

红毛藻 R-藻红蛋白的高效制备 以及抗体标记与检测

刘 婷¹, 沈建东¹, 刘光明¹, 蓝伟光², 曹敏杰^{1,*}

(1.集美大学生物工程学院, 福建厦门 361021;

2.三达膜科技(厦门)有限公司, 福建厦门 361022)

摘 要: 采用硫酸铵盐析和 DEAE-Sephrose 阴离子交换柱层析相结合, 从红毛藻 (*Bangia fusco-purpurea*) 中分离纯化到纯度系数 (A_{565}/A_{280}) 大于 6.0 的 R-藻红蛋白。SDS-PAGE 结果显示, 其亚基分子量分别为 19、21ku。用适宜摩尔浓度的异型双功能交联剂 N-琥珀酰亚氨基-3-2-吡啶基二硫丙酸醇 (SPDP) 将纯化的 R-藻红蛋白与羊抗小鼠 IgG 抗体交联, 利用 SDS-PAGE 和荧光检测鉴定 R-藻红蛋白与抗体的交联效果。结果显示: R-藻红蛋白能与羊抗小鼠 IgG 成功交联。分别采用 Dot blot 和 Western blot 对 R-藻红蛋白标记的抗体作为二次抗体, 小鼠抗鲑鱼主要过敏原小清蛋白单克隆抗体为一次抗体; 对鱼类小清蛋白进行免疫检测, 结果显示: R-藻红蛋白标记的抗体能检测相关抗原的存在, 且有良好的特异性。利用藻红蛋白荧光探针可缩短免疫杂交的检测时间, 简化操作过程。

关键词: R-藻红蛋白, 荧光探针, 交联, 免疫检测

Preparation of R-phycoerythrin from red alga and its application for antibody labeling and detection

LIU Ting¹, SHEN Jian-dong¹, LIU Guang-ming¹, LAN Wei-guang², CAO Min-jie^{1,*}

(1.College of Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2.Suntar Membrane Technology (Xiamen) Co., Ltd., Xiamen 361022, China)

Abstract: R-phycoerythrin (R-PE) was highly purified from red alga (*Bangia fusco-purpurea*) by ammonium sulfate fractionation and DEAE-Sephrose anion-exchange column chromatography, the purity rate (A_{565}/A_{280}) of R-PE was over 6.0. SDS-PAGE demonstrated that relative molecular masses of R-PE subunits were about 19 and 21 ku, respectively. Optimum concentration of heterobifunctional reagent N-succinimidyl-3-2-pyridyldithio propionate (SPDP) was used to polymerize goat anti-mouse IgG antibody and the cross-linking was identified using SDS-PAGE and fluorescence analysis. R-PE was successfully crosslinked with goat anti-mouse IgG as secondary antibody. Detection of major allergen parvalbumin in fish using R-PE labelled IgG were carried out by Dot blot and Western blot together with mouse anti-silver carp parvalbumin as primary antibody. The results demonstrated that R-PE labelled IgG could effectively detect the existence of parvalbumin and revealed good immunological specificity. The application of R-phycoerythrin as fluorescent probe is expected to shorten the detection time of immune hybridization and simplify the operation processes.

Key words: R-phycoerythrin; fluorescent probes; crosslinking; immunization detection

中图分类号: TS254.5⁺8

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)17-0147-04

荧光免疫分析是以荧光标记物作为探针的一种标记免疫分析法, 其灵敏度高, 可定性或定位地检测抗原或抗体^[1]。但是, 传统的荧光素(如 FITC 等)由于非特异荧光干扰, 存在检测特异性低等问题^[2-3]。R-藻红蛋白(R-phycoerythrin, R-PE)主要存在于红藻和部分蓝藻中, 是应用较广的一种色素蛋白^[4-7]。

