

重组别藻蓝蛋白 (holo-apcB) 的抗氧化活性研究

周孙林¹, 陈华新², 姜鹏², 李富超², 唐东山^{1, 3}

(1. 南华大学污染控制与资源化湖南省高校重点实验室, 湖南衡阳 421000)

(2. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071) (3. 南华大学环境保护与安全工程学院, 湖南衡阳 421001)

摘要: 本研究利用代谢工程技术原理在重组大肠杆菌表达合成了嗜热聚球藻 (*Thermosynechococcus elongatus* BP-1) 别藻蓝蛋白 β 亚基 (holo-apcB), 并利用亲和层析的方法对 holo-apcB 进行了分离纯化。SDS-PAGE 电泳胶图显示, holo-apcB 分子量与 18.4 ku 的蛋白条带相近, 与理论分子量吻合。光谱学分析结果显示, 其最大吸收峰为 615 nm, 最大荧光发射峰为 640 nm, 与天然别藻蓝蛋白 β 亚基具有相同的分子量和光谱学性质。在 55 °C 条件下, holo-apcB 的半衰期高达 31.9 h。以嗜热聚球藻天然别藻蓝蛋白 (APC) 及脱辅基别藻蓝蛋白 β 亚基 (apo-apcB) 为参照, 分析了 holo-apcB 的抗氧化活性。结果显示, holo-apcB 具有最强的抗氧化能力, 其清除羟自由基和氢过氧自由基半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 224.9 μ g/mL 和 20.6 μ g/mL, 显著低于 apo-apcB 和天然 APC 的 IC₅₀, 这表明 holo-apcB 中的藻蓝胆素也参与了抗氧化过程。

关键词: 别藻蓝蛋白; 抗氧化活性; 自由基

文章编号: 1673-9078(2014)8-112-116

Antioxidant Activity of Recombinant Allophycocyanin β -Subunit (Holo-apcB)

ZHOU Sun-lin¹, CHEN Hua-xin², JIANG Peng², LI Fu-chao², TANG Dong-shan^{1,3}

(1. Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse of University of South China, College and University of Hunan Province, Hengyang 421000, China) (2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China) (3. Institute of Environmental Protection and Safety Projects, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract: In this study, a recombinant allophycocyanin β -subunit (holo-apcB) [*Thermosynechococcus elongatus* BP-1] was biosynthesized in recombinant *Escherichia coli* by using metabolic engineering technology. Holo-apcB was then isolated and purified using affinity chromatography. SDS-PAGE analysis showed that there was a band with a molecular weight close to 18.4 ku, which matched the theoretical molecular weight of holo-apcB. Spectrum analysis showed the maximum absorbance and maximum fluorescence emission of holo-apcB were at 615 nm and 640 nm, respectively. Thus, this subunit had the same molecular weight and spectroscopic properties as those of holo-apcB. At 55 °C, the half-life of holo-apcB reached up to 31.9 h. Comparison of the antioxidant activity of holo-apcB with native allophycocyanin (APC) and apo-apcB showed that holo-apcB had the highest antioxidant activity. Moreover, the holo-apcB IC₅₀ values for hydroxyl and peroxy radical-scavenging activities were 224.9 μ g/mL and 20.6 μ g/mL, respectively, which were significantly lower than those for apo-apcB and native APC. Therefore, it was suggested that phycocyanobilin also has antioxidant functions.

Key words: allophycocyanin; antioxidant activity; free radical

人体因为与外界的持续接触, 包括呼吸 (氧化反应)、外界污染、放射线照射等因素不断的在人体体内产生自由基, 它是一种由氧气衍变而成一种不稳定物质。科学研究表明, 癌症、衰老或其它疾病大都与过

收稿日期: 2014-04-11

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费项目 (201205027-2), 863 计划项目 (2014AA093505), 国家自然科学基金 (41276164)

作者简介: 周孙林 (1990-), 女, 硕士, 从事藻类基因工程研究

通讯作者: 陈华新 (1976-), 副研究员, 从事海洋生物学与海洋生物技术研究; 唐东山 (1975 年-), 副教授, 硕士生导师, 从事环境生物技术研究

量自由基的产生有关联。生活的空间及形态均会造成体内自由基浓度大大增加, 这种情形称之为“氧化压力”, 氧化压力越大, 体内自由基浓度越高。而对抗这种氧化压力的能力称之为抗氧化能力。抗氧化剂通过抑制自由基的产生抑制自由基参与的过氧化反应, 抗氧化剂主要抑制自由基的产生和过氧化氢的生成, 从而减少 DNA 的氧化损伤, 抑制脂质过氧化。常见的抗氧化物质有维生素 C/E、胡萝卜素类、SOD 以及硒等。

