

说明书

一种葛仙米藻胆蛋白的提取、纯化方法及纯化的藻红蛋白

技术领域

本发明涉及一种高效提取及纯化葛仙米藻红蛋白的方法和纯化的藻红蛋白。

背景技术

葛仙米 (*Nostoc sphaeroids* Kutzing)，学名拟球状念珠藻，属蓝藻门 (*Nostocaceae*) 念珠藻属 (*Nostoc.*)，与发菜同属，古称天仙米、天仙菜，又名水木耳、田木耳、地木耳 (*Nostoc commune vauch*)，是我国传统出口的珍贵药食两用固氮蓝藻。它是一种多细胞的丝状植物，其细胞结构简单、个体由圆球形细胞组成不分枝的单列丝状体，丝状体呈念珠状，群体呈胶质状、球状或其他不规则形状，蓝绿色或黄褐色，肉眼可见，具有固氮能力。《本草纲目》、《药性考》、《全国中草药汇编》等称葛仙米的功效为明目益气、令人有子、解热清隔、利肠胃、痰火能疗、久食延年、消除疲劳、收敛、治夜盲症、烫火伤等。

藻胆蛋白是广泛存在于红藻、蓝绿藻和隐藻的藻胆体 (Phycobilisomes, PBS) 中的捕光色素蛋白，包括藻蓝蛋白 (Phycocyanin, PC)、藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE)、藻红蓝蛋白 (Phycoerythrocyanin, PEC) 和别藻胆蛋白 (Allphycocyanin, APC) 四类。葛仙米藻胆蛋白含量丰富，优于其他藻类。藻红蛋白是一类附加值非常高的荧光色素蛋白，可用于免疫分析中可溶性抗原、抗体检测诊断试剂、荧光探针、荧光标记等。目前市面上 1mg 纯度在 95% 以上的藻红蛋白售价达到 5000 元以上，纯度越高售价剧增。

藻胆蛋白的纯化通常首先需要经过如盐析法、等电点法或结晶法等初步分离除去杂蛋白后，再通过柱层析法纯化，包括羟基石灰石吸附层析法、纤维素系列离子交换层析法、亲和层析和分子排阻层析法。

在藻胆蛋白粗提粉中，杂蛋白含量极高。要分离得到商品应用标准的藻红蛋白，用已报道的藻胆蛋白分离纯化方法，操作复杂，导致生产成本太高，无法大量制备以满足潜在的市场需求。因此，有必要开发一种简单有效的适合大量制备分离纯化藻红蛋白的方法，为实现葛仙米藻红蛋白的工业化生产提供技术基础。

发明内容

本发明的目的是提供一种高效提取及纯化葛仙米藻红蛋白的方法和纯化的藻红蛋白。

为实现上述目的，本发明提供了一种葛仙米藻胆蛋白的提取方法，包括以下步骤：(a) 将葛仙米干粉加入水中；(b) 加入液氮，不断搅拌，待液氮挥发完全；(c) 离心过滤，得到葛仙米藻胆蛋白提取液；(d) 冷冻干燥得到葛仙米藻胆蛋白粗提粉末。

步骤 (a) 中，所述水可以是纯水、去离子水、蒸馏水等。

步骤 (a) 中，所述葛仙米干粉和水的质量比为 1:40~1:70；优选地，为 1:50，或 1:60。

说明书

步骤 (b) 中, 所述液氮的加入量为葛仙米干粉和水总质量的 0.5%~1%。

步骤 (b) 中, 所述搅拌的时间为 4h-10h; 优选地, 为 6h。

步骤 (c) 中, 所述离心的转速为 5000rpm-8000rpm; 离心的时间为 20min-30min; 可以采用碟式离心机离心过滤。

本发明还提供了一种葛仙米藻红蛋白的纯化方法, 包括以下步骤: (1) 选用阴离子交换柱过柱; (2) 配置 PB 缓冲液 Buffer A 和 PB-NaCl 缓冲液 Buffer B, 过滤; (3) 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末用 PB 缓冲液 Buffer A 溶解, 离心, 过滤; (4) 洗泵, 用 PB 缓冲液 Buffer A 平衡离子交换柱; (5) 将步骤 (3) 制备的溶解于 PB 缓冲液 Buffer A 中的葛仙米藻胆蛋白直接上样, PB-NaCl 缓冲液 Buffer B 梯度洗脱, 收集洗脱液; (6) 用盐溶液清洗离子交换柱, 然后用碱溶液溶液反向冲洗; (7) 对步骤 (5) 的洗脱液进行超滤浓缩, 透析, 得到纯化的葛仙米藻红蛋白水溶液; (8) 步骤 (7) 得到的葛仙米藻红蛋白水溶液 0~10℃ 保存。

步骤 (1) 中, 所述过柱前先用去离子水置换阴离子交换柱中的 20% 的乙醇水, 其目的是阴离子交换柱用 20% 的乙醇水保存, 使用前应该将其置换掉。

步骤 (1) 中, 所述阴离子交换柱为 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱。所述阴离子交换柱的介质为粒径为 50~150 μm , 交联度为 6% 的琼脂糖凝胶组成; 优选地, 为粒径为 90 μm , 交联度为 6% 的交联琼脂糖凝胶组成; 所述琼脂糖凝胶是依靠糖链之间的次级链如氢键来维持网状结构, 网状结构的疏密依靠琼脂糖的浓度。一般情况下, 琼脂糖凝胶的结构是稳定的, 可以在许多条件下使用 (如水, pH4-9 范围内的盐溶液); 琼脂糖凝胶在 40℃ 以上开始融化, 不能高压消毒, 可用化学灭菌活处理。交联琼脂糖凝胶是生物分离中常用的色谱基质, 利用不同的功能基对其表面的羟基进行修饰, 进而制备出疏水色谱、离子交换色谱和亲和色谱等商业填料。

