

- 1991, 29 (2): 251~ 260
- 4 Masiakowski P, Liu H X, Radziejensshi C, *et al.* Recombinant human and rat CNTF. *J Neurochem*, 1991, 57 (3): 1003~ 1012
- 5 威海青, 范明, 甘思德, 等 (Xian H Q, Fan M, Gan S D, *et al.*). 人睫状神经生长因子的原核表达纯化及其生物效应. *中国应用生理学杂志 (Chinese J Appl Physiol)*, 1996, 12 (1): 21~ 24
- 6 Daniel M B, Stuart J E. *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss Press, 1991. 50~ 160
- 7 Marston F A O, Freedman F B. Recovery and reaction of recombinant proteins. *Biochem Soc Trans*, 1988, 16 (1): 101~ 103
- 8 Marston F A O, Angal S, Lowe P A, *et al.* Scale-up of the recovery and reaction of recombinant proteins. *Biochem Soc Trans*, 1988, 16 (1): 112~ 115
- 9 Doonan S, Walter J M. Downstream processing of protein products. *Biochem Soc Trans*, 1990, 18 (1): 231~ 234

### Study of Renaturation of Recombinant Human Ciliary Neurotrophic Factor Expressed in *E. coli*.

XIAN Hai-Qing, FAN Ming, WU Yan (*Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*); QIU Zong-Yin (*Medical University of Chongqing, Chongqing 400046, China*).

**Abstract** Renaturation of human ciliary neurotrophic factor expressed in recombinant bacteria, by gel filtration chromatograph, was studied. It was showed that the renaturation rate by this way was higher than that by dilution and dialysis, and the protein was purified at the same time. It was a simple, rapid, good reproducibility and efficient procedure which can be used to produce ciliary neurotrophic factor in large scale.

**Key words** recombinant ciliary neurotrophic factor, renaturation, inclusion body

## 高纯度藻蓝蛋白分离纯化及光谱特性研究\*

王勇 钱凯先

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

董强<sup>1)</sup>

(山东省医学科学院, 济南 250062)

**摘要** 藻蓝蛋白 (PC) 具有特征性吸收光谱和荧光光谱, 是一种新颖的荧光分子探针. 为了获取高纯度 PC, 经过反复探索研究建立了 Sephadex G-200、DEAE-Sephadex A-25、HA、Sephadex G-200 的分离纯化程序. 此法效果理想: PAGE 显示为单条电泳带; 纯度值 ( $A_{615}/A_{280}$ ) 高达 14, 突破了国内外报告的最高值.

**关键词** 藻蓝蛋白, 螺旋藻, 柱色谱层析, 荧光光谱

**学科分类号** Q2251

螺旋藻细胞蛋白质含量高达干重的 50%~70%, 其中藻蓝蛋白占总蛋白质的 7% 左右. 这是一类稀有的光合色素蛋白, 仅存于蓝藻和红藻中, 藻蓝素是一种分子质量约 0.6 ku 的开链四吡咯化合物, 其分子上的乙叉基与多肽链上的脱氨酸以硫醚键共价连接构成藻蓝蛋白. 因此, 藻蓝蛋白的分离纯化是按蛋白质的柱色谱层析进行设计的. PC 通常为六聚体 ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub>, 与之相近的别藻蓝蛋白为三聚体 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>, 在分离纯化中必须去除别藻蓝蛋白, 同时保持 PC 的荧光活性, 这是提高 PC 纯度的关键. 藻蓝蛋白可作为荧光分子探针<sup>[1]</sup>, 并且有抗肿瘤活性, 提高免疫机能等功能, 受到国内外的重视.

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

盐泽螺旋藻变种 (*Spirulina subsalsa* var) 由浙江大学生物科学与技术系细胞研究室培养和保存.

#### 1.2 主要试剂

Sephadex G-200 (Pharmacia Co.)、DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Co.)、HA (上海华美公司)、L-巯基乙醇 (Fluka Co.)、聚乙二醇、丙烯酰胺、甲叉丙酰胺 (Bio-Red Co.)、Phycocyanin (Sigma Co.)、标准蛋白 ( $M = 17.5, 94$  ku, 上海

\* 浙江省自然科学基金资助项目 (396079).