R-PE 由脱辅基寡聚蛋白与开链四吡咯发色团共价结合而成。组成寡聚蛋白的亚基有 α 、 β 、 γ 3 种。通常, 红藻中的 R-PE 以 ($\alpha\beta$)₆ γ 形式存在, 分子量约为 240ku, 极少种类的 R-PE 有不同亚基数目^[8]。R-PE 色泽鲜艳, 并具有抗癌、抗氧化等功效, 可作为天然色素应用^[9-10]。由于色素分子的存在, R-PE 在可见光区 480~570nm 波段有较强的吸收, 且可产生强烈的荧光^[11]。R-PE 具有荧光强度大, 量子产率高的特点, 易与生物素、单克隆抗体等蛋白质结合, 是一种良好的荧光标记物, 被广泛地应用于医学诊断和生物学等研究领域^[10, 12-13]。探索简易、可靠的分离纯化技术和蛋白交联技术是藻红蛋白荧光探针研制

收稿日期: 2012-01-16 * 通讯联系人

作者简介: 刘婷 (1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究。

基金项目: 福建省重大科研专项 (2010NZ0001-3); 福建省自然科学基金 (2010J01044)。

和应用的关键环节之一。本文在前期研究的基础上,对红毛藻 R-PE 的分离纯化进行了优化,并将高纯度 R-PE 与羊抗小鼠 IgG 进行偶联,制备荧光探针并应用于鱼类主要过敏原小清蛋白的检测,以期今后开发高灵敏度免疫荧光诊断试剂用于食品安全检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红毛藻 (*Bangia fusco-purpurea*) 干品 福建省莆田市南日岛养殖产品; DEAE-Sephrose、硝酸纤维素膜 GE Healthcare 公司; 小鼠抗鲑鱼小清蛋白单克隆抗体 本研究室制备; SDS-PAGE 标准蛋白 Fermentas 公司; N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫丙酸酯) (SPDP)、2-亚氨基四氢嘧吩 (2-IT) Thermo 公司; 羊抗小鼠 IgG 厦门波生生物技术有限公司; 其它试剂 均为国产分析纯。

PT-2100 型组织捣碎机 瑞士 Kinematica 公司; Avanti JA-25 型高速冷冻离心机 美国 Beckman 公司; Biologic LP 型蛋白质柱层析系统 美国 Bio-Rad 公司; G-BOX 型凝胶成像仪 英国 Syngene 公司; Bio Photometer 型紫外分光光度计 德国 Eppendorf 公司; pH 计 美国 Beckman 公司; Fluorchem 型荧光化学发光凝胶成像仪 法国 Alpha Innotech 公司; WB-14 型恒温水浴 德国 Memmert 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 R-藻红蛋白的分离纯化 取 10g 干燥的红毛藻碾成粉末后,浸泡于 200mL 蒸馏水中,在 -70℃ 和常温下反复冻融三次。冻融液用磁力搅拌器搅拌 2h,用蒸馏水稀释至 400mL,经组织捣碎机捣碎、超声波破碎、绢布过滤、离心 20min (15000 × g, 4℃) 后弃沉淀,所得的上清液即为藻胆蛋白粗提液。将粗提液进行 35%~50% 饱和度的硫酸铵沉淀,离心 20min 后弃上清。将沉淀溶解于少量的 0.02mol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH7.0) 中,即为藻红蛋白粗提液。

用 0.02mol/L PBS (pH5.6, 含 0.05mol/L NaCl) 平衡 DEAE-Sephrose 柱 (2.5cm × 10cm), 将用初始缓冲液透析过的藻红蛋白粗提液上样于该柱。充分洗净未吸附蛋白后,在弱光条件下,使用相同体积的 0.02mol/L PBS (pH5.6, 含 0.05mol/L NaCl) 和 0.2mol/L NaH_2PO_4 (pH4.1, 含 0.2mol/L NaCl) 作线性梯度洗脱,洗脱液总体积为 500mL,流速为 1mL/min。收集洗脱组分,每管收集 3mL,测其 A_{565} 、 A_{620} 、 A_{650} 、 A_{280} 。根据各组分的特征吸收值及色谱带的颜色,选取纯度较高,即 $A_{565}/A_{280} > 5.0$ 的组分避光保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 R-藻红蛋白的纯度及分子量测定 参照 Laemmli 法^[14],使用 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和荧光检测来分析 R-藻红蛋白的分子量及纯化效果,以标准蛋白质 (116.0~14.4ku) 作对照。电泳结束后,采用化学发光荧光和可见光在 534nm 的激发光源下对凝胶进行荧光成像,并使用考马斯亮蓝 R-250 对蛋白进行染色。

