

富硒螺旋藻中硒别藻蓝蛋白的纯化及其特性

黄 峙 杨 芳 郑文杰

(暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)

摘 要:从富硒螺旋藻(*Se rich Spirulina platensis*, Se-SP)中分离纯化高纯度的含硒别藻蓝蛋白(*Se-containing allophycocyanin*, Se-APC)并观察其生化特性。羟基磷灰石和 DEAE-52 柱层析方法结合制备电泳技术纯化 Se-APC。光谱扫描、Native-PAGE、SDS-PAGE 和 IEF 方法鉴定 Se-APC 生化特性。2,3-DAN 荧光光度法检测蛋白质中 Se 含量。结果发现 3 种高纯度 Se-APC 的光谱特征分别与 APCI、APCII、APCIII 吻合。电泳鉴定它们可能都是($\alpha\beta$)₃。α、β 亚基分别为 18.3 和 15.7 kDa,其 pI 值分别为 4.76、4.85 和 5.02。3 种 Se-APC 中 Se 含量分别为 316、273 和 408 μg/g。Se-APC 经 0.5 mol/L NaSCN 解聚和 β-巯基乙醇变性处理后,蛋白质中 Se 含量依次减并趋于稳定。结果提示 Se-SP 中 APC 可结合 Se,APC 中 Se 含量与其分子聚态有关,亚基中含 Se 量稳定,可能是以共价键方式结合。Se-APC 生物活性及硒在蛋白质中的结合位点值得深入研究。

关键词:螺旋藻;硒;别藻蓝蛋白;纯化

中图分类号:Q51 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)03-0401-05

螺旋藻(*Spirulina*, SP)营养丰富均衡,并具有抗氧化、抗癌、调节免疫等功效^[1,2]。硒(Selenium, Se)是人体必需的微量元素,已发现人体内有 25 种硒酶和硒蛋白^[3]发挥重要生理功能。富硒大蒜、富硒茶和富硒椰菜等植物中含硒活性物质具有较高的医药应用价值^[4]。Mosulishvili 等^[5]认为 SP 是进行富硒和富碘的适宜载体;Li 等^[6]发现 SP 可转化无机硒生成有机硒,其中硒主要与蛋白质、多糖等生物大分子结合,黄峙等^[7]已建立富硒螺旋藻(*Selenium rich Spirulina*, Se-SP)培养方法。硒藻蓝蛋白(*Se rich phycocyanin*, Se-PC)的初步晶体学研究尚未揭示其中硒的存在状态和结合位点^[8],但生物活性试验发现 Se-PC 可上调小鼠抗氧化硒酶活性,对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤具有拮抗作用^[9]。Cases 等^[10]也发现螺旋藻含硒组分的生物利用度和生物活性较高。别藻蓝蛋白(*Allophycocyanin*, APC)是藻胆体(*Phycobilisome*, PBS)的重要组成部分,在光能捕获和传递中极其重要,最近还发现 APC 对肠病毒 71 感染猴肾细胞诱导的细胞病理反应具有明显抑制作用^[11]。本实验从 Se-SP 中提取纯化含硒别藻蓝蛋白(*Se-containing allophycocyanin*, Se-APC),并对其生化特性及硒结合特点进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 藻种和培养:螺旋藻(*Spirulina platensis*)取自暨南大学水生生物研究所。按文献[7]培养 Se-SP,鲜藻泥含硒 51.6 μg/g。

1.1.2 主要试剂和仪器:羟基磷灰石(*Hydroxyapatite*, HA)、DEAE-52、Sephadex G-200、高分子量蛋白标准购自 Pharmacia 公司;丙烯酰胺、两性电解质(*Ampholyte*)购自 Bio-Rad 公司;低分子量蛋白标准购自华美公司;其它试剂均为 AR 级;Microcon YM-10 超滤管购自 Millipore 公司。使用仪器主要有宁波新芝 JY92-II 型超声波破碎仪,Beckman 公司 LE-80 超高速离心机, Bio-Rad 公司 Model 491 制备电泳槽和 Mini Model 111 IEF 电泳槽,岛津 UV2450 紫外分光光度计,上海分析仪器厂 970CRT 荧光分光光度计。