<sup>1)</sup> 董强与王勇并立为第一作者.

收稿日期: 1998-08-10, 修回日期: 1999-01-07

东风生化试剂厂) 等。

### 1.3 主要仪器

LRH-250-G 自动光照培养箱、超声波细胞破碎器 (B-30 型, Branson ultrosomics Co.)、紫外-可见扫描式分光光度仪 (DU-50 型 Bechman Co.)、紫外-可见分光光度计 (7520 型、上海第二分析仪器厂)、荧光分光光度仪 (850 型、Hitachi Co.)、高速冷冻离心机 (20RP-52D 型、Hitachi Co.)、标准层析柱 (华美公司)、自动部分收集器 (BSZ-160 型、上海沪西仪器厂)、恒流泵 (HL-2 型、上海新波无线电厂) 等。

### 1.4 螺旋藻的培养

培养基成分:  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、微量元素等。

培养条件: 将藻体装入三角瓶置于自动光照培养箱中, 3 000 Lux、28~30 °C 条件下, 培养 7 d, 每升培养液可获取 10~20 g 湿重藻细胞。

### 1.5 藻蓝蛋白的粗提和盐析

**1.5.1 粗提:** 20 g 螺旋藻 (湿重) 用蒸馏水洗涤两次后, 悬浮于 0.001 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 中, 置 4 °C 过夜, 反复冻融, 然后用超声波发生器冰浴中超声破碎细胞 9 min (每 3 分钟间歇 1 min), 以 10 000 r/min 4 °C 离心 1 h, 去细胞碎片获上清液。

**1.5.2 盐析:** 在上清液中加 30%~60% 饱和度硫酸铵, 4 °C 静置盐析 24 h, 15 000 r/min 4 °C 离心 30 min, 收集蓝色蛋白沉淀, 溶解于少量 PBS 中, 置入透析膜 (截留分子量 12 ku), 在 0.01 mol/L PBS (pH 7.0) 中搅拌透析。截留液以 15 000 r/min 离心 10 min, 获上清液, 即上柱样品。

### 1.6 柱色谱层析分离

**1.6.1 Sephadex G-200 柱层析:** Sephadex G-200 充分溶胀抽气后装柱, 柱型为: 2.6 cm × 60 cm, 流速 15 ml/h, 核酸蛋白仪灵敏度为 0.5 A, 记录仪走纸速度 3 cm/h, 管速 3 管/h, 根据洗脱峰和  $A_{615}/A_{280}$  比值, 收集较浓的 PC 管部分。

**1.6.2 DEAE-SephadexA-25 柱层析:** 经上述分离得到的蛋白质液反透析浓缩后, 再对 0.005 mol/L PBS (pH 7.0) 透析, 离心去沉淀。柱型 1.6 cm × 20 cm、流速 15 ml/h, 检测灵敏度 0.2 A, 记录仪走纸 3 cm/h, 管速 3 管/h。洗脱液: 用 0.005 mol/L (pH 7.0) PBS (含 0.2 mol/L NaCl)

至 0.005 mol/L (pH 7.0) PBS (含 0.8 mol/L NaCl) 梯度洗脱。

**1.6.3 HA 柱层分析:** 将上述收集得到的 PC 液, 透析并适当浓缩, 上柱, 使 1/3 柱床着色。柱型: 1.6 cm × 20 cm、流速 10 ml/h, 检测灵敏度 0.2 A, 走纸 3 cm/h, 管速 6 管/h, 梯度洗脱, 上相为 0.1 mol/L (pH 7.0) PBS, 下相为 0.01 mol/L PBS, 均含 0.2 mol/L NaCl, 收集深蓝色的 PC 组分。