步骤 (2) 中, 所述 PB 缓冲液的 pH 为 5~6.5, 电导率为 5~10 $\mu\text{s/cm}$; 优选地, pH 为 6~6.5, 电导率为 6~8 $\mu\text{s/cm}$; 进一步优选地, pH 为 5、6、6.3、6.5, 电导率分别为 8.5 $\mu\text{s/cm}$ 、8.0 $\mu\text{s/cm}$ 、7.1 $\mu\text{s/cm}$ 、6.0 $\mu\text{s/cm}$ 。

步骤 (2) 中, 所述 PB-NaCl 缓冲液的 pH 为 5~6.5, 电导率为 5~10 $\mu\text{s/cm}$; 优选地, pH 为 6~6.5, 电导率为 6~8 $\mu\text{s/cm}$; 进一步优选地, pH 为 5、6、6.3、6.5, 电导率分别为 8.5 $\mu\text{s/cm}$ 、8.0 $\mu\text{s/cm}$ 、7.1 $\mu\text{s/cm}$ 、6.0 $\mu\text{s/cm}$ 。

步骤 (2) 中, 进一步优选地, PB 缓冲液 pH 为 5 时, 电导率为 8.5 $\mu\text{s/cm}$ 时, PB-NaCl 缓冲液 pH 为 5, 电导率为 8.5 $\mu\text{s/cm}$; 或, PB 缓冲液 pH 为 6 时, 电导率为 8.0 $\mu\text{s/cm}$ 时, PB-NaCl 缓冲液 pH 为 6, 电导率为 8.0 $\mu\text{s/cm}$; 或, PB 缓冲液 pH 为 6.3 时, 电导率为 7.1 $\mu\text{s/cm}$ 时, PB-NaCl 缓冲液 pH 为 6.3, 电导率为 7.1 $\mu\text{s/cm}$; 或, PB 缓冲液 pH 为 6.5 时, 电导率为 6.0 $\mu\text{s/cm}$

说明书

时, PB-NaCl 缓冲液 pH 为 6.5, 电导率为 $6.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 。

步骤 (2) 中, 所述 PB-NaCl 缓冲液的配制方法为在配置好的 PB 缓冲液中添加 NaCl 固体, 边加边测电导率, 直至电导率达到要求。

步骤 (2) 中, 所述过滤是指用 $0.2\mu\text{m}$ 的过滤膜减压过滤, 除去固体杂质; 采用减压泵减压抽滤的方法进行减压

步骤 (3) 中, 所述葛仙米藻胆蛋白粗提粉末可以按上述方法制备得到; 或所述葛仙米藻胆蛋白粗提粉末是由葛仙米干粉和纯水 (料液比 1:60) 提取 6h, 过滤, 冷冻干燥得到。

步骤 (3) 中, 所述葛仙米藻胆蛋白粗提粉末、PB 缓冲液的用量比 5g:1L~15g:1L; 优选地, 为 10g:1L。

步骤 (3) 中, 所述离心转速可以但不限于 5000~10000r/min, 如 8000r/min。

步骤 (3) 中, 所述离心时间为 20min~40min; 优选地, 为 30min。

步骤 (3) 中, 所述过滤优选采用 $0.2\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。

步骤 (4) 中, 所述洗泵时用去离子水洗 1~1.5 个柱体积; 优选地, 用去离子水洗 1 个柱体积。

步骤 (4) 中, 所述平衡过程用 3~10 个柱体积的 PB 缓冲液; 优选地, 用 4~6 个柱体积的 PB 缓冲液; 进一步优选地, 用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A。

步骤 (5) 中, 所述 PB 缓冲液的 pH 为 5~6.5, 电导率为 $5\sim 10\mu\text{s}/\text{cm}$; 优选地, pH 为 6~6.5, 电导率为 $6\sim 8\mu\text{s}/\text{cm}$; 进一步优选地, pH 为 6、6.3、6.5, 电导率分别为 $8.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 、 $7.1\mu\text{s}/\text{cm}$ 、 $6.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 。

步骤 (5) 中, 所述 PB-NaCl 缓冲液的 pH 为 5~6.5, 电导率为 $5\sim 10\mu\text{s}/\text{cm}$; 优选地, pH 为 6~6.5, 电导率为 $6\sim 8\mu\text{s}/\text{cm}$; 进一步优选地, pH 为 6、6.3、6.5, 电导率分别为 $8.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 、 $7.1\mu\text{s}/\text{cm}$ 、 $6.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 。

步骤 (5) 中, 进一步优选地, PB 缓冲液 pH 为 5, 电导率为 $8.5\mu\text{s}/\text{cm}$ 时, PB-NaCl 缓冲液 pH 为 5, 电导率为 $8.5\mu\text{s}/\text{cm}$; 或, PB 缓冲液 pH 为 6, 电导率为 $8.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 时, PB-NaCl 缓冲液 pH 为 6, 电导率为 $8.0\mu\text{s}/\text{cm}$; 或, PB 缓冲液 pH 为 6.3, 电导率为 $7.1\mu\text{s}/\text{cm}$ 时, PB-NaCl 缓冲液 pH 为 6.3, 电导率为 $7.1\mu\text{s}/\text{cm}$; 或, PB 缓冲液 pH 为 6.5, 电导率为 $6.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 时, PB-NaCl 缓冲液 pH 为 6.5, 电导率为 $6.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 。