1.2 Se-APCs 的分离和纯化

取新鲜 Se-SP 20g,按文献[12]密度梯度离心方法制备藻胆体(PBS),参照文献[13,14]分离和纯化 APC。PBS 用 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PB, pH7.0)透析 24h, 20000 × g 离心 20min,上清液上 HA 层析柱 I (5cm × 10cm), 50 mmol/L PB 洗去藻蓝蛋白,取顶层吸附 APC 的 HA 填装在 HA 柱 II (2.5cm × 25cm)上部, 50 ~ 300 mmol/L PB 线性梯度洗脱,流速为

基金项目:广东省自然科学基金重点项目(05103295);广东省自然科学基金团队项目(039213)

作者简介:黄峙(1968-),男,河南省信阳市人,讲师,博士,主要研究方向为天然活性蛋白质。Tel/Fax: 86-20-85220219;E-mail: thsh@jnu.edu.cn

收稿日期:2005-09-02;接受日期:2006-01-20;修回日期:2006-02-07

1.0mL/min, 5mL/管收集, 监测 A_{650} 洗脱峰, 按 $A_{650}/A_{280} > 1.5$ 合并洗脱液, 超滤浓缩后 DEAE-52 柱层析 (2.5cm × 25cm, 10mmol/L PB 平衡) 纯化, 10 ~ 300mmol/L 线性梯度 PB 液洗脱 (流速 1.0mL/min), 收集 $A_{650}/A_{280} > 2.5$ 的洗脱液, 超滤浓缩后冻干保存。Native PAGE 制备电泳 (4% ~ 15% 的梯度分离胶) 按照 Model 491 制备电泳槽说明书及文献 [15] 进行, 收集 $A_{650}/A_{280} > 4$ 的高纯度 Se-APC。

1.3 分析、检测与鉴定

室温下进行可见光谱扫描 (550 ~ 750nm) 和荧光发射光谱扫描 (扫描波长 650 ~ 750nm, EX 波长 650nm, EX 缝宽 5nm, EM 缝宽 10nm)。梯度 (4% ~ 20%) Native PAGE 和梯度 (5% ~ 25%) SDS-PAGE 分析按文献 [16] 进行。按文献 [17] 凝胶过滤法 (Sephadex G-200 柱 2cm × 80cm) 测定蛋白质分子量。超薄 IEF 使用 4% 聚丙烯酰胺凝胶 (含 pH4 ~ 6 Ampholyte 1.5% 和 10% 甘油), 按 Mini Model 111 IEF 电泳槽说明书操作, 聚焦完毕, 沿电场方向每 0.5cm 等距离切胶, 将胶块浸泡于饱和 KCl 溶液中, 测定 pH 值, 绘制 pH-长度图, 计算蛋白质的等电点。电泳胶片染色按文献 [16] 方法操作, 拍照保存。蛋白质含量测定用 Bradford 比色法, 以 BSA 为标准。硒含量测定采用 2,3-DAN 荧光分光光度法 [6]。

1.4 Se-APCs 的解聚和变性

Se-APCs 于 0.5mol/L NaSCN 溶液中透析过夜, 使解聚为单体 $(\alpha\beta)^{22}$; 用 10mmol/L β -巯基乙醇和 1% SDS 60°C 加热 20min 使 Se-APCs 完全变性, 超滤法除去游离硒, 分别检测解聚和变性后蛋白中硒含量。

2 结果和分析

2.1 Se-APCs 纯化和纯度鉴定

通过密度梯度离心制备纯度较高的完整藻胆体, 经光密度法测定 APC 约占藻胆蛋白的 13.5%。藻胆体在低离子强度缓冲液中可完全解离出藻胆蛋白 [12], HA 柱层析方法是分离 APC 的经典方法 [13, 14], 得到 3 个 APC 组分的纯度系数 (A_{650}/A_{280}) 分别为 1.58、1.69、1.55; 再经 DEAE-52 柱层析纯化, 其纯度系数分别提高到 2.93、3.16、3.22, 进一步用制备电泳纯化后, 其纯度系数均 > 4 , 为高纯度的 APC [22]。Native PAGE 和 IEF 鉴定显示 3 种 APC 均为单一条带, 证明蛋白纯度较高。

