

坛紫菜中别藻蓝蛋白的纯化及洗脱组分光谱研究

董宏坡¹, 左正宏², 陈奕欣²

(1. 茂名学院生物食品系, 广东茂名 525000 2 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要: 以福建省平潭县坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 为材料, 采用硫酸铵分级分离和柱层析法纯化别藻蓝蛋白 (APC), 并对纯化的条件进行了详细的探讨。研究表明: 采用 30% ~ 35% 饱和硫酸铵沉淀、Tris HCl (pH = 8.0) 作为洗脱缓冲液、DEAE Sephadex A-50 作为层析介质, 所获得的 APC 的纯度和回收率分别为 3.50 和 70.2%; SDS PAGE 表明 APC 有 α 和 β 两个亚基, 分子量分别为 18.9 kD 和 17.7 kD。因此该方法对于从坛紫菜中快速纯化 APC 是适合的。采用光谱分析研究柱洗脱组分, 结果表明: 坛紫菜中含有分子结构为 $(\alpha\beta)_6\gamma$ 的“双峰型”R-PE 含有结构为 $(\alpha\beta)_3$ 的 R-PC 含有结构为 $(\alpha\beta)_3$ 的 APC II。

关键词: 坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*); 别藻蓝蛋白; 柱层析; 光谱

中图分类号: Q949.29

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)06-0583-04

A llophycocyanin Purification from *Porphyra haitanensis* and Studies on Spectrum of Eluting Fractions

DONG Hong-Po¹, ZUO Zheng-Hong², CHEN Yi-Xin²

(1. Maoming College Maoming Guangdong 525000 China 2 School of Life Sciences Xiamen University, Xiamen 361005 China)

Abstract A llophycocyanin from *Porphyra haitanensis* collected in Pingtan County of Fujian Province was purified using ammonium sulfate precipitation and column chromatography. Meanwhile, factors of purification were studied in detail. The results showed that using 30% - 35% of the saturation ammonium sulfate precipitation, Tris HCl (pH = 8.0) as eluting buffering and DEAE-Sephadex-A-50 as chromatographic adsorbent, the purity and rate of recovery of allophycocyanin obtained were 3.50 and 70.2%, respectively. SDS-PAGE demonstrated the presence of two subunits α and β , with Mr 18.9 kD and 17.7 kD, respectively. Therefore the method was suitable for quick purification of allophycocyanin from *P. haitanensis*. At the same time, the fractions collected from column were researched by analysis of spectrum. The findings indicated that *P. haitanensis* contained the R-phycoerythrin with two absorption peaks which had the polypeptide composition $(\alpha\beta)_6\gamma$, the R-phycoerythrin which had the polypeptide composition $(\alpha\beta)_3$ and allophycocyanin II which had the polypeptide composition $(\alpha\beta)_3$.

Key words *Porphyra haitanensis*; A llophycocyanin; Column chromatography; Spectrum

藻胆蛋白在藻类的叶绿体中凝集成排列规则的小粒体, 即藻胆体 (phycobilisomes), 连接在内囊体的膜上。别藻蓝蛋白 (APC) 在藻胆体的中心, 靠近光合作用膜, 其外包裹着藻蓝蛋白 (PC), 最外层为藻红蛋白 (PE)^[1]。别藻蓝蛋白作为藻胆蛋白的一种, 在科学研究、医学、工业中具有广泛的应用前景。事实证明, 别藻蓝蛋白作为荧光探针优于其它的藻胆蛋白, 因为别藻蓝蛋白的最大激发峰和发射峰位于红光区, 而大多数的生物材料在红光区无发射峰, 这样就避免了相互之间的干扰^[2]。同时, 别藻蓝蛋白还可以作为食品中的色素添加剂以及医学中的光敏剂和抗肿瘤物质^[3]。目前, 国内外多是从蓝藻中

