

## 紫球藻藻红蛋白的分离纯化及光谱学特性

黄 键<sup>1</sup>, 王 娟<sup>1</sup>, 陈必键<sup>1,①</sup>, 王明兹<sup>1</sup>, 梁世中<sup>2</sup>

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350007; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 采用4℃反复浸提、离心、硫酸铵沉淀、DEAE-Sephrose Fast Flow 离子交换柱层析, 从紫球藻(*Porphyridium cruentum* Naegeli) 冻干粉中分离纯化藻红蛋白, 分离纯度达到4.85, 总收率51.9%; 经羟基磷灰石柱层析纯化, 藻红蛋白纯度达到5.10, 总收率34.0%, 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示1条带。所分离纯化的藻红蛋白含有3个亚基( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ), 在可见光区545 nm和560 nm处有2个吸收峰, 在498 nm处有1个吸收肩峰。实验结果说明所分离纯化的藻红蛋白纯度符合要求。

**关键词:** 紫球藻; 藻红蛋白; 分离纯化; 光谱学特性

中图分类号: TQ936.2; TQ937 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2006)02-0020-05

**Isolation and purification of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* and its spectrum characteristics** HUANG Jian<sup>1</sup>, WANG Juan<sup>1</sup>, CHEN Bi-lian<sup>1,①</sup>, WANG Ming-zi<sup>1</sup>, LIANG Shi-zhong<sup>2</sup> (1, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 2. College of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(2): 20-24

**Abstract:** The freeze dried powder of *Porphyridium cruentum* Naegeli was extracted with distilled water at 4℃, centrifuged, precipitated by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, chromatographed on a DEAE-Sephrose Fast Flow ion exchange column. As a result, the B-phycoerythrin was got with a purity of 4.85 and a yield of 51.9%, and with a purity of 5.10 and a yield of 34.0% when it was further purified by hydroxyl column chromatography. When the purified B-phycoerythrin was electrophoresed with polyacrylamide gel electrophoresis, only one band was observed. The purified B-phycoerythrin had three subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) and possessed two peaks at 545 nm and 560 nm, and a shoulder at 498 nm. The results showed that phycoerythrin from *P. cruentum* could be separated and purified quickly on the DEAE-Sephrose Fast Flow ion exchange column and hydroxyl column.

**Key words:** *Porphyridium cruentum* Naegeli; phycoerythrin; isolation and purification; spectrum characteristics

藻胆蛋白(Phycobiliprotein)是一种水溶性色素蛋白,存在于红藻、蓝藻、隐藻和某些甲藻体内,是这些藻类特有的光合系统捕光色素,在光合作用中起捕集光能和传递能量的作用。根据结构和光谱特性可将藻胆蛋白分为藻红蛋白(PE)、藻蓝蛋白(PC)和别构藻蓝蛋白(A-PC)。藻胆蛋白具有性质稳定,荧光量子产率高,背景干扰小,易于同生物素、抗体和糖蛋白等大分子交联等特点,既可以作为天然色素广泛应用于食品、化妆品、染料等工业,又可制成荧光试剂,用于临床医学诊断、免疫化学及生物工程等领域<sup>[1]</sup>,还可作为光动力治疗癌症<sup>[2,3]</sup>。

紫球藻(*Porphyridium cruentum* Naegeli)细胞内有1个大而呈星形的色素体,内含丰富的藻红蛋白及藻蓝蛋白,藻红蛋白占藻胆蛋白总量的84%,其

中以B-藻红蛋白含量最多。B-藻红蛋白相对分子质量为236 000 ± 18 000,含有38个藻胆红素,而且每240 000分子质量中至少有2个藻尿胆素非肽基基因;B-藻红蛋白由3个不同的亚基组成,其中 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基相对分子质量为17 500, $\gamma$ 亚基相对分子质量为30 200,这3个不同的亚基构成了1个( $\alpha\beta$ ) $\gamma$ 聚合体<sup>[4]</sup>。作者研究了紫球藻藻红蛋白的

收稿日期: 2005-09-19

基金项目: 福建省发展和改革委员会资助课题(闽计投资[2003]203)

作者简介: 黄 键(1965-),女,福建福州人,学士,副教授,从事天然产物生理功能研究。

① 通讯作者 E-mail: chenbil@fjnu.edu.cn

分离纯化方法,旨在建立简便、经济的藻红蛋白分离纯化技术。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

