

## Фікобіліпротеїнові барвники для біомолекул.

### 1. Препаративне отримання та спектральні властивості

В. Ю. Черненко\*, А. В. Кирюшин, Л. Л. Лукаш

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

---

*Авторами розроблено технологічний метод препаративного отримання фікобіліпротеїнів мікродоростей — фікоеритрину з одноклітинної червоної водорості *Porphyridium cruentum* та фікоціаніну з синьо-зеленої мікродорості *Anabaena variabilis*. Вивчено спектральні властивості одержаних барвників.*

---

Вступ. Сучасні методи молекулярної діагностики потребують впровадження нових високочутливих і водночас нешкідливих для здоров'я персоналу та пацієнтів неізотопних методів маркетування біоспецифічних макромолекул. Природні флюорохромні барвники з синьо-зелених та червоних мікродоростей є ідеальними в цьому відношенні маркерами. Їх характерні спектральні властивості та значний квантовий вихід ( $Q = 0,8$ ) забезпечують високу чутливість і специфічність нових діагностичних тест-систем [1, 2].

Фікобіліпротеїни — водорозчинні пігменти, які беруть участь у фотосинтезі синьо-зелених та червоних мікродоростей, мають високу флюоресцентну активність у кон'югованому стані з біологічно специфічними молекулами (моно- та поліклональними антитілами, авідином, білком А золотистого стафілококу, іншими лігандами) і можуть бути виявлені у фемтолярній кількості ( $10^{-15}$  моль/л) [1].

Практична вагомість препаративного отримання фікобіліпротеїнів обумовлена широкою сферою їх застосування для флюоресцентного аналізу клітин та молекул: визначення концентрації білкових компонентів у реакціях «антиген—антитіло» при імуноферментному аналізі, виявлення цільових субстанцій в гелях та інших нерозчинних носіях, для пошуку цільових молекул білків, антигенів у крові, сечі, лікворі. Особливе значення мають фікобіліпротеїнові барвники для дво- та триколірової ідентифікації і флюоресцентно активованої клітинної сепарації субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів людини [3]. Використання даних флюорохромів не потребує додаткових проявників (як у випадку маркерування пероксидазою хрому), результат фіксується безпосередньо під джерелом збуджуючого опромінення — люмінесцентного мікроскопу, хроматоскопу.

Авторами цієї роботи розроблено технологічний метод препаративного отримання фікобіліпротеїнів мікродоростей — фікоеритрину з одноклітинної червоної водорості *Porphyridium cruentum* та фікоціаніну з синьо-зеленої мікродорості *Anabaena variabilis*, вивчені спектральні характеристики отриманих барвників.

\*Correspondence address.

Вибір об'єктів дослідження обумовлений доступністю сировини, пов'язаною з технологічністю розмноження мікродоростей в умовах культури [4].

**Матеріали і методи.** Біомасу мікродорості *P. cruentum* було напрацьовано у відділі культивування водоростей Інституту біології південних морів НАН України (Севастополь), біомасу синьо-зеленої мікродорості *A. variabilis* — у відділі вірусів водоростей Інституту мікробіології та вірусології НАН України (Київ) Н. В. Колтуковою.

Для екстрагування фікобіліпротеїнів застосовували розроблений нами метод, який полягає в кількаразовому заморожуванні—відтаюванні біомаси мікродоростей у 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,0) наступного складу (на 1 л  $H_2O$ ):  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  — 15,48 г,  $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$  — 7,6 г. Отриману суспензію центрифугували на центрифугі «НС-6» при 6000 об/хв протягом 20 хв. Осад промивали цим же буфером і знову центрифугували.

До зібраного супернатанту додавали сульфат амонію до 65 % від насичення і залишали на ніч при 4 °С. Осад збирали центрифугуванням, розчиняли в мінімальному об'ємі 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0) і діалізували проти цього ж буфера при 4 °С протягом ночі. Діалізат використовували для подальшої очистки барвників. Фікоціанін фракціонували методом препаративного ізоелектрофокусування в штучному борат-гліцериновому рН-градієнті (4,6—5,2) у пластині 7 %-го поліакриламідного гелю [5]. Даний градієнт рН забезпечували градієнтом концентрації гліцерину (чда) 10—20 % в трис-боратному буфері: 0,1 М борна кислота, 0,04 М трис, рН 7,2, який використовували також як анолітний та католітний буфери [6]. Ізоелектричне фокусування тривало 16—18 год при напрузі 450 В та силі струму 40 мА.