纯化别藻蓝蛋白, 由于坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 的细胞壁厚, 别藻蓝蛋白含量少, 因此, 高效地从坛紫菜中纯化别藻蓝蛋白并对洗脱组分进行光谱学研究还未见报道。本文对从坛紫菜中纯化别藻蓝蛋白的条件、程序进行了详细的探讨, 建立了一个快速、高效地从坛紫菜中纯化别藻蓝蛋白的方法, 并对坛紫菜中藻胆蛋白的光谱学性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野生坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 采自福建省平潭县南海、将军山、北冰岛、硫酸岛等沿岸。

收稿日期: 2006-05-17 修回日期: 2006-09-11。

基金项目: 国家海洋 863 项目 (2002A603023) 资助。

作者简介: 董宏坡 (1978-), 男, 硕士, 主要从事海藻的分子遗传育种研究。

取坛紫菜的叶状体阴干后, -20°C 保存备用。

1.2 主要仪器

主要仪器有: ThermoSpectronic Unicam UV300 紫外分光光度计、V irsonic 475 型超声波破碎机、Beckman Avanti J 25 型冷冻离心机、DYY-11124D 小型双重垂直电泳槽、Bio Rad Bioagy LP 蛋白质纯化系统、LABCONCO freezone 18 升立式冻干机。

1.3 主要试剂

藻胆蛋白抽提液 E: 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲液 ($\text{pH} = 6.8$), 其中含 0.2 mol/L NaCl 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 巯基乙醇, 0.01% NaN_3 。

DEAE-Sephadex A-50 柱的下相洗脱液 A: 0.01 mol/L TrisHCl 缓冲液 $\text{pH} = 8.0$ (含 0.1 mol/L NaCl 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 巯基乙醇, 0.01% NaN_3)。

DEAE-Sephadex A-50 柱的上相洗脱液 B: 0.01 mol/L TrisHCl 缓冲液 $\text{pH} = 8.0$ (含 0.8 mol/L NaCl 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 巯基乙醇, 0.01% NaN_3)。

1.4 实验方法

(1) 藻胆蛋白的粗提 取阴干坛紫菜 6.25 g 用蒸馏水洗涤 3 次, 吹干, 在液氮下将其磨成粉末, 悬浮于抽提液 E 中, 4°C 过夜, 次日用超声波发生器超声破碎细胞 15 min (每 3 min 间歇 1 min) 用 $300\text{ }\mu\text{m}$ 筛网过滤, 滤液离心 (17000 g 4°C 30 min) 除去细胞碎屑, 获上清液, 将溶液体积定容到 250 mL , 得藻胆蛋白粗提液 S1。

(2) 藻胆蛋白的硫酸铵分级纯化 向粗提的坛紫菜藻胆蛋白 S1 中加入 25% 饱和度的硫酸铵, 得沉淀 C1 和上清液 S2 向 S2 中加入硫酸铵达 40% 饱和度, 得沉淀 C2 和上清液 S3 向 S3 中加入硫酸铵达 60% 饱和度, 得沉淀 C3 和上清液 S4 用抽提液

E 溶解 C2 加入硫酸铵达 30% 饱和度, 得沉淀 C4 和上清液 S5 向 S5 中加入硫酸铵达 35% 饱和度, 得沉淀 C5 和上清液 S6 向 S6 中加入硫酸铵达 40% 饱和度, 得沉淀 C6 和上清液 S7 向 S7 中加入硫酸铵达 60% 饱和度, 得沉淀 C7 和上清液 S8。每一步的上清液均调 pH 至 6.8 。

(3) DEAE-Sephadex A-50 柱层析 装柱体积为 $2.5 \times 22\text{ cm}$, 柱子装好后, 要用洗脱液 A 平衡 2~3 个柱体积。样品为沉淀 C5 先用洗脱液 A 透析过夜, 上柱前 17000 g 4°C 离心 30 min 用洗脱液 A 和洗脱液 B ($\text{pH} = 8.0$) 进行梯度洗脱, 流速为 30 mL/h , 先用洗脱液 A 洗脱 1 个柱体积, 以后每过一个柱体积 NaCl 浓度增加 0.07 mol/L , 分别收集不同的洗脱峰。