紫球藻引自中国科学院海洋研究所。紫球藻的培养参照文献[5]的方法进行,冻干粉获得参照文献[6]的方法进行。

### 1.2 方法

**1.2.1 藻红蛋白粗提液的制备** 5 g 紫球藻冻干粉加 50 mL 蒸馏水于冰箱中浸提过夜,6 000 r · min<sup>-1</sup> 高速冷冻(4℃)离心 20 min,取上清液;沉淀的藻泥按上述方法继续浸提,离心 2 次,合并 3 次浸提液即为藻红蛋白粗提液。于粗提液加入固体硫酸铵至饱和度分别为 20%、40%、60% 和 80%,静置过夜,高速冷冻离心 20 min,将沉淀溶于少量蒸馏水并装入透析袋中,于 4℃ 蒸馏水中透析 24 h,0.01 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸钠缓冲液(PBS)缓冲液(pH 7.0)平衡透析 24 h,高速冷冻离心 20 min,上清液即为藻红蛋白粗品。测定经硫酸铵分级沉淀的藻红蛋白样品纯度,以确定硫酸铵分级沉淀所采用的饱和度。

**1.2.2 藻红蛋白的分离纯化** 用 0.01 mol · L<sup>-1</sup> PBS(pH 7.0)平衡 DEAE - Sepharose FF 柱,将藻红蛋白粗品上样进行柱层析,用 0 ~ 0.5 mol · L<sup>-1</sup> NaCl 进行梯度洗脱,洗脱液总体积 400 mL,流速 1.5 mL · min<sup>-1</sup>,每管收集约 5 mL;于 280 和 545 nm 处测定各管的光吸收值;根据吸收峰和 OD<sub>545</sub>/OD<sub>280</sub> 比值,收集较纯的样品用羟基磷灰石柱进行层析,以离子强度为 0.01 ~ 0.1 mol · L<sup>-1</sup> PBS 作线形梯度洗脱,洗脱液总体积 550 mL,流速 0.5 mL · min<sup>-1</sup>,分步收集,于 280 和 545 nm 处测定各管的光吸收值。根据吸收峰和 OD<sub>545</sub>/OD<sub>280</sub> 比值,收集纯化的样品。

以藻红蛋白溶液在最大可见光吸收峰处的吸光值与蛋白质特征吸收峰的吸光值的比值(OD<sub>max</sub>/OD<sub>280</sub>)来表示藻红蛋白纯度。

**1.2.3 藻红蛋白的纯度鉴定** 用 PAGE 电泳法<sup>[7]</sup> 检测经 2 步柱层析后所收集的藻红蛋白的纯度,浓缩胶 4.5%,分离胶 7%,考马斯亮蓝 R - 250 染色。

**1.2.4 藻红蛋白的 SDS - PAGE 电泳** 用 SDS - PAGE 电泳法检测藻红蛋白的亚基组成及相对分子质量。浓缩胶 4.5%,分离胶 15%,考马斯亮蓝 R -

250 染色。

**1.2.5 藻红蛋白可见光光谱测定** 室温下用 752 型紫外光栅分光光度计于 380 ~ 800 nm 可见光区对纯化的藻红蛋白样品进行光谱扫描。

**1.2.6 藻红蛋白荧光光谱测定** 室温下用 Hitachi850 型荧光分光光度计测定纯化的藻红蛋白荧光激发光谱;在已知激发波长的情况下,测定其荧光发射光谱。

## 2 结果和分析

### 2.1 紫球藻藻红蛋白的分离纯化

紫球藻水溶性蛋白提取液经硫酸铵分级沉淀,以采用饱和度 60% 的硫酸铵沉淀所得样品的纯度最高(表 1)。从硫酸铵沉淀所得藻红蛋白粗品经 DEAE - Sepharose FF 柱层析、梯度洗脱得到的洗脱图谱(280 nm)可以看出,在整个层析过程中有 3 个吸收峰(图 1),第 1 个峰最大,为穿透峰,无色,是没有吸附上的杂蛋白;第 2 个峰较小,是用 0.125 mol · L<sup>-1</sup> NaCl 洗脱下来呈蓝紫色的杂蛋白;第 3 个峰是用 0.25 mol · L<sup>-1</sup> NaCl 洗脱下来的红色蛋白峰,即藻红蛋白。

表 1 硫酸铵饱和度对紫球藻藻红蛋白纯度的影响  
Table 1 Effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturation on purity of phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli

