

# 用高碘酸钠氧化法制备多管藻 R-藻红蛋白和钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的共价交联物

马圣媛 王广策\* 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

**摘要** 从海洋红藻多管藻 (*Polysiphonia urceolata*) 和蓝藻钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 中分别纯化了 R-藻红蛋白和 C-藻蓝蛋白, 然后用高碘酸钠氧化法将二者共价连接。交联反应液经 Sephadex G-200 凝胶过滤纯化共价交联物。光谱分析表明, 共价交联体内部存在着从 R-藻红蛋白到 C-藻蓝蛋白的能量传递。

**关键词** 多管藻 (*Polysiphonia urceolata*), R-藻红蛋白, 钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*), C-藻蓝蛋白, 高碘酸钠氧化交联法, 共价交联物, 光谱分析

**中图分类号** Q51 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)08-0052-04

藻胆蛋白是一类具有强烈荧光的水溶性的捕光色素蛋白, 目前已知的藻胆蛋白主要分布在蓝藻、红藻、隐藻和少量甲藻中, 主要分为 4 类: 藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白。藻胆蛋白是一类寡聚体蛋白, 基本构建单位是  $\alpha$  和  $\beta$  亚基, 在藻红蛋白中还存在着  $\gamma$  亚基<sup>[1]</sup>。每种亚基是由脱辅基蛋白和开链的四吡咯色素通过硫醚键共价交联, 目前已鉴定的色素也有 4 种: 藻红胆素、藻蓝胆素、藻尿胆素和藻紫胆素<sup>[2]</sup>。

藻胆蛋白种类多、荧光强、量子产率高, 因而有着广泛的应用, 如用作食品和化妆品的添加剂、肿瘤光动力治疗中的光敏剂<sup>[3]</sup>等, 但最多的还是用作藻胆蛋白荧光探针, 应用于医学诊断、动、植物检疫, 免疫学, 细胞生物学和分子生物学等方面, 尤其是在表面抗原的研究中, 可替代酶标、放射性同位素等。另外, 藻胆蛋白种类很多, 斯托克(Stocks)位移大, 共价交联物之间又存在能量传递, 可对细胞表面做多色分析<sup>[4]</sup>。目前国外的一些公司(如 Sigma 公司等)已有相关产品出售。

藻胆蛋白荧光探针制作的关键在于摸索简易、可靠和有效的蛋白质交联方法, 原理一般是利用交联剂与蛋白质表面的活性基团反应产生共价连接。但交联剂对藻胆蛋白的荧光在一定程度上有淬灭作用<sup>[5]</sup>, 所以选择合适的交联剂并且确定其用量是有必要的。以前作者以戊二醛为交联剂, 构建了多种藻胆蛋白共价体<sup>[6-10]</sup>, 共价交联和共价体的能量传递效率都有待提

高。本文报道了一种新的藻胆蛋白交联方法, 即高碘酸钠氧化法, 用于多管藻 R-藻红蛋白和钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的共价交联。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

多管藻 (*Polysiphonia urceolata*) 采自青岛汇泉湾, 螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 粉购自东营鲁胜公司。

### 1.2 藻胆蛋白的分离纯化及鉴定

藻胆蛋白的纯化采用羟基磷灰石法, 具体操作见文献 [11], 并通过吸收和荧光发射光谱鉴定 R-藻红蛋白(RPE)和 C-藻蓝蛋白(CPC)。

测定藻胆蛋白在可见光区的特征吸收峰值, 根据 Lambert-Beer 定律, 计算藻胆蛋白的浓度。查得 R-藻红蛋白的摩尔消光系数  $\epsilon(565 \text{ nm}, 1 \text{ mg/mL}) = 8.17$ , C-藻蓝蛋白的摩尔消光系数  $\epsilon(620 \text{ nm}, 1 \text{ mg/mL}) = 7.65$  (Sigma 公司 1997 年产品目录)。

吸收光谱采用岛津 UV-240 型扫描式分光光度计, 吸收池的光径 1 cm; 室温荧光发射光谱用日立

第一作者: 马圣媛, 出生于 1976 年, 硕士, 研究方向为: 藻类生理学与生长发育的人工调控。E-mail: syma@ms.qdio.ac.cn

\* 联系人

收稿日期: 2002-09-03; 修回日期: 2002-11-20

-850 型荧光分光光度计, 激发光和发射光的狭缝均为 5 nm。

### 1.3 高碘酸钠交联 RPE 和 CPC 及交联物

#### RPE-CPC 的分离纯化

RPE 和 CPC 的交联参见文献 [12], 具体方法如下: 0.4 mL RPE (0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>) 中逐滴加 20 mmol/L NaIO<sub>4</sub> (双蒸水) 0.63 mL, 室温避光搅拌反应 2 h, 加 0.4 mL CPC (0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>), 再加入 2.23 mg 干燥的 Sephadex G-25, 上述条件反应 3 h, 离心去掉 Sephadex G-25。最后加 5 mg/mL NaBH<sub>4</sub> (0.1 mmol/L NaOH) 0.07 mL, 0.5 h 后再次加 5 mg/mL NaBH<sub>4</sub> 0.22 mL, 反应 1 h, Schiff 碱可还原为稳定的交联物。

