

## 钝顶螺旋藻藻胆蛋白性质的研究

彭卫民<sup>①</sup> 商树田<sup>②</sup> 傅友兰 刘国琴

(中国农业大学生物学院)

**摘要** 采用羟基磷灰石柱层析法对钝顶螺旋藻藻胆蛋白粗提液进行纯化,得到藻蓝蛋白(PC)和别藻蓝蛋白(APC)纯化液。用紫外-可见分光光度计测得PC和APC的最大可见吸收峰分别在620 nm和650 nm处;用荧光分光光度计测得它们的室温荧光发射峰分别在645 nm和656 nm处。经12% SDS-PAGE法分析,PC由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚基组成,其分子量分别为16.3 kD和18.9 kD;APC也由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚基组成,其分子量分别为15.0 kD和16.9 kD。用高效液相色谱仪(HPLC)对PC和APC的氨基酸组成作了测定,发现二者的氨基酸组成比较相似。

**关键词** 钝顶螺旋藻;藻胆蛋白;藻蓝蛋白;别藻蓝蛋白

**分类号** Q176;O629.73

## Properties of Phycobili-Proteins from *Spirulina platensis*

Peng Weimin Shang Shutian Fu Youlan Liu Guoqin  
(College of Biology, CAU)

**Abstract** The purified phycocyanin(PC) and allophycocyanin(APC) were obtained from the phycobiliprotein crude extracts of *Spirulina platensis* by hydroxylapatite column chromatography analysis. The spectral characteristics of PC and APC were identified by ultraviolet-visible spectrophotometer and spectrofluorimeter. The maximum visible absorption peaks of PC and APC were at 620 nm and 650 nm respectively, and the maximum fluorescence emission peaks of PC and APC at room temperature were at 645 nm and 656 nm respectively. The subunits of phycobiliproteins could be separated by 12 % SDS-PAGE, which showed that PC consisted of two subunits:  $\alpha$  (16.3 kD) and  $\beta$  (18.9 kD), APC also consisted of two subunits:  $\alpha$  (15.0 kD) and  $\beta$  (16.9 kD). The amino acid compositions of PC and APC showed by HPLC were very similar.

**Key words** *Spirulina platensis*; phycobili-proteins; phycocyanin; allophycocyanin

螺旋藻(*Spirulina*)是蓝藻门(Cyanophyta)、蓝藻纲(Cyanophyceae)、段殖体目(Hormogonales)、颤藻科(Oscillatoriaceae)中的1个属。螺旋藻富含许多有营养价值、医疗价值和其他有价值的化学成分,其产品除可作为优良的纯天然食品和饲、饵料外,在医疗保健、精细化工和化妆品等诸多领域均有着广阔的应用前景<sup>[1,2]</sup>。藻胆蛋白(phycobiliproteins, PBP)是存在于某些藻类(主要是红藻、蓝藻)的藻胆体(phycobilisomes, PBS)中的一类色素复合蛋白,在藻细胞中主要起

收稿日期:1998-07-15

①彭卫民,现为清华大学生物系博士生,100084

②商树田,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

捕获光能和传递光能的作用。藻胆蛋白既是研究光合作用的极好材料,又可作为天然色素用于染料、化妆品和食品工业中。此外,它还可制成药品和荧光试剂用于医疗保健和医学临床诊断等领域<sup>[1,2]</sup>。螺旋藻中藻胆蛋白的含量非常丰富,可达细胞干重的20%以上,较其他蓝藻为高<sup>[1,3,4]</sup>。因此,对螺旋藻藻胆蛋白的研究十分有意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

所用藻种为钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)的1个优良藻株(品系)Sp.-D,为本实验室在生产研究上长期采用<sup>[5]</sup>。

### 1.2 方 法

**1.2.1 藻液培养** 将已纯化并扩大培养的藻种接种于容积为500 mL的三角瓶(事先经高压灭菌消毒,再加入Zarrouk培养液250 mL)中,接种浓度为 $A_{560}=0.2$ ,置于室内靠窗边光亮处培养,每天搅动3次,用光学显微镜及721型分光光度计监测其生长状况,待藻液 $A_{560}=0.8\sim 1.0$ 左右时即可采收。