Зконцентрований у вигляді вузької «зони» червоного кольору барвник (рис. 1) елюювали шляхом механічного подрібнення гелю з наступним



Рис. 1. Аналітичне ізоелектрофокусування фікобіліпротеїнів у штучному борат-гліцериновому рН-градієнті (4,4—5,2): 1, 2, 3 — фікоціанін *A. variabilis* має три зони: а — мажорна, б і в — мінорянні фракції з інтенсивно червоним кольором флюоресценції; 4, 5, 6 — фікосеритрин *P. cruentum* має одну мажорну (а) фракцію з інтенсивно оранжевим кольором флюоресценції; 7, 8, 9 — маркери ізоелектричних точок: рІ 5,2 — альбумін, рІ 4,8 та рІ 4,6 —  $\alpha_1$ -антитрипсин людини. Зйомки проведено при освітленні хроматоскопом «УФО-254» без фіксації та фарбування. Фотоплівка «Фото-64» («Сьєма», Україна), оранжевий фотофільтр

екстрагуванням невеликою кількістю (40—50 мл) 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0). Після кількаразового заморожування—відтаювання гельової маси, залитої буфером, фікоціанін відфільтровували. Контроль елюції білка здійснювали візуально. З метою концентрування барвника та подальшого його зберігання до елюату додавали сульфат амонію до 65 % від насичення.

Фікоеритрин отримували методом препаративного ізоелектрофокусування в штучному борат-гліцериновому рН-градієнті (4,4—5,2) за вищенаведеною схемою, а також методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі («Serva», США), як описано раніше [7]. Барвник наносили на колонку після попереднього діалізу проти 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,0). Десорбцію зразка проводили поступовим градієнтом іонної сили фосфатного буферного розчину (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 М). Фракції фікосритрину, що відрізнялися за кольором, збирали на колекторі фракцій «Bio Mark Inc.» (Львів). Методом електрофорезу в денатуруючих умовах з використанням 0,1 %-го DS-Na в 12 %-му поліакриламідному гелі по Лемблі [8] визначали молекулярну масу та субдинічний склад барвників (рис. 2).

Спектральні властивості одержаних барвників вивчали на спектрофотокориметрі «Hitachi. Model 850» (Японія).

Результати та обговорення. Отримані результати свідчать, що властивості фікоеритрину *P. cruentum* та фікоціаніну *A. variabilis* добре узгоджуються з літературними даними [1, 9], субдинічний склад відповідає такому нативних молекул цих барвників.

Фікосритрин має максимум поглинання при 540 нм за наявності двох

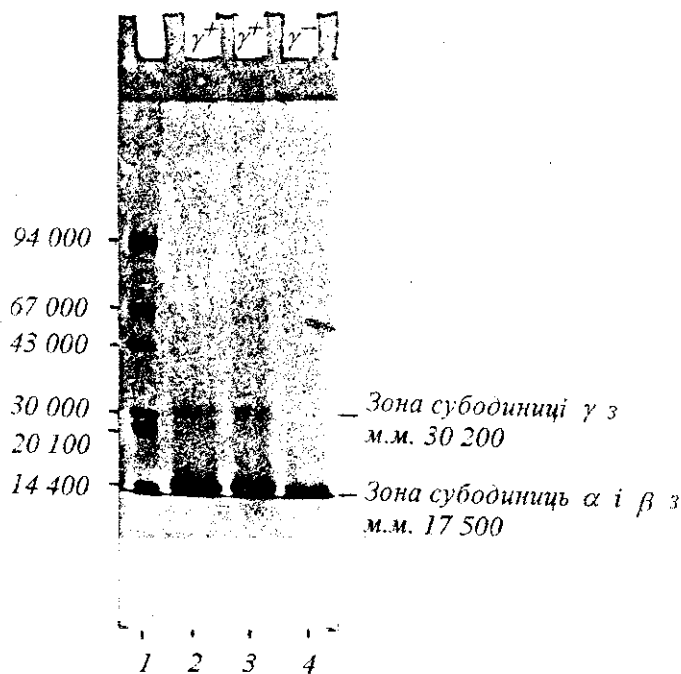


Рис. 2. Електрофорез у денатуруючих умовах за Лемблі (12 %-й поліакриламідний гель, 0,1 % DS-Na, 0,375 М трис-НСІ, рН 8,8): 1 — маркери молекулярної маси (14400 —  $\alpha$ -лактальбумін; 20100 — соевий інгібітор трипсину; 30000 — карбоангідраза; 43000 — овалбумін; 67000 — альбумін; 94000 — фосфорилаза Б); 2 — фікоеритрин, отриманий методом ізоелектрофокусування в штучному борат-гліцериновому рН-градієнті (4,6—5,4); 3 — фікоеритрин, отриманий методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі; 4 — фікоціанін, отриманий методом ПЕФ (рН 4,4—5,2)

Спектральні властивості фікобіліпротеїнів, отриманих методами препаративного ізоелектрофокусування (ІЕФ) в штучному борат-гліцериновому рН-градієнті (4,6—5,2) та іонообмінної хроматографії (ІОХ) на ДЕАЕ целюлозі

Фікобіліпротеїн	Мікрородорість	Спосіб отримання	Максимум поглинання, нм	Максимум флюоресцентної емісії, нм
Фікоеритрин	<i>P. cruentum</i>	ІЕФ	540	575*
»	»	10 x ДЕАЕ	540	575*
Фікоціанін	<i>A. variabilis</i>	ІЕФ	625	650*

\*Довжина хвилі збудження 480 нм.