1.2.3 R-藻红蛋白与羊抗小鼠 IgG 的交联 采用异型双功能交联剂 SPDP 和 2-IT (2-亚氨基四氢嘧吩)

来实现 R-藻红蛋白与羊抗小鼠 IgG (二抗) 的偶联^[15]。SPDP 在 R-藻红蛋白上衍生吡啶二硫基团,生成 R-藻红蛋白的 SPDP 衍生物;羊抗小鼠 IgG 经 2-IT 活化后引入游离的外源性-SH 基团,将携带吡啶二硫键的 R-藻红蛋白与携带-SH 的羊抗小鼠 IgG 按一定摩尔比交联,制备荧光标记抗体。具体步骤参考 Thermo 公司说明书和文献 [12],并略做修改。R-藻红蛋白在使用前需用 0.02mol/L 的 PBS (pH7.5) 进行脱盐,之后向 R-藻红蛋白和羊抗小鼠 IgG 中分别加入适量浓度的 SPDP 溶液和 2-IT 溶液,混合均匀后在室温下避光振荡反应 2h,超滤离心除去游离的 SPDP 和 2-IT。调整衍生化的 R-藻红蛋白与巯基化的羊抗小鼠 IgG 的摩尔比,混匀后在室温下避光振荡反应 18h,完成交联反应。

1.2.4 R-藻红蛋白荧光交联物的鉴定 R-藻红蛋白与抗体标记完成后,上样于 15% SDS-PAGE。电泳结束后,采用化学发光荧光和可见光在 534nm 的激发光源下对凝胶进行荧光成像,并使用考马斯亮蓝 R-250 染色分析偶联结果。

1.2.5 R-藻红蛋白荧光交联物的免疫检测 R-藻红蛋白标记羊抗小鼠 IgG 的免疫检测通过免疫印迹 (Western blot) 和点杂交 (Dot blot) 实现。Western blot 参照 Towbin 法^[16]进行,以牛血清白蛋白为对照,即鲫鱼小清蛋白 (过敏原) 和牛血清白蛋白经 SDS-PAGE 后,转膜,以 5% 的脱脂奶封闭后,采用小鼠抗鲑鱼小清蛋白单克隆抗体 1:1000 稀释为一抗, R-藻红蛋白标记的羊抗小鼠 IgG 1:200 稀释为二抗进行免疫印迹反应,分析检测结果。

Dot blot 方法如下:将鲫鱼小清蛋白稀释至浓度为 0.3、0.1、0.03、0.01mg/mL 后,从左至右依次点样 1.2μL 于 NC 膜上,以 5% 的脱脂奶封闭后,采用小鼠抗鲑鱼小清蛋白单克隆抗体 (1:1000 稀释) 为一抗, R-藻红蛋白标记的羊抗小鼠 IgG (1:400 稀释) 为二抗进行点杂交,分析检测结果。

2 结果与讨论

2.1 R-藻红蛋白的分离纯化

红毛藻 R-藻红蛋白粗提液透析后上样于 DEAE-Sephrose 阴离子交换柱,经过 0.05~0.2mol/L NaCl 线性梯度和 pH4.1~5.6 线性梯度相结合洗脱后,在 R-藻红蛋白的最大特征吸收峰对应的波长 565nm 下,可检测到一个较高的蛋白峰 (图 1)。R-藻红蛋白纯度以该溶液在 R-藻红蛋白最大可见吸收峰对应波长下的吸光值与蛋白质的特征吸光值之比 (A_{565}/A_{280}) 来表示^[5,8-9]。经 DEAE-Sephrose 阴离子交换柱层析, R-藻红蛋白纯度系数达到 6.25,而 A_{620}/A_{280} 和 A_{650}/A_{280} 均小于 0.01,说明溶液中不存在其它的藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白,同时测得 $A_{620}/A_{565} < 0.02$,即达到 R-藻红蛋白作为荧光标记物的要求。

前期的报道显示, R-藻红蛋白需采用两次或更多的柱层析才达到较好的纯化效果,如 Sun 等^[7]用 Sepharose CL-4B、Sephadex G-200 和 DEAE Sepharose Fast Flow 三次柱层析从海藻 (*macroalgae Heterosiphonia japonica*) 中得到纯度为 4.89 的 R-藻红

