

藻胆蛋白脱辅基蛋白对其抗氧化活性的影响*

周站平 陈秀兰 陈超 张玉忠**

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 探讨了光照和脱辅基蛋白结构对藻胆蛋白抗氧化活性的影响,结果表明,光照下,藻胆蛋白能够产生自由基,黑暗下,则能够清除自由基,因此,藻胆蛋白具有产生和清除自由基的双重功能。在光照下,用 SDS(十二烷基硫酸钠)、脲及碱性条件下,对藻胆蛋白进行变性,藻胆蛋白产生自由基的能力消失,清除自由基的能力明显增强,因此,藻胆蛋白清除自由基主要由藻胆色素完成,天然状态下藻胆蛋白中脱辅基蛋白三维结构更有利于色素基团对光能的吸收与传递,这与其在体内的生理功能相一致。

关键词 藻胆蛋白, 自由基清除

中图分类号 Q51 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)05-0077-05

藻胆蛋白是红藻和蓝藻中的光合作用主要捕光色素蛋白复合体,由藻胆素和脱辅基蛋白组成。藻胆素是开链的四吡咯化合物,通过共价键连接在藻胆蛋白上。藻胆素可以作为自然色素被广泛地应用于食品添加剂。藻胆素的结构与胆红素非常相似,胆红素是一种高效的自由基清除剂^[1]。许多研究表明^[2-4],藻胆蛋白也具有抗氧化活性,在体内和体外都可以防止脂质体过氧化,保护 DNA 不受破坏,同时还具有消除炎症的功能,并且藻胆蛋白的抗氧化活性随其纯度的增加而增加,表明藻胆蛋白清除自由基的能力主要与藻胆蛋白中的藻胆素有关,那么,藻胆蛋白中的脱辅基蛋白的构象对藻胆素清除自由基的能力有何影响,至今尚未见报道。

通常认为,藻胆蛋白是一类光化学性质很稳定的蛋白,因此通过光诱导使它们形成电荷转移复合物进而产生自由基看来是比较困难的,但是 Evstigneev^[5]报道,藻胆蛋白具有电子转移的功能,在用藻胆蛋白或藻胆体所构成的电化学池中,照光后获得了一定的光生电势,表明当存在合适的电子供体或受体时,藻胆蛋白能够给出电子。同时藻胆蛋白的藻胆素中的双键存在异构体,两种异构体之间可逆变化,也可以导致自由基的产生。Morcos^[6]等人证明藻胆蛋白在光动力治疗中可作为有效的光敏剂。因此,藻胆蛋白具有产生自由基和清除自由基的双重功能,清除自由基和产生自由基的条件是什么,至今未见系统的研究。本文从藻胆蛋白的结构入手,系统研究了藻胆蛋白的构象和其自由基产生与清除能力之间的关系。

1 材料与方法

1.1 藻种

螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 由中国科学院青岛海洋研究所提供,采用 Zarrouk 氏培养基,用白炽灯照光,光强 $50\mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 温度 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。培养 7~8 d, 于对数生长期进行收集。

1.2 藻胆蛋白的分离纯化

400 目纱布过滤螺旋藻培养液,藻泥溶于少量蒸馏水,反复冻融破碎细胞后,提取液经硫酸铵沉淀,然后上羟基磷灰石柱分离出 C-藻蓝蛋白 (CPC) 和别藻蓝蛋白 (APC),再经过 P300 柱进一步纯化。

1.3 羟基自由基清除率的测定 (α -脱氧核糖法)

取 0.2 mL 的 FeSO_4 -EDTA 混合液 (10 mmol/L) 于具塞试管中,加入 0.2 mL 的 α -脱氧核糖溶液 (20 mmol/L), 然后再加入 0.2 mL 测试样品,并用磷酸缓冲液 (pH=7.4) 定容至 1.8 mL, 最后加入 0.2 mL 的 H_2O_2 (10 mmol/L), 37°C 水浴 1 h, 然后加入 1 mL 2.8%

* 国家 863 计划课题 2002AA302213 号、山东省自然科学基金资助。

第一作者:周站平,出生于 1977 年,在读硕士研究生。E-mail: zhouzhp@hotmail.com

** 通讯联系人

收稿日期:2003-0226;修回日期:2003-03-28

的TCA终止反应,再加入1 mL TBA,混匀后沸水浴中加热10 min,冷却后532 nm处测光吸收。对照不加样品,用磷酸缓冲液补齐。

1.4 藻胆蛋白变性

不同浓度SDS、脲、不同pH处理CPC和APC,然后测定其自由基清除能力。

2 结果与分析

2.1 藻胆蛋白的分离纯化

藻胆蛋白经过硫酸铵沉淀、羟基磷灰石和P300柱层析后,室温下CPC和APC的最大吸收峰分别在

625 nm和650 nm,室温荧光发射峰分别为650 nm和665 nm,与文献报道^[7]吻合,CPC的 $A_{620}/A_{280} = 4.03$,APC的 $A_{650}/A_{280} = 3.91$,说明CPC和APC已经纯化^[7]。

