

异型双功能交联剂 SPDP 对 C-藻蓝蛋白的光谱影响

颜世敢^{1,3}, 陈秀兰¹, 张熙颖¹, 周百成^{1,2}, 张玉忠^{1*}

1. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100
2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071
3. 山东省动物疫病防治与育种重点实验室, 山东 济南 250100

摘要 一步阴离子交换层析法由钝顶螺旋藻中高效制备高纯度的 G 藻蓝蛋白, 纯化的 G 藻蓝蛋白最大吸收峰位于 620 nm, 室温最大荧光发射峰位于 640 nm。用异型双功能交联剂 SPDP 对 G 藻蓝蛋白进行蛋白质交联, 不同摩尔比的 SPDP 对 G 藻蓝蛋白溶液的吸收光谱和室温荧光发射光谱有显著影响。随着 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比的增加, G 藻蓝蛋白的吸光度和相对荧光强度均不同程度降低, 且室温荧光发射峰由 640 nm 蓝移至 630 nm。光谱研究结果表明用 SPDP 对 G 藻蓝蛋白进行蛋白质交联时 SPDP/G 藻蓝蛋白的摩尔比应小于 100, 否则荧光强度和荧光特性将发生显著改变。

关键词 G 藻蓝蛋白; SPDP; 光谱

中图分类号: Q586 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)05-1115-03

引言

G 藻蓝蛋白(G phycocyanin, G PC)是一种存在于蓝藻中的主要的捕光色素蛋白, 以($\alpha\beta$)₃或($\alpha\beta$)₆形式存在。G 藻蓝蛋白具有安全无毒、水溶性大、色泽鲜艳、荧光明亮的特性及抗氧化、抗疲劳、抑瘤、增强免疫等多种生物学活性, 被广泛用作食品和化妆品的色素、荧光检测试剂及药物(如抗氧化剂、示踪剂、光敏治疗剂、免疫增强剂等)。由于具有与其他合成的荧光染料明显不同的特性, 如无毒性、水溶性大、性质稳定、摩尔消光系数大、荧光量子产率高、表面活性基团多、易于交联等特征, 使包括 G 藻蓝蛋白在内的所有的藻胆蛋白成为优良的荧光染料, 国外已经将其开发成商品化的荧光检测试剂, 用于荧光免疫分析^[1]。藻胆蛋白用于荧光检测时要先借助化学交联剂将其与抗体、生物素、抗毒素等生物大分子交联成荧光探针, 才能用于荧光免疫分析。

N-琥珀酰亚胺 3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(3-(2-Pyridylthio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester, SPDP)是一种常用的异型双功能交联剂, 自 1978 年合成以来被广泛用于蛋白质的不同基团之间的交联^[2]。SPDP 先在蛋白质分子的游离氨基上引入吡啶二硫基, 然后再与另一含巯基蛋白质分子形成二硫键, 或者衍生的吡啶二硫基在二硫苏糖醇

DTT 的还原下产生巯基, 再通过巯基交换反应或巯基加成反应与另一个蛋白质分子交联, 产生异二聚物蛋白质。以 SPDP 为交联剂进行的蛋白质化学交联的优势在于: SPDP 不破坏生物大分子自身的二硫键, 能有效避免生物大分子的生物学活性损失; SPDP 为异型双功能交联剂, 能避免分子内和同种分子间的基团交联, 提高交联效率和交联质量; SPDP 衍生的吡啶二硫基在 343 nm 处有吸光度, 能够方便地测定其含量, 从而实现定量交联。

使用交联剂 SPDP 在 G 藻蓝蛋白上引入吡啶二硫基, 在一定的 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比范围内, 吡啶二硫基的引入数量与 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比成正比。但 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比对 G 藻蓝蛋白的光谱特性有无影响, 至今尚无报道。本文以光谱为表征, 首次报道了 SPDP/G 藻蓝蛋白的摩尔比对 G 藻蓝蛋白的光谱性质影响。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

紫外-可见分光光度计, 型号 U V/V is-550(日本 Jasco 公司); 荧光光度计, 型号 FP 5000(日本 Jasco 公司); SPDP, 分析纯(购自美国 Sigma 公司); 其他试剂均为国产分析纯(购自化学试剂公司)。

收稿日期: 2008-01-10, 修订日期: 2008-03-06

基金项目: 国家高新技术研究与发展规划资助项目(2008AA09Z404), 国家自然科学基金项目(40676078)和山东省科技发展计划项目(2006GG2205009)资助

作者简介: 颜世敢, 1971 年生, 山东省农科院副研究员, 山东大学生命科学院博士研究生 e-mail: yanshigan@yahoo.com.cn

* 通讯联系人 e-mail: zhangyz@sdu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 试验方法

