

# 龙须菜藻胆蛋白的分离及其清除自由基作用的初步研究

陈美珍, 张永雨, 余杰, 谢雄彬  
(汕头大学理学院生物系, 广东 汕头 515063)

**摘 要:** 龙须菜藻体经细胞破碎, 其水溶性提取物经硫酸铵沉淀即得藻胆蛋白粗提物。该粗提物经 Sephadex G-100 柱层析, 可分离出藻红蛋白(PE), 其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中仅显示一条带, 用 SDS-PAGE 不连续电泳测定其亚基分子量分别为 18000Da 和 24000Da。该 PE 的吸收光谱有二峰一肩, 最大吸收值在 570nm 处, 属 I 型 R-PE。分别采用 Fenton 体系和邻苯三酚-鲁米诺发光体系测定藻胆蛋白粗提物及分离的 PE 清除  $\cdot\text{OH}$  和  $\text{O}_2^{\cdot-}$  能力, 结果表明, 藻胆蛋白粗提物和分离的 PE 均有清除自由基作用, 但两者间存在差异。

**关键词:** 龙须菜; 藻胆蛋白; 分离; 吸收光谱; 自由基

## Studies on Separation and Scavenging Activities on Free Radicals of Phycobiliproteins from *Gracilaria Lemaneiformis*

CHEN Mei-zhen, ZHANG Yong-yu, YU Jie, XIE Xiong-bin,  
(Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China)

**Abstract:** The crude phycobiliproteins were got from water extraction of smashed cells of *Gracilaria lemaneiformis* were precipitated in ammonium sulfate. Phycoerythrin could be separated through chromatographed the crude phycobiliproteins by Sephadex G-100 column, and it appeared only one band in the polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular weights of subunits of the phycoerythrin are 18000Da and 24000Da that were measured by SDS-PAGE. The PE possessed an absorption maximum at 570nm and it belongs to R-PE type I. The scavenging activities of the crude phycobiliproteins and the PE on OH of Fenton reaction and  $\text{O}_2^{\cdot-}$  of Luminol reaction were studied. The results showed that the crude phycobiliproteins and the PE both could scavenge free radicals, but their abilities were different.

**Key words:** gracilaria lemaneiformis; phycobiliproteins; separation; absorption spectrum; free radical

中图分类号: Q503

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)03-0159-04

藻胆蛋白(phycobiliproteins)为红藻和蓝藻类光合作用的主要捕光色素蛋白, 易溶于水, 按光谱特性藻胆蛋白可分为红色的藻红蛋白(phycoerythrin, PE)、蓝紫色的藻蓝蛋白(phyocyanin, PC)和孔雀蓝色的异藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)<sup>[1]</sup>。藻胆蛋白的应用越来越受到重视, 除了作荧光探针用于医学诊断、免疫学和细胞学研究中外, 还可作为理想的天然色素用于食品、化妆品以及作为药物以提高人体免疫力等<sup>[2]</sup>。

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)是一种江蓠属产琼红藻, 含有丰富的碳水化合物和蛋白质。但以往由于产量不多, 及其适口性差, 很少直接食用, 主要用于提取琼脂, 因

此, 对龙须菜的研究不多。近年来, 随着广东、福建等地沿海地区人工养殖龙须菜逐渐形成规模, 产量不断增加, 有关龙须菜的研究也逐步引起人们的关注。作者对龙须菜成分分析发现龙须菜含有 19.14% (以干重计) 的粗蛋白, 因此对其藻胆蛋白的研究是很有价值的。但是目前关于龙须菜藻胆蛋白的研究报道仍很少, 现有文章也多见于对其藻胆蛋白光谱特性及其基因的研究。本文对龙须菜藻胆蛋白的提取、分离及其清除  $\cdot\text{OH}$  和  $\text{O}_2^{\cdot-}$  自由基的作用进行了初步的研究, 以期合理利用龙须菜资源, 提高其经济效益和龙须菜保健食品的开发提供科学依据。

收稿日期: 2003-09-22

作者简介: 陈美珍(1956-), 女, 副教授, 研究方向为天然活性物质研究与开发。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、仪器及试剂

1.1.1 新鲜龙须菜 2003年3~4月间采集于南澳岛,为人工养殖。

1.1.2 仪器 J2-21M 高效离心机 (Bechman)、751G 分光光度计、721 分光光度计、SHG-C 型生物化学发光测量仪、Sephadex G-100 层析柱 (1.8cm × 60cm) 等。

