

# 螺旋藻别藻蓝蛋白的纯化、理化特性与结晶\*

张少斌<sup>1</sup> 刘慧<sup>1</sup> 刘国琴<sup>2</sup> 商树田<sup>2</sup>

(沈阳农业大学生物科学技术学院 沈阳 110161)<sup>1</sup>

(中国农业大学生物生理学与生物化学国家重点实验室 北京 100094)<sup>2</sup>

**摘要:** 硫酸铵分级沉淀结合多种层析技术, 从螺旋藻 (SP-Dz) 中纯化到电泳纯别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC), 纯度 ( $A_{630}/A_{280}$ ) 达 4.83。APC 在 30 min 内的荧光扫描曲线为直线; 30 min 连续光照其相对荧光强度仍为原来的 98% 以上, 其抗荧光淬灭能力强于同样条件下的藻蓝蛋白 (PC) 及荧光素 TRITC。用悬滴气相扩散法培养获得了 APC 晶体。

**关键词:** 钝顶螺旋藻, 别藻蓝蛋白, 光谱, 晶体

**中图分类号:** Q94 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0031-04

## Purification, Physio-chemical Property and Crystallization of APC from *Spirulina*\*

ZHANG Shao-Bin<sup>1</sup> LIU Hui<sup>1</sup> LIU Guo-Qin<sup>2</sup> SHANG Shu-Tian<sup>2</sup>

(Biological Science and Technology College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)<sup>1</sup>

(State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094)<sup>2</sup>

**Abstract:** APC of electrophoresis-purity was obtained from *Spirulina* using ammonium sulfate grade precipitation followed with several gel chromatography, and the purity ( $A_{630}/A_{280}$ ) of which attained to 4.83. The fluorescence scan curve of APC was a direct line in 30 min; After exposed in light for 30 min, the relative fluorescence strength of APC preserved above 98 percent of that as begin. APC has a stronger anti-fluorescence quenching than PC or TRITC under the same condition. APC crystals were grown by hanging drop vapor diffusion method.

**Key words:** *Spirulina platensis*, Allophycocyanin, Spectrum, Crystal

别藻蓝蛋白是藻类藻胆体捕光色素复合蛋白之一, 在螺旋藻中达干重的 7% 以上。APC 主要含  $\alpha$  和  $\beta$  两种亚基, 天然 APC 以  $(\alpha\beta)_6$  的形式存在<sup>[1]</sup>。根据光谱特性差异, APC 可分为多种类型, 它们在藻胆体光能传递途径中处于不同位置, 在藻类光合作用中发挥着不同作用<sup>[2]</sup>。APC 突出的荧光特性使其在荧光显微检测, 临床诊断等方面应用广泛<sup>[3]</sup>。APC 还具有抗衰老、增强免疫力、抗肿瘤等重要生理活性, 在食品和保健品等领域用途广泛<sup>[4]</sup>。钝顶螺旋藻的一个直线型突变株 (SP-Dz) 具有生长快、藻胆蛋白含量高优点<sup>[5]</sup>。本研究以此为材料, 先用超声波法破碎藻体、硫酸铵分级沉淀和多种层析手段配合使用, 获得了电泳纯、能结晶的 APC, 并详细分析了其荧光稳定性, 为深入研究 APC 的结构与功能, 对开发利用螺旋藻都具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料与主要试剂

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 突变株 (SP-Dz) 为本实验室保存。DEAE Sepha-

\* 辽宁省教育厅项目 (No. 20040331)

沈阳农业大学青年教师基金 (No. 200401)

通讯作者 Tel: 13190048145, E-mail: zsb20022001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-12-12, 修回日期: 2006-02-23

rose Fast Flow (DEFF)、Sephacryl-300 (S-300) 购自 Pharmacia; 羟基磷灰石 (HAP) 购自 Merk; TRITC (四甲基异硫氰酸罗丹明) 标记的鬼笔环肽购自 Sigma 公司; 其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 螺旋藻培养与别藻蓝蛋白纯化