1.2.1 G 藻蓝蛋白的制备

参照本实验室已经建立的藻胆蛋白纯化方法并进行改进^[3]。将新鲜钝顶螺旋藻细胞溶于少量 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸醋酸钠缓冲液(pH 5.8)中,反复冻溶进行细胞破壁,然后高速离心,去除细胞碎片,收集上清液,用 20% 和 60% 饱和度的硫酸铵分级沉淀,沉淀重新悬浮于 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸醋酸钠缓冲液(pH 5.8)中,并用同样的缓冲液透析,得到 G 藻蓝蛋白粗提液。G 藻蓝蛋白粗提液经一步阴离子交换层析 DEAE Sepharose Fast Flow 纯化,用含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸醋酸钠缓冲液(pH 5.8~3.6) pH 梯度洗脱法即可制备出大量高纯度的 G 藻蓝蛋白。

1.2.2 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比对 G 藻蓝蛋白的光谱影响

高纯度的 G 藻蓝蛋白经 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.5 PBS 透析,按文献报道的公式计算浓度并调整浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[4]。SPDP 用 DMSO 溶解,配成不同摩尔浓度的母液。在每个 Eppendorf 管中加入 G 藻蓝蛋白溶液 500 μL ,然后分别缓慢加入 20 μL 不同摩尔浓度的 SPDP 溶液,使 SPDP/G 藻蓝蛋白的摩尔比分别为 20, 50, 100, 150, 200, 300,充分混匀,置 25°C 摇床中振荡作用 1.5 h,取出,用 Millipore 超滤离心管超滤去除多余的 SPDP,然后用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.5 PBS 稀释 20 倍,测定各管 G 藻蓝蛋白溶液的吸收光谱和室温荧光发射光谱。

1.2.3 G 藻蓝蛋白溶液的光谱测定

在紫外-可见分光光度计和荧光光度计上分别测定 G 藻蓝蛋白溶液的吸收光谱和室温荧光发射光谱。测定吸收光谱时使用光径为 10mm 的微量比色皿,扫描波长区间为 250~700 nm,带宽为 0.5 nm。测定室温荧光发射光谱时的激发波长为 580 nm,扫描波长区间为 600~700 nm,带宽为 3 nm,灵敏度为中等。

2 试验结果与讨论

2.1 G 藻蓝蛋白的光谱特性

纯化的 G 藻蓝蛋白为单峰型藻蓝蛋白,纯度指数 A_{618}/A_{280} 达 4.8,高于分析纯级别的藻胆蛋白的可见光最大吸收值与 280 nm 吸收值的比值为 4 的标准^[5]。纯化的 G 藻蓝蛋白溶液的最大吸收峰位于 620 nm。用 580 nm 波长的激发光激发时,纯化的 G 藻蓝蛋白溶液只产生一个荧光发射峰,室温最大荧光发射峰位于 640 nm。

2.2 SPDP 对 G 藻蓝蛋白溶液吸收光谱的影响

G 藻蓝蛋白溶液在 SPDP 的作用下吸收光谱发生改变。随着 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比的增加,G 藻蓝蛋白溶液的蓝色逐渐变淡,最大吸光度逐渐降低,最大吸收峰发生蓝移,同时在 343 和 280 nm 处的吸光度却随着 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比的增加而升高。

随着 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比的增加,G 藻蓝蛋白溶液的蓝色逐渐变淡,当 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比大于 300 时,G 藻蓝蛋白溶液蓝色基本消失,溶液变性沉淀。随着 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比的增加,G 藻蓝蛋白溶液的最大吸光度逐

渐降低。SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比为 100 时,G 藻蓝蛋白溶液的最大吸光度仅为空白对照的 44.7%; SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比为 300 时,最大吸光度仅为空白对照的 8.9%。另外,当 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比大于等于 100 时,G 藻蓝蛋白溶液的最大吸收峰发生蓝移,由原来的 620 nm 蓝移至 610 nm。试验结果见图 1。

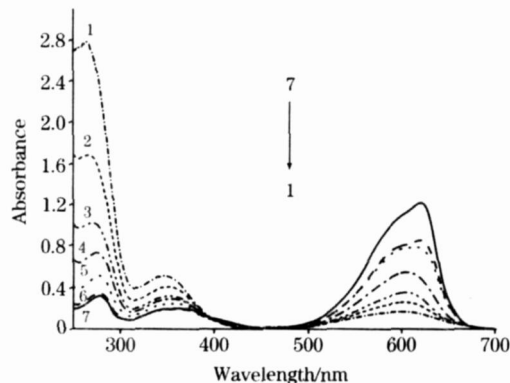


Fig 1 Absorption spectral change of G phycocyanin which was added into different molar ratios of SPDP