(4) SDS-PAGE 样品加入 $1 \times$ SDS 上样缓冲液 100°C 加热 5 min 短暂离心后即可加样, 分离胶 12% , 浓缩胶 5% 。室温下电泳。电泳结束后, 将凝胶放入染色液染色至少 4 h 以上。然后取出, 用脱色液脱色, 直至底色变白。

(5) 藻胆蛋白的光谱分析 在 ThermoSpectronic Unicam UV300 分光光度计上进行吸收光谱扫描, 所有样品的吸收光谱都是在室温下 TrisHCl ($\text{pH} = 8.0$) 缓冲液中进行测量的。

2 结果与分析

2.1 藻胆蛋白初始纯化组分的组成和纯度

藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白的纯度常用 A_{565}/A_{280} , A_{615}/A_{280} , A_{650}/A_{280} 的吸收比值来作为指标, 比值愈大, 表示该蛋白质纯度愈高^[4]。我们采用硫酸铵对藻胆蛋白粗提液 S1 进行分级分离实验, 并测定了每一步的 PE、PC、APC 的纯度 (见表 1)。从表中可看到以 5% 饱和度为间隔来分级, 对于

表 1 硫酸铵分级纯化过程中各步藻胆蛋白的纯度

Table 1 Purity of phycobiliproteins in purification process using solid $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

纯度 Purity	组分 Fractions							
	S1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
A_{565}/A_{280} (PE)	0.51	0.25	1.78	0.52	1.00	0.96	1.05	0.99
A_{615}/A_{280} (PC)	0.22	0.26	0.79	0.06	0.84	0.91	0.30	0.10
A_{650}/A_{280} (APC)	0.11	0.17	0.36	0.08	0.48	0.82	0.46	0.12

Notes PE—phycoerythrin; PC—phycocyanin; APC—a llophycocyanin.

$35\% \sim 40\%$ 之间的 C5 来说, 此组分 APC 纯度在几个组分中是最高的, 溶液颜色为深蓝色。可见在 C5 中, 虽然没有将 3 种藻胆蛋白分开, 但 APC 的组成比例大大提高了。

2.2 DEAE-Sephadex A-50 柱层析

2.2.1 洗脱液 pH 值和离子强度的选择

采用 pH 为 7.0 、 8.0 、 9.0 的 TrisHCl 缓冲液分别过柱, 研究发现在缓冲液 pH 为 8.0 时, 柱子上呈

现出清晰的红、蓝、淡蓝带, 此时获得的 APC 纯度最高, 达 3 50

对于离子强度, 一般缓冲液中盐浓度范围在 0~1 mol/L^[5]。我们先选择了这个范围进行预试验, 结果显示藻红蛋白在 0.31 mol/L NaCl 浓度下开始被洗脱下来; 藻蓝蛋白在 0.45 mol/L NaCl 处被洗脱; 别藻蓝蛋白在 0.52 mol/L 处被洗脱。可见采用 0.1~0.8 mol/L 的梯度洗脱是合适的。

2.2.2 上样量对 APC 回收率的影响

在装柱体积为 2.5×22 cm 和流速为 0.5 mL/min 的条件下, 进行了上样量对 APC 的回收率影响研究, 结果表明在上样量从 10.60 mg 增加到 33.52 mg 这一过程中, APC 的回收率基本保持恒定, 约在 70% 左右。当大于 33.52 mg 时, APC 的回收率下降 (见图 1)。这表明在 2.5×22 cm 柱体积时, 当上样量为 33.52 mg 树脂达到饱和, 超过这个值, 别藻蓝蛋白将随未吸附的样品一起流失, 从而导致回收率下降。