2.2 Se-APCs 分子量与亚基组成

3 种纯化 Se-APC 在 Native PAGE 中的迁移位置与 140kDa 蛋白标准接近 (图 1-A), 进一步用凝胶过滤方法测定它们的分子量分别为 130.9、98.1 和 106.30kDa (图 1-C)。由于 Native PAGE 主要用于分析蛋白质的均一性, 不太适用于测定蛋白质分子量, 所以与凝胶过滤测得的分子量存在较大差异。SDS-PAGE (图 1-B) 显示提取纯化的 Se-APC I, II 和 III 均含有 α 、 β 亚基, 其相对分子量分别为 18.3kDa 和 15.7kDa, 其中 Se-APC I 还存在明显的 γ (32kDa) 亚基, 采用常规 SDS-PAGE 分析未观察到 APC III 所含低分子量 (8 ~ 10kDa) 连接肽 L^c 。根据所测定的完整蛋白质及其亚基的分子量, 表明 3 种纯化 Se-APC 的分子大小与 $(\alpha\beta)_3$ 聚体吻合, 其中 Se-APC I 可能为 $(\alpha\beta)_3\gamma$, Se-APC III 则可能是 $(\alpha\beta)_3L^c$ 。利用超薄 IEF 检测 3 种 Se-APC 的 pI 值分别为 4.76、4.85 和 5.02 (图 2-A, B)。

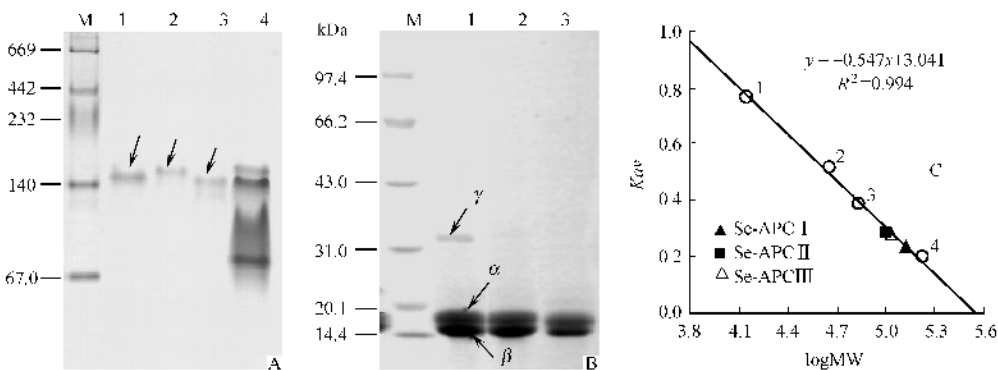


图 1 纯化 Se-APCs 的电泳鉴定和分子量测定

Fig. 1 Purified Se-APCs were analyzed by (A) Native PAGE and (B) SDS-PAGE, their molecular weight was detected on Sephadex G-200 column (C). Lane 1, 2 and 3 in A and B was Se-APC I, II, III respectively, Lane 4 was phycobilisome (PBS). MP contains molecular mass (kDa) markers listed at left side. Molecular weight (MW) standard curve on Sephadex G 200 column was shown in C [○, for standards of 1, Ribonuclease (13.7kDa); 2, Egg albumin (45kDa); 3, Bovine serum albumin (67kDa) and 4, Gamma γ -globulin (165kDa)].

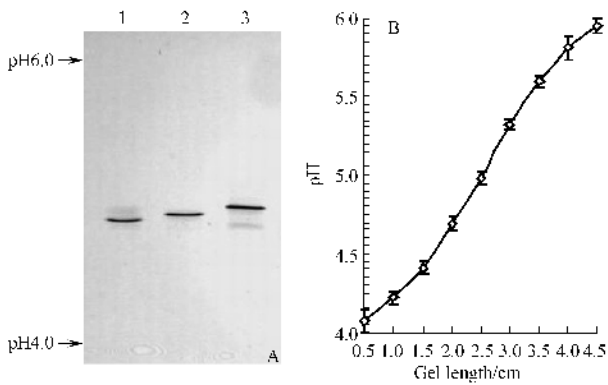


图2 纯化 Se-APCs 的 IEF 图及其等电点测定

Fig.2 IEF pattern of purified Se-APCs(A) and determination of their pI values(B).

