



高碘酸钠和戊二醛交联法构建的 R-藻红蛋白-C-藻蓝蛋白交联物能量传递效率的比较研究*

王广策** 马圣媛 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 从单细胞蓝藻钝顶螺旋藻中纯化 C-藻蓝蛋白, 从海洋红藻多管藻纯化 R-藻红蛋白. 分别用高碘酸钠氧化法和戊二醛法将二者共价连接为 R-藻红蛋白-C-藻蓝蛋白交联物, 再用 Sephadex G-200 柱层析纯化. 光谱分析表明, 用两种方法构建的共价交联物都可以将激发能从 R-藻红蛋白传递到 C-藻蓝蛋白. 二者相比, 高碘酸钠氧化法构建的共价交联物的能量传递效率更高.

关键词 R-藻红蛋白, C-藻蓝蛋白, 高碘酸钠氧化交联法, 戊二醛交联法, 共价交联物, 光谱分析, 传能效率

学科分类号 Q513⁺.4

藻胆蛋白主要分布在蓝藻、红藻、隐藻和少量甲藻中, 是一类具有强烈荧光的水溶性色素蛋白. 藻胆蛋白可分为 4 种: 藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白^[1].

藻胆蛋白因其具有强烈的荧光, 已作为荧光探针广泛应用于医学诊断、免疫学和分子生物学等方面, 国外一些公司 (Sigma 公司) 已有相关产品出售, 售价极高. 藻胆蛋白种类很多, 斯托克 (Stocks) 位移大, 共价交联物之间存在能量传递, 可对细胞表面做多色分析^[2]. 藻胆蛋白作为荧光探针用于细胞多色分析的关键在于, 构建具有很高激发能传递效率的藻胆蛋白共价交联物, 所以选择合适的交联剂及改进交联方法意义重大.

蛋白质的交联方法很多, 常见的有 N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫) 丙酸酯 (SPDP)^[3] 和戊二醛 (GA) 法等^[4]. 异型双功能交联剂 SPDP 能够于蛋白质分子中引入巯基, 然后利用巯基交换反应或者巯基加成反应与另一分子交联. 同型双功能剂 GA 的两个醛基可以分别与两个相同或不同的藻胆蛋白分子的 ϵ -氨基反应, 形成 Schiff's 碱, 将两分子以五碳链的桥连接起来^[5]. 高碘酸钠氧化法通常用于制备酶标抗体, 如辣根过氧化物酶, 其原理为, 含糖基化合物分子中的邻二醇结构可被高碘酸钠氧化为醛基, 然后与蛋白质分子中的氨基形成 Schiff's 碱^[5].

本研究分别采用高碘酸钠氧化法和戊二醛法, 将多管藻 R-藻红蛋白 (RPE) 和钝顶螺旋藻 C-藻蓝

蛋白 (CPC) 共价交联在一起, 形成共价交联物, 并比较了用两种方法构建共价交联物的激发能传递效率.

1 材料和方法

1.1 材料

多管藻采自青岛汇龙湾, 螺旋藻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 [6], 鉴定和浓度计算根据文献 [7].

1.3 戊二醛法交联物 RPE-CPC 的纯化

R-藻红蛋白和 C-藻蓝蛋白的戊二醛交联法参考文献 [8]: 将 RPE 和 CPC 分别溶解在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中 (pH 6.8). 取 0.40 ml RPE (6.78 mg) 和 0.40 ml CPC (6.59 mg) 混合均匀, 逐滴加至 0.40 ml 的 0.2% 戊二醛溶液 (0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.8) 中, 避光搅拌 18 h, 然后在 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 中透析除去戊二醛. 同时, 另取相同体积的 RPE 和 CPC, 以 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.8) 代替戊二醛, 作为对比, 操作步骤同上.

* 国家自然科学基金资助项目 (30250003) 和中国科学院海洋研究所前沿方向性资助项目 (L52022802).