### 1.2 方法

1.2.1 蛋白质含量的测定 采用微量凯氏定氮法。

### 1.2.2 藻胆蛋白粗提物制备

鲜龙须菜洗净沥干,加入少量 1mmol/L pH6.8 的磷酸缓冲液 (PBS),在 -20℃ 与 4℃ 下反复冻融 5 次,在冰浴中匀浆破碎,然后加入 20 倍蒸馏水 (以鲜重计) 于 4℃ 下避光搅拌提取 24h,离心 (7500r/min、30min、4℃),取粉红色上清液,加入硫酸铵 (饱和度为 55%) 充分搅匀,置 4℃ 避光沉淀,沉淀物置 1mmol/L pH6.8 的 PBS 中充分透析,离心得粉红色上清液即为藻胆蛋白粗提物。

### 1.2.3 藻胆蛋白的分离和纯度测定

藻胆蛋白的分离提纯<sup>[3]</sup>:用 Sephadex G-100 柱层析,以 1mmol/L pH6.8 的 PBS 洗脱,用核酸蛋白检测仪测定洗脱曲线,收集含藻红蛋白的粉红色洗脱液 (带有明显的荧光)。

藻红蛋白的纯度测定 将过柱后收集的藻红蛋白洗脱液进行聚丙烯酰胺不连续电泳<sup>[4]</sup>,并以相同方法比较过柱前粗提物中藻胆蛋白的组分。

### 1.2.4 分子量测定<sup>[4]</sup>

采用 SDS-PAGE 不连续电泳测定藻红蛋白亚基分子量,以低分子量标准蛋白作标准曲线。

### 1.2.5 光谱测定

上述分离的藻红蛋白在室温下用 751G 分光光度计测定其吸收光谱。

### 1.2.6 自由基清除率的测定

清除  $\cdot\text{OH}$  自由基能力的测定<sup>[5]</sup>:采用 fenton 体系,参照文献[5]的方法并略加修改。0.2ml 的  $\text{FeSO}_4$ -EDTA 混合液加 0.5ml 的 2-脱氧核糖加适量样品,用 PBS 定容至 1.9ml,其它与文献[5]一致。

清除  $\text{O}_2^{\cdot-}$  力的测定:采用邻苯三酚-鲁米诺发光体系,参考文献[6,7]的方法并略作修改:  $1.67 \times 10^{-4} \text{mol/L}$  邻苯三酚,以 pH10.2 的 0.1mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液 (含 0.16mmol/L EDTA) 配制 0.1mmol/L 鲁米诺溶液。空白对照用 0.05mol/L 的 PBS (pH7.8) 代替样品液,以维生素 C 作阳性对照。化学发光体系及发光测量方法与文献[7]相同。

## 2 结果与讨论

### 2.1 藻红蛋白的分离纯化

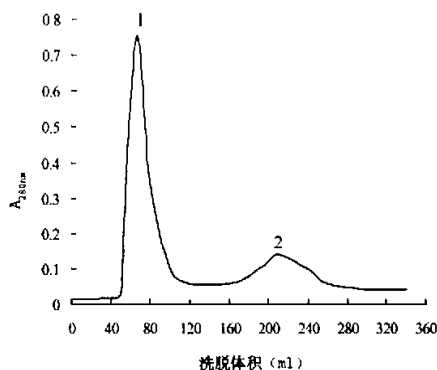
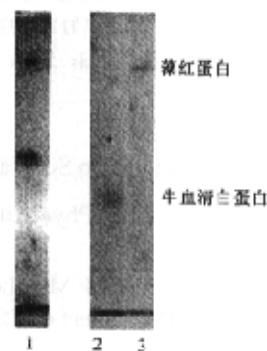


图1 藻胆蛋白粗提物经 Sephadex G-100 柱层析的洗脱曲线



1.粗提物 2.牛血清白蛋白 (68000Da) 3.分离的藻红蛋白

图2 聚丙烯酰胺不连续电泳

藻胆蛋白粗提物经 Sephadex G-100 柱层析其洗脱曲线如图1所示。藻胆蛋白粗提物和过柱后的第一个洗脱峰红色收集液即分离的藻红蛋白进行聚丙烯酰胺不连续电泳,结果见图2。从图1洗脱峰可见,粗提物中有两个主要组分,峰1的收集液为粉红色且带有明显荧光,是PE组分;峰2为杂蛋白。由图2粗提物经聚丙烯酰胺电泳时呈两条带也进一步证实了这一点。而峰1的收集液在电泳中只显示单一条带,说明用 Sephadex G-100 柱层析也可以分离出单组分的PE,但所得到的PE收集液纯度较低 ( $A_{570\text{nm}}/A_{280\text{nm}}=3.05$ )。若要获得较高纯度的PE需与常用的羟基磷灰石柱等其他纯化方法配合使用。

分别测定过柱后红色与无色洗脱液的蛋白含量,两者的比值是 2.86,由此可得出洗脱的藻胆蛋白粗提物中藻红蛋白约占 74.1% 左右 (忽略了其纯度),这与柱层析两洗脱峰大小关系一致,也与张学成 (1996)<sup>[1]</sup>报道的野生型龙须菜藻红蛋白占藻胆蛋白的 72.1% 基本相符。