2.3 Se-APCs 的光谱性质

吸收光谱(图3-A)显示纯化的3种 Se-APCs 的最大特征吸收峰分别位于 648、650 和 651nm,其中 Se-APC I 在 668nm 处明显有一肩峰,与 Zilinskas 等^[18]发现 APC I 在 668nm 长波处具有吸收的结果一致。与 Se-APC I 和 Se-APC II 相比,Se-APC III 的半峰宽较大,和 APC III 的光谱解叠结果^[19]一致,APC III 带有连接蛋白,因而解叠出 2 个组份(612nm 和 650nm),表现出平缓的峰形和较大的半峰宽。相应地 3 种 Se-APCs 荧光发射光谱(图3-B)显示,APC II 和 APC III 的最大荧光发射分别位于 659 和 660nm,而 APC I 则位于 672nm,相差 12nm 正好与 APC I 长波吸收光谱吻合。

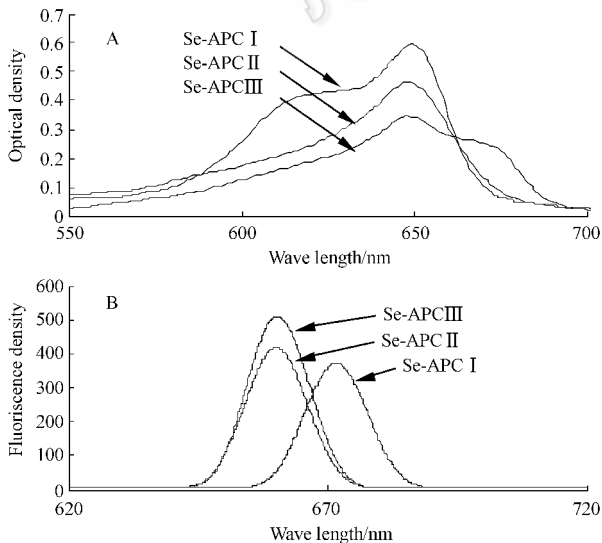


图3 纯化 Se-APCs 的吸收光谱及荧光发射光谱

Fig.3 Absorption spectra(A) and fluorescence emission spectra(B) of purified Se-APCs.

2.4 Se-APCs 的硒含量

图4可见,纯化的 Se-APC I、II 和 III 蛋白中含

硒量分别为 316、273 和 408 $\mu\text{g/g}$ 。经 0.5mol/L KSCN 处理后, $(\alpha\beta)_3$ 解聚为单体,其中硒含量降低约 25%。进一步用 β -巯基乙醇和 SDS 进行变性处理(60 $^\circ\text{C}$ 加热 20min),使 $(\alpha\beta)$ 单体解离为亚基,蛋白质中硒含量以及硒与 APC 摩尔比值均进一步降低且趋于稳定,完全变性蛋白质中的平均硒含量为 132 $\mu\text{g/g}$ 。

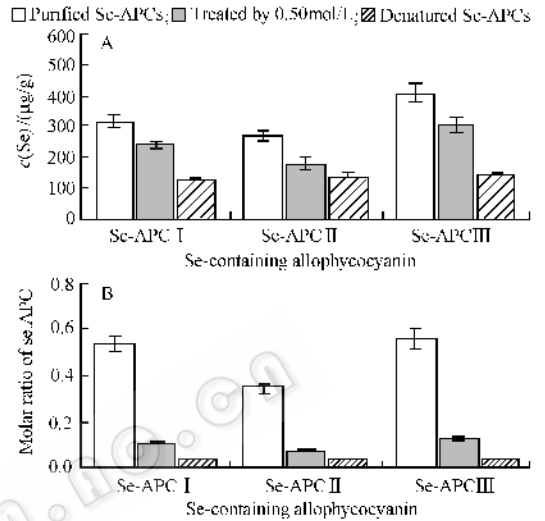


图4 纯化 Se-APCs 及其解聚和变性后的硒含量

Fig.4 Se content of native Se-APCs and effect of de-aggregation or denaturation treatments on it. A Se content in protein; B Molar ratio of Se:APC.

3 讨论

一般认为,APC 可分为 I, B, II 和 III,相对含量大约为:APC I 15%~20%、APC II 40%~50%、APC III 40%~45%、APB 估计小于 2%^[14,19],最大吸收光谱位于 648~650nm。Zilinskas 等^[18]发现 APC I 和 B 在 668 和 679nm 长波处具有吸收,而 APC II 和 III 则没有,这可能是引起 APC II 和 III 与 APC I 相比最大荧光发射相差 10~20nm 的原因。本实验从 Se-SP 中纯化获得 3 种高纯度 Se-APC,其光谱特性分别与 APC I, II 和 III 基本吻合。已报道的螺旋藻 APC 都是由 α 、 β 两种亚基组成,形成 $(\alpha\beta)_3$ 和 $(\alpha\beta)_6$,但藻体中 APC 异聚体呈现多态性,如 *Cyanidium caldarium* 的 APC I 由 α (18kDa)、 β (17kDa) 和 γ (35kDa) 3 个亚基构成,而 APC-B 由 16.1 和 15.3kDa 的 2 个亚基构成^[20]; *Myxosarcina concinna* 含有 3 种 APC,分别由 α (22.3)、 α (19.5)、 β (17.4)、 β (15.7) 和 β (15.1) 及 4 种连接肽 I (13.8)、I (11.3)、I (9.5) 和 I (8.3) 构成不同的异聚体^[15]; *Porphyra yezoensis* APC 由于亚基构成及堆叠方式的变化引起发色团与其它肽链间相互