**1.6.4 Sephadex G-200:** 上述纯化的 PC 浓缩液, 离心去沉淀, 再经过一次 Sephadex G-200 分子筛。洗脱液为: 0.01 mol/L PBS (0.2 mol/L NaCl), 流速 15 ml/h。检测灵敏度为 0.1 A, 走纸 3 cm/h, 管速 6 管/h, 收集单一洗脱峰部分。

### 1.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

聚丙烯酰胺浓度分离胶为 7.5%, 浓缩胶为 3.75%。加速剂分离胶用过硫酸铵, 浓缩胶用核黄素。起始 100 V 电泳, 样品进入分离胶后 200 V 电泳 3~4 h, 溴酚蓝前沿走出胶后 0.5 h 内停止电泳, 剥胶, 水: 二甲醇: 冰醋酸 (5: 5: 2) 为溶剂的 0.1% 的考马斯亮蓝 R-250 染液固定染色 4~10 h, 30% 甲醇的 10% 醋酸脱色, 保存于 7% 醋酸中。

## 2 主要结果

### 2.1 分级分离结果分析

**2.1.1 Sephadex G-200 柱层析:** 上样后, 样品在柱面呈一窄的深蓝色区带, 洗脱过程, 可观察到一较宽的淡黄色区带首先被洗脱下来, 随后是较窄的深蓝色的 PC 区带, 最后还有一个无色的蛋白质峰 (图 1)。

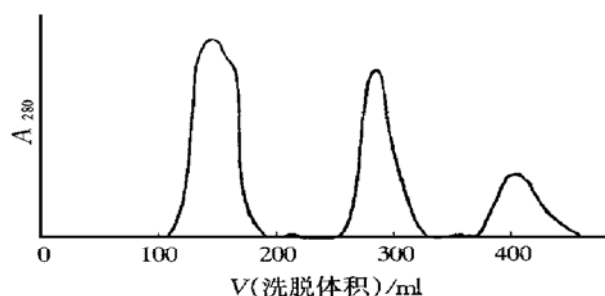


图 1 PC 的 SephadexG-200 层析图谱

此步骤黄色的大分子很快被洗脱, 有利于其后的离子交换和 HA 吸附层析。

**2.1.2 DEAE-SephadexA-25:** 上样后深蓝色区带被压缩吸附在柱层顶端, 随洗脱梯度增加依次有三个蛋白质峰出现。首先是一无色的低而宽的蛋白质

峰, 然后是深蓝色的 PC 峰出现, 最后是淡蓝绿色的小峰 (图 2).

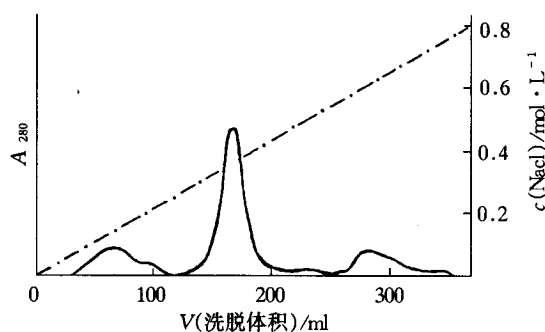


图 2 PC 的 DEAE-SephadexG-25 层析图谱

在洗脱过程中应不时调整吸去柱床顶的洗脱液以维持梯度的正确线性增长. 这是因为离子交换密度很高, 造成随洗脱浓度离子强度的提高, 床体体积缩小.