2.2 天然状态下CPC和APC的自由基生成和清除能力

2.2.1 光照对CPC和APC的自由基生成和清除能力的影响 从图1、图2可以看出,在日光灯下,天然状态下的CPC和APC不但不能清除自由基,反而具有生成自由基的能力。而在避光条件下,CPC和APC都表现出了清除自由基的能力。这与Pinero等

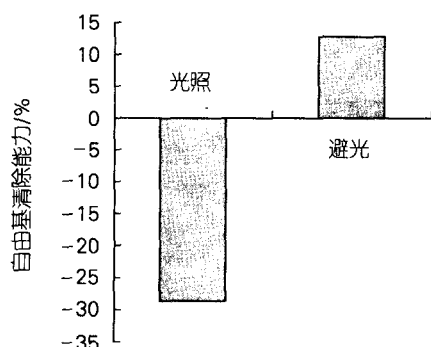


图1 光照对CPC(18.21 μg/mL)清除自由基的影响
Fig. 1 The effect of light on CPC's(18.21 μg/mL) scavenging radicals ability

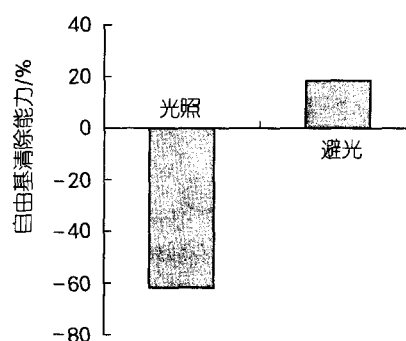


图2 光照对APC(102.25 μg/mL)清除自由基的影响
Fig. 2 The effect of light on APC's(102.25 μg/mL) scavenging radicals ability

2001年报道的结果不完全一致,说明藻胆蛋白对自由基的清除是有条件的,藻胆蛋白具有生成和清除自由基的双重功能。

2.2.2 蛋白浓度对CPC和APC的自由基清除能力的影响 在日光灯下,天然状态的CPC和APC,

生成和清除自由基的能力与其蛋白浓度有关,在低浓度下,CPC和APC具有产生自由基的能力,随着浓度的提高,CPC和APC则表现出清除自由基的能力(图3,图4)。这可能是由于光线较弱时,随着藻胆蛋白浓度的提高,藻胆蛋白不能饱和和吸收光能,自由基的生

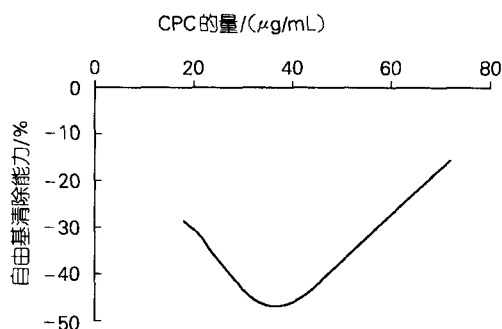


图3 不同浓度CPC的自由基清除能力
Fig. 3 The scavenging ability of different concentration CPC

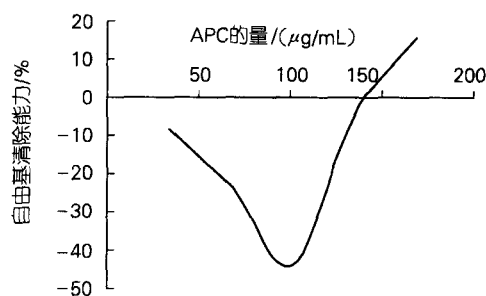


图4 不同浓度APC的自由基清除能力
Fig. 4 The scavenging ability of different concentration APC

成能力相对降低,从而表现出清除自由基的能力。

2.3 变性剂对 CPC 和 APC 自由基清除能力的影响

天然状态下藻胆蛋白的色素基团是与脱辅基蛋白紧密结合在一起,只有藻胆蛋白维持一定的三维构象,藻胆蛋白才具有吸收和传递光能的功能^[9]。而色素基团是藻胆蛋白生成和清除自由基起主要作用的组分,因此,藻胆蛋白的构象变化会对其生成和清除自由基的能力产生影响。

2.3.1 SDS 变性 天然状态的 CPC 和 APC 在

日光灯下,具有生成自由基的能力。SDS 是一种很强的变性剂,经过不同浓度的 SDS 变性后,在日光灯下,CPC 和 APC 生成自由基的能力消失,而清除自由基的能力都明显增强,随着 SDS 浓度的提高,自由基清除能力逐渐增强(图 5,图 6)。说明,SDS 存在下,藻胆蛋白的脱辅基蛋白变性,蛋白质链解开,藻胆色素外露,能量传递消失,而更有利于自由基的清除。