同时, 取相同数量的 RPE 和 CPC 作为对照, 进行上述反应, 只是以相同体积的双蒸水和 0.1 mmol/L NaOH 代替 NaIO<sub>4</sub> 和 NaBH<sub>4</sub>。

吸收和荧光发射光谱检测交联情况。

交联物的分离使用 Sephadex G-200 凝胶过滤 (70

× 1.6 cm), 以 0.001 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8, 0.2 mol/L NaCl) 平衡和洗脱。

## 2 结果

### 2.1 藻胆蛋白的特性鉴定

RPE 和 CPC 的吸收光谱和荧光发射光谱如图 1。RPE 在可见光区的特征吸收峰有 3 个, 分别在 498 nm、535 nm 和 565 nm 处, 荧光发射峰约位于 585 nm; 而 CPC 的特征吸收峰只有 1 个, 位于 620 nm 附近, 荧光发射峰约处于 645 nm。这与文献 [11] 的报道相符。

根据测得的特征吸收值计算得出, 用于交联的 RPE 和 CPC 的浓度分别为 16.96 mg/mL 和 16.47 mg/mL。

### 2.2 交联物 RPE-CPC 的制备及其特性分析

高碘酸钠交联反应液和对照以及分离后的 RPE-CPC 的吸收光谱如图 2, 反应前后吸收光谱差异非常明显, 尤其是 RPE 和 CPC 的峰形和峰高均变化很大, 如 RPE 3 个特征吸收峰的峰高比值发生变化, 反应前 OD<sub>565</sub>: OD<sub>535</sub>: OD<sub>498</sub> 为 1.28: 1.09: 1.00, 而反应后变为 0.09: 1.03: 1.00。纯化后共价交联体 RPE-CPC 的吸收光谱中, RPE 的特征峰则完全消失, 600 nm 处出现了新的峰值。相比之下 CPC 吸收峰的变化较少, 620 nm 附近始终有吸收肩, 只是反应后变得不明显, 而纯化后又可清楚辨认。这些可以说明高

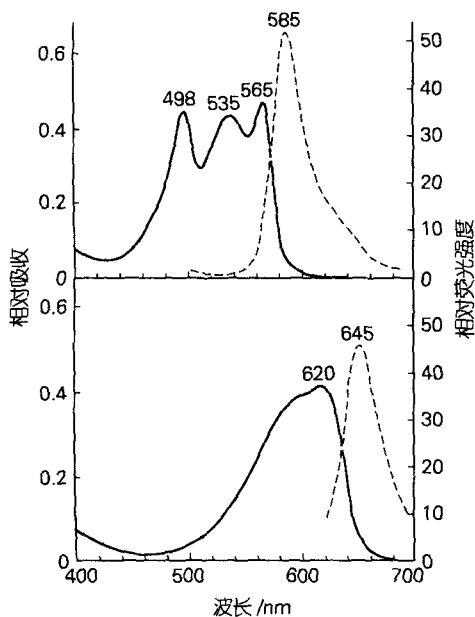


图 1 R-藻红蛋白和 C-藻蓝蛋白的吸收和荧光发射光谱

Fig. 1 The absorption and fluorescence emission spectra of R-phycoerythrin and C-phycoerythrin

—吸收光谱; --- 荧光发射光谱 (RPE:  $E_x = 498$  nm; CPC:  $E_x = 618$  nm)

A. R-藻红蛋白; B. C-藻蓝蛋白

—Absorption spectra of RPE and CPC; --- Fluorescence emission spectra of RPE and CPC (RPE:  $E_x = 498$  nm; CPC:  $E_x = 618$  nm)

