

文章编号:1001-6880(2016)5-0661-08

pH 调控双水相萃取色素蛋白复合体及其分配行为研究

唐雯熙^{1,2}, 张晓蓉^{1,2*}, 段 静¹, 吴湘霞¹¹吉首大学生物资源与环境科学学院; ²吉首大学植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 吉首 416000

摘要:为发展色素蛋白复合体分离纯化新方法, 探究 pH 调控 PEG1000/柠檬酸钾双水相系统萃取分离纯化色素蛋白复合体。优化萃取条件, 光谱法研究其分配行为, 检测产物纯度和生物活性。结果表明, 最佳萃取条件为调节 pH9.0, 相组成 C_{PEG1000} 19.0% / C_{柠檬酸钾} 20.0%, 蛋白质加量 3.42 mg/g, K 和萃取率达到最大, 分别为 8.8 及 86.0%。响应面分析法揭示, PEG1000 和柠檬酸钾质量浓度及 pH 对分配系数和萃取率影响显著。调节 pH7.0, 反萃取分配系数和反萃取率最小为 0.15 及 86.6%。蛋白质总回收率为 74.2%。pH 对色素蛋白复合体分配行为具有调控作用, pH 大于 8.5 体系, 色素蛋白趋于分配上相, 反之分配于下相, PEG1000/柠檬酸钾以及蛋白质加入量不影响色素蛋白复合体分配于上相。电泳表征发现, 萃取(pH9.0)上相存在 2 个蛋白质组分, 相对分子量(MW)为 7.0 kD 及 14.0 kD。反萃取(pH7.0)使相对分子量 7.0 kD 蛋白质组分分配于下相, 该组分为 LH2 β 亚基, 经萃取和反萃取产物生物活性稳定。pH 可调控 PEG1000/柠檬酸钾双水相系统萃取分离色素蛋白复合体, 产物纯度高, 生物活性稳定。

关键词:色素蛋白复合体; 双水相萃取系统; 分离因素; 萃取率; 生物活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.5.004

pH Regulation of Extraction of Pigment Protein Complexes by Aqueous Two-phase System and Investigation of Distribution Behavior

TANG Wen-xi^{1,2}, ZHANG Xiao-rong^{1,2*}, DUAN Jing¹, WU Xiang-xia¹¹College of Bio-resources and Environment Science, Jishou University; ²Key Laboratory of

Plant Resources Conservation and Utilization in Hunan Province, Jishou University, Jishou 416000, China

Abstract: To develop a novel purification method for the pigment protein complexes (PPCs), PPCs were separated and purified using aqueous two-phase system (ATPS) of polyethylene glycol (PEG) 1000/potassium citrate controlled by pH. The extraction condition of PPCs was optimized. The distribution behavior of PPCs in ATPS was detected by UV-Vis spectroscopy, and the purity and biological activity of product were investigated. The results indicated that the optimal extraction condition were 19.0% (W/W) PEG1000, 20.0% (W/W) potassium citrate, the proteins adding amount was 3.42 mg/g, and with pH 9.0. Under these conditions, the distribution coefficient (K) and the extraction rate of PPCs reached to the maximum at 8.8 and 86.0%, respectively. Response surface methodology analysis revealed that the phase compositions of PEG1000 and potassium citrate, pH condition had the significant effects on K and extraction rate. In reverse extraction process, the K of the reverse extraction came to the maximum of 0.15, the extraction rate of 86.6% at the pH 7.0. And the total protein yield was to 74.2%. The results of UV-Vis analysis discovered that the distribution behavior of PPCs can be regulated by the pH of system. PPCs tended to concentrate in the top phase solution under the condition of pH > 8.5, otherwise in bottom phase solution. The factors of PEG1000, potassium citrate and proteins added had not affected on the distribution behavior in ATPS. The electrophoresis analysis result found that there were two protein components in top phase (pH 9.0) with molecular weight (MW) about 7.0 kD and 14.0 kD. After reverse extraction (pH 7.0), only a component with MW 7.0 kD was back to potassium citrate solution, which was the β subunit of LH2. The biological activity of the purified PPCs was stable after the routines of the extraction and re-extraction. PPCs

can be separated and purified by the ATPS of PEG1000 / potassium citrate through controlling the pH of the system.