饱和度/%	Saturation	纯度 Purity(OD <sub>545</sub> /OD <sub>280</sub> )
0		0.52
20		0.90
40		0.96
60		1.82
80		1.45

经 DEAE - Sepharose 离子交换柱层析后获得的纯度较高的藻红蛋白样品再经羟基磷灰石柱层析,其洗脱图谱有 2 个峰(图 2),先出现的红色洗脱峰所代表的洗脱液即使在饱和度为 100% 的硫酸铵中仍未出现沉淀,因此推测该红色吸收峰为藻红蛋白脱落的色基成分和解离的氨基酸;随着磷酸缓冲液离子浓度的不断提高,出现 1 个明显的红色蛋白峰,该峰所代表的洗脱液即为藻红蛋白峰。

### 2.2 藻红蛋白纯度的 PAGE 电泳鉴定

将经 DEAE - Sepharose FF 离子交换柱 1 步层析及 DEAE - Sepharose FF 离子交换和羟基磷灰石柱 2 步层析分离纯化得到的紫球藻藻红蛋白进行

PAGE 电泳,结果见图3。纯化的藻红蛋白样品经 PAGE 电泳谱只呈现1条谱带,说明样品已达到电泳纯;只经过1步纯化的藻红蛋白谱带有一定的拖尾现象,而经2步纯化的样品则不存在拖尾现象,表明纯度更高。

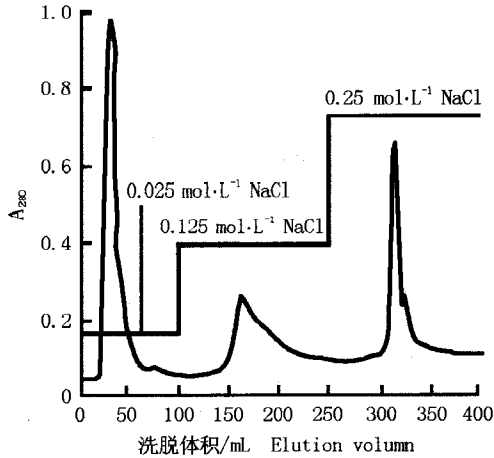


图1 紫球藻藻红蛋白的 DEAE-Sepharose FF 柱层析洗脱图谱  
Fig. 1 Elution profile of phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli by DEAE-Sepharose FF column chromatography

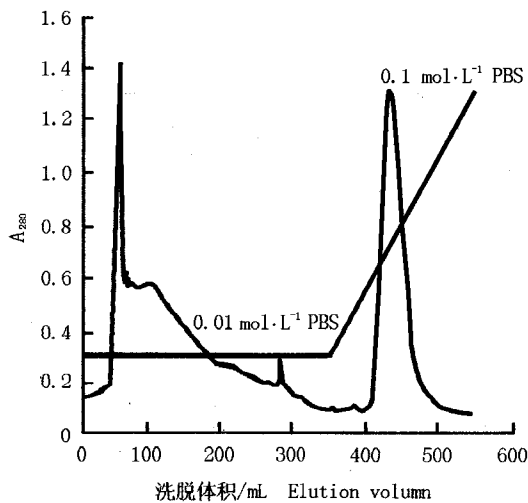


图2 紫球藻藻红蛋白的羟基磷灰石柱层析洗脱图谱  
Fig. 2 Elution profile of phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli by hydroxyl column chromatography

对经过2步层析后的藻红蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图4所示。经 SDS-PAGE 电泳,紫球藻藻红蛋白出现了3条主要的染色带,其中1条相对分子质量为30 000,第2条谱带的相对分子质量约为19 000~20 000,第3条谱带相对分子

质量约为15 000,这与文献所报道紫球藻藻红蛋白含有3个亚基( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )的结果相符。此外从图中还可看出,仅经过 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱层析的样品除了3条主要的条带外还有一些杂带,而经过2步纯化的样品则没有杂带,可见经过羟基磷灰石柱层析后样品纯度有所提高。

