, 肉眼可见的粉红色已完全退色。结果表明, B-PE 在 60 °C 以下是相对稳定的, 70 °C 以上变性较大。

590 nm 处有吸收峰, 发生了红移。

有研究表明, 在一个相当宽的 pH 值范围内, B-PE 和 R-PE 通常以稳定的六聚体 ($\alpha\beta$)₆ 形式存在^[14]。而在极端碱性条件下, B-PE 分子结构破坏剧烈, 有其他的官能团暴露出来^[15, 16], 使发色团的构象发生了变化, 从而荧光和特征吸收峰消失。极端酸性条件下, B-PE 出现不同程度沉淀, 载体蛋白由原来的球状结构向线性结构变化, 发色团与载体蛋白的相互作用也随之减弱, 空间构象发生变化^[4]。可见, B-PE 在碱性和酸性条件下有完全不同的构象特征, 与 pH 诱导其他蛋白的构象变化研究有相似结论^[17]。

2.1.3 光照时间

由图 3 可知, 试验强光下连续光照 24 h 以内, B-PE $A_{545\text{ nm}}$ 值变化不大, 24 h 后显著下降; $Em_{590\text{ nm}}$ 值则在 8 h 后显著衰减[见图 3(a)]。从光照 8~48 h 范围内的特征吸收光

谱[见图 3(b)]可看出, 563 nm 处吸收峰有所下降, 498, 615 nm 处吸收峰略有升高。52 h 后 B-PE 溶液基本退色且无荧

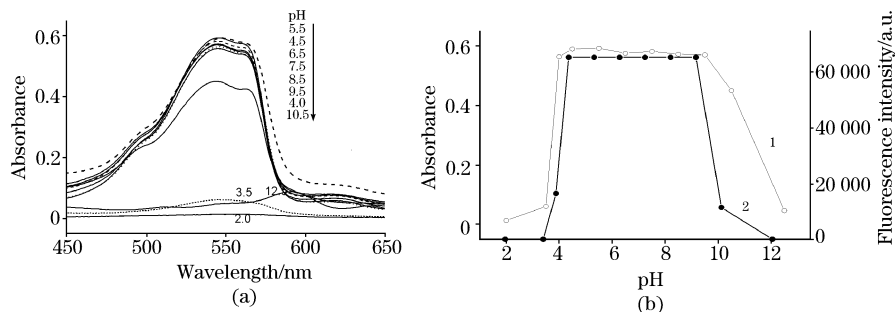


Fig. 2 Effect of pH on specific absorption spectra and fluorescence emission intensity of B-PE

(b) 1: $A_{545\text{ nm}}$; 2: $Em_{590\text{ nm}}$

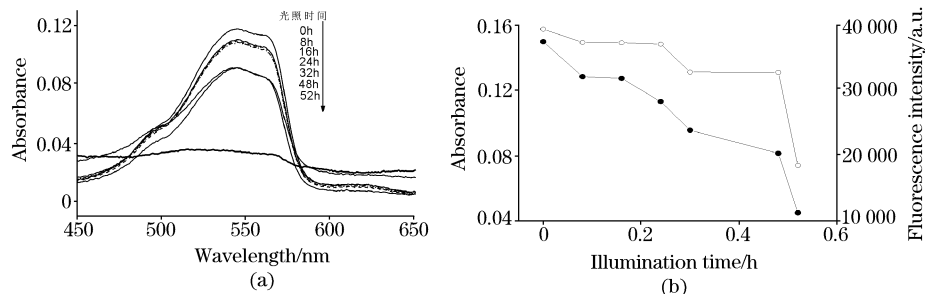


Fig. 3 Effect of illumination time on specific absorption spectra and fluorescence emission intensity of B-PE

(b) 1: $A_{545\text{ nm}}$; 2: $Em_{590\text{ nm}}$

也有研究^[18]报道了可见光照射下 PE 的光谱变化, 与本研究发现的变化趋势基本一致。光照对 B-PE 的变性机制可能有 2 种: 一方面光照可能导致藻胆蛋白及其发色团的空间结构发生变化, 引起发色团的摩尔消光系数 ϵ 的变化; 另一方面光照后各发色团能吸收和传递可见光能, 可能使发色团的浓度发生了变化, 从而导致 563 nm 处吸收峰下降, 而 498, 615 nm 处吸收峰升高。

