

文章编号: 1004 - 7271(2007)02 - 0135 - 05

小球藻蛋白质的分离、纯化及抗氧化特性

魏文志^{1,2}, 夏文水¹, 吴玉娟²

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036;

2. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:从小球藻中提取蛋白质,并研究了小球藻蛋白质抗氧化特性。通过反复冻融、细胞破碎、离心、盐析和凝胶层析,从小球藻中得到两种蛋白质(Pro I 和 Pro II),获得率分别为0.280%和0.664%。经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示为单条带,分子量分别为20.2 ku和20.4 ku。紫外可见光谱显示,Pro I在280 nm有一特征吸收峰,Pro II在280 nm和675 nm处各有一特征吸收峰。体外设计清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($\cdot OH$)实验,结果显示两种蛋白质能清除超氧阴离子自由基,黑暗条件下能清除羟自由基,但光照条件下生成羟自由基。

关键词:小球藻;蛋白质;分离纯化;抗氧化活性

中图分类号:S 963.2; S 917 **文献标识码:**A

Isolation, purification and property of anti-oxidation of the proteins from *Chlorella pyrenoidosa*

WEI Wen-zhi^{1,2}, XIA Wen-shui¹, WU Yu-juan²

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The proteins of *Chlorella pyrenoidosa* were extracted and the property of anti-oxidation of proteins was studied. Through repeated freezing and thawing, cell crushing, centrifuging, salting out and column chromatography, the two proteins (Pro I and Pro II) were obtained from *Chlorella pyrenoidosa*. The extraction rate of Pro I and Pro II was 0.280% and 0.664%. It has been demonstrated by SDS-PAGE as a single band and their molecular weight was 20.2 ku and 20.4 ku respectively. UV scanning spectrum shows that Pro I has absorption at point 280 nm and Pro II has absorption at point 280 nm and 675 nm. In order to estimate the antioxidation activity of Pro I and Pro II, superoxide anion($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radicals($\cdot OH$) *in vitro* were designed respectively. The results showed that both Pro I and Pro II could scavenge superoxide anion and generate hydroxyl radicals in light, but scavenge hydroxyl radical in dark.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; protein; isolation purification; antioxygenic activity

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)分类上属于绿藻门、绿球藻目、小球藻科、小球藻属,为单细胞植物。小球藻可快速繁殖和生长,是地球上植物中唯一能在20 h增长4倍的物种。小球藻营养价值高,其干粉的蛋白质含量在50%以上^[1]。已经证明小球藻热水抽提物具有促进免疫、抗肿瘤的作

收稿日期:2006-06-28

基金项目:江苏省教育厅自然科学研究指导性计划(NK0410193)

作者简介:魏文志(1970-),男,湖北天门人,讲师,主要从事生物饵料方面的研究。E-mail:wzwei38@sohu.com

用^[2,3],但小球藻的哪些成分有这些作用,则有进一步研究的必要。小球藻蛋白质的分离纯化的报道很少,而小球藻蛋白抗氧化作用的研究至今没有见到报道。本文以小球藻藻泥为原料,经反复冻融、细胞破碎、离心、盐析和凝胶层析得到两种分子量不同的蛋白质,并对两种蛋白质的抗氧化特性进行了研究,为进一步探讨小球藻蛋白质促进免疫、抗肿瘤的作用提供基础和理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料和主要仪器

小球藻藻泥(*Chlorella pyrenoidosa*) (江苏农科院微藻研究中心); Sephadex G-75 (Pharmacia Co)、标准蛋白(宝生物工程(大连)有限公司)

超声波细胞破碎机(JD-600型,宁波邱隘金达超声波仪器厂)、高速冷冻离心机(5810R,德国Eppendorf)、核酸蛋白检测仪(HD-21-1型,上海青浦沪西仪器厂)、电泳仪(EPS300,上海天能科技有限公司)、真空冷冻干燥机(FD-5型,上海离心机械研究所)。

1.2 小球藻蛋白质的粗提

1.2.1 粗提

称取200 g小球藻藻泥,悬浮于2000 mL pH7.0的0.001 mol/L磷酸缓冲液(PBS)中,反复冻融3次。然后用超声波细胞破碎机在冰浴中破碎细胞9 min(每90 s间歇60 s)。4℃12 000 r/min离心30 min,去细胞碎片获上清液。