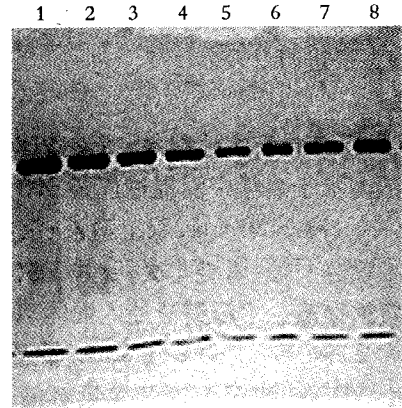


图3 紫球藻藻红蛋白的 PAGE 电泳图谱  
Fig. 3 Pattern of phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli by PAGE  
1,2,3,4:经 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱层析的藻红蛋白样品,点样量分别为20、15、10和5  $\mu$ L Phycoerythrin purified by DEAE-Sepharose FF column chromatography, the sample volume is 20, 15, 10 and 5  $\mu$ L; 5,6,7,8:经 DEAE-Sepharose FF 离子交换和羟基磷灰石柱层析的藻红蛋白样品,点样量分别为20、15、10和5  $\mu$ L Phycoerythrin purified by DEAE-Sepharose FF and hydroxyl column chromatography, the sample volume is 20, 15, 10 and 5  $\mu$ L.

图3 紫球藻藻红蛋白的 PAGE 电泳图谱  
Fig. 3 Pattern of phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli by PAGE

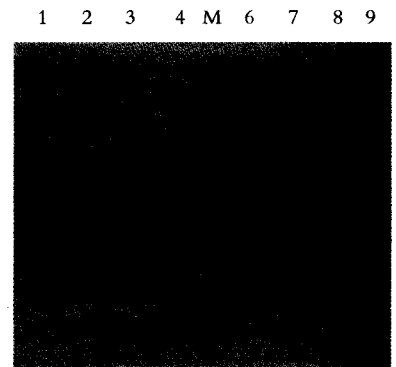


图4 紫球藻藻红蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱  
Fig. 4 Pattern of phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli by SDS-PAGE  
1,2,3,4:经 DEAE-Sepharose FF 离子交换和羟基磷灰石柱层析的藻红蛋白样品,点样量分别为20、15、10和5  $\mu$ L Phycoerythrin purified by DEAE-Sepharose FF and hydroxyl column chromatography, the sample volume is 20, 15, 10 and 5  $\mu$ L; 6,7,8,9:经 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱层析的藻红蛋白样品,点样量分别为20、15、10和5  $\mu$ L Phycoerythrin purified by DEAE-Sepharose FF column chromatography, the sample volume is 20, 15, 10 and 5  $\mu$ L.

图4 紫球藻藻红蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱  
Fig. 4 Pattern of phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli by SDS-PAGE

### 2.3 藻红蛋白可见光区光谱特性

对经 2 步纯化的紫球藻藻红蛋白在 380 ~ 800 nm 可见光区进行光谱扫描, 结果见图 5。

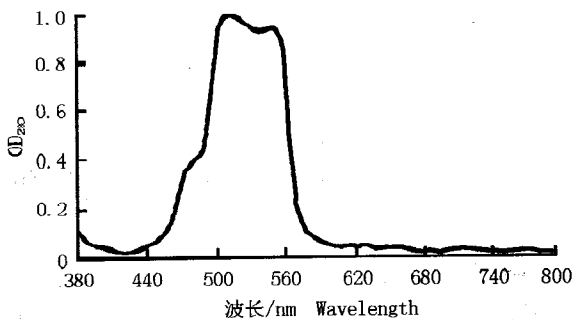


图 5 紫球藻藻红蛋白可见光吸收光谱  
Fig. 5 The visible light absorption spectrum of phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli

从图中可以看出, 经纯化的紫球藻藻红蛋白在 545 和 560 nm 处存在 2 个吸收峰, 在 498 nm 处还有 1 个肩峰, 而在 600 ~ 700 nm 范围内未见藻蓝蛋白 (615 nm) 和别藻蓝蛋白 (650 nm) 的特征吸收峰。这种吸收光谱特征和 B - 藻红蛋白相符<sup>[8]</sup>, 从而可证实所收集的纯化蛋白是 B - 藻红蛋白。

### 2.4 藻红蛋白的荧光光谱特性

对紫球藻藻红蛋白荧光激发状况进行分析, 结果表明, 紫球藻藻红蛋白存在 440, 470 和 490 nm 3 个荧光激发峰 (图 6); 荧光发射峰位于 578 nm 处 (图 7), 这一结果与温少红等的研究结果<sup>[9]</sup>一致。