2.1.3 HA 柱层析: 随洗脱液磷酸盐离子强度的提高, 只有一个明显的峰被洗脱下来, 呈深蓝色 (图 3).

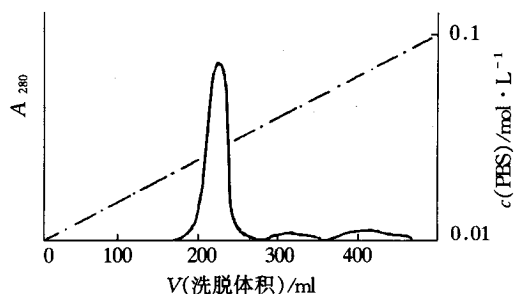


图 3 PC 的 HA 的层析图谱

2.1.4 SephadexG-200 分子筛: 从上面洗脱峰所获样品再次经 SephadexG-200 层析只有一个对称的窄而高的蛋白质峰, 即 PC 峰, 进一步去除了少量残留的杂蛋白 (图 4).

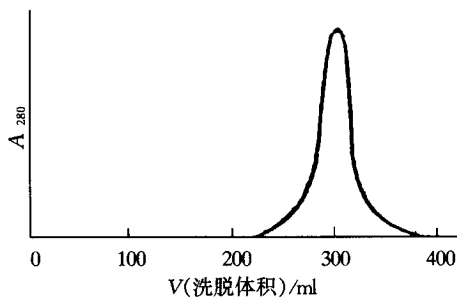


图 4 SephadexG-200 分子筛图谱

经过以上分离纯化程序最终获得  $A_{615}/A_{280} \approx 14$  的 PC, 证明其分辨力达到电泳单一区带的水平.

## 2.2 PC 纯度分析

测定各级分离提纯程序, 并总结如表 1.

表 1 PC 的各级纯化结果

分离程序	$A_{615}/A_{280}$
粗提	0.90
$(NH_4)_2SO_4$ 盐析	1.20
SephadexA-200 层析	4.60
DEAE-SephadexG-25	5.80
HA	7.80
SephadexG-200 分子筛	14.47

由表 1 可见纯度逐级提高, 最后纯度为 14.47, 超过国内外报道的最高值 10. 层析后的 PC 经过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 各重复组均显示单一的蓝色条带, 这种蓝色是 PC 特有的表征, 染色脱色后未发现其他杂蛋白色带存在 (图 5).

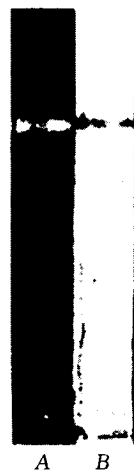


图 5 PC 的 PAGE 图  
A: 标样; B: 样品.

## 2.3 PC 吸收光谱

### 2.3.1 分离纯化后 PC 的紫外-可见光谱:

从图 6 中可以看出, PC 在 615 nm 有最大光吸收.

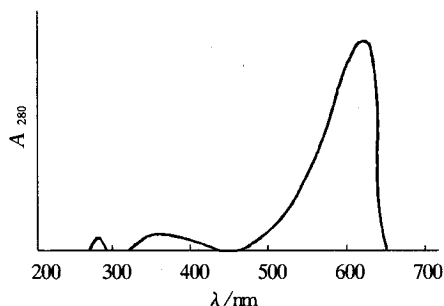


图 6 纯化后 PC 的紫外-可见吸收光谱 (pH 7.0)

2.3.2 pH 对 PC 的紫外-可见光谱影响: 对 PC 分别在 pH 3.0、pH 7.0、pH 13 时测定紫外-可见吸收光谱, 可见 pH 变小, PC 的可见光最大吸收峰蓝移, pH 变大, 则红移 (图 7)。

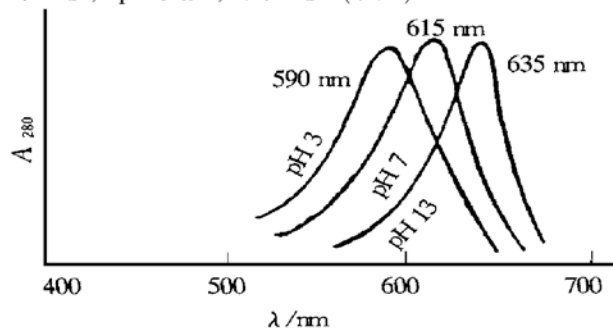


图 7 pH 对 PC 的可见光谱影响

### 2.4 PC 的荧光光谱

PC 在中性条件下荧光激发峰有两个: 分别位于 590 nm 和 635 nm (图 8), 荧光发射峰仅一个位于 650 nm (图 9), 且两个激发波长 590 nm 和 635 nm 分别激发时, 最大荧光峰不变, 均为 650 nm。

