PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FLUORESCENT PROBES FROM BLUE GREEN ALGAE

LUCKANA LAOUSOONTORNSIRI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1990

Copyright by Mahidol University

อภินันทนาการ
จาก
ศิษย์เก่า วิทยาลัย ม. มหิดล

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเตรียมและการศึกษาคุณสมบัติของสารฟลูออเรสเซนต์จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว
ผู้วิจัย	ลักขณา เหล่าสุนทรศิริ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล Ph.D.

พิชิต โตสุขวงศ์ Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 18 ธันวาคม พ.ศ.2533

บทคัดย่อ

สารphycocyanin เป็นสารชนิดหนึ่งของphycobilisomesสามารถสกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว(*Spirulina platensis*) ซึ่งสารนี้มีคุณสมบัติในการใช้เป็นตัวตรวจจับเรืองแสงในการวิเคราะห์ในด้านต่างๆ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติและใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนอีกทั้งยังสามารถสังเคราะห์แสงได้ สารนี้เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของโปรตีนในเซลล์การสกัดสารนี้ทำได้โดยแช่แข็ง *S.platensis* แล้วละลายที่ ๓๗ องศาเซลเซียล ประมาณ ๓ ถึง ๔ รอบแล้วปั่นแยกเอาส่วนใสสีน้ำเงินเข้ม และทำให้บริสุทธิ์ในปริมาณมากๆ สามารถทำได้ในการศึกษานี้ phycocyanin มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงในช่วง ๖๒๗ นาโนเมตร ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการเตรียมสารนี้จาก DE-cellulose columnจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่ ๐.๑๕ โมลาร์ ของเกลือแกงสารนี้มีความบริสุทธิ์โดยใช้อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ ๖๒๐ ต่อ ๒๘๐ มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ ๓.๔ เป็นตัวบ่งบอก phycocyanin เรืองแสงที่ ๖๔๐ นาโนเมตร และยังเสียสภาพที่อุณหภูมิเกินกว่า ๕๐ องศา ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสม ๔ ถึง ๔๐ องศา ส่วน pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง ๔ ถึง ๘ การเรืองแสงของ phycocyanin นี้ถูกรบกวนได้ด้วยความเข้มข้นของสารนี้ (quenching) phycocyanin ประกอบด้วย ๑๒ ส่วนย่อยซึ่งรวมน้ำหนักโมเลกุลได้ ๒๐๘ กิโลดาลตัล

สารชีวโมเลกุลอีกชนิดที่ใช้ประโยชน์มากคือ avidin สามารถสกัดได้จากไข่ขาวและสามารถทำได้ปริมาณมากเช่นเดียวกับ phycocyanin ขั้นตอนการเตรียมมี ๒ ขั้น ขั้นแรกใช้ CM-cellulose จับแล้วชะ ขั้นต่อไปใช้ 2-iminobiotin agarose (affinity column chromatography)ได้ avidin ที่บริสุทธิ์และสามารถสกัดได้ถึง ๓๔% และมีค่า spcecific activity ถึง ๑๕.๗ (*ug* biotin/ g protein) และมีค่าน้ำหนักโมเลกุลของส่วนย่อย ๑๘.๔ กิโลดาลตัล

Copyright by Mahidol University

๑๘.๔ กิโลดาลตัล

การเชื่อมphycocyanin กับ avidin โดยใช้สารเคมีอื่นๆ พบว่า herterobifunctional reagent ที่ชื่อ SPDP สามารถเชื่อมสารสองชนิดได้ในอัตราส่วน ๑:๑ และ ๑:๒ โดยที่สารใหม่นี้ยังคงคุณสมบัติของ phycocyanin และ avidin เพื่อเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ต่อไป.

Copyright by Mahidol University

Thesis Title: Purification and characterization of fluorescent probes from blue green algae

Name: Luckana Laousoontornsiri

Degree: Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Comittee:

Dhirayod Wititsuwanakul Ph.D.

Pichit Tosukhowong Ph.D.

Date of Graduation: 18 December B.E.2533 (1990)

ABSTRACT

Phycocyanin which is a protein component of phycobilisomes has been purified from *Spirulina platensis*. It is an effective fluorescent protein with high quantum yield. Phycocyanin is gaining wide acceptance for use as fluorescent probe in various different analytical techniques. The cyanobacteria *Spirulina platensis* is a type of blue-green algae found as natural bloom in water enviroment. It has ability for CO_2 fixation using the light harvsting phycobilisome proteins in photosynthesis process. Phycocyanin was found as major components upon dissuption of *Spirulina platensis* by repeated freeze-thawing of the cell mass. The blue-green algae is abundant in natural water source and serves as a suitable staring material. The deep blue supernate after removal of cell debris contained large amount of phycocyanin. A large scale preparation and purification procedure for phycocyanin was developed in this study. The protein was purified from DEAE cellulose column chromatography by linear salt gradient elution. It has characteristics of specific

Copyright by Mahidol University

absorbance at A620 which was used for monitoring the phycocyanin. The protein was eluted from the column at 0.15 M NaCl as almost pure phycocyanin peak. The absorbance ratio A620/A280 of fractions greater than 3.4 was found to be homogeneous phycocyanin and used as criteria for purity of the protein. Batch binding of phycocyanin with DEAE cellulose followed by step gradient salt elutions was employed in large scale purification as modified and adapted from the column method. The fluorescent properties of phycocyanin was characterized with maximum emission at 640 nm. It was sensitive to temperature above 50°C and pH 8. The optimum ranges for fluorescence were 20°C-40°C and pH 4-8. Phycocyanin was also found sensitive to concentration quenching which is a typical nature of fluorophores. Subunit molecular weight was 17.5 Kd and the native phycocyanin had molecular weight 208 Kd, indicating the phycocyanin was multimeric protein containing 12 subunits in the active from.

Avidin was also prepared and purified from egg-white in this investigation for conjugation study with phycocyanin. Large scale purification of avidin from diluted egg-white solution was developed by modification of the previously reported methods. The purification procedure was divided into two steps. The first step was batch binding of avidin with CM-cellulose followed by extensive washing and step wise elution with ammonium carbonate. Detection of avidin was monitored by specific dye binding assay using 4-hydroxyazobenzene 2'-carboxylic acid (HABA) which displayed absorbance of A500. The second step employed 2-iminobiotin agarose as affinity column for purification of avidin eluted from CM-cellulose. Combination of two steps resulted in 74% recovery of purified avidin with a specific activity increased from 4.1 (ug biotion/ g protein) at CM-cellulose

Copyright by Mahidol University

step to 15.7 in the final affinity step. The molecular weight of purified avidin was 18.5 Kd as reported in this study.

Conjugation of phycocyanin and avidin was carried out using different chemicals modifying methods. Glutaraldehyde and carbodiimide were found unsatisfactory and no phycocyanin-avidin conjugate was resulted in these methods. However, the heterobifunctional reagent, SPDP, was found satisfactory for the formation of phycocyanin-avidin conjugate. The conjugate had both A620 property of phycocyanin and A500 for HABA binding to avidin in the same complex. The conjugate with molecular weight 37 Kd probably represented 1:1 ratio and 1:2 ratio for the 55 Kd conjugate. This study demonstrated that it was possible to perform large scale preparation of phycocyanin and avidin from simple and abundant starting materials as well as the utilization of the two biomolecules for analytical and practical purposes.

Copyright by Mahidol University