** 通讯联系人.

Tel: 0532-2898574, E-mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003-09-04, 接受日期: 2003-10-28

RPE-CPC 的纯化使用 Sephadex G-200 凝胶过滤 (70 cm×1.6 cm), 以 0.001 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.8, 0.2 mol/L NaCl) 平衡和洗脱。

1.4 高碘酸钠氧化法制备 RPE-CPC

RPE 和 CPC 的高碘酸钠氧化法交联参考文献 [5], 具体操作见文献 [7]。

检测交联情况和交联物纯化方法同 1.3。

1.5 两种交联法构建的交联体传能效率的比较

采用荧光发射光谱的方法, 激发光为 498 nm, 比较 CPC 和 RPE 特征荧光发射峰的比值。

2 结 果

2.1 分离的藻胆蛋白特性鉴定

RPE 和 CPC 的吸收光谱和荧光发射光谱见图 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 的特征吸收峰只有一个, 位于 620 nm 附近, 荧光发射峰约处于 645 nm。这与文献 [6] 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 g/L 和 16.47 g/L。

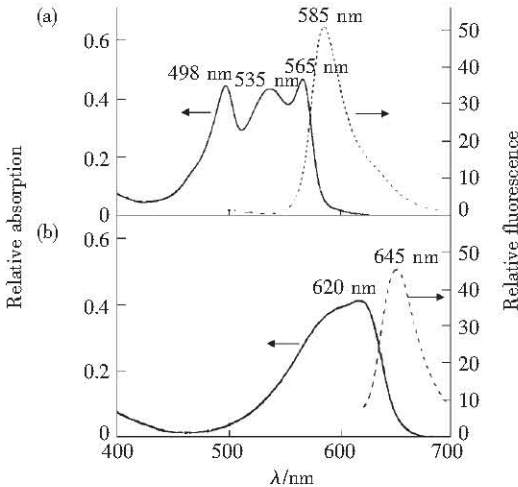


Fig. 1 Absorption and fluorescence emission spectra of the RPE (a) and the CPC (b)

——: Absorption spectra; - - -: Fluorescence emission spectra.

2.2 戊二醛交联法构建的 RPE-CPC 的光谱检测

戊二醛交联反应的吸收光谱见图 2, 反应前后 RPE 和 CPC 吸收峰的位置和峰形变化不明显, 如反应后 RPE 的 3 个特征吸收峰 $A_{565}:A_{535}:A_{498}$ 的比值由反应前的 1.26:1.08:1.00 变为 1.20:1.07:1.00,

纯化后变为 1.25:1.06:1.00, 说明戊二醛交联对藻胆蛋白的结构影响很少。

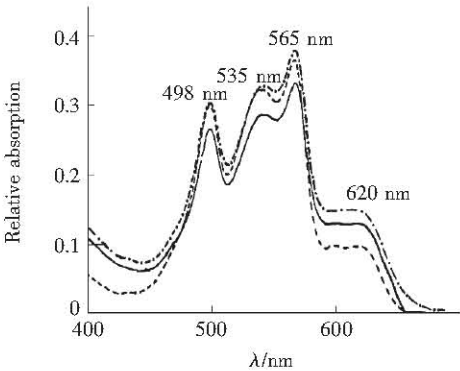


Fig. 2 Absorption spectra of the conjugate of the RPE and the CPC with glutaraldehyde

——: Mixture of RPE and CPC as control; - - -: Reaction of the conjugate of RPE and CPC with glutaraldehyde; · — ·: The purified conjugate of RPE and CPC with glutaraldehyde.

戊二醛交联液的荧光发射光谱见图 3, 交联液和对照相比, 650 nm 附近出现了明显的 CPC 发射峰, 而 585 nm 附近 RPE 的发射峰明显降低, 650 nm 和 585 nm 处的荧光强度比值从反应前的 0.11 上升到 0.60; 交联物经过 Sephadex G-200 柱层析纯化后比值为 0.62。这些说明了 RPE 和 CPC 的共价交联是成功的, 而且在交联体中激发能可以从 RPE 传到 CPC。

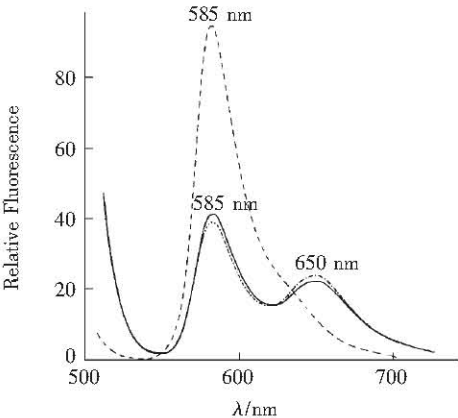


Fig. 3 Fluorescence spectra of the conjugate of the RPE and the CPC with glutaraldehyde

- - -: Mixture of RPE and CPC as control; ——: Reaction of the conjugate of RPE and CPC with glutaraldehyde; · — ·: The purified conjugate of RPE and CPC with glutaraldehyde.