作用改变,进而影响能量传递^[21]。通过电泳分析和分子量测定表明3种高纯度的Se-APC的分子大小与 $(\alpha\beta)_3$ 聚体基本一致,其中Se-APC I因含有 γ 亚基导致分子量较大,Se-APC II不含有其它连接肽而分子量最小,Se-APC III分子量比Se-APC II大8.2kDa,则可能因为结合有连接肽LC。

富硒螺旋藻培养及硒的形态和分布研究表明^[6],硒的有机化作用主要形成含硒蛋白质。硒对藻细胞生长具有双重性,硒的毒性抑制或生长促进作用机制及靶分子还有待阐明,从硒的化学性质推测,硒的结合可能对藻胆体的光能传递及转换产生影响。本实验提取纯化的Se-APC I, II和III的生化特性及其光谱行为与以往文献报道相似,说明APC中掺入微量硒可能对其结构和能量传递无明显影响。

尽管在原核生物和动物体内已相继发现几十种硒蛋白(Selenoprotein)^[3],但植物体内还未能普遍确定硒蛋白基因的存在及相应的调控元件,推测其中硒的结合形式可能有:硒代蛋氨酸随机插入、-S-Se-S-、硒代胱氨酸及非共价结合等。本文对3种含硒别藻蓝蛋白复合体中硒含量及硒的结合稳定性进行了检测。按照MacColl等^[22]报道的方法,采用0.5mol/L NaSCN将APC由 $(\alpha\beta)_3$ 聚体解聚为 $(\alpha\beta)$ 单体,用10mmol/L β -巯基乙醇和1% SDS处理使之完全变性还原为亚基,结合超滤方法去除游离硒,证明APC亚基可稳定结合少量硒,可能以硒代氨基酸共价形式结合,而多聚体则可能通过多种方式结合硒,表现出不稳定性。有关Se-APC的生物活性及其中硒的确切结合形式还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Hayashi O, Katoh T, Okuwaki Y. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina*. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1994, **40**: 431 - 441.
- [2] Ramirez D, Fernandez V, Tapia G, et al. Influence of C-phycoerythrin on hepatocellular parameters related to liver oxidative stress and Kupffer cell functioning. *Inflam Res*, 2002, **51**: 351 - 356.
- [3] 黄 峙, 向军俭, 郭宝江. 硒酶及硒化合物生理功能研究的新进展. *生理科学进展*, 2001, **32**(4): 293 - 297.
- [4] Pickering IJ, Prince RC, Salt DE, et al. Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 10717 - 10722.
- [5] Mosulishvili LM, Kirkesali EI, Belokobylsky AI, et al. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, **30**: 87 - 97.
- [6] Li ZY, Guo SY, Li L. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresour Technol*, 2003, **89**: 171 - 176.
- [7] 黄 峙, 郑文杰, 郭宝江. 钝顶螺旋藻富硒培养条件的优化. *生物工程学报*, 2002, **18**(3): 373 - 376.
- [8] 李乐农, 江 涛, 张季平, 等. 富硒螺旋藻中含硒藻蓝蛋白的纯化、结晶及初步晶体学研究. *中国科学(C辑)*, 2000, **30**(5): 449 - 455.
- [9] 黄 峙, 郑文杰, 杨 芳, 等. 含硒藻蓝蛋白抗小鼠实验性肝损伤的作用. *中国病理生理杂志*, 2002, **18**(7): 819 - 822.
- [10] Cases J, Wysocka IA, Caporiccio B, et al. Assessment of selenium bioavailability from high-selenium *Spirulina subfractions* in selenium-deficient rats. *J Agric Food Chem*, 2002, **50**: 3867 - 3873.
- [11] Shih SR, Tsai KN, Li YS, et al. Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J Med Virol*, 2003, **70**: 119 - 125.
- [12] Gantt E, Lipschultz CA. Structure and phycobiliprotein composition of phycobilisomes from *Griffithsia pacifica* (*Rhodophyceae*). *Journal of Phycology*, 1980, **16**: 394 - 398.
- [13] Breje K, Ficner R, Huber R, et al. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, 1995, **249**: 424 - 440.
- [14] Troxler RF, Greenwald LS, Zilinskas BA. Allophycocyanin from *Nostoc* sp. phycobilisomes. Properties and amino acid sequence at the NH₂ terminus of the alpha and beta subunits of allophycocyanins I, II, and III. *J Biol Chem*, 1980, **255**: 9380 - 9387.
- [15] Sun L, Wang S. Allophycocyanin complexes from the phycobilisome of a thermophilic blue-green alga *Myxosarcina concinna* Printz. *J Photochem Photobiol B*, 2003, **72**: 45 - 53.
- [16] 郭尧君. 蛋白质电泳技术手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001, 54 - 173.
- [17] 李丹彤, 崔铁军, 马国庆, 等. 孔石莼凝集素的分离纯化及性质的研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **16**(6): 773 - 778.
- [18] Zilinskas BA, Greenwald LS, Bailey CL, et al. Spectral analysis of allophycocyanin I, II, III and B from *Nostoc* sp. phycobilisomes. *Biochim Biophys Acta*, 1980, **592**: 267 - 276.
- [19] 王 慧, 赵井泉, 杨紫萱, 等. 藻胆体核心复合物结构与功能的研究(II). *高等学校化学学报*, 1997, **18**(9): 1517 - 1522.
- [20] Brown AS, Troxler RF. Properties and N-terminal sequence of allophycocyanin from the unicellular rhodophyte *Cyanidium caldarium*. *Biochem J*, 1977, **163**: 571 - 578.
- [21] Liu JY, Jiang T, Zhang JP, et al. Crystal structure of allophycocyanin from red algae *Porphyra yezoensis* at 2.2-Å resolution. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 16945 - 16952.
- [22] MacColl R, Eisele LE, Menikh A. Allophycocyanin: trimers, monomers, subunits, and homodimers. *Biopolymers*, 2003, **72**: 352 - 365.