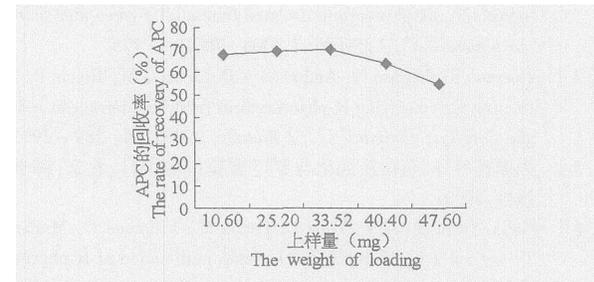


图 1 上样量对 APC 回收率的影响 (样品为 C5)
Fig. 1 Effect of loading on APC recovery

2.2.3 样品 C5 的 DEAE-Sephadex A-50 柱分离

对于样品 C5 的柱分离, UV 检测到 5 个间隔很明显的峰, 柱上有清晰的红、蓝、淡蓝 3 条带。我们收集了这 5 个峰, 分别为 CF1, CF2, CF3, CF4, CF5 (见图 2), 我们对每一个组分进行了鉴定。

组分 CF1、CF2 和 CF3 颜色为粉红色。从图 3

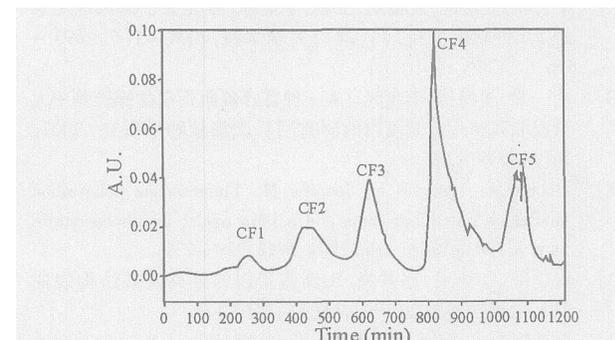


图 2 DEAE 柱分离样品 C5 的洗脱曲线
Fig. 2 Elution curve of the fractions collected from DEAE column using sample C5

可知, CF1、CF2 和 CF3 的吸收光谱在 498 nm 和 565 nm 有吸收峰, 在 545 nm 有吸收肩峰, 与报道的 R-PE 的吸收光谱相同^[6]。CF1 的吸收光谱已发生明显改变, 其 565 nm 的吸收峰向短波长偏移了 4~5 nm, 且 A_{565}/A_{498} , A_{565}/A_{545} 明显减少, 可见 CF1 中藻红蛋白六聚体已经解聚。

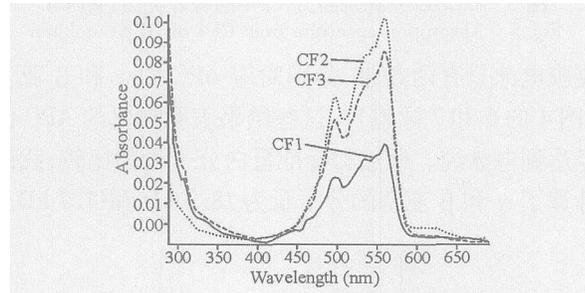


图 3 DEAE 柱洗脱组分 (RPE) 的吸收光谱
Fig. 3 Absorption spectrum of fractions from DEAE column

根据报道, R-PE 由 α 、 β 、 γ 3 个亚基组成, α 和 β 分子量在 20 kD 左右, γ 在 30 kD 左右^[4], 但组分 CF1 的 SDS-PAGE 电泳只见一条清晰的带, 在 55 kD 处 (见图 4 的泳道 2)。我们推测 55 kD 的带可能由 α 或 β 、 γ 和连接肽组成, 因为有报道认为 γ 亚基在藻红蛋白中是与 α 或 β 结合的, 这种结合很牢固, 能起到稳定 $(\alpha\beta)_6\gamma$ 六聚体的作用^[4]。CF2 和 CF3 除具有 55 kD 这条带, 它们在 20 kD 有一条很粗的带, 推测为 PE 的 α 和 β 亚基 (见图 4 的 3 和 4 泳道)。