2.2 变性剂对 B-PE 特征吸收光谱和荧光强度的影响

荧光强度和特征吸收光谱可表征处于不同变性状态时

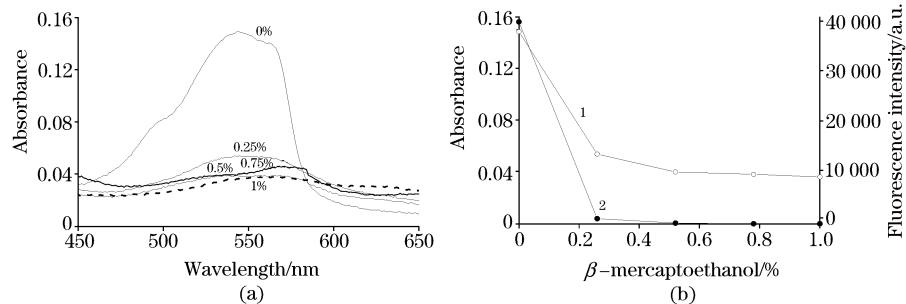


Fig. 4 Effect of β -mercaptoethanol on specific absorption spectra and fluorescence emission intensity of B-PE

(b) 1: $A_{545\text{ nm}}$; 2: $Em_{590\text{ nm}}$

β -巯基乙醇可破坏蛋白质二硫键, 使组成 B-PE 亚基的三级结构发生显著变化。加入 β -巯基乙醇后, B-PE 在 498 nm 处没有吸收峰, 可能是藻胆素构象发生变化, 不能正常

B-PE 的构象^[19], 为 B-PE 变性及复性动力学研究提供实验依据。

2.2.1 β -巯基乙醇

由图 4 可知, 加入 0.25%~0.5% β -巯基乙醇, 只在 555 nm 处有吸收峰, 特征吸收峰消失, 荧光强度急剧下降至 0; β -巯基乙醇达到 0.75% 时, 特征吸收峰红移至 573 nm 左右, 且出现蓝色沉淀, 荧光基本消失; 1% β -巯基乙醇与 B-PE 作用后, 不仅在 573 nm 处有吸收峰, 还在 620 nm 处出现吸收峰, 荧光消失, 出现蓝色沉淀。

吸收能量并将吸收的能量快速高效地传递给藻胆素^[20], 从而使 B-PE 特征吸收峰和荧光消失。

2.2.2 SDS

由图 5 知, B-PE 在 0.5%~1% SDS 作用下, 原来的特征吸收峰变窄, 只出现 545 nm 吸收峰和 496 nm 肩峰; 1%~2% SDS 作用下, B-PE 在 493 nm 处的吸收峰增强; 3% SDS 作用后, 545 nm 处特征吸收峰消失, 只出现 493 nm 吸收峰, 峰位置发生蓝移。SDS 作用下样品的荧光基本消失。

加入 SDS 前后蛋白质的荧光强度和吸收光谱有较明显的变化, 主要是由于 SDS 导致蛋白质变性引起蛋白质分子结构的变化^[21]。本研究还发现, 加入 0.5%~1% SDS 短时间内(6 h)不会有明显变化, 随着作用时间的延长, B-PE 变性

明显, 致使溶液完全褪色。

2.2.3 乙腈

由图 6 可知, 10%~20% 乙腈对 B-PE 的特征吸收光谱和荧光强度影响不大。浓度大于 30% 的乙腈使 B-PE $A_{545\text{ nm}}$ 和 $Em_{590\text{ nm}}$ 值有所衰减。70% 乙腈使 B-PE $A_{545\text{ nm}}$ 和 $Em_{590\text{ nm}}$ 值大幅降低。因此, 10%~70% 乙腈与 B-PE 作用后, 特征吸收光谱基本未发生变化, 只是峰强度减小, 且仍具有一定的荧光。

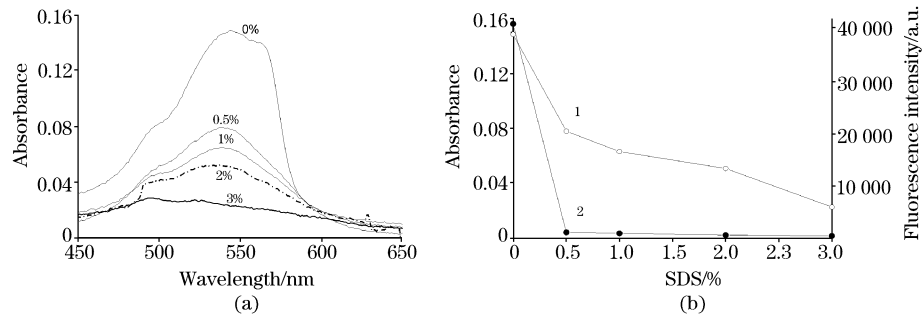


Fig. 5 Effect of SDS on specific absorption spectra and fluorescence emission intensity of B-PE