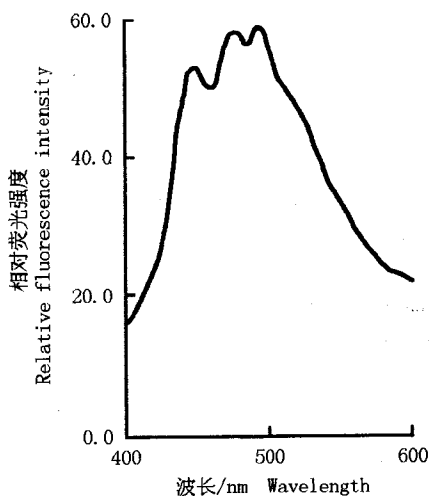


图 6 紫球藻 B - 藻红蛋白的荧光激发光谱  
Fig. 6 The fluorescence excitation spectrum of B-phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli

### 2.5 藻红蛋白分离纯化收率

紫球藻藻红蛋白经过粗提、饱和硫酸铵盐析、DEAE - Sepharose FF 离子交换层析和羟基磷灰石柱层析等步骤的纯化, 各步骤的得率如表 2 所示。

藻胆蛋白的纯度标准一般为  $OD_{545} / OD_{280} \geq 4.5$ <sup>[10]</sup>。本研究采用上述一系列步骤分离得到的紫球藻藻红蛋白纯度达到 4.85, 符合纯度标准的要求, 且总收率为 51.9%。

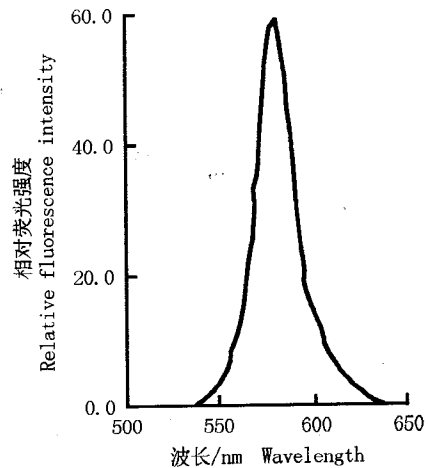


图 7 紫球藻 B - 藻红蛋白的荧光发射光谱  
Fig. 7 The fluorescence emission spectrum of B-phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli

表 2 紫球藻藻红蛋白分离纯化过程中各步骤的得率  
Table 2 The purify result of phycoerythrin from *Prophyridium cruentum* Naegeli

步骤 Step	纯度 Purity ( $OD_{545} / OD_{280}$ )	得率/% Yield
粗提液 Crude extraction liquor	0.52	100.0
20% $(NH_4)_2SO_4$	0.90	96.1
60% $(NH_4)_2SO_4$	1.82	90.8
DEAE-Sepharose FF	4.85	51.9
DEAE-Sepharose FF and hydroxyl column	5.10	34.0

## 3 讨 论

紫球藻藻胆蛋白的制备一般先采用反复冻融<sup>[9]</sup>或超声波处理<sup>[11,12]</sup>的方法破碎细胞, 经过离心或过滤, 即可获得藻胆蛋白的粗提液。近年开发了一种初步分离 B - 藻红蛋白的二相水溶液系统, 蛋白粗提物的纯度达到了  $2.9 \pm 0.2$ , 总产率达到了 77%<sup>[13]</sup>。本研究中紫球藻经反复冻融, 硫酸铵分级沉淀, 并将 20% 作为第 1 次硫酸铵沉淀的饱和度, 可较好地去除杂蛋白; 再用 60% 饱和度的硫酸铵进

行沉淀时,可将有颜色的蛋白沉淀下来,得到的藻红蛋白纯度相对较高。

在离子交换柱层析中,离子强度对蛋白质的选择性洗脱有直接的影响,分段洗脱比线性洗脱更加快捷、更易浓缩。用线形洗脱时藻红蛋白和前面的蓝紫色蛋白的洗脱峰有重叠,分离效果不理想。为了将主峰上的目的蛋白与杂蛋白分开,根据实验结果选用  $0.125$  和  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$  分段洗脱,经过离子交换柱层析可除去大部分无色的杂蛋白,蓝色蛋白及最后残留在柱上的紫色蛋白;而经过羟基磷灰石柱层析,可除去样品中脱落的色基和部分解离的氨基酸。

