

文章编号:1673-1689(2009)04-0521-04

## 盐泽螺旋藻藻蓝蛋白的分离纯化

于光<sup>1</sup>, 马宇翔<sup>2</sup>, 张成武<sup>3</sup>, 李朝军\*<sup>3</sup>

(1. 南京中医药大学基础医学院, 江苏南京 210046; 2. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏南京 210009; 3. 南京师范大学江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏南京 210097)

**摘要:** 固体硫酸铵沉淀盐泽螺旋藻藻胆蛋白, 羟基磷灰石(HA)柱分离纯化具光敏效应的藻蓝蛋白(C-PC), 光谱、电泳鉴定其纯度。体外细胞实验表明 C-PC 经光敏作用能更有效的抑制肿瘤细胞的生长。

**关键词:** 盐泽螺旋藻; 藻蓝蛋白; 光敏作用; 肿瘤细胞

中图分类号: Q 949

文献标识码: A

### Isolation and Purification of C-phycoyanin from *Spirulina subsalsa*

YU Guang<sup>1</sup>, MA Yu-xiang<sup>2</sup>, ZHANG Cheng-wu<sup>3</sup>, LI Chao-jun\*<sup>3</sup>

(1. College of Pre-clinical Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Molecular & Medical Biotechnology Laboratory, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** In this study, Precipitated C-phycoyanin (C-PC) from *Spirulina subsalsa* by solid ammonium sulphate and chromatographed on a hydroxylapatite column; The isolated C-phycoyanin then identified its purity by spectrum and electrophoresis. Furthermore, C-PC could inhibit tumor cells by photosensitization prominently.

**Key words:** *Spirulina subsalsa*, C-phycoyanin, photosensitization, tumour cells

光动力治疗是借助于在病灶富集的光敏剂光照下产生自由基和活泼态氧实现对肿瘤细胞的杀伤作用。由于在正常细胞和肿瘤细胞的选择性上, 光动力疗法更优于放疗和化疗, 所以深受人们重视。

藻蓝蛋白有光敏作用, 且安全无毒, 是一种有潜力的光敏剂, 可用于肿瘤的光动力治疗<sup>[1-3]</sup>。我们以目前国内外较少研究的盐泽螺旋藻为材料, 分离纯化藻蓝蛋白, 通过体外肿瘤细胞实验验证盐泽螺旋藻的藻蓝蛋白是否具有较强的光敏作用, 以期它为它在肿瘤的光动力治疗中的应用提供一定的理

论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

盐泽螺旋藻(*Spirulina subsalsa*)由以色列本古里昂大学沙漠研究所微藻生物技术实验室提供。生长于 Zarrouk 培养基中, 冷白荧光灯作为光源, 光暗周期为 14 : 10, 光强为 3 000 lux, 在 28 ℃ 恒温室通气培养, 一般生长 5 d 后于其对数生长后期收获。

A375 为人的恶性皮肤黑色素瘤细胞, U251 为人的神经瘤细胞, LO2 为人的肝细胞, 均为作者所

收稿日期: 2008-05-18

作者简介: 于光(1978-), 男, 江苏海安人, 讲师, 主要从事生化与分子生物学研究。

\* 通讯作者: 李朝军(1966-), 男, 安徽阜阳人, 教授, 主要从事细胞生物学相关研究。Email: lichaojun@yahoo.com

在实验室购买并保存。

### 1.2 试验方法

藻蓝蛋白的分离纯化对数期藻体反复冻融抽提藻胆蛋白,60%(W/V)饱和度的硫酸铵沉淀。沉淀溶于最小体积的1 mmol/L的磷酸盐缓冲液(pH值7.0)中,并透析。经羟基磷灰石(HA)柱层析,磷酸盐缓冲液(pH值7.0)分步洗脱,立即进行280 nm光谱测定,收集峰尖部分<sup>[4]</sup>。

### 1.3 藻蓝蛋白的纯度及活性鉴定

**1.3.1 纯度鉴定** 经Sephadex G-100柱层析和7.5%的PAGE鉴定藻蓝蛋白的纯度。

**1.3.2 活性鉴定** 藻蓝蛋白吸收光谱用日立557紫外可见光扫描仪测定(200~900 nm)。室温荧光光谱用日立MPF-4型荧光分光光度计测定,激发波长580 nm<sup>[5]</sup>。

### 1.4 藻蓝蛋白亚单位的分离与鉴定

若藻蓝蛋白的PAGE电泳为单一条带,再以12%的SDS-PAGE分析其亚单位<sup>[6]</sup>。

### 1.5 肿瘤细胞、正常细胞的继代培养

细胞生长的培养基为RPMI-1640(含10%的小牛血清,100 μg/mL链霉素,100单位/mL青霉素),体积分数5%CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱中培养。