### 2.2 光谱特性

分离纯化后的藻红蛋白吸收光谱见图3,其吸收峰为 498、545 (肩峰) 和 570nm,最大吸收峰在 570nm 处,由此推测,该藻红蛋白属于 I 型 R-PE<sup>[1,2]</sup>,此结果与张学成报道的

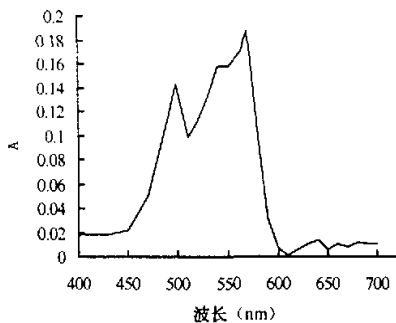
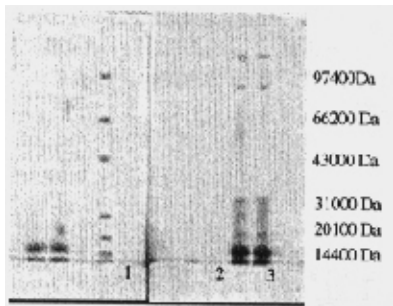


图3 分离的藻胆蛋白吸收光谱

野生型龙须菜 PE 为 II 型 R-PE<sup>[1]</sup> 不同。

2.3 藻胆蛋白的分子量测定



1. 藻胆蛋白粗提物 2. 分离纯化的藻胆蛋白 3. 蛋白分子量标准

图4 SDS-PAGE 电泳图

藻胆蛋白粗提物和分离后的藻胆蛋白经 SDS-PAGE 电泳图谱如图4所示。从图中可见粗提物在电泳时显示出多条带，而柱层析纯化得到的 PE 收集液在电泳中只显示前面两条，说明该 PE 是由大小两个亚基组成。利用标准蛋白回归方程可得其分子量分别是18000Da和24000Da。这一结果与图2中藻胆蛋白和牛血清白蛋白(68000Da)电泳带的位置比较，可见本实验所采用的提取、分离纯化方法未导致藻胆蛋白聚合体的离析。

2.4 清除自由基的作用

2.4.1 对  $\cdot\text{OH}$  自由基的清除作用

以苯甲酸作对比，研究了藻胆蛋白粗提物和分离的藻胆蛋白对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力，实验结果见图5和图6。从图中可知，两者的清除活性与蛋白浓度有关，当藻胆蛋白粗提物与藻胆蛋白在Fenton体系中的浓度分别为1.64mg/ml与0.26mg/ml时，对  $\cdot\text{OH}$  清除能力最强，达71%与55%，但均明显小于苯甲酸的清除作用。结果表明，藻胆蛋白粗提物与藻胆蛋白对  $\cdot\text{OH}$  均有清除作用，但两者的清除能力存在差异，其原因需进一步分析。

2.4.2 对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除能力

测定藻胆蛋白粗提物对邻苯三酚-鲁米诺发光体系产生

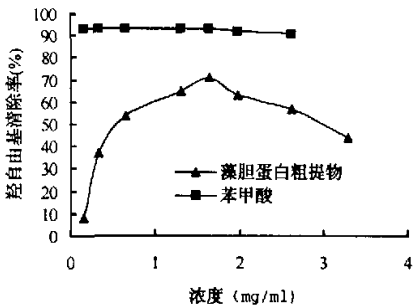


图5 藻胆蛋白粗提物清除羟自由基的能力

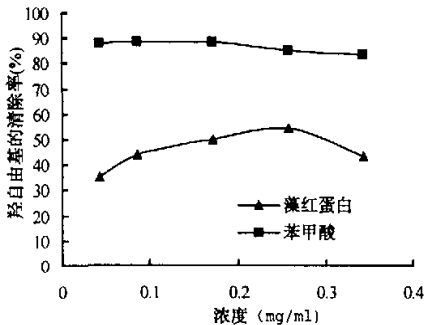


图6 藻胆蛋白清除羟自由基的能力

的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除作用如图7所示。结果表明，藻胆蛋白粗提物具有清除  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的作用，其清除率随着体系中蛋白含量升高而增加，但清除能力明显小于对照物维生素C。而本文却发现分离的藻胆蛋白有此作用，可能粗提物对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除作用是来自于其他蛋白，据罗广华(1998)报道<sup>[1]</sup>新鲜海藻的提取液含有SOD能清除超氧自由基。是否与SOD有关或是其他藻胆蛋白的作用？尚待进一步探讨。

