

# 重组别藻蓝蛋白(rAPC)的纯化与鉴定

唐志红<sup>1,2,3</sup>, 李富超<sup>1,2</sup>, 吴少杰<sup>1,2</sup>, 葛保胜<sup>1,2</sup>, 林凡<sup>1,2</sup>,

任育红<sup>1,2</sup>, 秦松<sup>1</sup>

(1.中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100039; 3.烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005)

**摘要:**报道了重组大肠杆菌表达的别藻蓝蛋白的下游生产工艺研究, 并对产物进行了分析鉴定。工程菌株 P1 先在 NBS BioFlo3000 型 5 L 自动发酵罐进行高密度发酵, 融合蛋白获得了高效表达, 且主要在细胞内以可溶形式存在。纯化前先将获得的菌体超声破碎, 然后经硫酸铵沉淀、疏水层析和离子交换层析三步纯化, 接着对纯化的重组别藻蓝蛋白 (rAPC) 进行 SDS-PAGE、PAGE、Western blot 等电点分析。证明已获得纯度为 96.4% 的 rAPC, 其等电点为 6.0, 并且具有与天然 APC 相似的抗原性。

**关键词:** 工程菌培养; 重组别藻蓝蛋白 (rAPC); 纯化

**中图分类号:** 936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)03-0056-04

藻胆蛋白是大量出现于蓝藻(Cyanophyta)、红藻 (Rhodophyta)、蓝绿藻 (Cyanophyta) 和隐藻 (Cryptophyta) 中的捕光色素蛋白, 主要包括藻红蛋白 (PE)、藻蓝蛋白 (PC)、别藻蓝蛋白 (APC) 和藻红蓝蛋白 (PEC) 4 种<sup>[1]</sup>。最初对于藻胆蛋白的研究主要集中在探讨其光合作用意义。近年来发现, 藻胆蛋白在食品、化妆品、医药以及生物工程领域都具有广阔应用前景<sup>[2]</sup>。

作者从蓝藻中克隆了别藻蓝蛋白基因, 通过构建融合蛋白的方式, 转入大肠杆菌, 得到了高效表达重组别藻蓝蛋白 (recombinant Allophycocyanin, rAPC) 的基因工程菌株 P1, 并且已对该工程菌株进行了高密度发酵和药理活性的研究<sup>[3]</sup>。作者报道了发酵后对目的蛋白进行分离、纯化以及性质研究的结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

基因工程菌 P1 (*Escherichia coli* TB1/rAPC) 由作者所在的实验室构建。酵母粉购自 AMERSCO 公

司, 丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺为 Sigma 公司产品, N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED) (Ultra Pure) 购自 Life Technologies (Invitrogen) 公司, 过硫酸铵 (APS, Ammonium Persulfate) 购自 BIO-RAD 公司, 分离纯化介质及快速蛋白液相层析系统均为 Amersham Biosciences 公司产品, 其余试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 高密度发酵及生物量测定

方法参照文献<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.2 粗提物的获得

发酵结束后离心法收集菌体, 按 1:20 比例用

收稿日期: 2004-04-25; 修回日期: 2004-08-20

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2001AA6204130); 中国科学院知识创新项目(KZCX3-SW-215)

作者简介: 唐志红 (1974-), 女, 山东武城人, 博士研究生, 从事海洋生物技术研究, E-mail: tangzhihong740503@yahoo.com.cn; 秦松, 通讯作者, 电话: 0532-2898500, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

buffer I(pH7.4, Tris 0.02 mol/L、NaCl 0.2 mol/L、 $\beta$ -巯基乙醇 0.001 mol/L)悬浮,在冰浴中超声 3 min,每次 3 s,间隔 25 s。10 000 r/min 离心 15 min,取上清液。

### 1.2.3 硫酸铵分级沉淀

将以上所得上清液用硫酸铵分级沉淀,10 000 r/min 离心 15 min,收取 10%~60%饱和度的蛋白质沉淀,buffer II(pH7.4, Tris 0.02 mol/L、NaCl 0.2 mol/L、 $\beta$ -巯基乙醇 0.001 mol/L、10%硫酸铵)溶解,用 0.46  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。整个操作过程在 0~4 进行。

### 1.2.4 疏水层析

Hiprep phenyl high sub 16/10 柱,采用 10%~0%硫酸铵线性梯度洗脱,最后用超纯水洗脱,收集 rAPC 峰。

### 1.2.5 离子交换层析

采用 Source15Q HR16/10 柱,用 5 倍柱体积的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 平衡柱子,0~1 mol/L NaCl 线性梯度洗脱。

### 1.2.6 蛋白质含量检测

用 Bradford 法<sup>[4]</sup>。

### 1.2.7 SDS-PAGE 鉴定

浓缩胶 3%,电压为 80 V;分离胶为 15%,电压 120 V,电泳 4 h,考马斯亮蓝染色。

### 1.2.8 PAGE 鉴定

方法参照文献<sup>[5]</sup>。

### 1.2.9 分子筛层析鉴定

Superdex75HR 10/30 柱,用 buffer I 平衡和洗脱柱子。

### 1.2.10 rAPC 的 Western blot 鉴定

将纯化后的样品经 SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜上,一抗为天然 APC 的兔抗血清(由本实验室制备),具体方法见参考文献<sup>[7]</sup>。

