

钝顶螺旋藻藻蓝蛋白提取纯化新工艺

李冰¹, 张学成², 高美华¹, 褚现明³

(1. 青岛大学 医学院, 山东 青岛 266012; 2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 3. 青岛市海慈医院, 山东 青岛 266033)

摘要:对钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)中藻蓝蛋白的提取和纯化方法进行了改进。用磷酸盐缓冲液循环冻融联合超声波破碎法, 50%硫酸铵沉淀获得藻蓝蛋白(phycocyanin, PC), 提取率达到13.1%。粗蛋白提取液再经过两次羟基磷灰石柱(HA)层析和sephacryl-HR-200凝胶层析对其进行纯化, 纯度达到4.71%。纯化后的PC在12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中得到两条带, 分别是和两个亚基, 分子质量分别为21.4 ku和17.0 ku。结果表明, 通过上述分离纯化过程得到了较高提取率和电泳纯度的藻蓝蛋白。

关键词:钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*); 藻蓝蛋白; 提取; 纯化

中图分类号: Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)08-0048-05

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)又称钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)是一种原核丝状蓝藻, 含有藻蓝蛋白、多糖、-胡萝卜素、 γ -亚麻酸等多种生物活性物质, 而藻蓝蛋白以其特有的营养和保健价值受到广泛的重视。

藻蓝蛋白(phycocyanin, PC)是一种存在于蓝藻细胞内的光合色素, 能高效捕获光能^[1]。其分子质量在40 ku左右, 由两个亚基组成, 亚基分子质量都在20 ku左右。肽链上共价结合1个开链的四吡咯环辅基, 类似动物红细胞的血红素结构。天然存在的藻蓝蛋白通常以六聚体($(\text{PC})_6$)的形式存在^[2]。与之相近的别藻蓝蛋白(Anthocyanin, APC)为三聚体($(\text{APC})_3$), 在650 nm处有最大吸收峰。分离纯化的水溶藻蓝蛋白在溶液中呈蓝色, 并发出紫色荧光, 在波长620 nm具有特异吸收峰, 可用吸光度 A_{620}/A_{280} 表示其纯度^[3]。因其水溶性、无毒、清亮且着色力强等优点, 藻蓝蛋白被广泛用于食品着色剂和化妆品的添加剂^[4]。藻蓝蛋白带有荧光, 可用作荧光标记物^[5]。另外, 研究表明藻蓝蛋白具有一定的医疗价值, Schwartz和Sklar^[6]发现螺旋藻藻蓝蛋白对癌细胞有抑制作用, 蔡心涵等^[7]研究了藻蓝蛋白对激光疗法的增敏作用, 张成武等^[8]报道了螺旋藻藻蓝蛋白对小鼠急性放射病的防护作用, 李冰等^[9]研究还发现藻蓝蛋白在抗肿瘤和提高机体免疫力方面有明显疗效。作者对藻蓝蛋白的提取和纯化方法进行了改进, 分离纯化了PC, 分离出两个亚基, 为PC的应用

积累充足的实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

钝顶螺旋藻粉(由作者所在的实验室提供); 羟基磷灰石(上海生物工程有限公司); sephacryl HR-200(Sigma公司); 紫外分光光度计(日本岛津公司); 自动部分收集器(上海沪西仪器厂); 高速低温冷冻离心机3K30型(美国PE公司); 超声波细胞破碎仪(B-30型, Branson ultrasonics Co.); 恒流泵(HL-2型, 上海新波无线电厂)。

1.2 藻蓝蛋白的提取和含量测定

1.2.1 藻蓝蛋白的提取方法

用磷酸盐缓冲液循环冻融联合超声波破碎法提取藻蓝蛋白。取螺旋藻粉50 g, 加入pH7.0 10 mmol/L的磷酸盐缓冲液(PBS) 300 mL, 于4℃浸泡后置于磁力振荡搅拌器上高速搅拌30 min, 然后在-20℃和38℃间交替冻融数次。静置30 min, 7 000 r/min 4℃离心50 min。其中上清液用50%饱和度的硫酸铵4