(b) 1: $A_{545\text{ nm}}$; 2: $Em_{590\text{ nm}}$

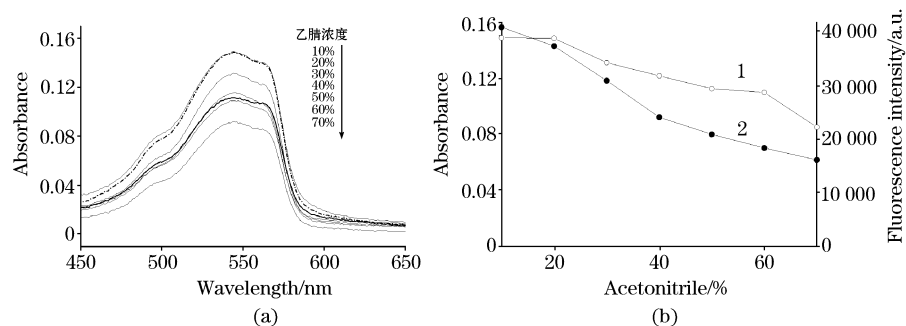


Fig. 6 Effect of acetonitrile on specific absorption spectra and fluorescence emission intensity of B-PE

(b) 1: $A_{545\text{ nm}}$; 2: $Em_{590\text{ nm}}$

乙腈是反相 HPLC 常用的有机流动相, 研究 B-PE 在不同浓度乙腈中的变性程度, 有利于选择合适的洗脱条件。有研究表明, 达到一定浓度的乙腈才能引起 B-PE 的亚基间一些键断裂或形成, 改变其亚基及亚基间空间接触和排布, 使整个蛋白质分子的构象发生解聚^[22], 但不影响到 B-PE 色基间的能量传递, 因而特征吸收峰和荧光变化幅度不大, 有利于对分离的 B-PE 亚基进行检测分析。

2.2.4 脲

由图 7 可知, 加入 2~8 mol·L⁻¹ 脲后 B-PE $A_{545\text{ nm}}$ 值下降显著; 2~6 mol·L⁻¹ 脲使其 $Em_{590\text{ nm}}$ 值缓慢衰减, 8 mol·L⁻¹ 脲其 $Em_{590\text{ nm}}$ 值剧烈衰减见图 7(b)。从吸收光谱图看可见图 7(a), 脲作用后 B-PE 的特征吸收光谱没有发生改变, 只是峰强度减小。

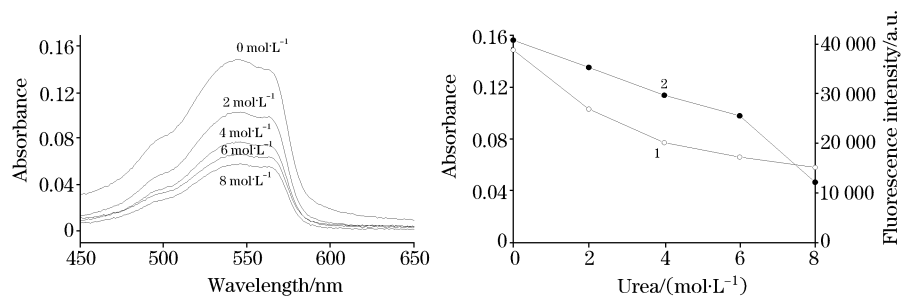


Fig. 7 Effect of urea on specific absorption spectra and fluorescence emission intensity of B-PE

(b) 1: $A_{545\text{ nm}}$; 2: $Em_{590\text{ nm}}$

脲常被用于蛋白质的解离和亚基的分离。在 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脲的作用下,大多数蛋白质分子都由折叠构象变成完全伸展的构象,蛋白质寡聚体则解离成亚基。脲通过破坏蛋白质分子内的氢键而使蛋白质从有序结构转变为无序结构,发生去折叠过程^[23]。由本研究的结果可推测,低浓度脲只能使蛋白处于一种不完全变性的状态,发生部分去折叠。说明 B-PE 对脲有一定的抵抗能力,低浓度脲作用后 B-PE 仍然保留有一定程度的有序空间结构,使整个蛋白质分子的构象发生轻微变化。

3 结 论

B-PE 具有良好的荧光特性和稳定性,在极端条件下才能使 B-PE 达到完全变性,可作为一种功能稳定的荧光试剂。B-PE 荧光强度和特征吸收光谱的变化趋势非常吻合,说明荧光强度和特征吸收光谱都能清楚地表征 B-PE 蛋白分子的构象变化及变化程度,所以可选用其一作为衡量 B-PE 稳定状态的指标。另外,本研究结果还可为建立 B-PE 亚基的分离方法提供依据。