Key words: pigment-protein complexes; aqueous two-phase system; distribution coefficient; extraction rate; biological activity

收稿日期:2015-12-16 接受日期:2016-03-07

基金项目:湖南省科技计划项目(2014SK3023)湖南省高校科技成果产业化培育项目(13CY016);湖南省教育厅重点项目(12A114);湖南省高校科技创新团队(2012-318)

* 通讯作者 Tel:86-743-8564416; E-mail: xrzhang0743@163.com

色素蛋白复合体(Pigment-protein complexes, PPCs)是不产氧光合细菌(Anoxygenic phototrophic bacteria)进行光合作用功能单元,包括反应中心(Reaction center, RC)和中心捕光复合体(Core light-harvesting complex, LH1)以及外周捕光复合体(Peripheral light-harvesting complex, LH2), RC 主要将光能转化为化学能,LH2 和 LH1 主要进行光能的吸收和传递^[1-3]。20世纪80年代,Deisenhofer等首次在3 Å 水平上解析了绿色绿芽菌(*Blastochloris viridis*)RC 的晶体结构,使光合作用机理研究取得较大进展^[4]。获得纯化的色素蛋白复合体对于研究膜蛋白结构和光合作用机理至关重要。目前,纯化色素蛋白复合体的常用方法为采用 LDAO 增溶细胞膜,通过(NH4)₂SO₄ 盐析,DEAE-32 纤维素阴离子柱层析分离纯化等步骤纯化的色素蛋白复合体^[5,6],包括 RC 复合体 H 亚基(MW33.1 kD)、M 亚基(MW30.7 kD)和 L 亚基(MW26.6 kD),以及 HL 复合体(LH1 和 LH2)的蛋白 α 亚基(MW6 kD)及 β 亚基(MW7 kD)。但该方法纯存在化步骤复杂,纯化收率低,耗时,所需设备昂贵等不足。

双水相萃取技术(即水溶液两相分配技术)是基于液-液萃取理论,利用物质在互不相溶的两水相间分配差异实现分离的萃取分离技术,已被用于分离纯化多种生物体和生物组织(病毒、细胞器、细胞膜等)、生物大分子物质(多糖、核酸、酶及蛋白质等)以及一些生物小分子物质和重金属离子^[7,8]。该技术于分离和纯化一步完成,并可连续操作,易于放大,产物收率高,生物相容性好等优点。常用的双水相体系包括聚合物/磷酸盐、聚合物/硫酸盐、聚乙二醇/柠檬酸盐体系^[9-11]。其中聚乙二醇(PEG)/中性盐体系具有生物、环境相容性好等优点,在蛋白质(酶)的提取分离,遗传物质的分离,氨基酸、抗生素以及病毒等微小生物分子的分离与纯化,提取中草药有效成分等领域应用广泛^[12-14]。基于聚乙二醇(PEG)/中性盐体系应用于蛋白质分离纯化的优势,本文以本实验室分离纯化并初步鉴定的光合细菌S131-2 菌株色素蛋白复合体为材料,利用聚乙二醇/柠檬酸钾双水相体系萃取分离,系统研究了PEG1000/柠檬酸钾双水相萃取分离条件,并检测色素蛋白复合体纯化效果和生物活性,以期为光合色素蛋白复合体纯化提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

光合细菌 S131-2 菌株为本实验室分离纯化和初步鉴定,并保存。牛血清白蛋白标准品(BR)购于上海生工,蛋白质标准分子量(BR)购于碧云天。溶菌酶(BR)购买于北京鼎国。

1.2 试剂与仪器

Unico-UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津),Hitachi F7000 荧光分光光计(日本日立),pHS-3C pH 计(上海精科),JY98-ⅢN 超声波细胞破碎仪(宁波新芝)。考马斯亮蓝 G250(BR),PEG1000、柠檬酸钾、Tris、柠檬酸、NaCl、蔗糖、浓盐酸、甲醇、冰醋酸等试剂均为国产分析纯,实验用水为双蒸水。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白质浓度测定

采用 Bradford 法^[15] 测定蛋白质浓度,显色指示剂为考马斯亮蓝 G250,吸收波长为 595 nm。通过测定,蛋白质浓度测定标准曲线线性方程为 $y = 5.2166x - 0.0837, R^2 = 0.9998$ 。

1.3.2 色素蛋白复合体混合溶液制备

收集培养 5 d 的光合细菌,双蒸水悬浮,加入终浓度 50.0 mg/g 湿菌体的溶菌酶,37.0 ℃ 水浴 6.0 h,室温放置过夜,加入体积分数为 1.0% 的 LDAO,质量分数为 0.1% 的 NaCl,超声波破菌 15.0 min (plus 3 s, stop 5 s, 功率 80.0%), 10000 rpm 离心 15.0 min 收集上清,50.0% 硫酸铵沉淀色素蛋白复合体,离心收集浮质,TL 缓冲液(10.0 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 体积分数为 0.1% 的 LDAO)溶解浮质,透析除盐,透析液冷冻浓缩,获得色素蛋白复合体浓缩液,检测蛋白质浓度,备用。