收稿日期: 2005-05-10; 修回日期: 2006-03-20

作者简介: 李冰(1980-), 女, 山东青岛人, 博士, 电话: 0532-82991208, E-mail: libing_516@yahoo.com.cn; 张学成, 通讯作者, 教授, 博士生导师, 主要从事海洋藻类生物技术研究, 电话: 0532-82032789, E-mail: xczhang@ouc.edu.cn

盐析^[10]24 h 得藻蓝蛋白;而离心沉淀得到的藻渣用 PBS 溶解后超声波处理 9 min (功率 100 W, 振幅 25%), 然后 7 000 r/min 离心 40 min, 50% 硫酸铵沉淀得藻蓝蛋白。收集以上两步得到的沉淀, 用 20 mL PBS 溶解, 置于透析袋(截留分子质量为 12 ku) 中在 2 000 mL 10 mmol/L PBS 中透析 12 h 以去除铵离子。

1.2.2 藻蓝蛋白浓度测定

采用考马斯亮蓝法: 取洗净干燥的试管分成两组按表 1 进行操作。标准蛋白质溶液质量浓度为 500 mg/L。

表 1 标准曲线制备

Tab. 1 Preparation of standard curve

试剂	用量 (μL)					
	管号					
	0	1	2	3	4	5
标准蛋白	0	50	100	150	200	250
蒸馏水	500	450	400	350	300	250

加 3 mL 考马斯亮蓝 G-250, 立即摇匀, 置室温放置 15 min, 然后 595 nm 波长处比色。取两组测定的平均值, 以标准蛋白质质量浓度 (g/L) 为横坐标, A_{595} nm 值为纵坐标作图, 即得标准曲线。另取 0.5 mL 未知浓度的 1/100 倍稀释的待测样品蛋白溶液同上测定, 以其 A_{595} 值推算出浓度大小。

1.3 藻蓝蛋白提取率的影响因素

1.3.1 浸泡时间

将螺旋藻粉置于 PBS 中于 4 ℃ 分别浸泡 2, 6, 10, 24, 48 h。

1.3.2 冻融次数

螺旋藻粉在 PBS 中于 4 ℃ 浸泡 48h, 改变冻融次数, 分别冻融 0, 2, 4, 6, 8, 10 次。

1.3.3 超声波

用于冻融后离心沉淀的藻渣的处理。藻渣用 PBS 溶解后超声波处理 9 min (功率 100 W, 振幅 25%), 然后 7 000 r/min 离心 40 min, 50% 硫酸铵沉淀得藻蓝蛋白。

1.4 藻蓝蛋白的纯化

1.4.1 羟基磷灰石柱 (HA 柱)

用 10 mmol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液预平衡层析柱, 然后加入粗蛋白提取液上柱, 在洗脱过程中不断增加磷酸盐缓冲液的离子强度 (分别以 10, 20, 50, 100, 200 mmol/L pH7.0 的 PBS 缓冲液, 并加 0.1 mol/L 的 NaCl 洗脱), 洗脱速度控制在 0.52

mL/min。分别收集不同离子强度缓冲液的洗脱液, 并进行光谱测定。再分别将特征吸收峰的藻蓝蛋白部分的洗脱液合并, 透析脱盐并用 PEG8000 浓缩。

1.4.2 Sephacryl HR-200 柱凝胶层析

经 1.4.1 纯化得到的藻蓝蛋白液上柱, 用 0.02 mmol/L Na_2HPO_4 + 0.1 mol/L KCl 缓冲液洗脱, 流速控制在 0.8 mL/min。取藻蓝蛋白部分洗脱液脱盐浓缩。