1.2.2 盐析

在上清液中加30%饱和度硫酸铵,边缓慢搅拌边加入。4℃静置盐析24 h后,12 000 r/min 4℃离心30 min,上清液和沉淀分别收集。上清液用超滤杯浓缩至200 mL,为上柱样品。沉淀用少量PBS溶解,置入透析膜于pH7.0的0.001 mol/L PBS中搅拌透析2 d,聚乙二醇-6 000包埋浓缩至60 mL,为上柱样品。

1.3 纯化

SephadexG-75充分溶胀抽气后装柱,柱型1.6 cm×50 cm,流速0.5 mL/min,核酸蛋白检测仪灵敏度为0.5 A,记录仪走纸速度3 cm/h,管速7管/h,以pH7.0的0.001 mol/L磷酸缓冲液(PBS)为洗脱剂,根据洗脱峰,收集较浓部分。

1.4 纯度鉴定和分子量测定

采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[4],分离胶浓度12%,电极缓冲液为Tris-甘氨酸电泳缓冲液,水:异丙醇:冰醋酸(13:5:2)的0.1%考马斯亮蓝R-250染色,水:乙醇:冰醋酸(17:1:2)脱色,采用标准分子量蛋白质作标准,溴酚蓝为指示剂,以标准蛋白质分子量的对数对相对迁移率作标准曲线,根据蛋白质的迁移率从标准曲线上读取分子量。

1.5 氨基酸测定

称取蛋白质样品置于水解管中,加入6 mol/L的HCl溶液,真空封口,在110℃下水解24 h,冷却后定容、过滤、蒸干,再加入0.02 mol/L的HCl溶液在空气中放置30 min,上氨基酸分析仪(HP1100型,美国Agilent公司)测定氨基酸的含量。

1.6 光谱测定

紫外可见吸收光谱采用UV-2401PC分光光度计(日本岛津公司),室温条件下测定。

1.7 类SOD活性测定

采用邓碧玉等^[5]的方法。测定时,于4.5 mL 50 mmol/L pH8.3磷酸缓冲液中加入10 μL 50 mmol/L邻苯三酚,迅速摇匀,倒入光径1 cm的比色杯中,在325 nm波长下每隔30秒测吸光度值1次,要求自

氧化速率每分钟 OD 值变化约 0.07。活力测定方法与上相同,加入邻苯三酚前,加入待测样品溶液,得数据按下式计算酶活力。酶活单位定义:每毫升反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量为 1 个酶活单位(U/mL):

$$\text{酶活性(U/mL)} = \frac{\frac{0.070 - A_{325\text{nm}}/\text{min}}{0.070} \times 100}{50\%} \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

1.8 羟基自由基清除率的测定

采用周站平等^[6]α-脱氧核糖法,取 0.2 mL 的 FeSO₄-EDTA 混合液(10 mmol/L)于具塞试管中,加入 0.2 mL 的 α-脱氧核糖法溶液(20 mmol/L),然后再加入 0.2 mL 测试样品,并用磷酸缓冲液(pH 为 7.4)定容至 1.8 mL,最后加入 0.2 mL 的 H₂O₂(10 mmol/L),37 °C 水浴 1 h,然后加入 1 mL 2.8% 的三氯乙酸终止反应,再加入 1 mL 1% 的硫代巴比妥酸(TBA),混匀后沸水浴中加热 10 min,冷却后于 532 nm 处测吸光度 A_s。不加样品,同样操作处理,测定其对比吸光度 A_c。样品自由基清除能力 SA% (scavenging activity) = (A_s - A_c)/A_s

2 结果与分析

2.1 小球藻蛋白质的纯化

上清液样品上样后,可见到淡绿色区带洗脱下来,见图 1。沉淀样品上样后,可见到较深的绿色区带洗脱下来,见图 2。洗脱后样品经透析袋透析、浓缩、冷冻干燥,得固体样品。Pro I 和 Pro II 获得率分别为 0.280% 和 0.664%。Pro I 为淡绿色,Pro II 为绿色。