### 1.6 藻蓝蛋白光敏作用研究

细胞加样方法同前,加样后24 h将96孔板置于400 W的碘钨灯下,隔30 cm高的水柱及四层玻璃辐照,每次5 min,共3次。照光后继续于体积分数5%CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱中孵育,12 h后进行形态观察及SRB法测定。

### 1.7 细胞形态变化的观察

倒置显微镜观察,Leica数码相机拍照。

### 1.8 SRB法

细胞培养结束后,三氯乙酸(TCA)固定细胞,磺基罗丹明B(SRB)染色。用空白对照调零,所用波长为490 nm。对每种细胞的处理重复3次,进行数据统计,并计算样品对肿瘤细胞的体外抑制率。

抑制率=(对照孔OD值-样品孔OD值)/对照孔OD值×100%

## 2 实验结果

### 2.1 藻蓝蛋白的分离纯化

藻胆蛋白经HA柱层析,如图1。峰1为柱穿过组分(1 mmol/L洗脱),可见光谱扫描发现在560 nm处有吸收峰,为藻红蛋白;峰2为变性的藻胆蛋白(10 mmol/L洗脱);峰3为藻蓝蛋白(30 mmol/L

万方数据

洗脱);峰4为别藻蓝蛋白(100 mmol/L洗脱)。

### 2.2 藻蓝蛋白的纯度及活性鉴定

**2.2.1 纯度鉴定** HA柱层析后的藻蓝蛋白过Sephadex G-100柱洗脱,为单一洗脱峰。

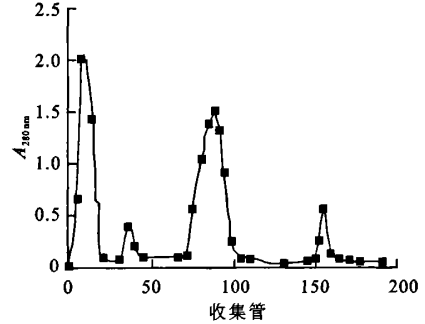


图1 藻胆蛋白HA柱层析

Fig. 1 Washing figure of phycobiliprotein

图2为不同批次纯化后的藻蓝蛋白经7.5%的PAGE鉴定纯度。均为单一条带,说明纯化后的藻蓝蛋白已达到电泳纯,称为C-PC。

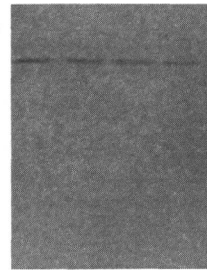


图2 藻蓝蛋白PAGE图

Fig. 2 PAGE of C-phycoyanin

**2.2.2 活性鉴定** 藻胆蛋白有多种组分,且 $A_{620\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}=1.48$ 。纯化后的藻蓝蛋白的紫外可见光扫描图见图3,最大吸收峰位于615 nm,而360 nm处为保持活性藻蓝蛋白四吡咯环的特征吸收峰,且 $A_{615\text{ nm}}/A_{271\text{ nm}}=4.7$ ,达到纯化标准。

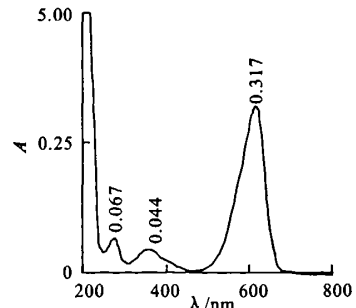


图3 藻蓝蛋白紫外可见光扫描

Fig. 3 Scan figure

藻蓝蛋白吸收光能发出红色荧光,被别藻蓝蛋白吸收,这样光能就从藻蓝蛋白传到别藻蓝蛋白,

继而进行能量的传递。若藻蓝蛋白变性则荧光减弱或消失,所以把荧光光谱作为一项鉴定藻蓝蛋白活性的指标。如图 4,藻蓝蛋白的室温荧光发射峰位于 641.3 nm 处,与别藻蓝蛋白的特征吸收峰 650 nm 相近,所以分离得到了具有活性的藻蓝蛋白。