按彭为民等<sup>[5]</sup>的方法培养和收获螺旋藻。使用磷酸钠缓冲液 (5 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0, 含有 0.02 mmol/L PMSF, 0.1 mmol/L EDTA, 0.4 mmol/L NaN<sub>3</sub>, 2 mmol/L β-巯基乙醇) 悬浮藻体、超声破碎, 离心 (10,000 ×g, 30 min) 后的上清液进行 20% ~ 50% 饱和度硫酸铵分级沉淀, 沉淀复溶离心后的上清液上层析柱。在 FPLC 系统下, 依次上 S-300 (φ1.6 cm × 80 cm, 1.0 mL/min)、DEFF (φ1.6 cm × 10 cm, 1.0 mL/min, 0 ~ 0.5 mol/L NaCl)、HAP (φ1.6 cm × 5 cm, 0.5 mL/min, 5 ~ 200 mmol/L 磷酸钠) 和第 2 次 S-300 纯化 APC。

### 1.3 别藻蓝蛋白纯度测定与含量计算

以经验公式 APC (mg/mL) = [A<sub>650</sub>-0.208 (A<sub>620</sub>)] /5.09 计算 APC 含量, 以 A<sub>650</sub>/A<sub>280</sub> 的值表示 APC 的纯度<sup>[6]</sup>, A<sub>650</sub>和 A<sub>280</sub> 的值用 752 紫外可见分光光度计测定。

### 1.4 别藻蓝蛋白光谱分析与晶体培养

用 UV640 蛋白核酸分析仪扫描吸收光谱, F-4500 荧光分光光度计扫描荧光光谱, 荧光显微镜观察荧光淬灭。室温避光条件下, 用悬滴气相扩散法<sup>[1]</sup>培养 APC 晶体。

## 2 结果与讨论

### 2.1 别藻蓝蛋白的纯化

螺旋藻经超声波破碎、硫酸铵分级沉淀, 将蛋白沉淀溶解后上 S-300 层析柱, 用 1 mmol/L 磷酸缓冲液洗脱, 结果如图 1A 所示。取洗脱峰 2 的溶液上 DEFF 层析柱, 取蓝色洗脱峰溶液上 HAP 层析柱, 结果如图 1B 所示, 收集洗脱峰 2 的溶液进行电泳鉴定、纯度测定和光谱分析。传统 APC 的纯化主要利用 HAP 吸附层析法, 或利用葡聚糖凝胶过滤和 DEAE-纤维素柱层析法<sup>[3]</sup>。用 S-300 替代 G-200, 洗脱速度由 0.2 mL/min 提高到 1.0 mL/min, 缩短了纯化周期。用 DEFF 替代 DE-52, 使介质的再生简单易行, 适于连续大规模纯化。本技术路线把纯化周期从传统的几天缩短在一天, 降低了蛋白降解变性的可能, 提高了纯化效率, 为开发利用 APC 创造了良好条件。

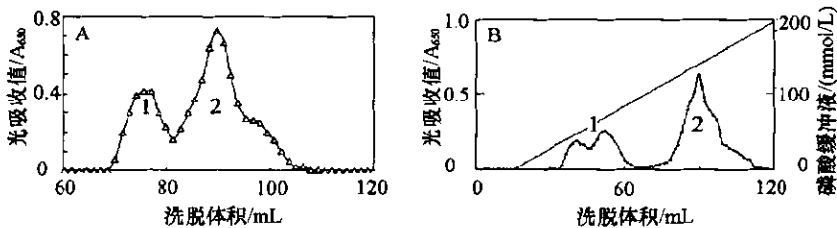


图1 藻胆蛋白的纯化

A 分子筛 (S-300) 柱层析, B 羟基磷灰石 (HAP) 柱层析

### 2.2 别藻蓝蛋白的纯度及产量测定

蛋白的纯度及产量见表 1。SP-Dz 粗蛋白提取液中 APC 含量高达干重的 9.8%, 随着纯化步骤的进行, 纯度逐渐提高, 最高纯度可达 8 以上。从 1 克鲜螺旋藻 (干重 0.2