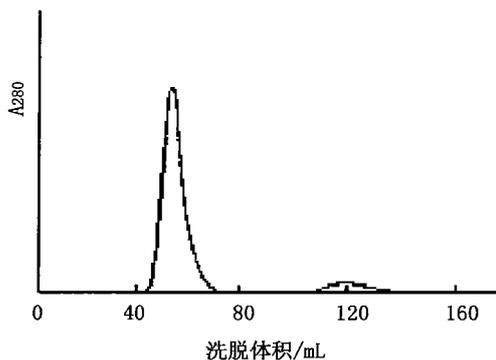


图 1 上清液 SephadexG-75 层析图谱

Fig. 1 Chromatography pattern of the supernatant

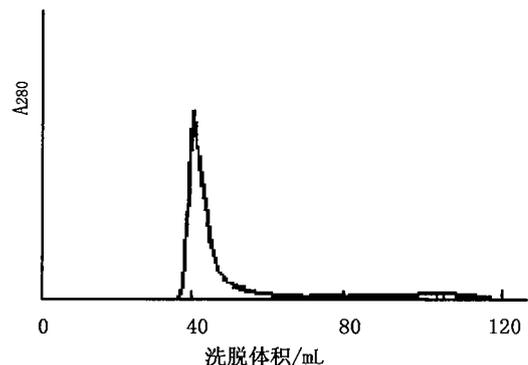


图 2 沉淀 SephadexG-75 层析图谱

Fig. 2 Chromatography pattern of the sediment

2.2 小球藻蛋白质纯度鉴定和分子量测定

从图 3 可以看出,两种蛋白质经 SDS-PAGE 电泳,均显示一条带,说明两种蛋白质均为电泳纯。与标准蛋白质分子量比较,结果显示 Pro I 分子量大约为 20.2 ku,Pro II 分子量大约为 20.4 ku。

2.3 氨基酸测定

两种小球藻蛋白质的 17 种氨基酸质量分数见表 1。酸性氨基酸有 Asp 和 Glu,在 Pro I 中 Asp 和 Glu 含量最高,在 Pro II 中 Asp 含量较高,而 Glu 含量低一些。碱性氨基酸有 His、Arg 和 Lys,在 Pro I 和 Pro II 中含量均较低,说明 Pro I 和 Pro II 均为酸性蛋白。

2.4 紫外可见光谱测定

两种蛋白质经紫外可见光扫描(图 4),Pro I 在 280 nm 有一特征吸收峰,Pro II 为除了在 280 nm 有一特征吸收峰外,在可见光区 675 nm 处有一特征吸收峰。

2.5 类SOD活性测定

从图5可以看出 Pro I 和 Pro II 都能抑制连苯三酚自氧化速率,从而对 $O_2^- \cdot$ 具有一定的清除能力,且随着浓度的升高,清除率是逐渐升高的。

2.6 羟自由基清除率的测定

羟自由基是化学性质最活泼的活性氧,几乎能和生物体内所有的分子发生反应。图6结果显示在光照条件下两种蛋白质具有生成羟自由基的作用,浓度越高生成羟自由基的能力越强。图7结果显示在黑暗条件下两种蛋白质均具有清除羟自由基的作用,浓度越高清除羟自由基的能力越强。

3 讨论

林芃等^[7]提取纯化小球藻蛋白质得到四种蛋白质,且四个峰的峰值近似。本实验经粗提、凝胶层析同样得到四个峰,但有两个峰的峰值很低。可能是同一属的植物,种不一样,组成藻类的成分不一样^[8]。两种蛋白质经 SDS - PAGE 电泳,显示一条带,说明两种蛋白质均为电泳纯。