**1.2.2 藻胆蛋白的粗提**<sup>[6~8]</sup> 用260目网膜过滤采收,采收时用自来水及蒸馏水分别冲洗2~3次,将藻泥装入烧杯中,加入适量 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$   $0.001\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缓冲液(pH7.0,含 $\beta$ -巯基乙醇 $0.001\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{NaN}_3$   $0.001\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{NaCl}$   $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;文中如无特别说明,所用缓冲液皆为 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液),用黑色塑料膜包扎杯口,置于冰箱冰冻室内,待其结冰后取出,再置于冰箱低温室约5℃内融解。如此反复冻融3次,镜检冻融效果。然后离心( $15\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,45 min,4℃),取上清液,即得藻胆蛋白粗提液。

**1.2.3 藻胆蛋白的纯化**<sup>[6~8]</sup> 取藻胆蛋白粗提液,缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (至50%饱和度)盐析,离心( $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,20 min,4℃),收集沉淀,溶于适量 $0.001\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缓冲液中,对沉淀溶解液透析(过夜,中间更换3~4次 $0.001\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缓冲液),再离心( $15\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,30 min,4℃),取上清液,用PEG浓缩,上羟基磷灰石(Hydroxylapatite, HA)柱,用 $0.001\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缓冲液平衡,在低温10℃、弱光下连续层析2次,用所配系列缓冲液作阶段梯度洗脱。经连续2次HA柱层析纯化之后,PC和APC的纯度可达3.5以上(用藻胆蛋白液在最大可见吸收峰波长的吸光值与蛋白质的特征吸光值之比( $A_{\lambda_{\max}}/A_{\lambda_{280}}$ )来表示其纯度<sup>[6]</sup>,即:PC纯度用 $A_{\lambda_{620}}/A_{\lambda_{280}}$ 表示,APC纯度用 $A_{\lambda_{650}}/A_{\lambda_{280}}$ 表示)。将藻胆蛋白纯化液暂存于冰箱(5℃)内备用。

**1.2.4 藻胆蛋白的光谱特性分析** 用岛津UV-240紫外可见分光光度计测定藻胆蛋白纯化液的最大可见吸收峰波长;用日立850型荧光分光光度计测定藻胆蛋白纯化液的最大荧光发射峰波长,所用激发波长为 $\lambda=580\text{ nm}$ ,狭缝宽度为10 nm,扫描密度为 $50\text{ nm}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

**1.2.5 藻胆蛋白的亚基组成分析** 在室温下进行12% SDS-PAGE(垂直板电泳),电压为60 V,时间约2.5~3 h,固定与染色2~3 h,脱色(过夜),直至看见清晰的蛋白条带为止。

**1.2.6 藻胆蛋白氨基酸组成分析** 用高效液相色谱仪测定。样品用100 mL HCl  $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 在110℃水解24 h。

## 2 结果与讨论

### 2.1 藻胆蛋白的光谱特性

经羟基磷灰石柱层析法分离、纯化所得 PC 和 APC 分别处于  $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中。光谱测定的结果表明,PC 的最大可见吸收峰位于 620 nm 处,APC 的最大可见吸收峰位于 650 nm 处;PC 的室温荧光发射峰位于 645 nm 处,APC 的室温荧光发射峰位于 656 nm 处。这与其他种(或品系)的螺旋藻藻胆蛋白的光谱特征很接近<sup>[3,4]</sup>。

### 2.2 藻胆蛋白的亚基组成分析

从电泳结果(图 1)看,PC 和 APC 皆由大小 2 亚基组成。以标准蛋白的相对迁移率( $x$ )及其对应的分子量的对数( $y$ )为参数进行回归分析,所得回归方程为: $y = -1.0228x + 5.1255$  ( $R_2 = 0.9889$ )。经计算,螺旋藻(*Sp. -D*)PC 的  $\alpha$  亚基(小亚基)分子量约为 16.3 kD,  $\beta$  亚基(大亚基)分子量约为 18.9 kD; APC 的  $\alpha$  亚基分子量约为 15.0 kD,  $\beta$  亚基分子量约为 16.9 kD。因此,PC 的最小分子量约为 35.2 kD, APC 的最小分子量约为 31.9 kD。*Sp. -D* PC 和 APC 各亚基的大小与其他种(品系)略有差异<sup>[3,4]</sup>。