步骤 (5) 中, 所述上样量为 2~4 个柱体积; 优选地, 为 2、2.5、3、4 个柱体积。

步骤 (5) 中, 所述收集的洗脱液为 4~5 个柱体积 20~100% 的洗脱液, 优选为 40~100% 的洗脱液。

步骤 (6) 中, 所述盐溶液优选为 NaCl 或 KCl, 所述盐溶液的浓度为 0.02~0.1M; 优选

说明书

地，为 0.05M。

步骤（6）中，所述盐溶液的用量为 1~2 个柱体积。

步骤（6）中，所述碱溶液优选为 NaOH 或 KOH，所述碱溶液的浓度为 0.1~0.5M；优选地，为 0.1M。

步骤（6）中，所述碱溶液的用量为 3~4 个柱体积。

步骤（7）中，所述超滤膜孔径为 1000D~8000D；优选地，为 3000D。

步骤（7）中，所述透析可采用任何常规透析方法进行。

步骤（8）中，所述水溶液保存的温度优选为 4℃。

具体地，本发明藻红蛋白的纯化方法，包括以下步骤：将葛仙米藻胆蛋白粗提粉末用 pH 为 6~6.5、电导率为 6~8 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解，8000r/min 离心 30min，用 0.2 μ m 的滤膜过滤；Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱过柱，用去离子水置换的 6% 的交联琼脂糖凝胶介质灌柱，用 1 个柱体积的去离子水洗泵，5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡，上样 4 个柱体积，收集 pH 为 6~6.5、电导率为 6~8 μ s/cm 的 PB-NaCl 缓冲液 Buffer B 的梯度洗脱液 4~5 个柱体积，用 3000D 的超滤膜超滤浓缩，透析，水溶液 4℃ 保存。

本发明还提供了一种由上述纯化方法纯化得到的葛仙米藻红蛋白；所述藻红蛋白的藻红蛋白的相对分子量为 67KD-70KD。

与现有技术相比，本发明的有益效果在于：

i) 本发明选用的阴离子交换柱如 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱显著提高了纯化效率，省去现有纯化方法中需采用硫酸铵沉淀的步骤，并且大大提高了藻红蛋白的浓度和纯度，方法简单，效果明显，可处理量大，为工业化应用提供了基础。

ii) 本发明选用的上样条件经实验证明上样量大，一次可纯化的蛋白样品多，纯化方法简单，成本低，大大提高了藻红蛋白的纯化效率，为实现工业化大生产提供基础。

iii) 本发明可以去除藻胆蛋白粗提粉末中大部分的杂质，使得藻红蛋白的提取率接近 100%，损失量少。

iv) 本发明得到的葛仙米藻红蛋白浓度和纯度都得到显著提高，可以将藻红蛋白的纯度提高到 90% 以上，甚至更高。

v) 本发明纯化的藻红蛋白，产品附加值高，可应用于化妆品、食品、保健食品以及生物医药等领域，有广阔的开发前景。

附图说明

图 1 表示实施例 7 中纯化的藻红蛋白的凝胶过滤色谱图。凝胶过滤层析根据蛋白质的分子量的不同在不同的时间出峰，经过峰面积与总面积的比值计算得到每次检测样品的纯度。

说明书

根据出峰位置估算藻红蛋白的相对分子量为 67KD-70KD。

图 2 表示实施例 7 中纯化的藻红蛋白与藻红蛋白对照品的紫外光谱（1.藻红蛋白；2.藻红蛋白标准品）。通过对比，两个样品的出峰位置基本相同，有相近的共轭结构，是同类样品。

图 3 表示实施例 7 中纯化的藻红蛋白与藻红蛋白对照品的荧光光谱（1.藻红蛋白；2.藻红蛋白标准品）。通过对比，两个样品的出峰位置相同，说明是同类样品。

图 4 表示三组分 SGS-PAGE 分析图（1：Marker（Mr 从下至上分别是 14.3kD、20.1kD、29.0kD、44.3kD、66.4kD、97.2kD）；2：按本发明上述方法制备的藻胆蛋白粗提粉末；3：实施例 7 纯化得到的藻红蛋白；4：藻蓝蛋白）根据电泳数据分析藻红蛋白的亚基分子量约为 14kD。

具体实施方式

结合以下具体实施例和附图，对本发明作进一步的详细说明。实施本发明的过程、条件、实验方法等，除以下专门提及的内容之外，均为本领域的普遍知识和公知常识，本发明没有特别限制内容。实施例中未注明的具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件，或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可通过正规渠道商购买得到的常规产品。

本发明藻红蛋白浓度的检测方法为考马斯亮蓝 G250 染色法，测定波长为 595nm 处的吸光值，按李合生的《植物生理生化实验原理和技术》记载方法绘制标准曲线并计算，购买藻红蛋白标准品所测得的藻红蛋白标准曲线为 $OD_{595}=0.8096c+0.0084$ ， $R^2=0.9986$ ；浓度的计算方法为：浓度 $c=(OD_{595}-0.0084)\div 0.8096$ 。

本发明藻红蛋白的纯度由紫外吸收光谱仪检测，纯度的计算方法为：

$$\text{纯度} = A_{545}/A_{280}; \quad \text{纯度}\% = A_{545}/(A_{545}+A_{280}) \times 100\%。$$