A. RPE; B. CPC

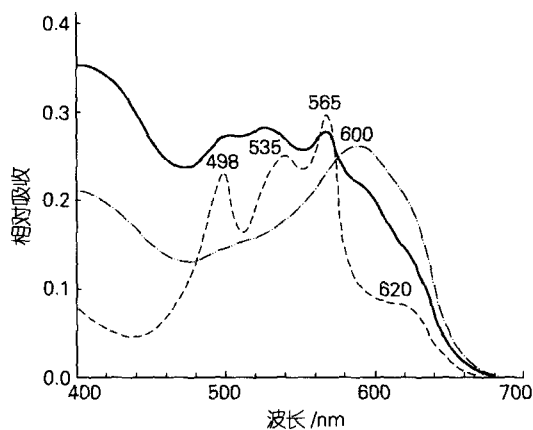


图 2 高碘酸钠氧化法交联 RPE 和 CPC 的吸收光谱

Fig. 2 The absorption spectra of conjugate of RPE and CPC with periodic acid sodium

--- RPE 和 CPC 交联反应对照; — RPE 和 CPC 交联反应样品; - · - · Sephadex G-200 纯化的 RPE-CPC

--- the control of conjugate of RPE and CPC; — the sample of conjugate of RPE and CPC; - · - · purified RPE-CPC after a Sephadex G-200 column

碘酸钠交联 RPE 和 CPC 时,对藻胆蛋白的结构产生一定的影响。

荧光发射光谱能更清楚地说明 RPE 和 CPC 交联的情况,如图 3。交联液和对照相比,虽然 640 nm 附近没有出现 CPC 的荧光发射峰,可是 640 nm 和 585 nm 发射峰的比例明显升高,由对照中的 0.16 上升为 0.27,这说明交联液中存在从 RPE 到 CPC 的能量传递,从而可以说明交联共价体 RPE-CPC 的生成;纯化以后发现 RPE-CPC 585 nm 附近的峰蓝移到 575 nm 附近,而且 640 nm 附近出现了明显的发射峰,与 575 nm 发射峰的比值为 1.29。这证明 RPE 和 CPC 交联成功。

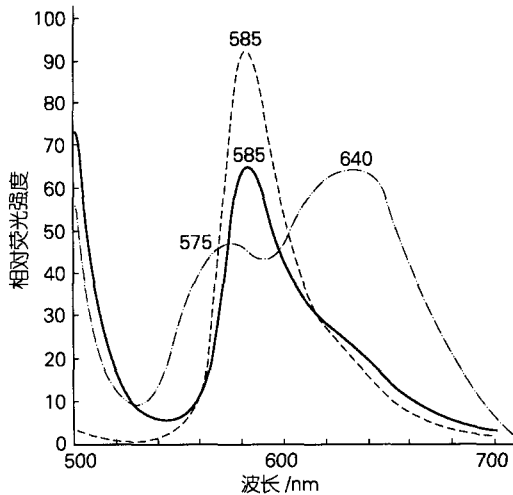


图 3 高碘酸钠氧化法交联 RPE 和 CPC 的荧光发射光谱 ( $E_x = 498 \text{ nm}$ )

Fig. 3 The fluorescence emission spectra of conjugate of RPE and CPC with periodic acid sodium

--- RPE 和 CPC 交联反应对照; — RPE 和 CPC 交联反应样品;  
- · - · Sephadex G-200 纯化的 RPE-CPC  
····· the control of conjugate of RPE and CPC; — the sample of conjugate of RPE and CPC; - · - · purified RPE-CPC after a Sephadex G-200 column

### 3 讨论

蛋白质交联时,交联剂类型的选择和用量是非常重要的。因为交联剂过量会导致蛋白变性,而不足会影响交联效率<sup>[12]</sup>。常见的藻胆蛋白交联方法有戊二醛(GA)和 N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)<sup>[13]</sup>。前者的反应原理是利用藻胆蛋白表面的活性基团——赖氨酸的  $\epsilon\text{-NH}_2$ , GA 的两个醛基可

以分别与两个藻胆蛋白分子上的氨基形成 Schiff 碱,将两分子以五碳链的桥连接起来,如 CPC-APC<sup>[8,10]</sup>, RPE-APC<sup>[7]</sup>和 RPE-CPC<sup>[9]</sup>3 种藻胆蛋白能量传递模型的构建就是以 GA 为交联剂的,不过该法容易形成同种蛋白间的交联,产物均一性较差。后者的原理是利用蛋白表面的巯基,SPDP 可先与一种蛋白分子反应,生成保护性巯基-二硫吡啶基,通过巯基交换反应与另一蛋白分子上的巯基形成共价的二硫键,因为反应条件温和,蛋白分子中通常没有巯基反应活性基团,巯基交换反应具有良好的选择性,在一定程度上可避免相同分子间的聚合,而且通过定量引入巯基及巯基反应活性基团,可以实现控制交联,得到化学专一性和生物专一性更好的交联产物,但是交联剂 SPDP 本身比较昂贵,而且贮存时湿度大容易潮解。