1.3.3 双水相系统相图测定

采用浊点法测定相图。将 50.0% (W/W) PEG1000 溶液、40.0% (W/W) 柠檬酸钾溶液和去离子水称重;称取一定量 40.0% (W/W) 柠檬酸钾溶液于烧杯中,30 ℃ 水浴,将 50.0% (W/W) 的 PEG1000 溶液逐滴加入到烧杯中,搅拌至出现浑浊,加少量水至浑浊消失,称重确定 PEG1000 加入量,得到双节线上一个点相组成,反复重复上述操作,得到足够的双节点。反之亦然。PEG1000 和柠檬酸钾质量百分含量计算公式:

$$X(\%) = P / (P + Q + W) \times 100$$

$$Y(\%) = Q / (P + Q + W) \times 100$$

式中:X 为 PEG 的质量分数,Y 为柠檬酸钾的质量分数;P 为 PEG 在系统中的总量(g),Q 为柠檬

酸钾在系统中的总量(g);W 为水在系统中的总量(g)。

1.3.4 PEG1000/柠檬酸钾体系组成对萃取的影响

固定 $C_{\text{柠檬酸钾}}$ 为 20.0% (W/W),与梯度浓度为 17.0%、18.0%、19.0%、20.0%、21.0% 的 PEG1000 形成双水相体系,pH9.0,蛋白质终浓度为 3.42 mg/g,萃取分离色素蛋白复合体。测定分配系数、萃取率,以 3 组平行实验取平均值。固定 C_{PEG1000} 为 19.0% (W/W),梯度浓度为 18.0%、19.0%、19.5%、20.0%、20.5% 的柠檬酸钾形成双水相体系,pH9.0,蛋白质加入浓度为 3.42 mg/g,进行蛋白质的萃取分离。测定分配系数、萃取率,以 3 组平行实验取平均值。相关计算公式为:

分配系数 $K = C_t/C_b$;上相萃取率($Y_t\%$) = 上相蛋白质量($C_t V_t$)/蛋白质总量($C_t V_t + C_b V_b$);下相萃取率($Y_b\%$) = 下相蛋白质量($C_b V_b$)/蛋白质总量($C_t V_t + C_b V_b$)。

式中 C_t 、 C_b 分别代表上、下蛋白质含量, V_t 、 V_b 分别代表上、下相体积。

1.3.5 蛋白质浓度对萃取的影响

采用 C_{PEG1000} 为 19.0% 及 $C_{\text{柠檬酸钾}}$ 为 20.0% 相组成的双水相系统,pH9.0,改变蛋白质加入量,体系蛋白质终浓度分别为 0.83 mg/g(5.0 mg)、1.67 mg/g(10.0 mg)、2.58 mg/g(15.0 mg)、3.42 mg/g(20.0 mg)、4.17 mg/g(25.0 mg)。测定分配系数、萃取率,以 3 组平行实验取平均值。计算公式同上。

1.3.6 pH 对萃取的影响

选用 C_{PEG1000} 为 19.0% 及 $C_{\text{柠檬酸钾}}$ 为 20.0% 相组成的双水相系统,蛋白质加入浓度为 3.42 mg/g,以柠檬酸调节双水相体系 pH6.0、pH7.0、pH8.0、pH8.5、pH9.0、pH10.0,进行蛋白质的萃取分离。测定分配系数、萃取率,以 3 组平行实验取平均值。计算公式同上。

1.3.7 响应面优化实验设计

在单因素实验的基础上,根据 Box-Behnken 中心组合原理,设计 3 因素,分别为 PEG1000(A)、柠檬酸钾(B)及 pH(C);及 3 水平,分别为 A 因素(18.0、19.0、20.0)、B 因素(19.0、20.0、21.0)及 C 因素(8.0、9.0、10.0),以分配因素(K)及萃取率为响应值,分析 A、B、C 显著性。利用 Design-Expert 8.0.5b 软件设计响应面实验,得出各因素之间的最佳组合。以 3 组平行实验取平均值。