1.4.3 HA 柱

由 1.4.2 得到的藻蓝蛋白浓缩液再次过 HA 柱进行纯化。透析、浓缩、冷冻干燥, 以备电泳。

1.5 SDS-PAGE 电泳

采用垂直板状不连续电泳系统。分离胶质量分数为 12%, 浓缩胶质量分数为 5%。样品在浓缩胶中电泳电压为 100 V, 进入分离胶后 200 V 电泳 3~4 h。剥胶, 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染液固定染色 1 h, 用含 30% 甲醇的 10% 冰醋酸脱色。

2 结果

2.1 藻蓝蛋白浓度测定

将得到的 6 个点连接起来得到一条标准曲线, 计算回归率 $R^2 = 0.9904$, 说明线性关系良好。对应曲线可通过检测待测藻蓝蛋白在 595 nm 的吸光度, 计算待测样品的浓度。

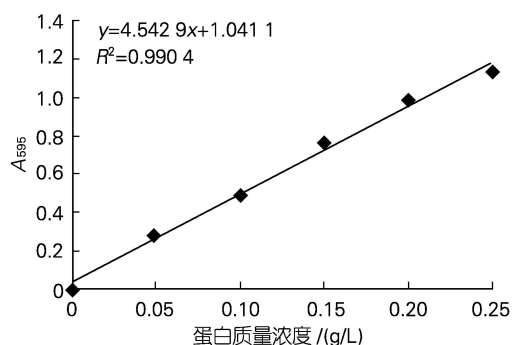


图 1 蛋白质标准曲线

Fig. 1 The standard curve of protein

2.2 藻蓝蛋白提取率的影响因素

2.2.1 浸泡时间对藻蓝蛋白提取率的影响

表 2 显示浸泡 48 h 藻蓝蛋白的提取率明显高于浸泡 2 h 的提取率, 但其纯度组间无明显差距。由此证明在实验范围内浸泡时间越长藻蓝蛋白的提取率越高。

表 2 浸泡时间对藻蓝蛋白提取率的影响

参数	浸泡时间(h)				
	2	6	10	24	48
蛋白提取率(%)	3.3	4.6	5.1	5.4	5.6
A_{620}/A_{280}	0.81	0.81	0.9	0.74	0.7

2.2.2 冻融次数对藻蓝蛋白提取率的影响

取浸泡 48 h 后的藻粉经 PBS 反复冻融处理。由表 3 可见冻融 10 次藻蓝蛋白的提取率最高可达 7.1%, 由此可见藻蓝蛋白的提取率与冻融次数在实验范围内呈正相关性。

表 3 冻融次数对藻蓝蛋白提取率的影响

参数	冻融次数					
	0	2	4	6	8	10
蛋白提取率(%)	5.6	5.8	6.0	6.6	6.8	7.1
A_{620}/A_{280}	0.88	0.81	0.79	0.97	0.89	1.01

2.2.3 超声波处理对藻蓝蛋白提取率的影响

对于冻融后仍未破裂的藻细胞采用超声波处理。表 4 可见在 2.2.2 中冻融 0, 2, 4, 6, 8 和 10 次后仍未破裂的藻细胞经超声处理后, 藻蓝蛋白的提取率分别为 4.8%, 4.9%, 5.3%, 5.7%, 5.9% 和 6.06%。

表 4 超声波处理对藻蓝蛋白提取率的影响

参数	冻融次数					
	0	2	4	6	8	10
蛋白提取率(%)	4.8	4.9	5.3	5.7	5.9	6.0
A_{620}/A_{280}	0.61	0.59	0.55	0.60	0.52	0.55

2.2.4 藻蓝蛋白的总提取率

综合上面 2.2.2 和 2.2.3 两步的蛋白提取率即可得到藻蓝蛋白的总提取率(图 2)。藻蓝蛋白在浸泡 48 h, 后经 PBS 冻融 10 次, 最后超声波处理得到的蛋白最大提取率为 13.1%。