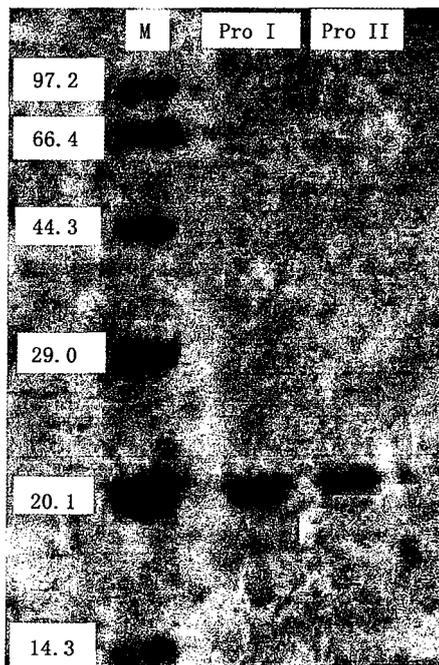


图3 两种蛋白质电泳图谱
Fig.3 Electrophoretic patterns of the two proteins

表1 两种蛋白质氨基酸组成
Tab.1 Amino acids of the two proteins

名称	含量(g/100g)		名称	含量(g/100g)	
	Pro I	Pro II		Pro I	Pro II
Asp	0.550	0.308	Cys	0.013	0.006
Glu	0.425	0.156	Val	0.257	0.183
Ser	0.228	0.114	Met	0.097	0.140
His	0.122	0.062	Phe	0.272	0.425
Gly	0.280	0.164	Ile	0.191	0.096
Thr	0.226	0.107	Leu	0.353	0.190
Ala	0.339	0.170	Lys	0.185	0.079
Arg	0.196	0.113	Pro	0.175	0.040
Tyr	0.226	0.129			

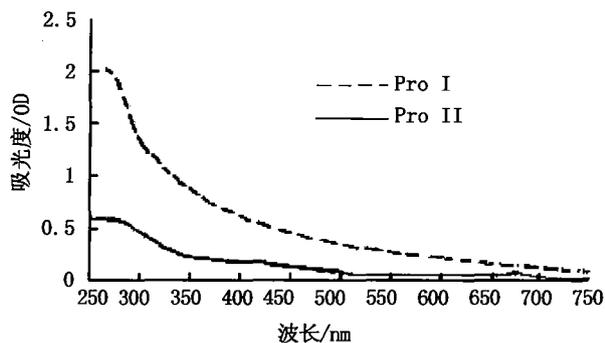


图4 两种蛋白质紫外可见吸收光谱
Fig.4 Ultraviolet and visible spectrums of the two proteins

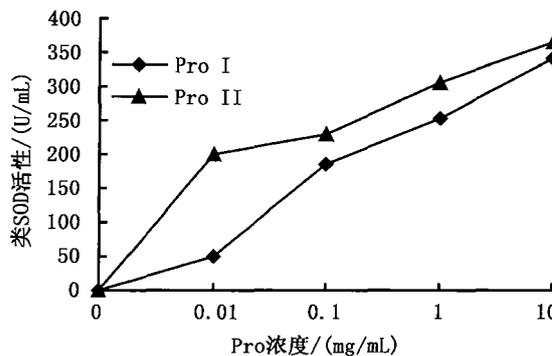


图5 两种蛋白质不同浓度对类SOD活性的影响
Fig.5 The effects of concentrations of the two proteins on the like - SOD activity

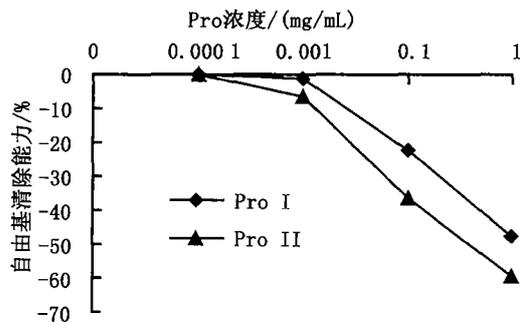


图6 光照条件下两种蛋白质对生成羟自由基的能力

Fig. 6 ·OH producing capacities on different concentrations of the two proteins in light

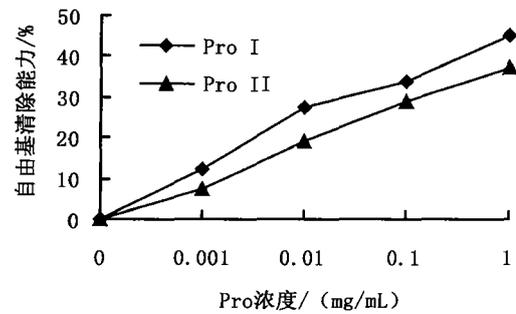


图7 黑暗条件下两种蛋白质清除羟自由基的能力

Fig. 7 ·OH scavenging capacities on different concentrations of the two proteins in dark