1.3.8 反萃取

取萃取体系的上相溶液置于洁净离心管中,等体积加入质量分数为 20.0% 的柠檬酸钾缓冲液,以柠檬酸调节 pH7.0,振荡混合充分,将混合均匀的样品在 1500 rpm 条件下离心分离 10.0 min,室温静置待体系完全澄清,测量上、下相体积,测定上下相蛋白质含量。

1.3.9 SDS-PAGE 电泳

吸取适量 pH7.0 及 pH9.0 双水相上、下相,透析除去 PEG1000 及柠檬酸钾,冷冻浓缩,10.0 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶解蛋白质,5×上样 buffer 上样。浓缩胶 5.0%,分离胶 12.5%,考马斯亮兰 R250 染色,冰乙酸-甲醇脱色,成像。

1.3.10 光谱分析

紫外光谱测定,取双水相体系上、下相溶液,于紫外可见分光光度计扫描分析,以相应的空白双水相体系溶液为对照,测试光程 10 mm,扫描精度 1 nm,扫描波长范围 200~1000 nm。

荧光光谱测定:待测样品浓度以紫外可见分光光度计定量,保持 OD₈₀₀ = 2.0。发射光谱模式扫描,激发光源波长分别为 364 nm、475 nm 及 502 nm。狭缝宽度 10.0 mm,增益中,扫描精度 1 nm。

2 实验结果

2.1 PEG1000/柠檬酸钾双水相相图

PEG1000/柠檬酸钾双水相系统相图如图 1 所示。T(Top)表示上相组成,为 PEG1000 质量分数。B(Bottom)表示下相组成,为柠檬酸钾质量分数;直线 TB 为线系,其长度表示双水相两相间组成差异的大小。在双节线(TCB)以上的区域为两相区,以下的区域为均相区。C 为临界点,在临界点 C 处体系为均一相,两相的差别消失,蛋白质在两相中的分配系数为 1。由结果可知,PEG1000/柠檬酸钾双水相体系,在 PEG1000 质量分数为 3.6%~45.5% 和柠檬酸钾质量分数为 4.1%~29.2% 能形成稳定的

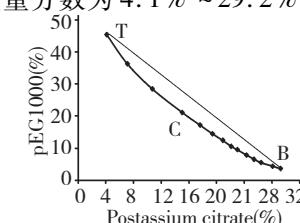


图 1 PEG1000/柠檬酸钾双水相体系相图

Fig. 1 Phase diagram of PEG1000/potassium citrate ATPS

双水相体系,本实验采用双节线以上区域的萃取体系进行实验。

2.2 单因素萃取条件优化

2.2.1 PEG1000/柠檬酸钾相组成对萃取效率影响

相组成直接影响线系,差别越大线系越长,系统越远离临界点,易于使蛋白质的分配系数增大^[9,11,16]。因此,实验考察不同质量分数 PEG1000、柠檬酸钾的组成对 PPCs 萃取的影响。在蛋白质终浓度为 3.42 mg/g, pH 9.0 条件下,固定柠檬酸钾质量分数为 20.0%, 改变 PEG1000 浓度, 分配系数 (K) 及萃取率的变化如图 2A 所示。由结果可知,随着增大 PEG1000 浓度,色素蛋白复合体的分配系数 (K) 及萃取率均为增加,质量分数为 19.0% 时,K 值

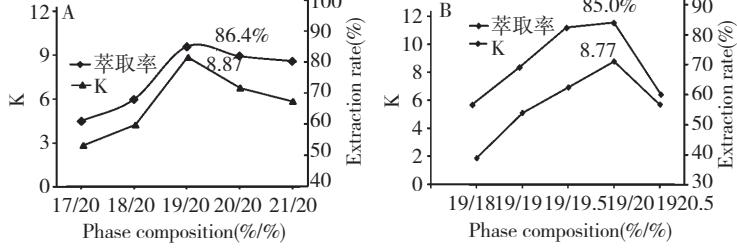


图 2 不同质量分数 PEG1000(A) 及柠檬酸钾(B) 相组成对萃取影响

Fig. 2 Effect of different quality PEG1000(A) and potassium citrate(B) on extraction of PPCs

2.2.2 蛋白质浓度对萃取效率影响

蛋白质加入量对分离因素 (K) 及萃取率的影响如图 3。由结果可见,随着蛋白质量的增加,在上相中的分配也随之增加,当加入量达到 3.42 mg/g 时,分配系数 (K) 及萃取率趋于最大,为 8.81 及 85.4%。当继续增加蛋白质量时,上相中蛋白质饱和而抑制体系的萃取,分配系数和萃取率趋于下降。因此,确定蛋白质为 3.42 mg/g 为最佳加入量。