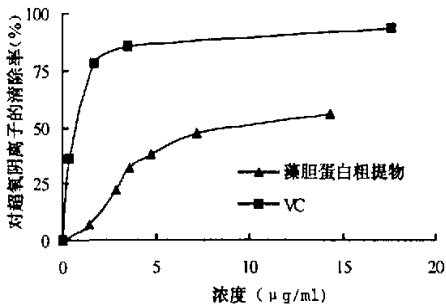


图7 藻胆蛋白粗提物清除超氧阴离子能力

3 小结

3.1 采用Sephadex G-100柱层析能从龙须菜藻胆蛋白粗提物中分离出藻胆蛋白，该藻胆蛋白约占龙须菜藻胆蛋白粗提物

中蛋白总量的74.1%左右。

3.2 实验表明龙须菜藻胆蛋白具有较好的清除自由基活性,对开发利用很有意义。龙须菜含有丰富的活性多糖、藻红蛋白及膳食纤维和营养元素等,有很好的保健功效。若龙须菜单纯用于提取琼脂是一种资源的浪费,应考虑对其综合利用,以提高经济价值。

#### 参考文献:

- [1] 张学成,张锦东,隋正红,等.江蓠属藻胆蛋白的研究 I 诱变、突变体筛选及藻胆蛋白的光谱物性[J]. 青岛海洋大学学报,1996,26(3): 318-325.
- [2] 范晓,张士瑾,秦松等.海洋生物技术新进展[M]. 北京:海洋出版社,1999,196-204.
- [3] 温少红,赵呈龙,张莉萍.紫球藻 B-藻红蛋白的分离纯化[J].中国海洋药物,2001,(3):33-35.
- [4] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000,77-121,212.
- [5] 陈美珍,余杰,郭慧敏.大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用研究[J].食品科学,2001,23(1): 43-47.
- [6] 徐靖,杨秀岑,邻苯三酚鲁米诺发光体系测定 OD 活性[J]. 邵阳医学院学报,1999,6月,18(2): 68-70.
- [7] 张尔贤,等.菊花提取物的抗氧化活性研究[J].食品科学,2000,21(7): :6-9.
- [8] 罗广华,王爱国,柯德森.海藻中清除氧自由基的物质[J].热带亚热带植物学报,1998,6(1): 15-18.
- [9] Sui Zhenhong,Zhang Xuecheng,Cloning and analysis of phycoerythrin genes in gracilaria lemaneiformis(rhodophyceae)[J].Chinese Journal of Oceanology and Limnology,2000,18(1):42-46.
- [10] Wang Guangcc,Sun Haihao,Fan Xiao,Zeng Chengkui.Large-scale isolation and purification of r-phycoerythrin from red alga palmaria pilmata using the expanded bed adsorption method[J].Acta Botanica Sinica,2002,44(5): 541-546.
- [11] 李邵蓉,林惠民. *Rhodosourus marinus* 中藻红蛋白的纯化及其性质的研究[J].水生生物学报,1996,20(3): 257-263.

## 亚麻籽油降脂作用的实验研究

黄庆德<sup>1</sup>, 刘列刚<sup>2</sup>, 郭萍梅<sup>1</sup>, 黄凤洪<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北 武汉 430062; 2. 华中科技大学同济医学院, 湖北 武汉 430030)

**摘 要:** 以成年大鼠为实验对象, 研究摄食亚麻籽油对血清总胆固醇 TC、甘油三酯 TG、高密度脂蛋白胆固醇 HDL-c 的影响, 结果显示, 28d 后各剂量亚麻籽油组与阳性对照组比较, 血清总胆固醇下降达到 27.0%~35.1%、甘油三酯下降 3.8%~28.6%、高密度脂蛋白胆固醇升高 3.48~9.28mg/dl。亚麻籽油对血脂调节作用极其显著。

**关键词:** 亚麻籽油;  $\alpha$ -亚麻酸; 血脂

### Study on the Reducing Blood Lipids of Flaxseed Oil

HUANG Qing-de<sup>1</sup>, LIU Lie-gang<sup>2</sup>, GUO Ping-mei<sup>1</sup>, HUANG Feng-hong<sup>1</sup>

(1. Oil Crops Institute of Chinese Academy of Agricultural Science, Wuhan 430062, China;

2. Tongji Medicine College of Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** The study was about whether and how much flaxseed oil reduces the blood lipids of SD rats. Total cholesterol (TC), Triacylglycerol (TG), High density lipoprotein cholesterol (HDL-c) were measured in the 28<sup>th</sup> day for all groups. The results showed that flaxseed oil can not only reduce TC and TG value in hyperlipid rats significantly. But also improved HDL-c significantly.

**Key words:** flaxseed oil;  $\alpha$ -linolenic acid; blood lipids.

中图分类号: S567.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)03-0162-04

收稿日期: 2003-10-28

作者简介: 黄庆德 (1964-), 男, 高级工程师, 主要从事农产品加工与储藏工程、油料加工、油脂精细化工方面的科研工作。