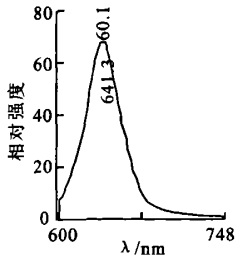


图 4 藻蓝蛋白荧光光谱  
Fig. 4 Fluorescence emission

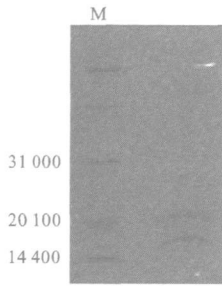


图 5 SDS-PAGE  
Fig. 5 SDS-PAGE

### 2.3 C-PC 亚单位的分离与鉴定

12%的 SDS-PAGE 见图 5,其中左道为已知相对分子质量的标准蛋白,右道为 C-PC。可见 C-PC 由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚单位组成,其相对分子质量约为 16 000 和 20 500,推算 C-PC 的最小相对分子质量为 36 500。

### 2.4 C-PC 对细胞的影响

先经 SRB 检测,选择 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  为 C-PC 的有效作用浓度,24 h 为 C-PC 的有效作用时间。C-PC 加入 A375 细胞,并经过碘钨灯照射后,细胞形态就出现明显的差异,继续孵育 12 h 后细胞会变圆(图 6d),到 24 h 后细胞会漂离培养瓶(表述不准确),说明 C-PC 经光敏作用后更为显著的抑制 A375 细胞的生长。图 6a 是不经碘钨灯照射的对照组细胞,图 6b 是经碘钨灯照射后的对照组细胞。

SRB 实验结果表明:碘钨灯照射对对照组 A375 细胞没有显著的影响;C-PC 对 A375 细胞有一定的抑制作用,碘钨灯光照后抑制作用更为显著。光敏作用前,C-PC 对 A375 细胞的抑制率为 9.3%;光敏作用后,抑制率为 31.0%(图 7)。对于其它细胞如 U251 也有类似结果(图 8)。

万方数据

C-PC 对非肿瘤细胞如 LO2 没有显著的抑制作用。

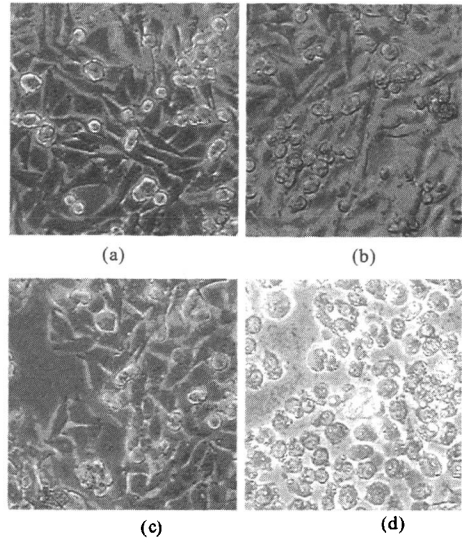
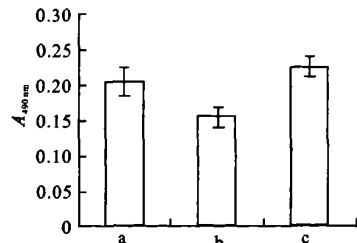


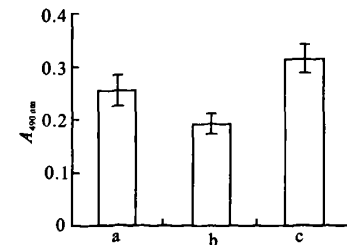
图 6 (a) 对照组 A375 细胞;(b) 碘钨灯照射的对照组 A375 细胞;(c) 藻蓝蛋白无光敏处理的 A375 细胞;(d) 藻蓝蛋白光敏处理的 A375 细胞