实施例 1 采用 DEAE-Cellulose 52 阴离子交换柱进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 50.01g、50.03g、49.99g 葛仙米干粉分别加入 2500mL 纯水，搅拌均匀后加入 20mL 液氮，边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后，继续搅拌，待碎冰完全溶解，离心过滤，冷冻干燥分别得到 10.02g、9.98g、10.01g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末。分别用 pH 为 7.0、电导率为 $5.7\mu\text{s}/\text{cm}$ 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解，8000r/min 离心 30min，用 $0.2\mu\text{m}$ 的滤膜过滤；采用 DEAE-Cellulose 52 阴离子交换柱过柱：1) 用 1 个柱体积的去离子水洗泵；2) 用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡；3) 上样 2 个柱体积。收集 40~100% pH 为 7.0、电导率为 $5.7\mu\text{s}/\text{cm}$ 的 PB-NaCl 洗脱液，结果见下表 1：

说明书

表 1

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	0.96	4.87	83
第二次	0.96	4.87	83
第三次	0.96	4.87	83

由上表 1 可见，三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 0.96g/mL，纯度均值为 4.87 (83%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。但是纯化的藻红蛋白的纯度和浓度偏低，可见 DEAE-Cellulose 52 阴离子交换柱纯化藻红蛋白效率不高，效果较差。

实施例 2 采用 DEAE-Cpato 阴离子交换柱进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 50.11g、50.07g、49.91g 葛仙米干粉分别加入 2500mL 纯水，搅拌均匀后加入 20mL 液氮，边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后，继续搅拌，待碎冰完全溶解，离心过滤，冷冻干燥分别得到 9.97g、10.03g、10.01g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末，分别用 pH 为 7.0、电导率为 5.7 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解，8000r/min 离心 30min，用 0.2 μ m 的滤膜过滤；采用 DEAE-Cpato 阴离子交换柱过柱：1) 用 1 个柱体积的去离子水洗泵；2) 用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡；3) 上样 2 个柱体积。收集 40~100% pH 为 7.0、电导率为 5.7 μ s/cm 的 PB-NaCl 洗脱液，结果见下表 2：

表 2

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	1.01	5.21	83.9
第二次	1.01	5.21	83.9
第三次	1.01	5.21	83.9

由上表 2 可见，三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 1.01g/mL，纯度均值为 5.21 (83.9%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。同样，纯化的藻红蛋白的纯度和浓度偏低，可见 DEAE-Cpato 柱纯化藻红蛋白效率不高，效果较差。

实施例 3 采用 DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换柱进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 49.98g、50.13g、49.92g 葛仙米干粉分别加入 2500mL 纯水，搅拌均匀后加入 20mL 液氮，边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后，继续搅拌，待碎冰完全溶解，离心过滤，冷冻干燥分别得到 9.96g、9.97g、10.02g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末，分别用 pH 为 7.0、电导率为 5.7 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解，8000r/min 离心 30min，用 0.2 μ m 的滤膜过滤；采用 DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换柱过柱：1) 用 1 个柱体积的去离子水洗泵；2) 用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡；3) 上样 1 个柱体积，收集 40~100% pH 为 7.0、电导率为 5.7 μ s/cm 的 PB-NaCl 洗脱液，结果见下表 3：

说明书

表 3

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	1.02	6.02	85.8
第二次	1.02	6.02	85.8
第三次	1.02	6.02	85.8

由上表 3 可见,三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 1.02g/mL,纯度均值为 6.02 (85.8%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。但纯化的藻红蛋白的纯度和浓度不高,可见 DEAE-Sephadex Fast Flow 柱纯化藻红蛋白虽然较以上两种阴离子交换柱纯度稍有提高,但是效率仍然不理想,效果较差。

实施例 4 采用 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 50.09g、50.03g、49.99g 葛仙米干粉分别加入 2500mL 纯水,搅拌均匀后加入 20mL 液氮,边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后,继续搅拌,待碎冰完全溶解,离心过滤,冷冻干燥分别得到 9.96g、9.91g、10.01g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末,分别用 pH 为 7.0、电导率为 5.7 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解,8000r/min 离心 30min,用 0.2 μ m 的滤膜过滤;采用 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱过柱:1)用 1 个柱体积的去离子水洗泵;2)用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡;3)上样 2 个柱体积。收集 40~100% pH 为 7.0、电导率为 5.7 μ s/cm 的 PB-NaCl 洗脱液,结果见下表 4:

表 4

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	2.09	9.68	90.6
第二次	2.09	9.68	90.6
第三次	2.12	9.68	90.6

由上表 4 可见,三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 2.10g/mL,纯度均值为 9.68 (94.1%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。另外,经 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱纯化的藻红蛋白的纯度和浓度均有显著提高,可见 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱适用于藻红蛋白的纯化。

实施例 5 采用本发明方法进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 60.01g、60.11g、60.03g 葛仙米干粉分别加入 3000mL 纯水,搅拌均匀后加入 25mL 液氮,边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后,继续搅拌,待碎冰完全溶解,离心过滤,冷冻干燥分别得到 12.51g、12.47g、12.53g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末,分别用 pH 为 5.0、电导率为 8.5 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解,8000r/min 离心 30min,用 0.2 μ m 的滤膜过滤;采用 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱过柱:1)用 1 个柱体积的去离子水洗泵;2)用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡;3)上样 2.5 个柱体积。收集 40~100% pH 为 5.0、电导率为 8.5 μ s/cm 的 PB-NaCl 洗脱液,结果见下表 5:

说明书

表 5

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	2.51	10.01	90.9
第二次	2.51	10.01	90.9
第三次	2.51	10.01	90.9

由上表 5 可见,三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 2.51g/mL,纯度均值为 10.01 (90.9%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。另外,经 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱纯化的藻红蛋白的纯度和浓度均有显著提高,可见 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱适用于藻红蛋白的纯化。

实施例 6 采用本发明方法进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 75.01g、75.03g、75.99g 葛仙米干粉分别加入 3750mL 纯水,搅拌均匀后加入 30mL 液氮,边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后,继续搅拌,待碎冰完全溶解,离心过滤,冷冻干燥分别得到 15.00g、14.97g、15.03g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末,分别用 pH 为 6.0、电导率为 8.0 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解,8000r/min 离心 30min,用 0.2 μ m 的滤膜过滤;采用 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱过柱:1) 用 1 个柱体积的去离子水洗泵;2) 用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡;3) 上样 3 个柱体积。收集 40~100% pH 为 6.0、电导率为 8.0 μ s/cm 的 PB-NaCl 洗脱液,结果见下表 6:

表 6

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	3.03	13.62	93.2
第二次	3.03	13.62	93.2
第三次	3.03	13.62	93.2

由上表 6 可见,三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 3.03g/mL,纯度均值为 13.62 (93.2%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。另外,经 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱纯化的藻红蛋白的纯度和浓度均有显著提高,可见 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱适用于藻红蛋白的纯化。

实施例 7 采用本发明方法进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 100.01g、100.13g、100.09g 葛仙米干粉分别加入 5000mL 纯水,搅拌均匀后加入 40mL 液氮,边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后,继续搅拌,待碎冰完全溶解,离心过滤,冷冻干燥分别得到 20.02g、19.98g、20.01g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末,分别用 pH 为 6.3、电导率为 7.1 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解,8000r/min 离心 30min,用 0.2 μ m 的滤膜过滤;采用 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱过柱:1) 用 1 个柱体积的去离子水洗泵;2) 用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡;3) 上样 4 个柱体积。收集 40~100% pH 为 6.3、电导率为 7.1 μ s/cm 的 PB-NaCl 洗脱液,结果见下表 7:

说明书

表 7

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	4.21	16.43	94.3
第二次	4.21	16.43	94.3
第三次	4.21	16.43	94.3

由上表 7 可见,三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 4.21g/mL,纯度均值为 16.43 (94.3%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。实验发现,当上样条件为:用 pH 为 6.3、电导率为 7.1 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解时,可以达到上样 4 个柱体积,所得到的藻红蛋白浓度最高,为 4.21g/mL;同时,洗脱条件为 pH 为 6.3、电导率为 7.1 μ s/cm 的 PB-NaCl 缓冲液 Buffer B 梯度淋洗可以得到纯度为 16.43 的藻红蛋白,大大提高了纯化效率。

实施例 7 中纯化的藻红蛋白的凝胶过滤色谱图如图 1 所示。凝胶过滤层析根据蛋白质的分子量的不同在不同的时间出峰,经过峰面积与总面积的比值计算得到每次检测样品的纯度。出峰位置约为 8mL,根据标准图谱,9mL 左右分子量约为 67KD,估算藻红蛋白的相对分子量为 67KD-70KD。

实施例 7 中纯化的藻红蛋白与藻红蛋白对照品的紫外光谱如图 2 所示。通过对比,两个样品的出峰位置基本重合,吸收峰为 542nm 和 565nm,有相近的共轭结构,判断为同类样品。

实施例 7 中纯化的藻红蛋白与藻红蛋白对照品的荧光光谱如图 3 所示。通过对比,两个样品的特征出峰位置相同 (575nm),说明是同类样品。

实施例 8 采用本发明方法进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 75.11g、75.03g、74.99g 葛仙米干粉分别加入 3750mL 纯水,搅拌均匀后加入 30mL 液氮,边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后,继续搅拌,待碎冰完全溶解,离心过滤,冷冻干燥分别得到 15.02g、14.92g、15.03g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末,分别用 pH 为 6.5、电导率为 6.0 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解,8000r/min 离心 30min,用 0.2 μ m 的滤膜过滤;采用 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱过柱:1) 用 1 个柱体积的去离子水洗泵;2) 用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡;3) 上样 3 个柱体积。收集 40~100% pH 为 6.5、电导率为 6.0 μ s/cm 的 PB-NaCl 洗脱液,结果见下表 8:

表 8

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	3.02	14.12	93.4
第二次	3.02	14.12	93.4
第三次	3.02	14.12	93.4

由上表 8 可见,三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 3.02g/mL,纯度均值为 14.12 (93.4%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。

说明书

实施例 9 采用本发明方法进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 50.08g、50.30g、49.94g 葛仙米干粉分别加入 2500mL 纯水，搅拌均匀后加入 20mL 液氮，边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后，继续搅拌，待碎冰完全溶解，离心过滤，冷冻干燥分别得到 10.02g、9.91g、10.01g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末用 pH 为 7.5、电导率为 5.8 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解，8000r/min 离心 30min，用 0.2 μ m 的滤膜过滤；采用 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱过柱：1) 用 1 个柱体积的去离子水洗泵；2) 用 5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡；3) 上样 2 个柱体积。收集 40~100% pH 为 7.5、电导率为 5.9 μ s/cm 的 PB-NaCl 洗脱液，结果见下表 9：