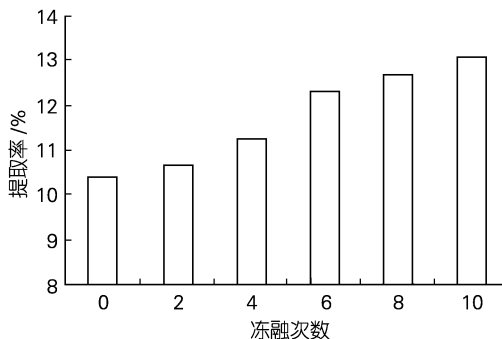


图 2 藻蓝蛋白的总提取率测定

Fig. 2 The determination of the total extraction rate of PC

2.3 纯化结果

2.3.1 经 HA 柱纯化结果

粗藻蓝蛋白经过羟基磷灰石柱层析, 磷酸盐缓冲液洗脱, 结果见图 3。峰 1 为穿过组份, 目标组份藻蓝蛋白主要集中在峰 2 和峰 3, 峰 4 含藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白, 峰 5 为别藻蓝蛋白。 $A_{620}/A_{280} = 2.56$ 。

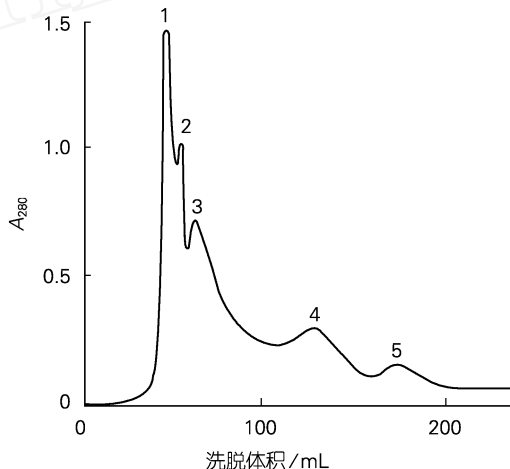


图 3 藻蓝蛋白粗品经羟基磷灰土层析洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of crude phycocyanin via HA column

2.3.2 经 sephacryl HR-200 柱凝胶层析结果

收集峰 2 和峰 3 的组份, 经过 sephacryl HR-200 柱凝胶层析得到 3 个峰, 结果见图 4。a 组份呈深蓝色, 成分主要是藻蓝蛋白。 $A_{620}/A_{280} = 3.64$ 。

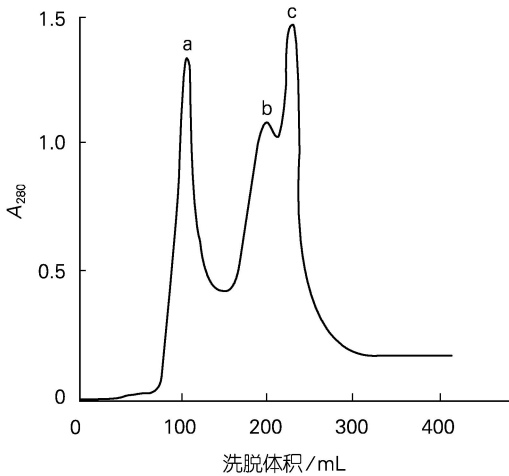


图4 组份 2,3 经 sephacryl HR-200 柱凝胶层析洗脱曲线
Fig.4 Elution curve of component 2, 3 via sephacryl HR-200