Fig. 6 (a) A375 cells of control without illumination ( $\times 20$ ); (b) A375 cells of control with illumination ( $\times 20$ ); (c) A375 cells added phycocyanin without illumination ( $\times 20$ ); (d) A375 cells added phycocyanin with illumination ( $\times 20$ )



a. 未经光敏处理的细胞;b. 光敏处理细胞;c. 对照  
图 7 SRB 法测定藻蓝蛋白对 A375 细胞的影响

Fig. 7 SRB method inspect photosensitive effect to A375 cells



a. 未经光敏处理的细胞;b. 光敏处理细胞;c. 对照  
图 8 SRB 法测定藻蓝蛋白对 U251 细胞的影响

Fig. 8 SRB method inspect photosensitive effect to effect to U251 cells

### 3 结 语

体外细胞实验发现盐泽螺旋藻藻蓝蛋白经光敏作用可以更有效的抑制肿瘤细胞。藻蓝蛋白是首先证明有光动力功能的藻胆蛋白,1989年,美国专利介绍应用藻蓝蛋白作为光敏剂处理动脉粥样

硬化的离体实验和移植肿瘤的动物实验,报道了藻蓝蛋白对血管内的硬化斑具有显著的清除作用,对移植肿瘤细胞有显著的杀伤效果<sup>[8-9]</sup>。实验中发现盐泽螺旋藻藻蓝蛋白经光敏作用抑制肿瘤细胞的效果更为明显,可用作肿瘤的光动力治疗,是一种具有潜力的光敏剂。

### 参考文献(References):

- [1] Granville D J, Levy J G, Hunt D W C. Photodynamic treatment with benzoporphyrin derivative monoacid ring A produces protein tyrosine phosphorylation events and DNA fragmentation in murine P815 cells[J]. **Photochemistry and Photobiology**, 1998,67(3):58-362.
- [2] 黄蓓,张平,孙兆奇,等. 藻胆蛋白色素肽与癌光敏光敏作用的比较实验[J]. 激光生物学报, 2006, 15(5): 471-477.  
HUANG Bei,ZHANG Ping,SUN Zhao-qi,et al. Comparison experiment of photosensitive effect between phycobiliprotein chromophore peptide and photofrin II [J]. **Acta Laser Biology Sinica**, 2006, 15(5): 471-477. (in Chinese)
- [3] 蔡心涵,何立明,蒋家伦,等. 螺旋藻藻蓝蛋白对癌激光增敏作用的实验研究[J]. 中国海洋药物杂志,1995,1:15-18.  
CAI Xin-han,ZHANG Shu,HE Li-ming,JIANG Jia-lun, et al. The experimental study of application on phycocyanin in cancer laser therapy[J]. **Chinese Marine Drug**,1995,1:15-18. (in Chinese)
- [4] 李冰,张学成,高美华,等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白提取纯化新工艺[J]. 海洋科学,2007,31(8):48-52.  
LI Bing,ZHANG Xue-cheng,GAO Mei-hua,et al. New research on extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. **Marine Sciences**, 2007,31(8):48-52. (in Chinese)
- [5] 梁文裕,NISHIFUJITaku. 发菜藻蓝蛋白分离纯化的研究. 西北植物学报[J]. 2008,28(2),303-309.  
LIANG Wen-yu,NISHIFUJITaku. Isolation and Purification of C-phycocyanin from *Nostoc flagelli form*[J]. **Acta Bot Boreal Occident Sin**,2008,28(2):303-309. (in Chinese)
- [6] 卓素珍,张虹. 螺旋藻中藻蓝蛋白的生理功能及其提取纯化研究进展[J]. 食品科技,2008,1:150-152.  
ZHOU Su-zhen,ZHANG Hong. Research review on physiological activity and its extract and purity technique of phycocyanin from *apirulina platensis*[J]. **Food Science and Technology**, 2008,1:150-152. (in Chinese)
- [7] 徐静娟,邹敏辰,朱劼,等. 茶树菇多糖免疫调节作用的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(6):36-39.  
XU Jing-juan,WU Min-chen,ZHU Jie, et al. Study on immunoregulatory function of *agroclybe cylindracea* polysaccharide (ACP)[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007,26(6):36-39. (in Chinese)
- [8] 谭阳,黄蓓,任艳敏,等. 藻蓝蛋白亚基细胞渗透性及对肿瘤细胞光敏作用的研究[J]. 激光生物学报,2007,16(6):684-688.  
TAN Yang,HUANG Bei,REN Yan-min, et al. A Study of Pervasion Character and PDT Effect of Phycocyanin Subunits on Cancer Cell Treatment[J]. **ACTA LASER BIOLOGY SINACA**, 2007,16(6):684-688. (in Chinese)[9]HUANG Bei. The Experimental research of r-phycoerythrin subunits on cancer treatment;a new photosensitizer in PDT[J]. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**,2002(1):35-41.

(责任编辑:杨萌)