表 9

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	2.11	3.71	78.7
第二次	2.11	3.71	78.7
第三次	2.11	3.71	78.7

由上表 9 可见，三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 2.11g/mL，纯度均值为 3.71 (78.7%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。但是 PB 缓冲液 Buffer A 和 PB-NaCl 缓冲液 Buffer B 的 pH 超过 6.5 时，纯化效果明显下降。

实施例 10 采用本发明方法进行实验室小试纯化藻红蛋白

将 50.02g、49.93g、49.99g 葛仙米干粉分别加入 2500mL 纯水，搅拌均匀后加入 20mL 液氮，边加边剧烈搅拌。待液氮挥发完全后，继续搅拌，待碎冰完全溶解，离心过滤，冷冻干燥分别得到 9.98g、9.95g、10.03g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末，分别用 pH 为 9.3、电导率为 9.2 μ s/cm 的 PB 缓冲液 Buffer A 溶解，8000r/min 离心 30min，用 0.2 μ m 的滤膜过滤；用 1 个柱体积的去离子水洗泵，5 个柱体积的 PB 缓冲液 Buffer A 平衡，上样 4 个柱体积，收集 40~100%pH 为 9.3、电导率为 9.5 μ s/cm 的 PB-NaCl 洗脱液，结果见下表 10：

表 10

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	2.09	2.74	73.2
第二次	2.09	2.74	73.2
第三次	2.11	2.74	73.2

由上表 10 可见，三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 2.10g/mL，纯度均值为 2.74 (73.2%)。经过三次重复实验验证了本实验有很好的重现性。得到的藻红蛋白的浓度均显著低于其他实施例，说明该上样和洗脱的 pH 范围是不合适的，适宜的洗脱条件为 PB 缓冲液 Buffer A 的 pH 为 5~6.5，电导率为 5~10 μ s/cm，上样条件为 PB-NaCl 缓冲液 Buffer B 的 pH 为 5~6.5，电导率为 5~10 μ s/cm。

说明书

对比例 1

将 10.03g、9.96g、10.02g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末按文献“李邵蓉, *Rhodosorus marinus* 中藻红蛋白的纯化及其性质的研究”, 用 Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.4、0.1mol/L, 下同) 溶解, 用 1 个柱体积的去离子水洗泵, 5 个柱体积的 Tris-HCl 缓冲液平衡, 上样 4 个柱体积, 用 0.1mol/L、0.2mol/L、0.5mol/L 的 NaCl 溶液分步洗脱, 收集红色样品对 Tris-HCl 缓冲液透析, 再通过一次同样的 DEAE 纤维柱, 收集红色样品, 将收集的样品对 PB 缓冲液 (pH=6.6, 0.1mol/L) 充分透析, 上 Bio-gel p300 柱, 收集两条红色带, 检测结果见下表 11:

表 11

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	0.60	4.3	81.1
第二次	0.59	4.3	81.1
第三次	0.60	4.3	81.1

由上表 11 可见, 三次纯化得到藻红蛋白浓度均值为 0.597g/mL, 纯度均值为 4.3 (81.1%), 其浓度以及纯度均显著低于实施例 1~4。经过三次重复实验验证。

对比例 1 中选用的缓冲体系 Tris-HCl 及 pH 使得纯化效果较差, 纯化操作步骤繁杂, 增加了实际操作的成本。本发明方法选用的 PB 缓冲体系更适合藻红蛋白的纯化, 一次层析即可完成纯化过程, 而且藻红蛋白纯度、浓度高于对比例 1。因此, 本发明的方法可操作性强, 操作简便, 使用成本低, 纯化得到的藻红蛋白的浓度和纯度高。

对比例 2

将 10.01g、10.04g、10.03g 葛仙米藻胆蛋白粗提粉末按文献“程凌江, 条斑紫菜中 R-藻红蛋白的纯化及其和亚基的分离与发色团含量的测定”, 用 15%的 NH_4SO_4 盐析除杂, 用 Bio-gel p300 柱进一步纯化, 洗脱液为 pH=6.8 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (含 1mmol/L 叠氮钠和 mmol/L β -巯基乙醇), 洗脱液流速 15mL/h, 收集红色带, 检测结果见下表 12:

表 12

	藻红蛋白浓度 (g/mL)	纯度	纯度 (%)
第一次	0.67	8.1	89
第二次	0.67	8.1	89
第三次	0.67	8.1	89

由上表 12 可见, 三次纯化得到的藻红蛋白的浓度均值为 0.67g/mL, 纯度均值为 8.1 (89%), 其浓度以及纯度均显著低于实施例 3~4。经过三次重复实验验证。

对比例 2 中选用的 PB 缓冲体系 pH 较低, 体系偏酸性, 使得藻红蛋白的纯化虽然经过两

说明书

步纯化，但纯化的纯度不理想，最高仅为 89%。本发明方法得到的藻红蛋白的纯度显著高于对比例 2，而且本发明方法通过一次层析即可完成纯化过程，得到的藻红蛋白纯度和浓度均高于对比例 2。因此，本发明的方法可操作性强，操作简便，使用成本低，得到的藻红蛋白浓度高、纯度高。