克) 中可得到纯度值在 4.8 以上的 APC 1.8 mg, 这个纯度及产量远高于已有的报道<sup>[5]</sup>。

表 1 纯化过程中别藻蓝蛋白的纯度变化

| 纯化步骤                    | 纯度    | 产率 (%) (干重) |
|-------------------------|-------|-------------|
| 上清液                     | 0.46  | 9.80        |
| 硫酸铵分级沉淀 (20% ~ 50% 饱和度) | 0.52  | 7.80        |
| S-300 凝胶过滤              | 1.44  | 1.50        |
| 离子交换层析                  | 2.16  | 1.30        |
| 羟基磷灰石层析                 | 4.83  | 0.90        |
| 二次 S-300 凝胶过滤           | >8.00 | <0.04       |

### 2.3 别藻蓝蛋白的电泳分析及等电聚焦

蛋白电泳结果见图 2, 纯化的 APC 达到电泳纯。变性电泳 (图 2A) 显示, APC 亚基分子量 ( $\alpha$  及  $\beta$ ) 分别在 15 kD 和 17 kD; 活性电泳 (图 2B) 分析表明, APC 天然分子量在 220 kD 左右; 等电聚焦分析表明, APC 的等电点为 pH 4.9, 上述结果与已有报道相似<sup>[6]</sup>。

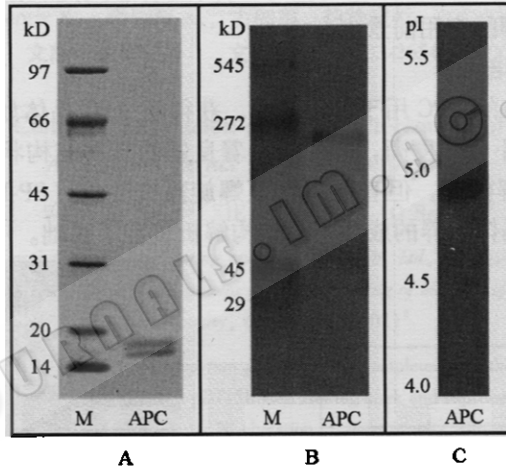


图 2 别藻蓝蛋白的电泳分析

A 变性电泳, B 活性电泳, C 等电聚焦

### 2.4 别藻蓝蛋白的吸收光谱和荧光光谱

由图 3 可见, APC 吸收光谱 (图 3, A) 范围很宽, 在 500 nm ~ 700 nm 都有很强的吸收, 最大吸收峰在 616 nm, 它与 PC 的区别在于它在 650 nm 还有一个特征吸收峰,

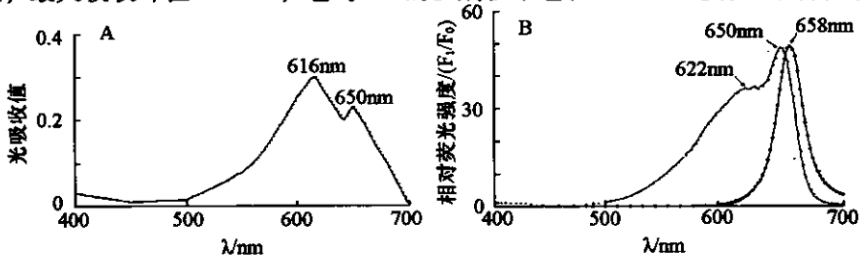


图 3 APC 吸收光谱和荧光光谱

A 吸收光谱, B 荧光光谱

— APC (EX), 激发光谱 (发射波长 658nm), —○— APC (EM), 发射光谱 (激发波长 622nm)