2.3 两种交联方法构建 RPE-CPC 传能的比较

高碘酸钠氧化法交联反应的吸收光谱和戊二醛交联反应相比, 变化很大 (图 4). 主要表现在 RPE 3 个特征吸收峰的比值 $A_{565} : A_{535} : A_{498}$ 由 1.28:1.09:1.00 变为 0.09:1.03:1.00, 纯化后 RPE 的特征峰则完全消失, 600 nm 处出现了新的峰值. 这可以说明高碘酸钠交联 RPE 和 CPC 时, 对藻胆蛋白的结构影响较大.

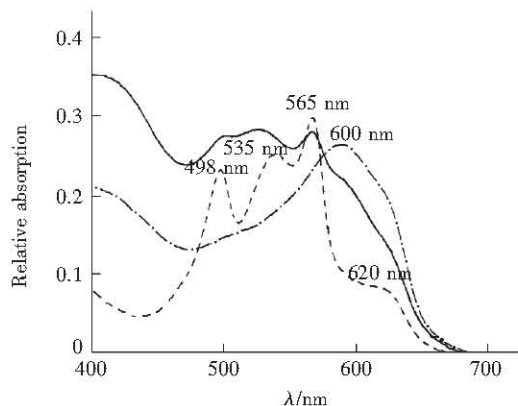


Fig. 4 Absorption spectra of the conjugate of the RPE and the CPC with sodium periodate

---: Mixture of RPE and CPC as control; —: Reaction of the conjugate of RPE and CPC with sodium periodate; ···: The purified conjugate of RPE and CPC with sodium periodate.

荧光发射光谱中, 650 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, 进而证明共价交联体 RPE-CPC 的生成. RPE-CPC 纯化后 585 nm 附近的峰蓝移到 575 nm 附近, 而 640 nm 附近出现了明显的发射峰, 与 575 nm 发射峰的比例为 1.29. 这证明 RPE 和 CPC 交联成功, 而且交联体内从 RPE 到 CPC 的能量传递效率较高^[7].

图 5 表明两种交联产物的传能效率, 戊二醛交联的共价交联体荧光发射峰位于 650 nm 和 585 nm 附近, 二者的比例约为 0.62; 高碘酸钠氧化法交联的 RPE-CPC 的荧光发射光谱位于 640 nm 和 575 nm 附近, 分别较前者蓝移约 10 nm, 而且二者比例约为 1.29. 很明显, 高碘酸钠作交联剂制备的共价体中 RPE 可十分有效地将能量传递给 CPC, 所以其传能效率远远高于戊二醛交联的 RPE-CPC.

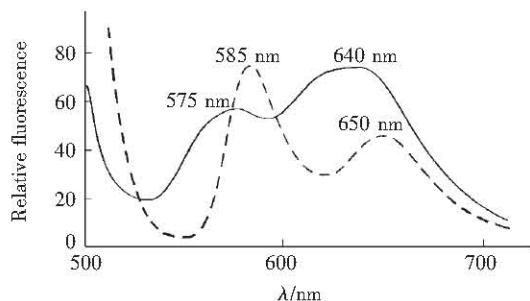


Fig. 5 Absorption and fluorescence spectra of the conjugate of the RPE and the CPC with both sodium periodate and glutaraldehyde

---: Purified conjugate of RPE-CPC with sodium periodate;
—: Purified conjugate of RPE-CPC with glutaraldehyde.

3 讨 论

本研究以戊二醛作为交联剂, 交联 RPE 和 CPC, 所采用的是步混合交联法. 该方法操作简单方便, 但理论上认为交联剂和不同分子表面活性基团反应速率不同, 容易形成同种蛋白质交联, 所以反应中除目的交联物 RPE-CPC 外, 还有各种不同的副交联物, 如 RPE-RPE, CPC-CPC, 甚至还会有 3 个以上蛋白质的聚合体, 反应不均一. 而高碘酸钠氧化法采用的是两步法, 首先 RPE 分子中的邻二醇与高碘酸钠反应生成醛基衍生物, 除去过量的氧化剂后再与 CPC 分子中的氨基生成 Schiff's 碱, 再以硼氢化钠还原 Schiff's 碱形成稳定的单键, 这样不但减少了同种分子之间交联的几率, 增加反应的均一性, 使得目标交联物较高, 而且得到的交联物比戊二醛交联法更稳定.