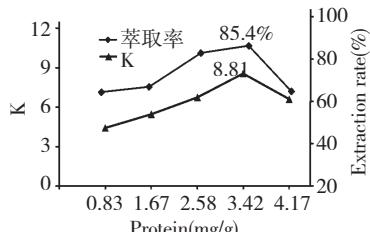


图 3 色素蛋白复合体加入量对萃取影响

Fig. 3 Effect of different quality of PPCs on extraction

2.2.3 pH 对萃取率影响

pH 会影响蛋白质构象和解离状态,从而影响其在双水相体系中的分配^[17]。实验考察 pH 对双水

及萃取率达到最大,分别为 8.87 及 86.4%,表明增加浓度 PEG1000 利于色素蛋白萃取。这是由于 PEG 的增大使聚合物与蛋白质相互作用增强,当聚合物到达一定浓度时,由于聚合物的空间位阻作用,使蛋白质 K 及萃取率降低所致,因此确定 C_{PEG1000} 为 19.0% 为最佳萃取浓度。

由图 2B 结果可见随着柠檬酸钾浓度增大,分配系数 (K) 增加,质量分数为 20.0% 时,K 值 (8.77) 及萃取率 (85.0%) 达到最大。这主要是由盐析作用的结果,盐析作用促使更多的蛋白质分配到体系的上相,增大分配系数和萃取率。实验确定柠檬酸钾质量分数 20.0% 时为最佳萃取浓度。

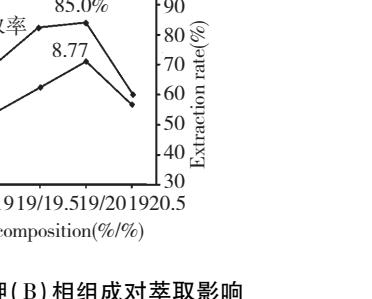


图 4 不同 pH 对色素蛋白复合体萃取影响

Fig. 4 Effect of different pH on extraction of PPCs

2.2.4 响应面法优化萃取条件

在单因素优化实验基础上,采用响应曲面图分析因素对响应变量的影响趋势以及各因素之间的相互关系。由于响应面等高线图能够直观地反映出各因素交互作用对响应值的影响,椭圆形表示二因素交互作用显著,圆形表示二因素交互作用不显著^[17]。由图 5 可知,沿 PEG1000 浓度轴向、柠檬酸钾浓度轴向以及 pH 轴向的等高线变化密集,说明

PEG 浓度、柠檬酸钾浓度以及 pH 三因素对分配系数和萃取率的影响显著。根据回归方程求一阶偏导,最佳萃取条件为 PEG1000 浓度为 19.4%, 柠檬酸钾为 20.8%, pH 为 9.38, 双水相萃取色素蛋白复合体 K 为 9.18%, 萃取率为 87.0%, 与实际值误差为 0.007%, 为便于实际操作选择萃取最优条件 C_{PEG1000} 19% (W/W)/C_{柠檬酸钾} 20% (W/W) 为相组成, 体系为 pH9.0。

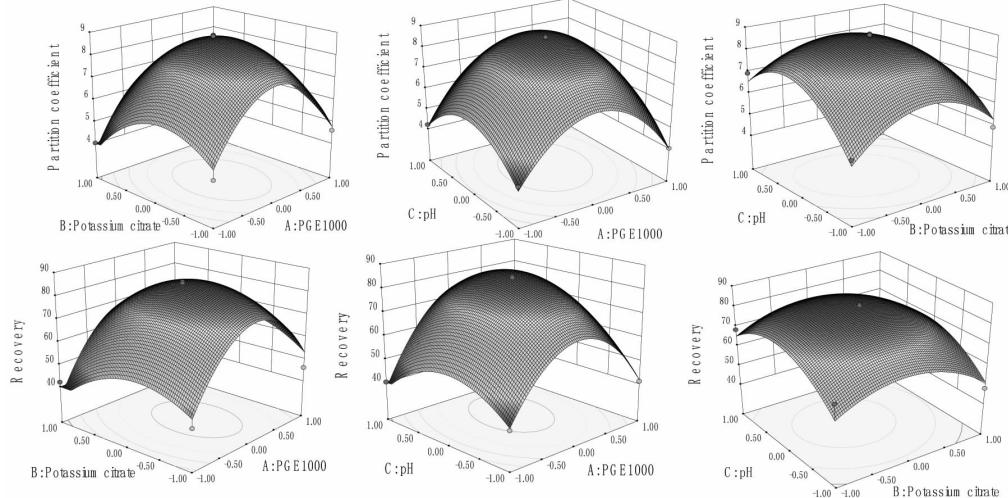


图 5 分配系数(A)和萃取率(B)对 PEG1000 和柠檬酸钾浓度及 pH 的响应面图

Fig. 5 Response surface plots showing the effect of PEG1000, potassium citrate concentration and pH on K (A) and recovery rate (B)