### 1.2.11 等电点检测

方法参照文献<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 重组菌 P<sub>1</sub> 的高密度发酵

在密度发酵过程中采用梯度递加流加补料的方式。当菌体光密度达到  $A_{600}$  为 5 时,溶解氧突然上升,开始补料,最终菌体干质量达到 16.8 g/L, rAPC 的表达最终占可溶性蛋白的 25.7%。图 1 为基因工程菌 P1 高密度发酵时的生长曲线图。

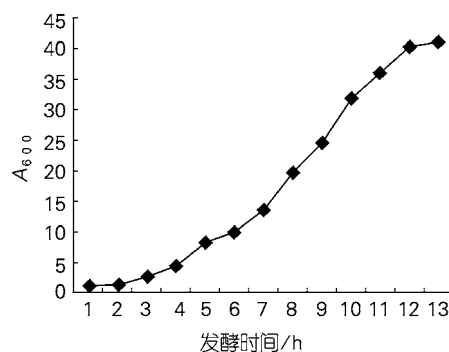


图 1 高密度发酵中基因工程菌(*Escherichia coli*)P1 的生长曲线

Fig.1 The profile of  $A_{600}$  in high cell density cultivation of *Escherichia coli* P1

### 2.2 rAPC 的纯化及鉴定

#### 2.2.1 硫酸铵分级沉淀

在实验中根据不同饱和度硫酸铵沉淀 SDS-PAGE 的结果证实, rAPC 主要集中在 10%~60% 饱和度的范围内。采用 Bradford 法分析,证实蛋白质的平均回收率达 60%~70%。通过硫酸铵分级沉淀,除掉了大量的杂蛋白和核酸类物质。

#### 2.2.2 疏水层析纯化

疏水层析的原理是蛋白分子在高盐浓度时与层析介质结合,低盐浓度时与介质解离。用 buffer II 溶解后,直接上 Hiprep phenyl high sub 16/10 预装柱,经过疏水层析后,目的蛋白的纯度达到 91%,纯化倍数达 2.92。图 2 为 rAPC 粗品硫酸铵沉淀后的疏水层析色谱图。

#### 2.2.3 离子交换层析纯化

离子交换层析采用的层析介质是 Source15Q,它是强阴性的,分辨率极高,适于精细纯化。在离子交换层析中,又有新的杂质峰出现,说明 rAPC 又得到了进一步的纯化,目的蛋白纯度达到 96.4%。图 3 为 APC 离子交换层析色谱图。

#### 2.2.4 rAPC 纯度鉴定

采用 SDS-PAGE (图 4)、PAGE (图 5) 和分子筛 (图 6) 3 种手段对纯化后的 rAPC 进行了纯度测定。结果表明,最终 rAPC 的纯度达 96.4%。

#### 2.2.5 rAPC 的免疫原性及等电点测定

将纯化后的蛋白进行 Western blot 鉴定, rAPC 具有与天然的别藻蓝蛋白相同的免疫原性。采用等电聚焦电泳的方法, 测得 rAPC 的等电点为 6.0。