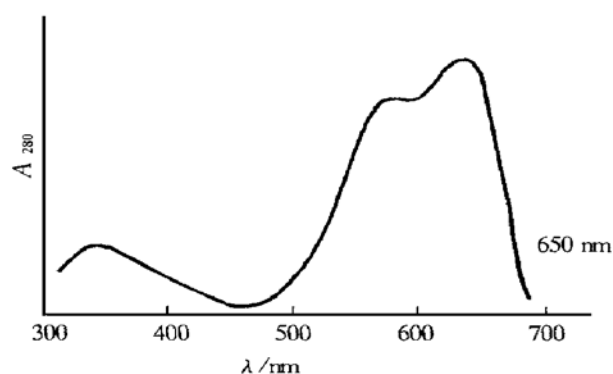


图 8 PC 的荧光激发光谱

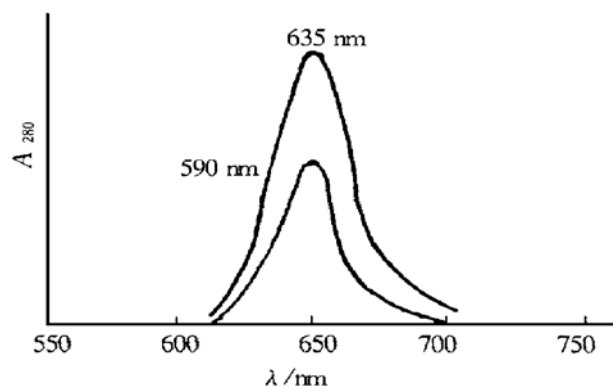


图 9 PC 的荧光发射光谱

## 3 讨 论

3.1 PC 的提取方法很多, 有溶菌酶法、低渗浸泡

法、冻融法。实验证明采用超声波与反复冻融相结合的方法, 快速并且效果好。

3.2 PC 的层析纯化, 传统的是 HA 柱层析反复纯化, 但层析过程中总留有一部分比重大的黄色液体, 堵塞柱床, 使洗脱不均匀, 带不平整等。先经过 Sephadex-G-200 分离后, 黄色大分子很快洗脱下来, 利于其后的 DEAE-Sephadex-A-25 离子交换和 HA 吸附层析。

3.3 经过 Sephadex-G-200、DEAE-Sephadex-A-25、HA、Sephadex-G-200 的纯化程序可获取高纯度的 PC, 其纯度值 ( $A_{615}/A_{280}$ ) 为 14, SDS-PAGE 呈一条带, 所以可认为本品纯度超过国内外报道的最高值<sup>[2-4]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 Vernon T O I, Glazer A N. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J Cell Biol*, 1982, **93** (3): 981~ 986
- 2 Lin H M. Comparison of *Spirulina subsalsa* with other *Spirulina* species. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, **15** (1): 27~ 34
- 3 Glazer A N. Comparative biochemistry of photosynthetic light-harvesting systems. *Ann Rev Biochem*, 1983, **52**: 125~ 157
- 4 Liu Q F, Wang H, Zhang X K. Purification and properties of phycobiliprotein of *Spirulina subsalsa* var. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1988, **12** (2) 146~ 153

**The Study for Isolation and Purification of Phycocyanin with High Purity and Its Spectra Characteristics.** WANG Yong, QIAN Kai Xian (*Department of Biological Science and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*); DONG Qiang (*Institute of Medical Science, Jinan 250062, China*).

**Abstract** The phycocyanin (PC) is a kind of fluorescence molecular probe because it has characteristic absorption spectra and fluorescence spectra. To get highly purified phycocyanin, the successive procedure of column chromatography was set up with Sephadex-G-200、DEAE-Sephadex-G-25、HA、and Sephadex-G-200. The results showed that the purity standard (ratio of  $A_{615}/A_{280}$ ) reaches to 14 at pH 7.0, and it has been demonstrated by PAGE as a single band.

**Key words** phycocyanin, *spirulina subsalsa* var, column chromatography, fluorescence spectra