2.3 色素蛋白复合体分配行为

PPCs 富含细菌叶绿素及类胡萝卜素, 光谱特征典型。以色素分子为探针分子研究 PPCs 在 PEG1000/柠檬酸钾双水相体系萃取过程的分配行为, 结果如图 6 所示。由结果可见, 改变 PEG1000/柠檬酸钾体系的相组成及蛋白质加入量对 PPCs 分配于上、下相无影响, 上相均存在 385、460、485、512、590、800 nm 以及 860 nm 等典型的色素蛋白吸

收峰(图 6A、B、C a), 下相无色素吸收峰(图 6A、B、C b), 表明 PPCs 均分配于上相。pH 对 PPCs 分配具有调控作用, 调节体系 pH8.5 ~ 10, PPCs 分配于上相, 上相 PEG1000 溶液存在典型的 PPCs 吸收峰, 下相溶液无吸收峰(图 6D a)。当调节 pH6.0 ~ 8.5 时, PPCs 分配于下相, 典型的 PPCs 吸收峰出现在下相柠檬酸钾溶液, 上相溶液吸收峰消失(图 6D b)。由于 pH 可改变蛋白质解离状态, 因此 pH8.5

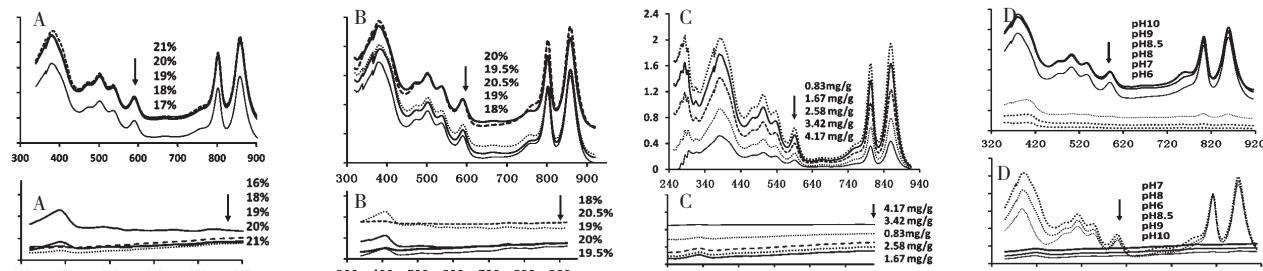


图 6 色素蛋白复合体在双水相系统的分配行为光谱分析

Fig. 6 Distribution behavior of PPCs in ATPS by UV-vis analysis

注:A、B、C、D 示 PEG1000、柠檬酸钾、蛋白质、pH; a、b 示上、下相

Note: A, B, C and D showed PEG1000, potassium citrate, protein and pH; a and b showed top and bottom phases

~10, PPCs 可能呈负离子状态易于分布于上相 PEG1000 溶液。当体系 pH6.0~8.5 时, PPCs 因带阳电荷转移到下相柠檬酸钾溶液, 该结果也揭示纯化的色素蛋白复合体 pI 约为 8.5。

2.4 反萃取纯化色素蛋白复合体

根据萃取实验及分配行为表征结果可知, 降低体系 pH 可实现色素蛋白复合体的反萃取。pH7.0

时色素蛋白复合体分配于下相达到最大。实验选定 pH7.0 柠檬酸钾缓冲溶液为新相组成, 优化了反萃取体系的条件, 结果总结于表 1。由结果可见, 当萃取体系上相与质量分数为 20.0% 柠檬酸钾缓冲液的体积比(r)为 1:1 时, 可有效反萃取色素蛋白复合体, K 为 0.15, 反萃取率(Yb%)达到 86.6%, 达到最大, 此时蛋白质总回收率(Y%)为 74.2%。