蛋白质交联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. 交联剂往往会对目标蛋白结构有一定的破坏, 不同的交联方法对目标蛋白的结构与功能也有不同的影响. 由于 RPE 和 CPC 均具有一些重要的光谱特征, 通过构建二者的共价交联体, 可以非常方便地比较两种不同的交联方法对交联体结构和功能的影响: a. 两种交联方法对蛋白质结构的影响. 实验中发现戊二醛对藻胆蛋白的吸收光谱影响甚微, 荧光发射光谱变化也不大, 可见戊二醛作为交联剂性质温和. 相比之下, 高碘酸钠对藻胆蛋白的结构有较大的影响, 如藻胆蛋白的吸收光谱交联前后差异明显, 而且特征

荧光发射峰也蓝移 10 nm 左右。b. 比较两种交联方法得到的交联物的能量传递效率。实验结果证明, 高碘酸钠氧化法得到的交联物, 传能效率远远高于戊二醛一步法得到的共价体。Wang 等^[9]曾采用戊二醛两步交联法制备共价的 RPE-CPC, 荧光发射光谱中 650 nm 和 585 nm 的发射峰比值约为 0.56, 传能效率也远远低于高碘酸钠交联的 RPE-CPC。可见高碘酸钠交联法虽然对藻胆蛋白的结构影响较大, 但是制备的共价物能量传递效率要高于戊二醛法 (包括一步和两步法)。

藻胆蛋白作为荧光探针的显著优点就是荧光强、种类多、发射光的波长不同, 因此可以作为细胞表面抗原的多色分析。而在进行多色分析时, 最方便快捷的方式是用单一波长激发, 可以在显微镜视野分辨具有不同荧光特征的抗原。如果用单一的藻胆蛋白与抗体结合, 很难做到这点, 因为不同藻胆蛋白的激发波长不同, 所以构建具有能量传递功能的藻胆蛋白共价交联物显得尤为重要。然而, 以往构建的藻胆蛋白共价交联物的能量传递效率较低^[4,8,9~11], 难以用能量供体的激发波长激发交联物时, 获得较强的能量受体发射光。为此, 探索最佳的交联方法, 获得具有高效能量传递的藻胆蛋白共价交联物, 是开展以藻胆蛋白为探针进行细胞多色分析的关键。通过本研究可以发现, 高碘酸钠氧化法制备的藻胆蛋白共价交联物不仅反应产物均一, 而且传能效率很高, 这使藻胆蛋白共价交联物在表面抗原多色分析中的应用成为可能, 其应用前景非常广阔。

参 考 文 献

- 1 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
Wang G C, Deng T, Tseng C K. Marine Sciences, 2000, **24** (2): 22~25
- 2 Glazer A N, Stryer L. Phycofluor probes. Trends Biochem Sci, 1984, **9** (10): 423~427
- 3 Glazer A N, Stryer L. Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates- emission wavelength shifting by energy transfer. Biophysical J, 1983, **43** (3): 383~386
- 4 Wang G C, Zhou B C, Tseng C K. Spectropic properties of the C-phycocyanin-allophycocyanin conjugate and the isolated phycobilisomes from *Spirulina platensis*. Photosynthetica, 1997, **34** (1): 57~65
- 5 洪孝庄, 孙曼弄, 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
Hong X Z, Sun M J, Gong X Q. The Protein-linking Techniques in The Ligand Analysis. Beijing: Press of Medicine and Pharmacy in China, 1993. 28~31
- 6 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
Wang G C, Zhou B C, Tseng C K. Marine Sciences, 1996, **1**: 52~55
- 7 马圣媛, 王广策, 曾呈奎. 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体. 海洋科学, 2003, **27** (8): 52~55
Ma S Y, Wang G C, Tseng C K. Marine Sciences, 2003, **27** (8): 52~55
- 8 Wang G C, Zhou B C, Tseng C K. Construction of energy transfer model of C-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. Chin Sci Bull, 1997, **42** (1): 69~72
- 9 Wang G C, Zhou B C, Tseng C K. Study on the excitation energy transfer of an artificial C-phycocyanin-R-phycoerythrin conjugate. Botanica Marina, 1997, **40** (4): 325~328
- 10 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
- 11 Ma S Y, Wang G C, Sun H B, et al. Characterization of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycocyanin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum*. Plant Science, 2003, **164** (2): 253~257