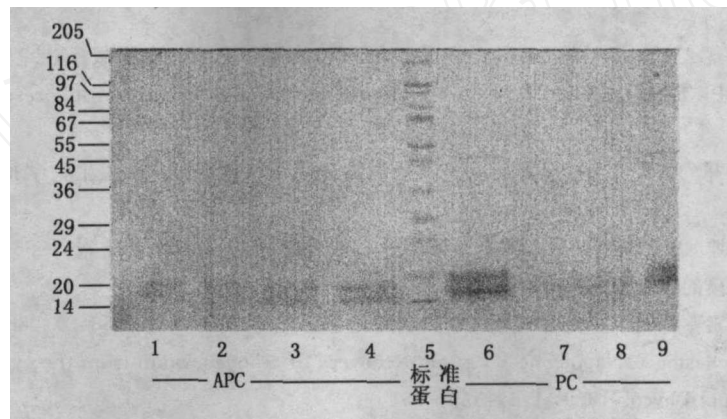


图 1 *Sp. -D* 的 PC 和 APC 的 12% SDS-PAGE 图谱\*

### 2.3 藻胆蛋白的氨基酸组成

用高效液相色谱(HPLC)法分析 *Sp. -D* 藻胆蛋白提取液的氨基酸组成(表 1)。可见,PC 和 APC 的氨基酸组成比较相似,皆以苯丙氨酸的含量为最高;其次,天冬氨酸,谷氨酸和酪氨酸含量也较高,而脯氨酸含量均很低,组氨酸含量更低,均未检测出。由于 PC 和 APC 的酸性氨基酸含量明显高于碱性氨基酸的含量,因此 PC 和 APC 皆为酸性蛋白;又由于 PC 中酸性氨基酸(Asp 和 Glu)与碱性氨基酸(Arg, Lys, His)含量之比为 2.14,比 APC 的 1.92 稍高,因此,可以推测 PC 的等电点较 APC 稍低,这与文献报道螺旋藻 PC 和 APC 的等电点分别为 4.4 和 4.6 的结果相符<sup>[3]</sup>。此外,*Sp. -D* 与其他种或品系的藻胆蛋白氨基酸组成也基本一致<sup>[3,4]</sup>。本实验受样品纯度所限,尚无法计算出 PC 和 APC 分子的氨基酸残基数。

表 1 *Sp.-D* 的 PC 及 APC 的氨基酸组成 $\rho_{AA}/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 

氨基酸	PC	APC	氨基酸	PC	APC	氨基酸	PC	APC
Asp	0.23	0.25	Ala	0.19	0.16	Leu	0.16	0.18
Ser	0.14	0.13	Tyr	0.19	0.28	His	0.00	0.00
Glu	0.24	0.25	Pro	0.07	0.07	Lys	0.09	0.11
Thr	0.11	0.11	Val	0.11	0.12	Met	—	—
Gly	0.11	0.12	Phe	1.64	1.37	Cys	—	—
Arg	0.13	0.15	Ile	0.09	0.11	Trp	—	—

需要指出的是,由于本实验是采用酸处理法处理样品,色氨酸被全部破坏,故不能检出。甲硫氨酸和半胱氨酸也受盐酸水解法的局限未能测定。酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸在盐酸水解中均被部分破坏,因此,实际值应比测定结果要高些。另外,天冬酰胺和谷氨酰胺在酸水解处理后分别转变为天冬氨酸和谷氨酸。

## 参 考 文 献

- 1 李定梅. 螺旋藻——全球人类最理想的食物. 第2版. 北京: 警官教育出版社, 1997, 152
- 2 Glazer A N. Phycobiliproteins——a family of valuable, widely used fluorophores. *J Appl Phycol*, 1994 (6): 105~115
- 3 刘其芳, 王后乐, 张宪孔. 盐泽螺旋藻藻胆蛋白的分离和特性研究. *水生生物学报*, 1988, 12(2): 146~153
- 4 李建宏, 邵子厚, 曾昭琪等. 极大螺旋藻藻蓝蛋白性质的研究. *南京大学学报*, 1996, 32(1): 59~63
- 5 商树田. 螺旋藻的优良单株. *植物杂志*, 1995: 20
- 6 陈世辉. 藻蓝素萃取及其稳定性试验. *中国农业化学会志(台湾)*, 1995, 33(2): 288~295
- 7 Herrera A, Boussiba S, Napoleone V, et al. Recovery of c-phycoerythrin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *J Appl Phycol*, 1989, 1(4): 325~331
- 8 Siegelman H W, Kycia J H. Algal biliproteins: handbook of phycolological method. In: Johan A H ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1978, 71~79