由实施例 1~10 和对比例 1~2 可见，（1）本发明所选用的 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱的填料是 6%的交联度琼脂糖凝胶，在纯化中表现出高载量（120mg/mL）和高稳定性（操作温度 4~40℃，操作压力 \leq 3Bar），性能更好。实验证明本发明方法适于采用该树脂用于纯化藻红蛋白，效果明显优于其他 DEAE 阴离子交换柱（包括 DEAE-52 纤维素柱以及 DEAE-Sephadex Fast Flow 柱）；且藻红蛋白质损失少，上样量大，纯度高，可能是因为本发明采用的离子交换柱配基与藻红蛋白结合，而与其他杂质蛋白不结合，提高了藻红蛋白的吸附量；（2）在缓冲液 pH 值为 5~6.5 时，本发明方法得到的藻红蛋白的纯度显著高于对比例，是因为只有在该合适的 pH 范围内，PB 体系中的磷酸盐离子包裹的藻红蛋白的带负电部分裸露，使得藻红蛋白尽可能多地吸附于 Agarosix FF-DEAE 柱上，而其他的杂蛋白不被吸附，在上样平衡时就会被排除在柱外；Tris-HCl 体系则很难使藻红蛋白吸附。（3）本发明可以通过一步 Agarosix FF-DEAE 分离得到纯度高、产量高（上样量大，得到的藻红蛋白浓度高）的藻红蛋白，大大简化了实验步骤。

综上所述，采用本发明方法可以从葛仙米藻胆蛋白粗提粉末中得到浓度在 2.51g/mL 以上，纯度在 10.01（90.9%）以上的藻红蛋白，并且本发明方法上样量大、方法简单、工艺周期短；同时本发明方法还将纯化的藻红蛋白的纯度从已有文献中报道的 4.3（81.1%）提高到 16.43（94.3%），显著提高了藻红蛋白的纯度，具有很大的应用前景。

本发明的保护内容不局限于以上实施例。在不背离发明构思的精神和范围下，本领域技术人员能够想到的变化和优点都被包括在本发明中，并且以所附的权利要求书为保护范围。

权利要求书

- 1.一种葛仙米藻红蛋白的纯化方法，其特征在于，包括步骤：（1）选用阴离子交换柱过柱；（2）配置 PB 缓冲液 Buffer A 和 PB-NaCl 缓冲液 Buffer B；（3）葛仙米藻胆蛋白粗提粉末用 PB 缓冲液 Buffer A 溶解，离心，过滤；（4）洗泵，用 PB 缓冲液 Buffer A 平衡离子交换柱；（5）将步骤（3）制备的溶解于 PB 缓冲液 Buffer A 中的葛仙米藻胆蛋白直接上样，PB-NaCl 缓冲液 Buffer B 梯度洗脱，收集洗脱液；（6）用盐溶液清洗离子交换柱，然后用碱溶液反向冲洗；（7）对步骤（5）的洗脱液进行超滤浓缩，透析，得到纯化的葛仙米藻红蛋白水溶液；其中，PB 缓冲液 Buffer A 的 pH 为 5~6.5；PB-NaCl 缓冲液 Buffer B 的 pH 为 5~6.5。
- 2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤（2）中，PB 缓冲液 Buffer A 的电导率为 5~10 μ s/cm；PB-NaCl 缓冲液 Buffer B 的电导率为 5~10 μ s/cm。
- 3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤（2）中，所述 Buffer A 缓冲液和 Buffer B 缓冲液的 pH 为 6~6.5，电导率为 6~8 μ s/cm。
- 4.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤（2）中，所述 PB 缓冲液 pH 为 5，电导率为 8.5 μ s/cm 时，PB-NaCl 缓冲液 pH 为 5，电导率为 8.5 μ s/cm；或，PB 缓冲液 pH 为 6，电导率为 8.0 μ s/cm 时，PB-NaCl 缓冲液 pH 为 6，电导率为 8.0 μ s/cm；或，PB 缓冲液 pH 为 6.3，电导率为 7.1 μ s/cm 时，PB-NaCl 缓冲液 pH 为 6.3，电导率为 7.1 μ s/cm；或，PB 缓冲液 pH 为 6.5，电导率为 6.0 μ s/cm 时，PB-NaCl 缓冲液 pH 为 6.5，电导率为 6.0 μ s/cm。
- 5.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤（1）中，所述阴离子交换柱为 Agarosix FF-DEAE 阴离子交换柱。
- 6.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤（1）中，所述阴离子交换柱的介质为粒径为 50~150 μ m，交联度为 6%的琼脂糖凝胶。
- 7.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤（1）过柱前先用去离子水置换离子交换柱介质中的 20%的乙醇水。
- 8.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤（3）中，所述葛仙米藻胆蛋白粗提粉末、PB 缓冲液的用量比 5g:1L~15g:1L。
- 9.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤（4）中，所述超滤膜孔径为 1000D~8000D。
- 10.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤（6）中，所述 NaCl 或 KCl 的浓度为 0.02~0.1M；所述 NaOH 或 KOH 的浓度为 0.1~0.5M。
- 11.一种由权利要求 1~10 之任一项所述方法得到的葛仙米藻红蛋白。
- 12.一种葛仙米藻胆蛋白的提取方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：（a）将葛仙米干粉加入水中；（b）加入液氮，搅拌，待液氮挥发完全；（c）离心过滤，得到葛仙米藻胆蛋白提取液；（d）冷冻干燥得到葛仙米藻胆蛋白粗提粉末。