Comparative Studies on The Efficiency of Energy Transfer of Two R-phycoerythrin-C-phycocyanin Conjugates Constructed From Sodium Periodate and Glutaraldehyde Respectively *

WANG Guang-Ce **, MA Sheng-Yuan, ZENG Cheng-Kui

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

Abstract The C-phycocyanin and the R-phycoerythrin were purified from the blue-green alga *Spirulina platensis* and red alga *Polysiphonia urceolata* respectively. Both sodium periodate and glutaraldehyde are effective coupling agents being capable of constructing the R-phycoerythrin-C-phycocyanin conjugate, which was also called phycobiliproteins energy transfer model. The two artificial conjugates constructed with different methods were purified by Sephadex G-200 chromatography respectively. Spectra analysis indicated that energy transfer occurred in the two conjugates. The conjugate with sodium periodate had the higher efficiency of energy transfer than that with

glutaraldehyde conjugate.

Key words R-phycoerythrin, C-phycoerythrin, crosslink by oxidation with sodium periodate, crosslink with glutaraldehyde, conjugate, spectra analysis, energy transfer efficiency

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30250003) and The Innovative Project of Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences (L52022802).

** Corresponding author. Tel: 86-532-2898574, E-mail: gzwang@ms.qdio.ac.cn

Received: September 4, 2003 Accepted: October 28, 2003

第十二届国际生物流变学大会 (12thICB) 暨第五届 国际临床血液流变学大会 (5thICCH) 联合会议 第一轮通知

由国际生物流变学会、国际临床血液流变学会和中国生物物理学会生物力学与生物流变专业委员会主办, 重庆大学和重庆市科协承办的第十二届国际生物流变学大会 (12thICB) 暨第五届国际临床血液流变学大会 (5thICCH) 将于 2005 年 5 月 30 日至 6 月 3 日在重庆市召开。

本届大会的主题是: Biorheology/clinical hemorheology: advancing with time and focusing on human health (生物流变学/临床血液流变学: 与时俱进, 关注人类健康)。

大会顾问委员会: 主席: Y-C Fung

大会组织委员会: 主席: 廖福龙 (中国), 秘书长: 蔡绍哲 (中国)

大会学术委员会: 主席: Y P Wu (中国), K-L P Sung (USA)

会议主题:

1) Biofluid rheology and mechanics; 2) Biosolid rheology and mechanics; 3) Rheological methodology; 4) Vascular rheology and biology; 5) Clinical hemorheology; 6) Microcirculation; 7) Hemorheological drugs and traditional medicine; 8) Cell rheology and cellular engineering; 9) Molecular rheology and mechanics; 10) Mechanical response and stress-growth relationship; 11) Rheological aspects of tissue engineering; 12) Rheological aspects of tissue injury and regeneration; 13) Rheological aspects of stem cell biology

重要时间: 1) 会议回执: 2004 年 6 月 30 日

2) 论文摘要截止日期: 2005 年 2 月 28 日

有关会议地点、注册费、论文摘要格式等信息请详见第二轮通知。第二轮通知将于 2004 年 11 月底登出, 届时将通过 E-mail 或邮寄发出, 并请见会议网址: <http://www.icbicch.com/>

(12thICB) 和 (5thICCH) 回执 (2005 年 5 月 30 日 ~ 6 月 3 日, 重庆)

姓 名: 性别: 职务:

工作单位:

通讯地址:

邮政编码:

电 话: 传真:

E-mail

☐ 我拟 (12thICB) 和 (5thICCH), 请寄第二轮通知

☐ 我拟提交会议论文摘要

会议回执寄至: 北京 100101 朝阳区大屯路 15 号 中国生物物理学会 魏舜仪

电话: 010-64889894, E-mail: sb@sun5.ibp.ac.cn