其较宽的吸收光谱范围有利于其在藻类光合作用中发挥作用。由图3B可见，荧光激发光谱的范围也很宽，在490 nm ~ 650 nm都能受到激发而产生荧光，最大激发波长在650 nm，此外在622 nm还有一个激发峰，最大荧光发射波长在658 nm，为红色荧光。激发与发射光谱之间的距离可以达到30 nm以上，这一特点有利于降低利用其荧光特性时的背景。

### 2.5 别藻蓝蛋白的荧光稳定性分析

在荧光分光光度计下，在30 min的扫描时间内，无论是绿光激发（曲线a）还是蓝光激发（曲线b），APC的荧光扫描曲线均为一条直线，相对荧光强度在扫描过程中变化很小，由此可见，纯化的APC具有很好的荧光稳定性（图4）。在荧光显微镜下的观察结果也证明了这一点。设定起始相对荧光强度为100%，在蓝光或绿光连续激发30 min后，APC的相对荧光强度变为原来的99%和98%，其抗荧光淬灭能力不仅远高于常用的荧光素TRITC（相对荧光强度变为原来的86%和66%），而且也高于PC（相对荧光强度变为原来的92%和81%）。上述特点使其不仅可以在荧光分光光度计下进行定量荧光分析，也可用于荧光显微镜下长时间的动态荧光观察。APC作为一种新兴的荧光分子将具有广阔的应用前景<sup>[7]</sup>。

### 2.6 别藻蓝蛋白晶体培养

收集纯度值大于8的APC用于晶体培养。获得的APC晶体如图5所示，这一结果充分说明纯化的APC不仅纯度高，而且保持着良好的天然结构状态。钝顶螺旋藻APC的晶体结构虽已得到解析<sup>[1]</sup>，但直线型钝顶螺旋藻突变株（SP-Dz）的APC结构是否发生变化还不清楚，晶体培养的成功为其结构解析奠定了基础。

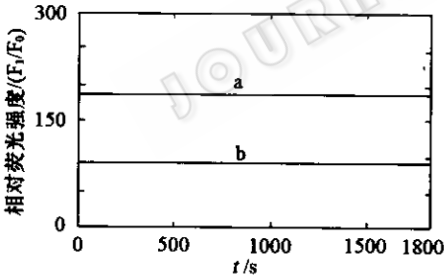


图4 别藻蓝蛋白荧光强度扫描曲线  
a 绿光连续照射, b 蓝光连续照射

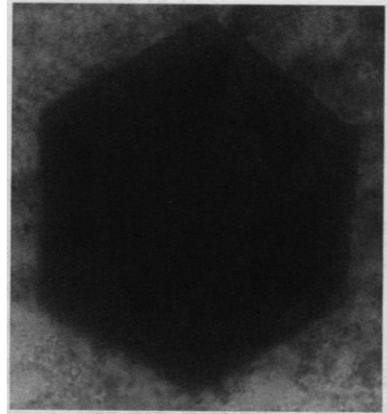


图5 别藻蓝蛋白晶体

### 参考文献

[1] Brejc K, Ficner R, Huber R, *et al.* J Mol Biol, 1995, 249: 424 ~ 440.  
 [2] 刘其芳, 王后乐, 张宪孔. 水生生物学报, 1988, 12 (2): 146 ~ 153.  
 [3] 胡鸿钧. 螺旋藻生物学及生物技术原理. 北京: 科学出版社, 2003. 81 ~ 97.  
 [4] 葛保胜, 任育红, 唐志红, 等. 微生物学通报, 2005, 32 (4): 37 ~ 41.  
 [5] 彭卫民, 商树田, 刘国琴, 等. 食品科学, 1999, 6: 48 ~ 49.  
 [6] 张成武, 曾昭琪, 张媛贞. 天然产物研究与开发, 1996, 8 (2): 29 ~ 34.  
 [7] 吴萍, 顾铭, 戚艺华, 等. 生命科学研究, 2001, 5 (2): 109 ~ 113.