2.3.2 脲变性 相对于 SDS,不同浓度的脲对藻胆蛋白的变性程度不同,1.6 mol/L 的脲对藻胆蛋

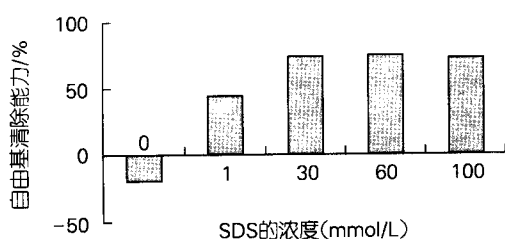


图 5 SDS 对 CPC(57.26 $\mu\text{g/mL}$)清除自由基的影响
Fig. 5 The effect of SDS on CPC's(57.26 $\mu\text{g/mL}$) scavenging radicals ability

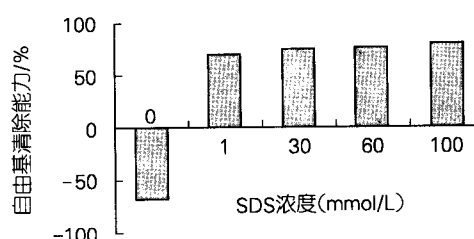


图 6 SDS 对 APC(51.12 $\mu\text{g/mL}$)清除自由基的影响
Fig. 6 The effect of SDS on APC's(51.12 $\mu\text{g/mL}$) scavenging radicals ability

白的变性作用非常微弱,在光照的条件下,藻胆蛋白仍具有产生自由基的能力。随着脲的浓度增加,藻胆蛋白的清除自由基的能力也逐渐增强。当脲的浓度达到 6.4 mol/L 时,藻胆蛋白的自由基清除能力明显增

加(图 7,图 8)。

2.4 pH 对藻胆蛋白自由基清除能力的影响

酸性条件下测定自由基清除能力的反应体系不稳定,因此,本文测定了碱性条件对藻胆蛋白清除自

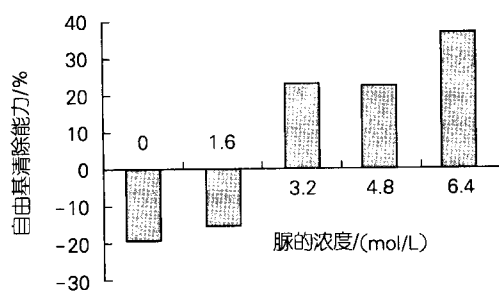


图 7 脲对 CPC(28.63 $\mu\text{g/mL}$)清除自由基的影响
Fig. 7 The effect of urea on CPC's (28.63 $\mu\text{g/mL}$) scavenging radicals ability

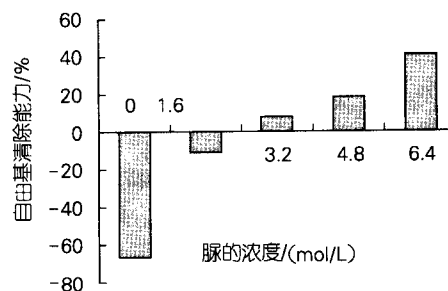


图 8 脲对 APC(102.25 $\mu\text{g/mL}$)清除自由基的影响
Fig. 8 The effect of urea on APC's(102.25 $\mu\text{g/mL}$) scavenging radicals ability

由基的影响。藻胆蛋白在 pH3~10 范围内,是比较稳定的,这也是该类蛋白具有广泛应用前景的原因之一,在日光灯下,pH7 时,CPC 和 APC 都具有生成自由基的能力,但随着 pH 的增高,CPC 和 APC 清除自由

基的能力逐渐增强(图 9,图 10)。说明,尽管 CPC 和 APC 在 pH8~10 范围内,脱辅基蛋白并没有变性,但在碱性条件下,藻胆色素周围的氨基酸残基的解离特性会发生变化,从而影响 CPC 和 APC 生成和清除自

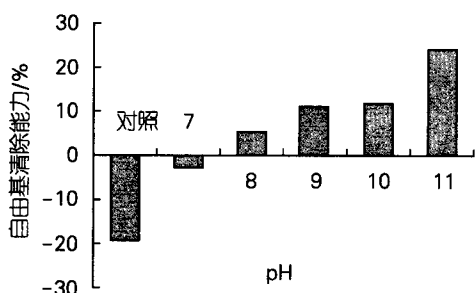


图9 pH对CPC(28.63 μg/mL)清除自由基的影响
Fig.9 The effect of pH on CPC's(18.21 μg/mL) scavenging radicals ability