本文报道的高碘酸钠氧化法是通过高碘酸钠的氧化作用将藻胆蛋白表面的糖基氧化为醛基,再与另一蛋白表面的氨基形成 Schiff 碱的共价键结构。Tussen-Kurstak<sup>[12]</sup>指出  $\text{NaIO}_4$  对蛋白分子中糖基氧化的最佳浓度为  $4 \sim 8 \text{ mmol/L}$ ,这样可以保证蛋白有效的结合和活性的保持。实验中发现高碘酸钠在交联过程中对藻胆蛋白的结构有一定的影响,可能的原因是高碘酸钠作为一种氧化剂,作用于色基附近的脱辅基蛋白,使色基的微环境变化而导致其光谱发生变化,如图 2。在交联物的能量传递效率方面,640 nm 和 585 nm 荧光发射峰的比例大于 1,较戊二醛交联的 RPE-CPC 传能效率要高<sup>[9]</sup>,这说明高碘酸钠共价交联物的能量传递效率还是比较高的。所以高碘酸钠氧化法交联藻胆蛋白对研制藻胆蛋白荧光探针,尤其是用藻胆蛋白探针作细胞表面多色分析时意义重大。

### 参考文献

- 1 王广策,周百成,曾呈奎. B-藻红蛋白和 R-藻红蛋白  $\gamma$  亚基的分离、特性及其在分子中的空间位置分析. 中国科学(C),1998,28(1):36-41
- 2 王广策,邓田,曾呈奎. 藻胆蛋白的研究(I). 海洋科学,2000,24(2):22-25
- 3 李冠武,王广策. R-藻红蛋白介导的光敏效应对 DNA 分子的生物学效应. 生物化学与生物物理进展,2000,27(6):621-624
- 4 Glazer A N, Stryer L. Phycofluor probes. Trends Biochem Sci, 1984, 9:423-427
- 5 Köst H P, Rath K, Wanner G, et al. Phycobilisomes and isolated phycobiliproteins. Effect of glutaraldehyde and benzoquinone on fluorescence. Photochemistry and Photo -

- biology*, 1981, 34: 139-143
- 6 王广策,周百成,曾呈奎. 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白能量传递模型的构建. 科学通报, 1996, 41(8): 741-743
  - 7 Wang G C, Zhou B C, Tseng C K. The excitation energy transfer in an artificial R-phycoerythrin-allophycocyanin conjugate. *Photosynthetica*, 1996, 32(4): 609-612
  - 8 Wang G C, Zhou B C, Tseng C K. Spectropic properties of the C-phycoerythrin-allophycocyanin conjugate and the isolated phycobilisomes from *Spirulina platensis*. *Photosynthetica*, 1997, 34(1): 57-65
  - 9 Wang G C, Zhou B C, Tseng C K. Study on the excitation energy transfer of an artificial C-phycoerythrin-R-phycoerythrin conjugate. *Botanica Marina*, 1997, 40(4): 325-328
  - 10 Wang G C, Zhou B C, Tseng C K. Construction of energy transfer model of C-phycoerythrin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Chinese Science Bulletin*, 1997, 42(1): 69-72
  - 11 王广策,周百成,曾呈奎. 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白和多管藻 R-藻红蛋白的分离及摩尔消光系数的测定. 海洋科学, 1996, 1: 52-55
  - 12 洪孝庄,孙曼霁,龚雄麒. 配体结合分析中的蛋白质连接技术. 北京: 中国医药科技出版社, 1993. 28-31
  - 13 Glazer A N, Stryer L. Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates: Emission wavelength shifting by energy transfer. *Biophysical Journal*, 1983, 43: 383-386

## CONJUGATE OF R-PHYCOERYTHRIN FROM *Polysiphonia urceolata* AND C-PHYCOCYANIN FROM *Spirulina platensis* WITH PERIODIC ACID SODIUM

MA Sheng-Yuan WANG Guang-Ce ZENG Cheng-Kui (C.K. Tseng)

(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Sep., 3, 2002

Key Words: *Polysiphonia urceolata*, R-phycoerythrin, *Spirulina platensis*, C-phycoerythrin, Cross-reaction with periodic acid sodium, Conjugate, Spectra analysis

### Abstract

R-phycoerythrin and C-phycoerythrin were isolated and purified from marine red alga *Polysiphonia urceolata* and blue-green alga *Spirulina platensis* respectively with a hydroxylapatite column. And then, the conjugate of RPE-CPC was obtained by cross-reaction with periodic acid sodium. After being separated by a Sephadex G-200 column, the conjugate was characterized with fluorescence emission spectra and the energy transfer from the RPE to the CPC could occur in the RPE-CPC conjugate.

(本文编辑:张培新)