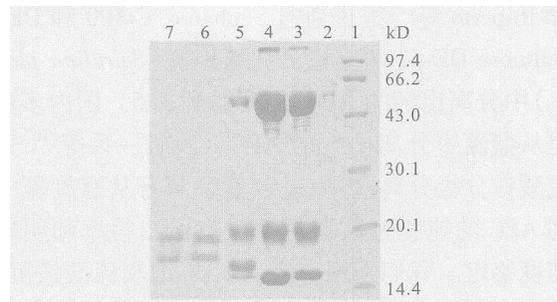


图 4 DEAE 柱洗脱组分 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig. 4 SDS-PAGE characterization of the fractions collected from DEAE column

对于组分 CF4 其颜色深蓝色, 吸收光谱在 555 nm 和 615 nm 处有最大吸收峰, 具有典型的 RPC 特征^[7] (见图 5)。从吸收光谱和电泳图 4 上看, 它的 APC 已完全去除 (光谱中无 650 nm 吸收和电泳中无 APC 的亚基带)。

组分 CF5 为淡蓝色, 其 $A_{650}/A_{280} = 3.5 > 3$, $A_{650}/A_{620} = 1.48 > 1.4$ 。它的吸收光谱在 650 nm 有最大吸收峰, 在 620 nm 有肩峰, 具有典型的 APC 三聚体的吸收光谱特征^[8] (见图 6)。SDS 聚丙烯酰胺

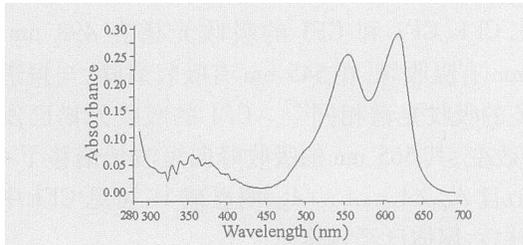


图 5 DEAE 柱洗脱组分 CF4 的吸收光谱 (RPC)

Fig 5 Absorption spectrum from CF4 of DEAE column

凝胶电泳只有两条带, 分别对应 APC 的 α 和 β 亚基 (图 4 的 6 和 7 泳道)。这些结果表明纯化的 APC 已经达到电泳纯。通过和标准蛋白分子量的比较, 我们计算了 α 和 β 亚基的分子量为 18.9 kD 和 17.7 kD。

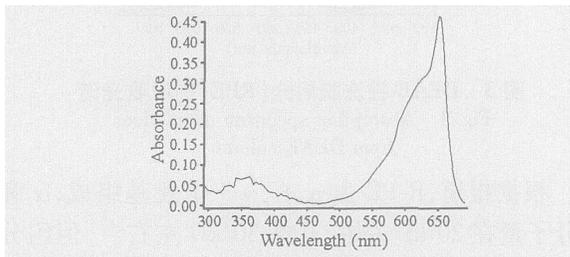


图 6 DEAE 柱洗脱组分 CF5 的吸收光谱 (APC)

Fig 6 Absorption spectrum from CF5 of DEAE column

3 讨论

红藻坛紫菜中别藻蓝蛋白的含量非常低, 只有 0.5~0.8 g/100 g^[9]。至今在国外只有从蓝藻中分离别藻蓝蛋白的报道, 且分离的工序复杂, 时间长。如 Ruperto 等^[2]报道通过 Sephadex G-100 和 DEAE-cellulose DE-52 两支柱子从螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 中分离出纯的 APC, 纯度达到 3.5。国内多数也是从蓝藻中分离出纯的 APC。如胡一兵等^[10]先用硫酸铵分级分离, 然后过羟基磷灰石从螺旋藻中得到 APC 的纯度为 3.7, 但他没有给出得率和明确的纯度鉴定。我们采用 30%~35% 饱和硫酸铵沉淀、DEAE-Sephadex A-50 作为层析介质, 所获得的 APC 的纯度和回收率分别达到 35.0% 和 70.2%。