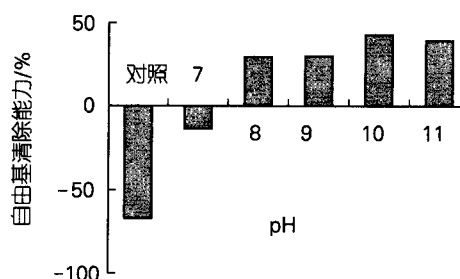


图10 pH对APC(102.25 μg/mL)清除自由基的影响
Fig.10 The effect of pH on APC's(102.25 μg/mL) scavenging radicals ability

由基的能力。CPC在pH11, APC在pH10时,清除自由基的能力明显增强,说明藻胆蛋白已经变性。相对于APC, CPC对pH更稳定。

3 讨论

藻胆蛋白是螺旋藻中重要的捕光色素蛋白,其光能传递效率可达90%以上。天然状态下的藻胆蛋白在光照时可获得一定的光生电势,当存在合适的电子供体或电子受体,藻胆蛋白就能够给出电子,从而可以产生自由基。应用ESR技术可以捕捉到由藻胆蛋白产生的自由基。

光是天然状态下的藻胆蛋白能否产生自由基的关键。但是藻胆蛋白并不是随着其浓度的增加而没有限制的产生自由基,它本身所含有的氨基酸和藻胆色素又可能与自由基反应而作为自由基清除剂, Pintero^[4]等发现藻胆蛋白清除自由基的能力随着其纯度的增加而增加。

藻胆蛋白清除自由基是有条件限制的, Pintero^[4]等报道的藻胆蛋白在纯化过程中经过了冷冻干燥等步骤,我们发现冷冻、pH等对藻胆蛋白的结构及光谱特性没有很大的影响,但是这些条件的变化都会导致藻胆蛋白发色团周围氨基酸残基的电荷变化,同时也会影响藻胆色素与脱辅基蛋白以及色素与色素之间的相互作用。这些因素都会影响藻胆蛋白清除自由基的能力。

藻胆蛋白经过变性剂处理,将会表现为亚基的解离,继而是蛋白链变性,此时的色素基团由于失去蛋白链的调控作用而呈现出构象发生卷曲,这种结构使

之表现为光吸收下降,荧光减弱,甚至完全消失(结果未列出)。在这个过程中,蛋白质链的解构,使处于包被中的色素基团暴露,从而藻胆蛋白的自由基清除能力增加,因此,天然状态下的藻胆蛋白更有利于光能的吸收与传递,而不是自由基清除的理想状态,这与藻胆蛋白在体内的生理功能相一致。

参考文献

- 1 Stocker R, Yamamoto Y, Mc Donagh AF, et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Sci*, 1987, 235: 1 043-1 046
- 2 Hirata T, Tanaka M, Ooike M, et al. Radical scavenging activities of phycocyanobilin prepared from a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Fisheries Sci*, 1999, 65: 971-972
- 3 Hirata T, Tanaka M, Ooike M, et al. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *J of Applied Phycology*, 2000, 12: 435-439
- 4 Pintero Estrada JE, Bermejo Bescos P, Villar del Fresno AM. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco*, 2001, 56: 497-500
- 5 Evstigneev VB. The origin of life and evolutionary of biochemistry. London, New York: Plenum press, 1974. 97
- 6 Morcos N C, Henry W L. US Patent. 1987, 4886831, *Chem Abstr*, 1990. 113, 553j
- 7 向文洲, 吴伯堂, 曾呈奎. 海水钝顶螺旋藻藻胆蛋白的初步研究. *热带海洋*, 1991, 10(4): 62-66
- 8 王广策, 邓田, 曾呈奎. 藻胆蛋白的研究概况(II) - 藻胆蛋白的结构及其光谱特性. *海洋科学*, 2000, 24(3): 19-22

研究 **N**OTE
简 报

EFFECT OF AOPROTEIN ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHYCOBILIPROTEINS

ZHOU Zhan-Ping CHEN Xiu-Lan CHEN Chao ZHANG Yu-Zhong

(*State Key lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, 250100*)

Received: Feb., 26, 2003

Key Words: Phycobiliprotein, Radical scavenging

Abstract

This article studied the effects of light and apoproteins' structure on antioxidant activity of Phycobiliproteins. The results showed that Phycobiliproteins could generate hydroxyl radicals in light and scavenge them in dark. Its abilities of generating radical disappeared and scavenging radical greatly increased when Phycobiliproteins were denatured by SDS, urea and in alkaline condition. The results showed that the Phycobilins were the main part of Phycobiliproteins to scavenge hydroxyl radical. The Apoproteins' structure of nature Phycobiliproteins was at most fit for absorption and transfer of light, which was consistent with the function of Phycobiliproteins in *Spirulina platensis*.

(本文编辑:张培新)