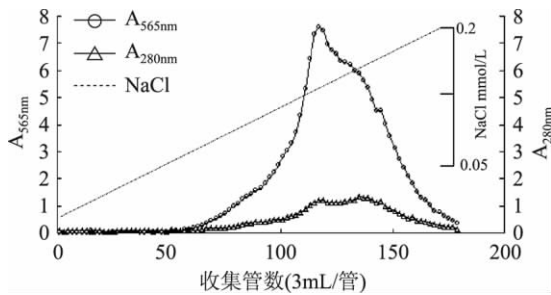


图1 R-藻红蛋白的 DEAE-Sepharose 柱层析纯化结果
Fig.1 DEAE-Sepharose chromatography of R-Phycoerythrin from *Bangia fusco-purpurea*

蛋白。Rossano 等^[11]采用 hydroxyapatite column 以及 Superdex 75 柱层析从地中海红藻 (*Corallina elongata*) 中纯化出纯度大于 5.3 的 R-藻红蛋白。本研究仅采用 DEAE Sepharose 一次柱层析,能分离纯化得到纯度为 6.25 的 R-藻红蛋白,步骤更少,方法和操作简单快速,且重复性好,并且获得的 R-藻红蛋白纯度也高于 Liu^[5]等采用 DEAE Sepharose Fast Flow 一次柱层析从 *Polysiphonia urceolata* 中得到的 R-藻红蛋白(纯度系数为 5.6)。

2.2 R-藻红蛋白的纯化效果及分子量测定

SDS-PAGE 结果显示,纯化得到的 R-藻红蛋白的 α 亚基和 β 亚基的相对分子质量分别约为 19、21ku(图 2A),因两者的相对分子质量接近,所以出现了部分重叠现象,这与文献^[7,11]报道的 R-藻红蛋白的亚基分子量大小相近,而 γ 亚基由于含量太少而未能检测出一致。藻红蛋白的荧光检测结果如图 2B 所示,在藻红蛋白的 α 和 β 亚基的位置出现相应的明亮荧光条带,而 γ 亚基由于含量少,故在相应的位置没有观察到荧光条带,说明纯化的 R-藻红蛋白荧光较强。

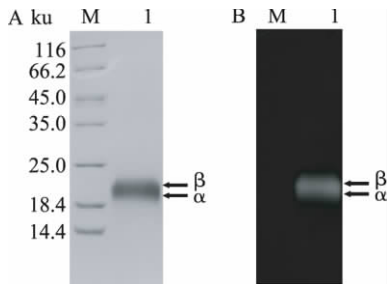


图2 R-藻红蛋白的 SDS-PAGE(A) 荧光检测(B)
Fig.2 SDS-PAGE(A) ,Fluorescent detection(B) of purified R-Phycoerythrin from *Bangia fusco-purpurea*

注: M: 标准分子量蛋白; 1: R-藻红蛋白。

2.3 R-藻红蛋白荧光交联物的鉴定

R-藻红蛋白与羊抗小鼠 IgG 分别经异型双功能交联剂 SPDP 和 2-IT 作用后进行交联,结果如图 3 所示。SDS-PAGE(图 3A)显示,在分离胶顶部出现大分子量的聚合物,推测该聚合物可能是 R-藻红蛋白与羊抗小鼠 IgG 交联后的生成物。对蛋白进行荧光检测结果如图 3B 所示,除 R-藻红蛋白的荧光条带外,在分离胶的顶部也有荧光亮带出现,与 SDS-PAGE 中大分子量聚合物的位置一致。由于羊抗小鼠 IgG 不会产生荧光,说明 R-藻红蛋白与羊抗

小鼠 IgG 已经成功交联。分离胶顶部的大分子量聚合物即为 R-藻红蛋白与羊抗小鼠 IgG 的交联物,且荧光强度较高。

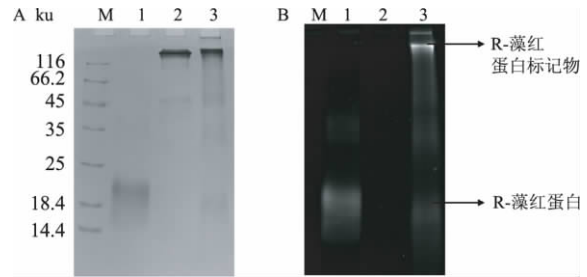


图3 R-藻红蛋白与羊抗小鼠 IgG 交联后的 SDS-PAGE(A) 和荧光检测(B)