紫球藻藻红蛋白经过 DEAE - Sepharose FF 离子交换柱层析纯化,纯度 ( $\text{OD}_{545}/\text{OD}_{280}$ ) 达到 4.85, 所得到的藻红蛋白经 PAGE 电泳显示 1 条带,说明已达到电泳纯,总收率 51.9%, 而经过 2 步柱层析 (DEAE - Sepharose FF 离子交换柱层析和羟基磷灰石柱层析) 的样品纯度提高不明显,且经羟基磷灰石柱层析后得率降低,总收率 34.0%。采用 DEAE - Sepharose FF 离子交换柱层析具有纯化效果好、上样量大和样品得率较高等特点。有许多学者采用不同的纯化介质纯化紫球藻藻胆蛋白。通过 Toypearl DEAE - 650M 离子交换、羟基磷灰石和 Sephadex G - 200 凝胶分离得到紫球藻 B - 藻红蛋白,最终得到的 B - 藻红蛋白的纯度 ( $\text{OD}_{542}/\text{OD}_{500}$ ) 在 6.0 以上<sup>[14]</sup>; 采用超声波处理、DEAE - 纤维素 DE - 52 层析和 Sephadex G - 100 凝胶柱层析,藻红蛋白纯度 ( $\text{OD}_{545}/\text{OD}_{280}$ ) 达 3.5<sup>[11]</sup>; 将紫球藻经超声波处理、DEAE 膨化床层析和 DEAE - 纤维素填充床层析,所得到的藻红蛋白纯度 ( $\text{OD}_{545}/\text{OD}_{280}$ ) 为 4.6, 收率 66%<sup>[14]</sup>; 将藻胆蛋白粗提物经硫酸铵沉淀、透析、羟基磷灰石和 Sephadex G - 100 柱层析,分离纯化得到 B - 藻红蛋白纯度 ( $\text{OD}_{545}/\text{OD}_{280}$ ) 分别为 4.92 和 3.78, 聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳得到 1 条带<sup>[9]</sup>。与已报道的藻红蛋白分离纯化方法相比,本研究采用 DEAE - Sepharose FF 离子交换柱层析优于温少红等<sup>[9]</sup>和 Bermejo 等<sup>[11]</sup>报道的方法,虽然纯度略高于 Bermejo 等<sup>[15]</sup>报道的方法,但总收率则略低。

#### 参考文献:

- [1] 隋正红, 张学成. 藻红蛋白研究进展[J]. 海洋科学, 1998, 22(4): 24 - 27.
- [2] 李冠武, 王广策, 温博贵, 等. 藻红蛋白应用于肿瘤光动力治疗的研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2001, 8(4): 353 - 356.
- [3] 李冠武, 王广策, 温博贵, 等. 藻红蛋白介导的光敏反应可诱导人肝癌 7721 细胞凋亡[J]. 肿瘤防治杂志, 2002, 9(2): 144 - 146.
- [4] Glazer A N, Hixon C S. Subunit structure and chromophore composition of rhodophyten phycoerythrins *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin and b-phycoerythrin[J]. J Biol Chem, 1977, 252(1): 32 - 42.
- [5] Chen B L, Huang J, Liang S Z, et al. Culture of *Porphyridium cruentum* in photobioreactor and its effect on hypolipidemic[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(4): 432 - 436.
- [6] 刘丽平, 黄键, 陈必链, 等. 紫球藻对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的调节作用[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(4): 18 - 20.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [8] 曹茂林. 藻胆蛋白[J]. 植物生理学通讯, 1990(5): 72 - 78.
- [9] 温少红, 赵呈龙, 张莉萍. 紫球藻 B - 藻红蛋白的分离纯化[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(3): 33 - 35, 24.
- [10] 王重庆, 李云兰, 李德昌, 等. 高级生物化学教程[M]. 北京: 北京出版社, 1994. 42.
- [11] Ma S H, Wang G C, Sun H B, et al. Characterization of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum* [J]. Plant Sci, 2003, 164: 253 - 257.
- [12] Bermejo R, Talavera E M, Alvarez-Pez J M. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits [J]. J Chromatogr A, 2001, 917(1 - 2): 135 - 145.
- [13] Jorge B, Marco R P. Bioprocess intensification; a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* [J]. J Chromatogr B, 2004, 807: 33 - 38.
- [14] Stadnichuk I N, Karapetyan N V, Kislov L D, et al. Two  $\gamma$ -polypeptides of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* [J]. J Photochem Photobiology B, 1997, 39: 19 - 23.
- [15] Bermejo R, Acien F G, Ibanez M J, et al. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography [J]. J Chromatogr B, 2003, 790(1 - 2): 317 - 325.