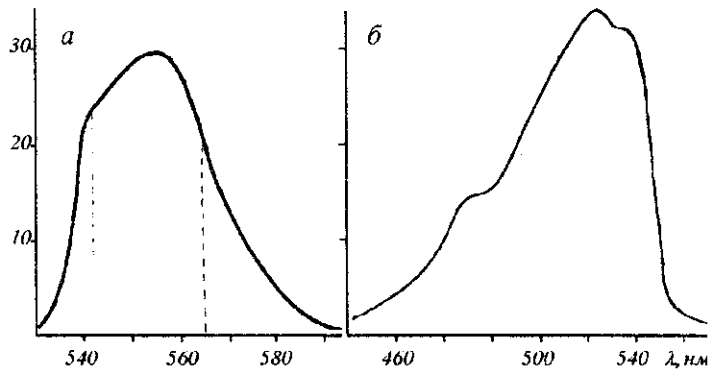


Рис. 3. Спектри поглинання фікоеритрину *P. cruentum*: а — максимум поглинання знаходиться в межах від 540 до 565 нм, що узгоджується з літературними даними [1]; барвник отриманий методом препаративного ізоелектрофокусування в штучному борат-гліцериновому рН-градієнті (4,4—4,9); б — спектр отримано методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ целюлозі; максимум поглинання становить 545 нм; чітко визначені три піки при довжинах хвиль 498, 545 та 563 нм характеризують нативний блок В-фікоеритрин *P. cruentum* [1]. По осі ординат — відносні оптичні одиниці

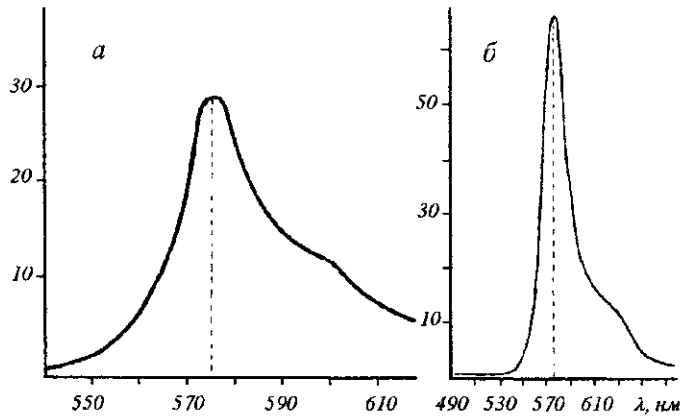


Рис. 4. Спектри люмінесцентної емісії фікоеритрину *P. cruentum*, отримані методами препаративного ізоелектрофокусування в штучному борат-гліцериновому рН-градієнті (4,4—4,9) (а) та іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ целюлозі (б) при довжині хвилі опромінення 480 нм. Максимум емісії становить 575 нм. По осі ординат — відносна інтенсивність флюоресцентної (а) і люмінесцентної (б) емісії

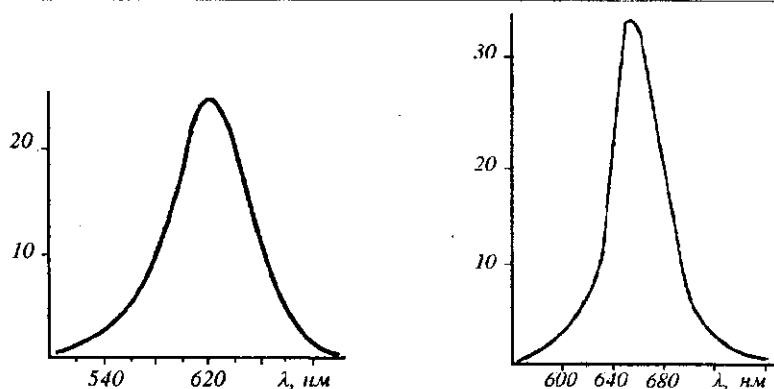


Рис. 5. Спектр поглинання фікоціаніну *A. variabilis*, отриманий методом препаративного ізоелектрофокусування в штучному борат-гліцериновому рН-градієнті (4,6—5,2). Максимум поглинання становить 625 нм. По осі ординат — відносні оптичні одиниці