说明书摘要

本发明公开了一种葛仙米藻红蛋白的纯化方法，包括：（1）选用阴离子交换柱过柱；（2）配置 PB 缓冲液 Buffer A 和 PB-NaCl 缓冲液 Buffer B；（3）葛仙米藻胆蛋白粗提粉末用 PB 缓冲液 Buffer A 溶解，离心，过滤；（4）洗泵，用 PB 缓冲液 Buffer A 平衡离子交换柱；（5）将步骤（3）制备的溶解于 PB 缓冲液 Buffer A 中的葛仙米藻胆蛋白直接上样，PB-NaCl 缓冲液 Buffer B 梯度洗脱，收集洗脱液；（6）用盐溶液清洗离子交换柱，然后用碱溶液反向冲洗；（7）对淋洗液进行超滤浓缩，透析，得到纯化的葛仙米藻红蛋白水溶液。本发明的方法操作简单，得到的葛仙米藻红蛋白浓度和纯度都得到显著提高，适于工业化大规模生产。

说明书附图

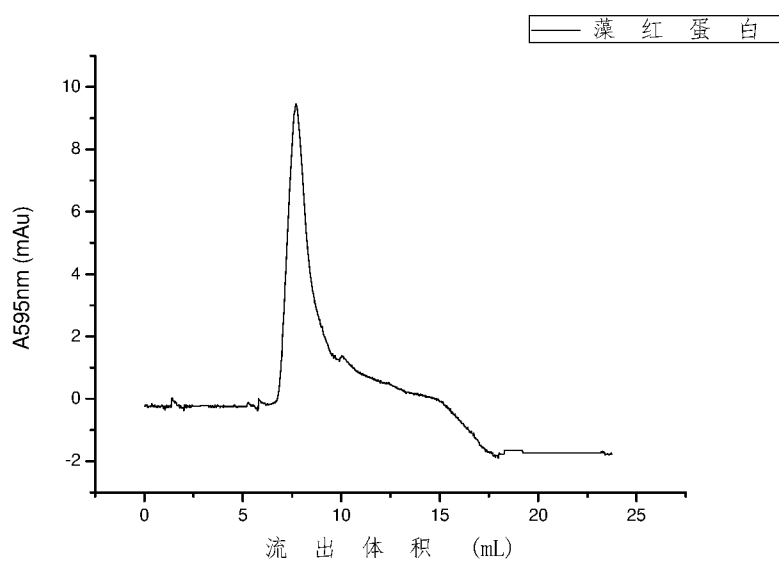


图 1

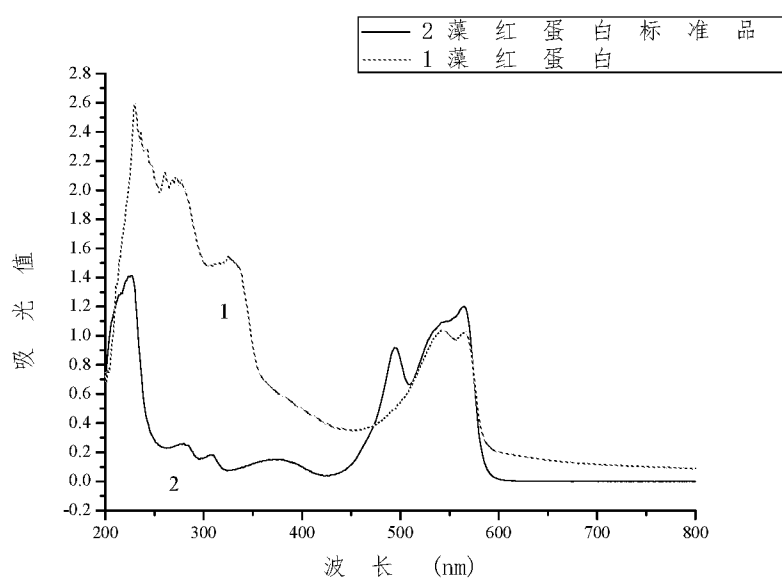


图 2

说明书附图

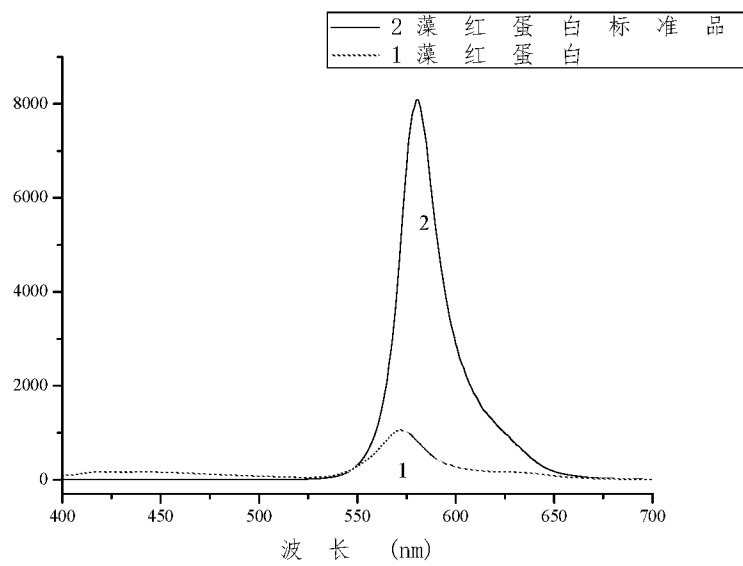


图 3

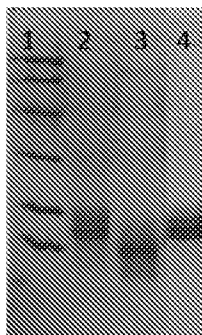


图 4