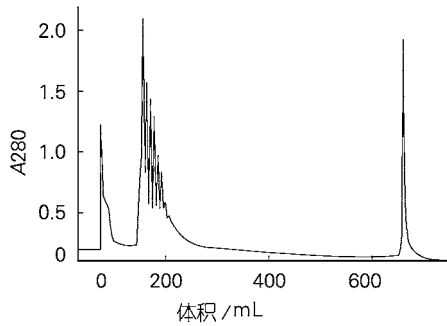


图2 rAPC 的疏水层析色谱

Fig.2 Hydrophobic interaction chromatography of rAPC

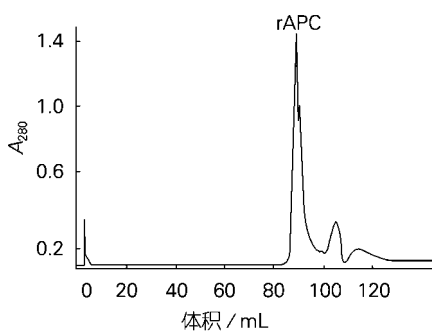


图3 rAPC 的离子交换层析色谱

Fig.3 Ion exchange chromatography of rAPC

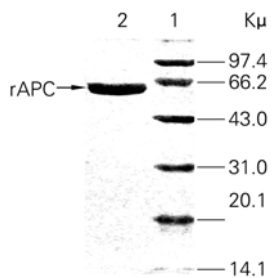


图4 纯化的 rAPC 的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified rAPC

1. 标准蛋白; 2. 纯化的 rAPC  
1. marker; 2. purified rAPC

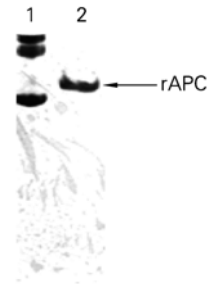


图5 纯化的 rAPC 的 PAGE 分析

Fig.5 PAGE analysis of purified rAPC

1. 标准蛋白; 2. 纯化的 rAPC  
1. marker; 2. purified rAPC

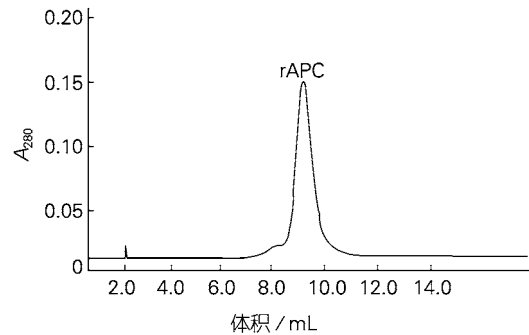


图6 纯化的 rAPC 的分子筛层析分析

Fig.6 Gel filtration chromatography of purified rAPC

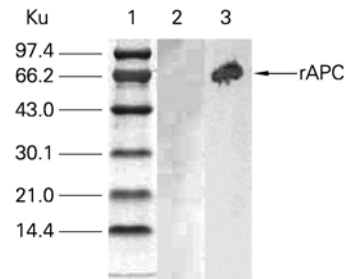


图7 rAPC 的免疫印迹分析

Fig.7 Western blot analysis of purified rAPC

1. 标准蛋白; 2. 未经诱导的菌体蛋白; 3. 纯化的 rAPC  
1. marker; 2. the proteins from recombinant *Escherichia coli* P1 without induction; 3. purified rAPC

### 3 讨论

目前融合表达的成本较高,难以满足临床需求,因此发展低成本的生产方案极为迫切,作者在这里所采用的大肠杆菌表达系统,表达量高,生产成本低,适合于大规模的生产。

在整个纯化过程中,硫酸铵分级沉淀后,溶液中会含有较高的盐离子,刚好满足疏水层析交换的要求,而经过疏水层析后,含有较低的盐离子浓度,适合于进行离子层析。整个纯化过程所采用的手段组合比较合理,避免了多余的步骤,rAPC 的收率较高;而且疏水层析和离子交换层析都能吸附大量的目的蛋白,硫酸铵价格相对来说也很便宜,因此3种分离纯化的方式都适于工业的大规模生产。

对发酵产物进行一系列分离纯化后,最终获得的 rAPC 具有与天然 APC 具有相似的抗原性。此外,作者还进行了动物体内的药效、药理和毒理实验,表明 rAPC 具有显著的抗肿瘤活性,说明 rAPC 具有潜在的临床应用前景。

参考文献:

[1] Sidler W A. Phycobilisome and phycobiliprotein structures

[A]. Bryant DA. The Molecular Biology of cyanobacteria [C]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994. 139-216.  
 [2] 王仲孚, 赵谋明. 藻胆蛋白研究[J]. 生命的化学, 2000, 20(2): 72.  
 [3] 赵方庆, 唐志红, 林凡, 等. 表达 rAPC 大肠杆菌的高密度发酵及纯化产物的抑瘤活性 [J]. 高技术通讯, 2003, 13(2): 29-32.  
 [4] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.  
 [5] 吴冠芸. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 126.  
 [6] 彭秀玲. 基因工程实验技术(第二版) [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1995. 256-271.  
 [7] 李建武, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 197-202.  
 [8] 李民, 陈常庆. 重组大肠杆菌高密度发酵研究进展[J]. 生物工程进展, 2000, 2: 26-31.

## Purification and characterization of recombinant allophycocyanin(rAPC) expressed in a recombinant *Escherichia coli* P1

TANG Zhi-hong<sup>1,2,3</sup>, LI Fu-chao<sup>1,2</sup>, WU Shao-jie<sup>1,2</sup>, GE Bao-sheng<sup>1,2</sup>, LIN Fan<sup>1,2</sup>, REN Yu-hong<sup>1,2</sup>, QIN Song<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Ocean School, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Apr., 25, 2004

**Key words:** recombinant; Allophycocyanin (rAPC); purification

**Abstract:** This study reports a method to purify rAPC and analysis of the purified rAPC. The culture of the recombinant *Escherichia coli* strain was performed in a NBS BioFlo 3000 5 L fermentor (New Brunswick, USA); The final cell density was 16.8g dried cell/L broth and rAPC was produced as a water-soluble type. After sonication, the supernatant of free cell was fractionally precipitated by ammonium sulfate. The protein was further purified by hydrophobic interaction chromatography and ion exchange chromatography. The purity of rAPC reached 96.4%; The purified rAPC was an acid protein (PI=6.0) and had a Mr value of approximate 60 ku; And the immunogenicity of rAPC is identical with that of its natural counterpart. (本文编辑:张培新)