Рис. 6. Спектр люмінесцентної емісії фікоціаніну *A. variabilis*, отриманий методом препаративного ізоелектрофокусування в штучному борат-гліцериновому рН-градієнті (4,6—5,2) при довжині хвилі опромінення 480 нм. Максимум емісії становить 650 нм. По осі ординат — відносна інтенсивність люмінесцентної емісії

інших піків — 498 та 563 нм, також описаних у літературі [1]. Максимум емісії фікоеритрину при довжині хвилі збудження 480 нм становить 575 нм, що відповідає оранжевому кольору флюоресценції. Фікоціанін має максимум поглинання при 625 нм, максимум емісії при довжині хвилі збудження 480 нм становить 650 нм, що відповідає червоному кольору флюоресценції (таблиця, рис. 3—6).

Барвники добре зберігають свої властивості при довгостроковому зберіганні у вигляді суспензії у 75 %-му розчині від насичення сульфату амонію.

При аналізі отриманих результатів було зроблено обнадійливі висновки про перспективність застосування фікобіліпротеїнових барвників у лабораторній практиці. Оптимізм таких висновків обумовлений наявністю вітчизняних виробників необхідних джерел збуджуючого випромінювання.

Львівське виробниче об'єднання «Полярон» виготовляє гелій-неонові та аргонні лазерні випромінювачі, які генерують випромінювання з довжинами хвиль, необхідними для збудження флюоресцентної емісії фікоеритрину — 488 нм (зелене випромінювання, тип лазера ЛГН-503) та фікоціаніну — 630 нм (червоне випромінювання, тип лазера ЛГН-207 А).

Вибір системи «Джерело випромінювання—барвник—система оптичної реєстрації» буде залежати від спектральних властивостей флюоресцентних барвників (довжини хвилі максимального поглинання та максимальної емісії), які використовують для аналізу, та конкретних цілей — одно-, дво-, чи триколірової реєстрації флюоресценції молекулярних субстанцій.

Автори висловлюють подяку О. І. Корнелюку та І. В. Клименко за допомогу у вивченні спектральних властивостей фікобіліпротеїнових барвників.

В. Ю. Черненко, А. В. Кирюшин, Л. Л. Лукаш

Фикобилипротеиновые красители для биомолекул. 1. Препаративное получение и спектральные свойства

Резюме

Авторами разработан технологический метод препаративного получения фикобилипротеинов микроводорослей — фикоэритрина из одноклеточной красной водоросли *Porphyridium cruentum* и

фикоцианина из сине-зеленой микроводоросли *Anabaena variabilis*. Изучены спектральные свойства выделенных красителей.

V. Y. Chernenko, A. V. Kiryushyn, L. L. Lukash

Phycobiliprotein pigments for biomolecules. I. Preparative fractionation and spectrale characteristics

Summary

The authors have elaborated technological approaches concerning preparative fractionation of phycobiliproteins — phycoerythrin from a microalga *Porphyridium cruentum*, and of phycocyanin from a cyanophyte alge *Anabaena variabilis*. The spectral properties of dyes obtained have been also investigated.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Oi V. T., Glazer A. N., Stryer L. Fluorescent conjugates for analysis of cells and molecules // J. Cell. Biol.—1982.—93.—P. 981—986.
2. Cordier G. Flow cytometry for immunology // Biol. Cell.—1986.—58, N 2.—P. 147—150.
3. Антитела. Методы / Под ред. Д. Кэрти.—М.: Мир, 1991.—Т. 2.—315 с.
4. Андрюк Е. И., Коптева Ж. П., Занина В. В. Цианобактерии.—К.: Наук. думка, 1990.—197 с.
5. А. с. № 1400275 (СССР). Способ разделения  $\alpha_1$ -антитрипсина на фракции / Г. Г. Демидова, В. Ю. Черненко, К. А. Одынец, Л. Е. Король.
6. Троицкий Г. В., Ажицкий Г. Ю. Изоэлектрическое фокусирование белков в самоорганизующихся и искусственных рН-градиентах.—К.: Наук. думка, 1984.—184 с.
7. Пастер Е. У., Овод В. В., Позур В. К., Вихоть Н. Е. Иммунология. Практикум.—К.: Вища шк., 1989.—С. 128—130.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.
9. Patent USA N 4 859 582 Fluorescent conjugates for analysis of molecules and cells / L. Stryer, A. Glazer, V. Oi.—1989.

УДК 577.112.083

Надійшла до редакції 13.11.95