表 1 色素蛋白复合体反萃取条件分析

Table 1 Analysis of reverse extraction condition of PPCs

上/下相组体积比 Volume ratio of top/bottom phase(r)	分配系数 Distribution coefficient(K)	下相萃取率 Recovery of bottom phase(Yb%)	总回收率 Yield(Y%)
1:1	0.15	86.6	74.2
2:3	0.35	72.0	61.9
1:2	0.40	70.0	60.2
1:3	0.49	65.0	55.9

2.5 色素蛋白复合体纯度及生物活性分析

采用 SDS-PAGE 表征双水相萃取 PPCs 纯度, 结果如图 7 所示。在 pH9.0 条件下, 萃取体系上相显示 2 个蛋白质组分, 为 MW 14 kD 及 7 kD, 下相溶液未见该组分(图 7 Lane4、5)。调节 pH7.0, 反萃取体系的下相可见 MW 7kD 的蛋白质组分(图 7 Lane2), 该组分为色素蛋白复合体 LH2 β 亚基^[14]。而 MW 14kD 蛋白质组分(为溶菌酶)分配于上相(图 7 Lane3)。未经纯化的粗品色素蛋白复合体存在 5 个蛋白条带(图 7 Lane6), 杂蛋白含量高。该结果进一步揭示, pH 可调控 PEG1000/柠檬酸钾双水

相体系萃取和反萃取过程, 实现 PPCs 的分离纯化, 纯度可达到电泳纯。

PPCs 结合类胡萝卜素和细菌叶绿素分子, 具有宽光谱的捕获和传递光能的生物学活性^[15]。因此采用荧光光谱法探究双水相萃取后的色素蛋白复合体的生物稳定性, 结果如图 7B 所示。可见, 以 364、475 nm 及 502 nm 等波长为激发波时, 纯化的 PPCs 在 620、670 nm 处有荧光发射(图 7B 箭头所示), 与萃取前 PPCs 的荧光特征一致, 表明双水相纯化的 PPCs 具有捕获光能和传递光能的生物活性。

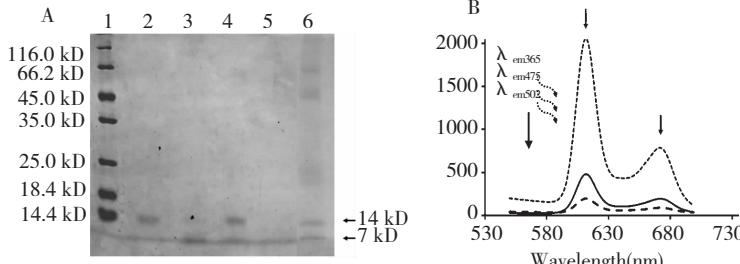


图 7 色素蛋白复合体电泳表征(A)及荧光光谱(B)

Fig. 7 Analysis of PPCs by SDS-PAGE(A) and fluorescent spectrometry(B)

注: Lane1 蛋白质 maker; Lane2,3 为 pH7 上及下相; Lane4,5 为 pH9.5 上及下相; Lane6 为蛋白原液

Notes: Lane 1 was protein maker; Lane2,3 were top and bottom solution with pH7; Lane4,5 were top and bottom solution with pH9.5; Lane 6 was protein mixture

2.6 双水相萃取分离路线

基于 PPCs 双水相萃取和反萃取结果及其分配行为, 对 pH 调控 PPCs 双水相萃取分离的技术路线设计如图 8 所示。操作步骤为:(1)室温条件下, 相

组成 C_{PEG1000} 为 19% (W/W), C_{柠檬酸钾} 为 20% (W/W), 蛋白质加样终浓度为 3.42 mg/g, 调节 pH9.0, 色素蛋白复合体被分配在上相溶液, 大部分杂蛋白(约 60%)留在下相;(2)将上相溶液与等体积

$C_{\text{柠檬酸钾}}$ 为 20% (W/W) 溶液组成反萃取体系, 调节 pH7.0, PPCs 趋于分配下相, 杂蛋白 (MW 14kD) 留

在上相; (3) 收集下相溶液, 透析除盐, 获得纯化的 PPCs。

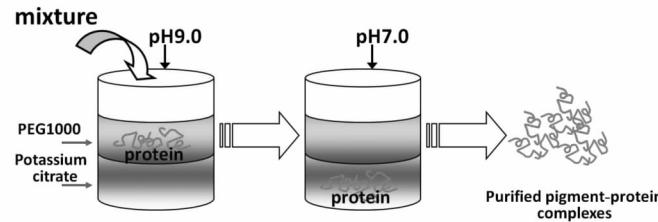


图 8 pH 调控双水相萃取分离色素蛋白复合体路线

Fig. 8 Scheme of pH-controlled extraction and separation of pigment-protein complexes by ATPS