1: 0; 2: 20; 3: 50; 4: 100; 5: 150; 6: 200; 7: 300

2.3 SPDP 对 G 藻蓝蛋白荧光发射光谱影响

SPDP 对 G 藻蓝蛋白的荧光强度影响较大。随着 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比的增加,G 藻蓝蛋白溶液的相对荧光强度降低,荧光发射峰蓝移。SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比为 50 时,G 藻蓝蛋白的荧光强度为对照的 38.5%; SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比为 100 时,G 藻蓝蛋白的荧光强度仅为对照的 23.6%,并且室温荧光发射峰由原来的 640 nm 蓝移至 630 nm(见图 2)。荧光发射峰蓝移的可能原因是 G 藻蓝蛋白溶液在高浓度化学试剂 SPDP 作用下构型发生变化,由 $(\alpha\beta)_3$ 降解为 $(\alpha\beta)$ 单体,因而荧光光谱也随之改变^[6]。在一定的 pH、离子强度、温度范围内,藻胆蛋白的结构和性质能保持相对稳定^[7]。但藻胆蛋白是蛋白质,对化学试剂比较敏感。本课题组曾报道过表面活性剂 CHAPS 对藻胆蛋白的天然存在模式-藻胆体的荧光光谱的影响^[8]。因此在使用 G 藻蓝蛋白作为荧光染料进行荧光标记时不能片面追求交联得率而忽视了

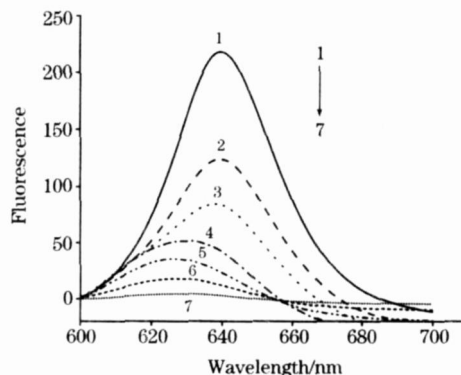


Fig 2 Fluorescence emission spectral change of G phycocyanin which was added into different molar ratios of SPDP

1: 0; 2: 20; 3: 50; 4: 100; 5: 150; 6: 200; 7: 300

G 藻蓝蛋白的光谱性质变化。从荧光光谱变化可以看出, 为避免 G 藻蓝蛋白的荧光强度损失过大和荧光发射光谱蓝移,

使用 SPDP 对 G 藻蓝蛋白进行交联时 SPDP/G 藻蓝蛋白摩尔比应小于 100。

参 考 文 献

- [1] Glazer A N. Journal of Applied Pycology, 1994, 6(2): 105.
- [2] Carlsson J, Drevin H, Axen R. Biochemical Journal, 1978, 173(3): 723.
- [3] Liu Luning, Chen Xiulan, Zhang Xiyang, et al. Journal of Biotechnology, 2005, 116: 91.
- [4] Bennett A, Bogorad L. Journal of Cell Biology, 1973, 58(2): 419.
- [5] Siegelman H W, Kycia J H, in Hellebust J A, Craigie J S(Editors). Handbook of Phycological Method, Cambridge University Press, 1978. 71.
- [6] Padgett M P, Krogmann D W. Photosynthesis Research, 1987, 11: 225.
- [7] Galland Irmouli A V, Pons L, Lucon M, et al. Journal of Chromatography B, 2000, 739: 117.
- [8] ZHANG Xiying, LIU Lirning, CHEN Xiulan, et al(张熙颖, 刘鲁宁, 陈秀兰, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(10): 1224.

Spectral Changes of G Phycocyanin with Different Molar Ratios of SPDP

YAN Shir gan^{1, 3}, CHEN Xiulan¹, ZHANG Xiying¹, ZHOU Baicheng^{1, 2}, ZHANG Yurzhong^{1*}

1. State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Ji nan 250100, China

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

3. Shandong Key Lab of Animal Disease Control and Breeding, Ji nan 250100, China

Abstract Pure G phycocyanin was prepared from *Spirulina platensis* using one step anion exchange chromatography. The G-PC obtained was with an absorption maximum at 620 nm and a fluorescence emission maximum at 640 nm when excited by 580 nm. SPDP is an excellent heterobifunctional crosslinker for thiolating amines. Different molar ratios of SPDP have remarkable influence on the absorption and fluorescence spectra of G phycocyanin. The absorption maximum and fluorescence emission maximum both decreased and blue shifted from 640 nm to 630 nm as the molar ratios of SPDP increased. It was found that the molar ratios of SPDP to G phycocyanin was not more than 100 was appropriate to being conjugated with other biomolecules from the absorption and fluorescence spectra of G phycocyanin.

Keywords G phycocyanin; SPDP; Spectrum

(Received Jan. 10, 2008; accepted Mar. 6, 2008)

* Corresponding author