参 考 文 献

- [1] CHEN Feng, JIANG Yue(陈峰,姜悦). *Microalgae Biotechnology(微藻生物技术)*. Beijing: China Light Industry Press(北京:中国轻工业出版社), 1989. 108.
- [2] LI Guang-wu, WANG Guang-ce, LU Lei, et al(李冠武,王广策,陆雷,等). *Acta Laser Biology Sinica(激光生物学报)*, 1997, 6(3): 1119.
- [3] Glazer A N. *Appl. Phycobiliprotein*, 1994, 6: 104.
- [4] Sachurfu, LUO Liao-fu(萨楚尔夫,罗辽复). *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol(内蒙古大学学报·自然科学版)*, 2003, 34(1): 47.
- [5] HUANG Yan, QIN Li, ZHU Jin-chang(黄岩,秦利,朱晋昌). *Photographic Science and Photochemistry(感光科学与光化学)*, 1993, 11: 56.
- [6] Johes R F, Speer H L, Kury W. *Physiologia Plantarum*, 1963, 16: 636.
- [7] LIU Shi-sheng, WEI Dong, ZHU Gui-fang(刘石生,魏东,朱桂芳). *Journal of South China Univ. of Tech. (Natural Science Edition)(华南理工大学学报·自然科学版)*, 2005, 33(2): 82.
- [8] Bermejo Roman R, Alvarez-Pez J M, Acien Fernandez F G. *Journal of Biotechnology*, 2002, 93: 73.
- [9] Richard G Fisher, Nancy E Woods, Herbert E Fuchs. *Journal of Biotechnology*, 1980, 255(11): 5082.
- [10] Daniel J Lundell, Alexander N Glazerg. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259(9): 5472.
- [11] Ruperto Bermejo, Diego J Tobaruela, Eva M Talavera, et al. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, 263: 616.
- [12] Vaidya S, Orta-Ramirez A, Smith D M, et al. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 4: 465.
- [13] Galland-Irmouli A V, Pons L, Lucon M, et al. *Journal of Chromatography B*, 2000, 739: 117.
- [14] Glazer A N. *Mol. Cell Biochem.*, 1977, 18: 125.
- [15] YANG Cang-zhen, MA Jin-shi, JIANG Li-jin(杨苍珍,马金石,蒋丽金). *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 1988, 15: 200.
- [16] CHEN Xiao-qiang, GONG Xing-guo, SHI Feng(陈小强,龚兴国,史锋). *Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析试验室)*, 2004, 23(11): 5.
- [17] LIANG Hong, SONG Zhong-rong, ZHOU Yong-qia, et al(梁宏,宋仲容,周永洽,等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 1994, 14(6): 39.
- [18] ZHENG Jiang, GAO Ya-hui, WANG Wen-xing(郑江,高亚辉,王文星). *Journal of Xiamen University(Natural Science)(厦门大学学报·自然科学版)*, 2003, 42(1): 117.
- [19] ZHANG Jing(张静). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(4): 455.
- [20] WU Hua-ju, ZHANG Jian-ping, XIA An-dong(伍华菊,张建平,夏安东). *Photographic Science and Photochemistry(感光科学与光化学)*, 1995, 13(1): 53.
- [21] HE Jin-an, YE Xi-lin, JIANG Li-jin(何靳安,叶锡林,蒋丽金). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica(生物化学与生物物理学报)*, 1994, 26(4): 371.
- [22] ZHANG Xi-ying, LIU Lu-ning, CHEN Xiu-lan, et al(张熙颖,刘鲁宁,陈秀兰,等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(10): 1224.
- [23] YANG Fang, LIANG Yi(杨芳,梁毅). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2003, 61(6): 803.

Effects of Environmental Factors and Denaturants on the Specific Absorption Spectrum and Fluorescence Characters of B-Phycoerythrin

HU Jin-mei¹, WEI Dong^{1*}, GUO Si-yuan¹, CHEN Feng^{1,2}

1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

2. Department of Botany, University of Hong Kong, Hong Kong, China

Abstract Effects of environmental factors and denaturants on the variation rules of the specific absorption spectrum and fluorescence emission intensity of B-phycoerythrin were systematically investigated in the present paper. The results showed that B-phycoerythrin was relatively stable under certain conditions: the pH range from 4.5 to 9.5, temperature range from 25 to 60 °C, and illumination intensity at 2 800 lx in 24 h. The specific absorption spectrum and fluorescence emission intensity of B-phycoerythrin changed slightly. The conformation of B-phycoerythrin changed remarkably with 0.5%-3% SDS or 0.25%-1% β -mercaptoethanol, the fluorescence emission intensity declined greatly, and the specific absorption peaks disappeared. The fluorescence emission intensity declined, while the specific absorption spectrum did not change, but the peak intensity reduced slightly with 10%-70% acetonitrile or 2-8 mol \cdot L⁻¹ urea. The possible reasons for the conformation changes of B-phycoerythrin with various environmental factors and different denaturants were briefly discussed.

Keywords Phycoerythrin; Environmental factors; Denaturant; Specific absorption spectrum; Fluorescence

(Received Nov. 8, 2005; accepted Feb. 28, 2006)

* Corresponding author