Fig.3 SDS-PAGE(A) and Fluorescent detection(B) of cross-linking reaction of R-Phycoerythrin and goat anti-mouse IgG

注: M: 标准分子量蛋白; 1: R-藻红蛋白; 2: 羊抗小鼠 IgG; 3: R-藻红蛋白与羊抗小鼠 IgG 的交联物。

R-藻红蛋白标记抗体的鉴定一般是采用荧光分光光度计检测交联物的荧光发射光谱^[13,17]。颜世敢等^[18]采用 SDS-PAGE 对 R-藻红蛋白标记的抗鸡 IgG 进行了检测,但未对其进行荧光检测。本文采用的 SDS-PAGE 结合荧光检测方法可直接通过观察蛋白及相应的荧光条带鉴定 R-藻红蛋白与抗体是否成功偶联,较光谱扫描等方法更加直观和快捷。

2.4 R-藻红蛋白荧光交联物的免疫检测

2.4.1 R-藻红蛋白标记羊抗小鼠 IgG 的 Western blot 检测 用小鼠抗鲑鱼小清蛋白单克隆抗体(一抗), R-藻红蛋白标记的羊抗小鼠 IgG(二抗)对鲫鱼小清蛋白进行免疫反应的 Western blot 结果如图 4 所示。在分子量为 10ku 处有一个明亮的特异性反应条带,说明 R-藻红蛋白标记的羊抗小鼠 IgG 能间接快速地检测过敏原(鲫鱼小清蛋白)的存在。通过观察荧光强度和位置,即可直观快速地确定过敏原的存在,提高了检测速度和灵敏度。此外,该抗体与牛血清白蛋白不产生反应,说明其具有良好的特异性。

2.4.2 R-藻红蛋白标记羊抗小鼠 IgG 的 Dot blot 检测 将不同浓度的鲫鱼小清蛋白与小鼠抗鲑鱼小清蛋白单克隆抗体反应后,用 R-藻红蛋白标记的羊抗小鼠 IgG 进行免疫反应。结果如图 5 所示,从图中荧光亮度可知,当鲫鱼小清蛋白浓度为 0.03mg/mL 时仍能被检测到,说明 R-藻红蛋白标记的羊抗小鼠 IgG 有较高的灵敏度,能较好地应用于免疫检测领域。

小清蛋白是鱼类的主要过敏原,痕量的过敏原即可能导致过敏患者产生严重的过敏反应。目前对鱼类过敏原的分析主要采用 ELISA、PCR、SDS-PAGE 等方法进行检测^[19],如 Faste 等^[20]采用抗鳕鱼小清蛋白多克隆抗体建立了双抗夹心 ELISA 检测食物中小清蛋白的存在情况,但操作复杂且费时费力。Sun 等^[21]采用 RT-PCR 对小清蛋白进行了检测,但该方法不能从蛋白水平如实反应食品中过敏原的存在情况。而本研究采用 R-藻红蛋白标记二次抗体的

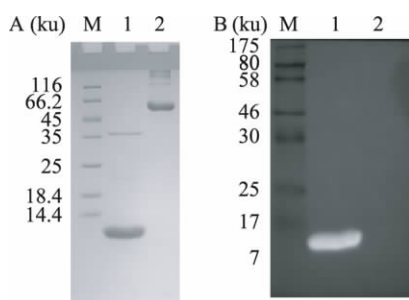


图4 鲫鱼小清蛋白的 SDS-PAGE(A) 和 R-藻红蛋白标记羊抗小鼠 IgG 的免疫检测(B)
Fig.4 SDS-PAGE of crucian carp parvalbumin(A) and

Western blot detection of parvalbumin using R-Phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG(B)
注: A: M 标准分子量蛋白; 1: 鲫鱼小清蛋白; 2: 牛血清白蛋白; B: M 预染标准分子量蛋白。



图5 R-藻红蛋白标记羊抗小鼠 IgG 的 Dot blot 检测
Fig.5 Dot blot detection of parvalbumin using R-Phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG

注: 1、2、3、4 分别表示鲫鱼小清蛋白浓度为 0.3、0.1、0.03、0.01mg/mL。

Western blot 和 Dot blot 检测方法,操作简单,直接通过观察荧光强度和位置即可确定过敏原(小清蛋白)的存在,能如实反映水产食品中过敏原的存在情况,提高了检测速度。

3 结论

本实验采用硫酸铵盐析并结合一次阴离子交换柱层析技术,能够快速高效地从红毛藻中分离纯化出高纯度($A_{565}/A_{280} > 6.0$)并具有良好的荧光特性的 R-藻红蛋白。在异型双功能交联剂 SPDP 和 2-IT 的共同作用下,R-藻红蛋白可与羊抗小鼠 IgG 成功交联。该标记物可用于快速检测鱼类主要过敏原小清蛋白的存在,且抗体活性损失小,灵敏度高。

对食物过敏原小清蛋白可靠定量检测方法的建立将有助于规范水产食品标签,保证消费者的安全。同时,也可今后开发针对鱼类过敏原的快速检测试剂盒提供重要的参考。

参考文献

- [1] 陈国珍,黄贤智,郑朱梓,等. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 1-28.
- [2] Jason J, Larned J. Single-cell cytokine profiles in normal humans: comparison of flow cytometric reagents and stimulation protocols[J]. J Immunol Methods, 1997, 207: 13-22.
- [3] Winterrowd G E, Chin J E. Flow cytometric detection of antigen-specific cytokine responses in lung T cells in a murine model of pulmonary inflammation[J]. J Immunol Methods, 1999, 226: 105-118.
- [4] Glazer A N. Phycobilisome, a macromolecular complex optimized for light energy transfer[J]. Biochim Biophys Acta,

1984, 768: 29-51.

- [5] Liu L N, Chen X L, Zhang X Y, et al. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* [J]. J Biotechnol, 2005, 116: 91-100.
- [6] Gantt E, Lipschultz C A, Grabowski J, et al. Phycobilisomes from blue green and red algae: isolation criteria and dissociation characteristics[J]. Plant Physiol, 1979, 63: 615-620.
- [7] Sun L, Wang S M, Gong X Q, et al. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica* [J]. Protein Express Purif, 2009, 64: 146-154.
- [8] Soni B, Kalavadia B, Trivedi U, et al. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India [J]. Process Biochem, 2006, 41: 2017-2023.
- [9] Kaixian Q, Franklin M, Borowitzka M A. The study for isolation and purification of R-phycoerythrin from a red alga [J]. Biotechnol Appl Biochem, 1993, 43(2): 133-140.
- [10] 陈小强. 坛紫菜中 R-藻红蛋白的分离纯化、理化性质及生物活性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [11] Rossano R, Ungaro N, D'Ambrosio A, et al. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongate* Ellis & Solander [J]. J Biotechnol, 2003, 101: 289-293.
- [12] 顾铭, 吴萍, 戚艺华, 等. 藻胆蛋白荧光探针及其标记[J]. 生命科学研究, 2001, 5(2): 109-113.
- [13] Zhou M, Cai C, Liu J X, et al. Optimization of IgG conjugation with R-phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* [J]. J Appl Phycol, 2010, 22: 459-464.
- [14] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [15] 洪秀庄, 孙曼霁. 蛋白质连接技术[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1992, 34-35.
- [16] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 4350-4354.
- [17] Glazer A N, Stryer L. Fluorescent phycobilisome protein conjugates for analyses of cells and molecules [J]. J Cell Biol, 1982, 93: 981-986.
- [18] 颜世敢, 朱丽萍, 张玉忠, 等. 藻红蛋白标记抗鸡 IgG 荧光抗体的高效制备 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(2): 127-131.
- [19] Schubert-Ullrich P, Rudolf J, Ansari P, et al. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 395(1): 69-81.
- [20] Faste C K, Plassen C. Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods [J]. J Immunol Methods, 2008, 329(1-2): 45-55.
- [21] Sun M, Liang C, Gao H, et al. Detection of parvalbumin, a common fish allergen gene in food by real-time polymerase chain reaction [J]. J AOAC Int, 2009, 92(1): 234-240.