2.3.3 经 HA 柱凝胶层析结果

组分 a 再次经过 HA 柱层析得到藻蓝蛋白的单一洗脱峰,结果见图 5。表明藻蓝蛋白得到进一步纯化, $A_{620} / A_{280} = 4.71$ 。

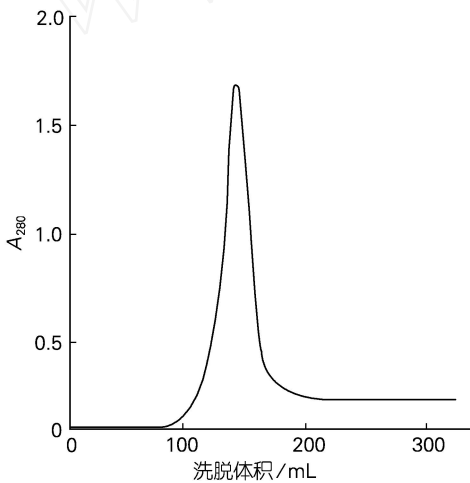


图5 组份 a 经 HA 柱凝胶层析洗脱曲线

Fig.5 The elution curve of component a via HA column

2.3.4 纯化后藻蓝蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

纯化后的藻蓝蛋白通过 12% SDS-PAGE 电泳得到两条条带,对应蛋白的两个亚基 α 和 β , 分子质量分别为 $17.0 \text{ ku} \pm 0.7 \text{ ku}$ 和 $21.4 \text{ ku} \pm 1.0 \text{ ku}$ (图 6)。

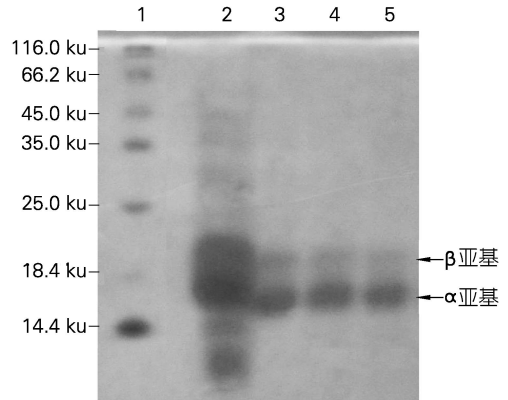


图6 SDS-PAGE 电泳图

Fig.6 SDS-PAGE electrophoretogram

1. 蛋白 marker;2. 藻蓝蛋白粗提取液;3,4,5 为纯化后的藻蓝蛋白
1. marker proteins;2. crude PC extracts;3,4,5. purified PC

3 讨论

高效的分离纯化技术是提高产品质量和得率,降低目标产物生产成本的关键。藻蓝蛋白的应用现状,要求开发出一套藻蓝蛋白低成本生产技术,以扩大对这一优良的荧光标记物和具潜在药用价值的高附加值产品的生产和应用。为此,作者简化了某些分离纯化步骤,提高了藻蓝蛋白的得率和纯度。

(1) 选用的实验材料为钝顶螺旋藻粉。由于藻粉经喷雾处理,部分细胞壁已被破坏,因此溶于磷酸盐缓冲液的藻粉经磁力搅拌 30 min 后,某些细胞的细胞壁破碎,藻蓝蛋白易溶出。

(2) 实验证明,用反复冻融的方法来破碎螺旋藻细胞壁效果很好。经 6 次反复冻融之后,用显微镜观察发现大部分藻丝已断裂,藻细胞破裂,藻蓝蛋白从胞内释出。

(3) 经搅拌和冻融处理仍未破碎的细胞作者采用超声破碎法做进一步处理。但作用的强度和时间要注意控制,强度过大时间过长都可能导致细胞内蛋白等有效组份的破坏,强度过小时间太短又可能达不到破碎细胞的目的。经过实验比较,发现用功率 100 W,振幅 25% 的超声波处理 9 min (每作用 2 min 间隔 1 min) 效果较好。

(4) Siegelman 等^[11]曾建议用硫酸铵盐析时,采用分步沉淀的方法,即用 30% 饱和度的硫酸铵来沉淀 PC,而 50% 饱和度的硫酸铵来沉淀 APC。但本实验发现两者所得的盐析沉淀溶解液中的 PC 和 APC 成分比例几乎无差异,不能将 PC 主体和 APC 主体分开。因此,要想获得较高纯度的螺旋藻藻蓝蛋白,必须采用柱层析法对粗提取液进行纯化。