Purification and properties of Se-containing allophycocyanins from selenium rich *Spirulina platensis*

HUANG Zhi* ,YANG Fang ,ZHENG Wen-jie

(College of Life Science and Technology , Jinan University , Guangzhou 510632 , China)

Abstract : Three Se-containing allophycocyanins (Se-APC) with high purity were purified from Se rich *Spirulina platensis* (Se-sp.) by hydroxyapatite chromatography , DEAE-52 anion-exchange chromatography and native gel preparative electrophoresis. Their biochemical properties were explored by spectral scanning and electrophoresis analysis of Native-PAGE , SDS-PAGE and IEF on thin slab gel. Protein molecular weight (MW) of APC aggregation was determined by gel filter on Sephadex G-200 column. Se content of native and denatured Se-APC was detected by 2 ,3-DAN fluorescence method. According to visible and fluorescence spectral character , three purified fractions of APC were identified to be APCI , APCII and APCIII. Native-PAGE and SDS-PAGE analysis revealed that they all shaped trimer ($\alpha\beta\beta$) of α and β subunit with molecular mass of 18.3kDa and 15.7kDa , whereas APCI contains γ subunit (about 32kDa) visibly and APCIII maybe contain the linker peptide of L^C (8 ~ 10kDa) based on their MW to be determined of 130.9 , 98.1 and 106.30kDa. IEF detection showed that the pI of Se-APCs was 4.76 , 4.85 and 5.02 respectively. Se content of three purified Se-APCs were 316 , 273 and 408 μ g/g , which decreased about 25% after deaggregation treatment by 0.50mol/L NaSCN and decreased more than 50% after denaturation treatment by 2-mercaptoethanol and reached to a steady content of 132 μ g/g on average. These results indicated that Se incorporation into APC had no influence on function of energy transfer as well as biochemical property of APCs , and Se binding with APCs was highly relevant to its aggregation states whereas Se integrated steadily with its subunits.

Keywords : *Spirulina platensis* ; Selenium ; Allophycocyanin

Foundation item : Key Project of Guangdong Province Natural Science Foundation (05103295 , 039213)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-20-85220219 ; E-mail : thsh@jnu.edu.cn

Received : 2 September 2005/Accepted : 20 January 2006/Revised : 7 February 2006