3 讨论与结论

基于高分子聚合物 PEG 良好的生物相容性, PEG/无机盐体系是应用于蛋白质萃取最广的方法之一^[16-18]。研究表明, PEG 分子量对蛋白质分配系数影响较大, 随着 PEG 分子量的降低, 空间斥力作用减弱, 易于蛋白质富集到含 PEG 相^[16]。本实验选择 PEG1000/柠檬酸钾体系, 结果表明, PEG1000/柠檬酸钾体系可有效萃取分离色素蛋白复合体, 优化的萃取体系 C_{PEG1000} 为 19% (W/W), $C_{\text{柠檬酸钾}}$ 为 20% (W/W), 最佳蛋白质加入浓度为 3.42 mg/g, pH9.0, 分离因素 K 达到最大 8.8, 蛋白质的萃取率达到 86.0%。反萃取结果揭示, pH7.0 条件下, 以萃取上相 PEG1000 与等体积质量分数为 20% 的柠檬酸钾组成新相, 可实现 PPCs 反萃取, 萃取率达 86.6%, 通过双水相的萃取和反萃取实现色素蛋白总收率为 74.4%。据报道, PEG1000/柠檬酸钾体系应用于牛血清白蛋白 (BSA) 萃取分离^[16,18], 经萃取和反萃取 BSA 回收率为 91.1%, 取得了满意的分离度和收率。相比较, 本实验从混合体系萃取分离色素蛋白复合体, 实现了 74.4% 的产物收率, 达到了较好收率效果。产物经电泳分析可见, 该方法纯化了一个分子量为 7kD 的色素蛋白复合体组分, 该组分为 LH2 的 β 亚基, 经双水相萃取分离该 PPCs 组分生化活性完好。研究结果揭示, pH 对 PPCs 在双水相系统分配具有调控作用, 当 pH ≥ 8.5 , 该 PPCs 组分解离为阳离子, 分配在上相 PEG1000 溶液。当 pH < 8.5 时, 该 PPCs 组分解离为阳离子, 分配于下相。PEG1000/柠檬酸钾相组成、蛋白质加入量对色素蛋白复合体在双水相上、下相分配无影响。增加 PEG1000 及柠檬酸钾含量、蛋白质加入量有利于增大分配因素和萃取率, 可能是 3 个因素导致了体系

线系的增大, 利于蛋白质向上相分配。

本实验发展了一种色素蛋白复合体纯化方法, 室温条件下, 蛋白质加样终浓度为 3.42 mg/g 条件下, 调节体系 pH9.0, 通过 $C_{\text{PEG1000}} 19\% / C_{\text{柠檬酸钾}} 20\%$ 双水相的萃取后, 其上相 PEG1000 溶液与等体积质量分数 20% 柠檬酸钾组成反萃取体系, 调节 pH7.0 进行反萃取, 收集下相, 透析除盐, 获得纯化的色素蛋白复合体。该方法集分离纯化于一步, 简便快速, 产物收率高, 生物学活性稳定。

参考文献

- 1 Cogdell RL, Thornber JP. Light-harvesting pigment-protein complexes of purple photosynthetics bacteria. *Febs Lett*, 1980, 22(1):1-8.
- 2 Varga AR, Staehelin LA. Pigment-protein complexes from *Rhodopseudomonas palustris*: isolation, characterization, and reconstitution into liposomes. *J Bacteriol*, 1985, 161: 921-927.
- 3 Shimada K. Light-harvesting pigment-protein complexes of *Rhodopseudomonas sphaeroides forma sp. denitrificans*. *J Biochem*, 1985, 98:465-473.
- 4 Deisenhofer J, Epp O, Miki K, et al. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, 1985, 318:618-624.
- 5 Zhao LG (赵良贵), Dong YM (董彦敏), Yang SP (杨素萍), et al. Influence of LDAO on the conformation and release of bacteriochlorophyll of peripheral light-harvesting complex (LH2) from *Rhodobacter azotoformans*. *Spectrosc Spectral Anal* (光谱学与光谱分析), 2010, 30:2807-2811.
- 6 Beyer SR, Ullrich S, Kudera S, et al. Hybrid nanostructures for enhanced light-harvesting: plasmon induced increase in fluorescence from Individual Photosynthetic pigment-protein complexes. *Nano Lett*, 2011, 11:4897-4901.

(下转第 684 页)