(5) 蛋白粗提取液经过 HA 柱层析时,在 10 ~ 20 mol/L 缓冲液作用下,PC 即可被洗脱下来,而 APC 要在 50 ~ 100 mol/L 缓冲液作用下才被洗脱下来。经过一次 HA 柱层析之后,PC 纯度可大幅度提高,达到 2.56。

(6) 再经 sephacrylHR-200 柱和 HA 柱各一次,藻蓝蛋白得到进一步纯化,纯度达 4.71。

(7) 经 SDS-PAGE 电泳分析,藻蓝蛋白单体由两个亚基组成,分子质量分别为 17.0 ku ± 0.7 ku 和 21.4 ku ± 1.0 ku。天然存在的钝顶螺旋藻藻蓝蛋白以六聚体 ()₆ 形式存在,分子质量为 (17.0 + 21.4) × 6 = 230.4 ku。

参考文献:

- [1] Glazer A N. A macromolecular complex optimized for light energy transfer [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1984, 768: 29-51.
- [2] 易国良, 蒋丽金. 藻胆蛋白生物合成的模型反应[J]. 化学学报, 1991, 49(1): 94-97.
- [3] 张成武. 钝顶螺旋藻藻胆蛋白的分离、纯化及其理化特性[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(2): 29-33.
- [4] 张学成. 螺旋藻——最完美的功能食品[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999.
- [5] Brody M R, Emwrsen. The effect of wave length and intensity of light on the Proportion of pigments in *Porphyridium cruentum* [J]. *Am J Botaong*, 1959, 46: 433-440.
- [6] Schwartz J L, Sklar G. Growth inhibition and destruction of oral cancer cells by extracts of *Spirulina* [J]. *Proc Amer Oral Pathol*, 1986, 40: 23-27.
- [7] 蔡心涵, 何立明, 蒋家伦, 等. 螺旋藻藻蓝蛋白对激光疗法增敏作用的研究[J]. 中国海洋药物, 1995, 14(1): 15-18.
- [8] 张成武, 曾昭琪, 张爱贞, 等. 钝顶螺旋藻多糖和藻胆蛋白对小鼠急性放射病的防护作用[J]. 营养学报, 1996, 18(1): 327-332.
- [9] 李冰, 张学成, 高美华, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白和多糖的抗肿瘤免疫活性研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(3): 396-402.
- [10] Boussiba S, Richmond A E. Isolation and characterization of phycocyanins from blue-green algae *Spirulina platensis* [J]. *Microbiol*, 1979, 120: 155-159.
- [11] Siegelman H W, Kycia J H. Handbook of phycological method [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1978. 71-79.

New research on extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis*

LI Bing¹, ZHANG Xue-cheng², GAO Mei-hua¹, ZHU Xian-ming³

(1. Medical College of Qingdao University, Qingdao 266012, China; 2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Haici Hospital, Qingdao 266033, China)

Received: May, 10, 2005

Key words: *Spirulina plantensis*; phycocyanin; extraction; purification

Abstract: The optimum method of extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis* was improved in this paper. Through repeatedly freezing and thawing alternatively in the presence of phosphate buffer combined with ultrasonic fragmentation, the phycocyanin was efficiently extracted from *S. platensis* by being precipitated in 50% solid ammonium sulphated, resulting in 13.1% recovery of phycocyanin. Then, the crude phycocyanin was chromatographed by hydroxylapatite (HA) column, further purified by sephacrylHR-200 gel chromatography and HA column chromatography again. In the end the phycocyanin with a high purity (A_{620}/A_{280}) of 4.71 was obtained. Analyzed by 12% SDS-PAGE electrophoresis, phycocyanin migrated as two bands corresponding to its two subunits (and) and the molecular weights were 17.0 ku and 21.4 ku, respectively. The results showed that we got the phycocyanin with a comparatively high extracting rate and a high purity by means of a series of extraction and purification procedures.

(本文编辑:张培新)