机体新陈代谢产生的自由基是人体生命活动中生物化学反应的中间产物,包括羟基自由基、超氧阴离子自由基等。许多疾病的发生、发展与自由基对组织的损伤有密切关系,它们可以损伤碳水化合物、蛋白质、脂类、核酸等生物大分子物质,可导致功能和代谢紊乱,可加快机体的衰老过程,可诱发癌症、心血管疾病等^[9]。正常情况下,机体产生和清除自由基处于动态平衡。但当物理或生物的因素引起自由基不能被及时清除,外源自由基清除剂可以降低体内自由基水平,使机体维持一个良好的状态^[10]。

在碱性条件下,连苯三酚会发生自动氧化反应,释放出超氧阴离子。连苯三酚自氧化速率与超氧阴离子产生的浓度有关,自氧化速率被抑制的大小显示超氧阴离子自由基 $O_2^- \cdot$ 被清除的强弱。生物体内 SOD 是机体用于消除 $O_2^- \cdot$,从而消除自由基对机体氧化损伤的酶。目前发现的大多数 SOD 几乎都是酸性蛋白,两种小球藻蛋白质也是酸性蛋白,可能它们清除 $O_2^- \cdot$ 的机理和 SOD 是一样的,即与机体内的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等共存的方式起作用的^[11]。

羟自由基是化学性质最活泼的活性氧,其反应速度快,是对机体危害最大的自由基。 $FeSO_4 - H_2O_2$ 脱氧核糖体系在 pH7.4 的磷酸缓冲液中反应时,产生的 $\cdot OH$ 进攻脱氧核糖,最终降解形成丙二醛 (MDA),TBA 与 MDA 在酸性环境中结合生成粉红色化合物。本研究说明小球藻蛋白质对自由基的清除作用是有条件的,具有生成和清除的双重功能。这与周站平等^[6]报道钝顶螺旋藻的别藻蓝蛋白在光照下具有生成羟自由基的能力,而在黑暗下却表现为清除羟自由基的实验结果是相似的。小球藻蛋白质是小球藻的捕光色素蛋白,光照条件下,当存在适当的电子供体或电子受体,小球藻蛋白质能给出电子,从而产生自由基。在黑暗条件下,小球藻蛋白质与羟自由基反应的速率大于脱氧核糖,保护了脱氧核糖免受氧化损伤,从而具有清除自由基的作用^[12]。

参考文献:

- [1] 李师翁,李虎乾. 小球藻干粉的营养学和毒理学研究[J]. 食品科学,1997,18(7):48-51.
- [2] Hasegawa T, Okuda M, Nomoto K, et al. Augmentation of the resistance against *Listeria monocytogenes* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in mice[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1994, 16(2):191-202.
- [3] Konishi F, Tanaka K, Himeno K, et al. Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): Resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes[J]. Cancer Immunol Immunother, 1985, 19(2):73-78.
- [4] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社,1981:112-118.
- [5] 邓碧玉,袁勤生,李文杰. 改良的连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2):163.
- [6] 周站平,刘鲁宁,陈秀兰,等. 光照、变性剂和 pH 对钝顶螺旋藻别藻蓝蛋白抗氧化活性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(2):179-185.
- [7] 林 芃,刘 艳,杨海波. 对小球藻蛋白质的提取及分离的研究[J]. 大连大学学报, 2002, 23(4):70-72.
- [8] 周志刚,刘志礼,刘雪娟. 极大螺旋藻多糖的分离、纯化及其抗氧化特性的研究[J]. 植物学报, 1997, 39(1):77-81.
- [9] 井乐刚,路 芳,张永忠. 大豆异黄酮的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2):62-65.
- [10] 戚向阳,陈维军,张俐勤,等. 罗汉果皂甙清除自由基及抗脂质过氧化作用的研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2):382-388.
- [11] Yang T, Mieko S, Shinjiro K, et al. A facilitated electron transfer of copper-zinc superoxide dismutase (SOD) based on a cysteine-bridged SOD electrode[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1569(1):151-158.
- [12] 韩立强,杨国宇,王艳玲,等. 肌肽清除自由基及抗氧化性质的作用研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2006, 27(1):43-46.