根据吸收光谱的不同, 藻红蛋白可分为 R-藻红蛋白、B-藻红蛋白、C-藻红蛋白 (蓝藻中), 以后又发现了藻红蛋白 566 (隐藻中)^[11]。由藻红蛋白的吸收光谱知, 我们从红藻坛紫菜中分离出的为“双峰型”R-藻红蛋白, 其特征是在 498 nm 和 565 nm 处有吸收峰, 在 545 nm 处有吸收肩峰。

藻蓝蛋白可分为 C-藻蓝蛋白和 R-藻蓝蛋白。张建平等^[12]从多管藻中分离出 R-藻蓝蛋白三聚体在可见光范围有两个明显的吸收峰, 分别为 555 nm 和 615 nm。由吸收光谱可看出, 坛紫菜中藻蓝蛋白

为 R-PC 型, 且在 pH=8.0 时是以三聚体 ($\alpha\beta$)₃ 的形式存在的。

现已知别藻蓝蛋白有 APC-II、APC-I、APC-B、APC-LCM 4 种形式, 主要区别在于其多聚体是有 2 个或 2 个以上分子量不同的带色亚基组成及其是否带无色多肽^[13]。我们从坛紫菜中分离的 APC 其结构为 ($\alpha\beta$)₃, 不带无色多肽, 且凝胶电泳只有 α 和 β 两个亚基; 最大吸收峰在 650 nm, 吸收光谱中 $A_{650}/A_{620}=1.48$ 这与文献 [8] 报道的相同, 证明应为念珠藻 (*Nostoc* sp.) 的 APC-II。

参考文献:

- [1] Gantt E. Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue green algae [J]. *Int Rev Cytol* 1980, **66**: 45-80
- [2] Ruperto Bermejo Eva M, Takavera Jose M, Alvarez pez Juan C. Orte Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis* high performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits [J]. *J Chromatogr A* 1997, **778**: 441-450
- [3] Shin Ru Shik, Kun Nan Tsai Yi, Shuane Li, Chuang Chun Chuck, Err Cheng Chan. Inhibition of enterovirus 7F induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue green alga *Spirulina platensis* [J]. *J Med Virol* 2003, **70**: 119-125
- [4] Rossano R, Ungaro N, Ambrosio A D, Luzzi GM, Riccio P. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red alga *Corallina elongata* [J]. *J Biotech* 2003, **101**: 289-293
- [5] 朱厚础等译. 蛋白质纯化与鉴定实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] Gallant Imouli A V, Pons L, Lucon M, Villame G, Mabet N T, Gueant J L, Florence J. One step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *J Chromatogr B* 2000, **739**(1): 117-123.
- [7] Bermejo R R, Alvarez JM, Acién F G, Molina Grima E. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* [J]. *J Tech* 2002, **93**: 73-85
- [8] Trinquet E, Maurin F, Preadaut M, Mathis G. Allophycocyanin I as a Near infrared fluorescent tracer: Isolation, characterization, chemical modification, and use in a homogeneous fluorescence resonance energy transfer system [J]. *Analyti Biochem* 2001, **296**: 232-244.
- [9] 董宏坡, 左正宏, 王重刚, 王诚, 陈奕欣. 福建省平潭海区坛紫菜品质性状的分析 [J]. 厦门大学学报, 2004, **43**(5): 693-696
- [10] 胡一兵, 胡鸿钧, 李夜光. 从一种富含藻胆蛋白的螺旋藻中大量提取和纯化藻蓝蛋白的研究 [J]. 武汉植物学研究, 2002, **20**(4): 299-302
- [11] Robert M, Leslie E E, Jennifer M. Fluorescence polarization studies on four biliproteins and a bilin model for phycoerythrin 545 [J]. *Biophysica Acta* 1999, **1412**: 230-239.
- [12] 张建平, 张景民, 赵井泉. R-藻蓝蛋白的分离及其结构表征 [J]. 生物物理学报, 1997, **13**(2): 173-178
- [13] Axel Ducret, Shirley A, Muller Kenneth N, et al. Reconstitution, characterization and mass analysis of the pentacyclic allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. *J Mol Biol* 1998, **278**: 369-388.