1998 年 Romay 等首次报道了 C-藻蓝蛋白具有抗

氧化作用,能抑制肝脏微粒脂过氧化物生成^[1],清除细胞受破坏后产生的自由基,避免自由基导致氧化性DNA损伤。之后藻红蛋白和别藻蓝蛋白等藻胆蛋白的抗氧化活性相继得以证明^[2-3]。此外,由于藻胆蛋白亚基上共价结合藻胆色素(藻蓝胆素或藻红胆素),藻胆蛋白呈现出鲜艳的颜色,是良好的天然色素。在欧、美、日等发达国家,藻胆蛋白已被用作食品和化妆品的添加剂。

从藻类提取和纯化藻胆蛋白工艺复杂,其制备成本较高,商品价格昂贵,在应用上受到一定的限制。利用代谢工程技术原理,在大肠杆菌中构建藻胆蛋白的生物合成途径,重组合成藻胆蛋白,为藻胆蛋白的制备提供了新的途径。2006年Ge等^[4]在大肠杆菌中表达了脱辅基别藻蓝蛋白 α 和 β 亚基,研究发现脱辅基别藻蓝蛋白具有抗氧化活性,能够抑制羟自由基(hydroxyl radical)生成,其抗氧化能力均强天然APC。利用代谢工程原理,我们在大肠杆菌构建了嗜热聚球藻别藻蓝蛋白 β 亚基(holo-apcB)生物合成途径,不仅实现脱辅基蛋白的高效表达,而且实现了藻蓝胆素与脱辅基蛋白的共价结合,重组藻胆蛋白holo-apcB呈现出鲜亮的蓝色。

本研究在上述基础上,通过大肠杆菌的发酵和重组蛋白的分离纯化,制备了别藻蓝蛋白 holo-apcB 样品。通过与天然别藻蓝蛋白和重组脱辅基别藻蓝蛋白的比较,研究 holo-apcB 清除自由基能力,并探讨重组别藻蓝蛋白脱辅基蛋白与色素在抗氧化性中的作用,为重组藻胆蛋白在食用色素上的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

表达脱辅基别藻蓝蛋白 β 亚基(apo-apcB)的菌株(*E.coli* BL21 (DE3) /pRSF-apcB),以及表达合成携带藻蓝胆素的别藻蓝蛋白 β 亚基(holo-apcB)的菌株(*E.coli* BL21 (DE3) /pCDF-Ho1-pcyA, pRSF-apcB-cpcU-cpcS),由中国科学院海洋研究所构建保藏。别藻蓝蛋白 β 亚基基因克隆自嗜热聚球藻(*Thermosynechococcus elongatus* BP-1),其他基因来源于聚胞藻(*Synechocystis sp.* PCC6803),嗜热聚球藻藻种(*Synechococcus elongatus* BP-1)购自日本国立环境研究所。

1.2 仪器

紫外可见分光光度计(UV1801),北分瑞利;荧光分光光度计(F4500),Hitachi;蛋白分离纯化系

统(AKTA Avant25),GE;超声波细胞破碎仪,宁波新芝。

1.3 试验方法

1.3.1 重组别藻蓝蛋白的制备

1.3.1.1 重组别藻蓝蛋白的发酵表达

将重组大肠杆菌甘油种接种到LB培养基中,37℃条件下活化过夜。按照4%的接种量接种到300 mL TB (pH 7.4)培养基中,37℃、200 r/min条件下培养3 h,之后将培养基冷却至室温,加入终浓度为0.5 mM的IPTG,于28℃、160 r/min条件下继续培养16 h。

1.3.1.2 重组别藻蓝蛋白的分离纯化

菌液于冷冻离心机8000×g,4℃离心10 min收集菌体。菌体用破碎缓冲液(20 mM Na₂HPO₄, 20 mM 咪唑, 500 mM NaCl)洗涤一次,重悬于破碎缓冲液中。冰浴条件下用超声波破碎仪破碎200个循环(工作5 s,间隙5 s)。9000×g,4℃离心30 min,上清用0.45 μm硝酸纤维素滤膜过滤后用于上柱纯化。

利用GE公司AKTA Avant25蛋白纯化系统对样品进行纯化,亲和层析柱为GE公司的HisTrap预装柱,脱盐柱为G-25预装柱。蛋白样品上柱后用洗涤缓冲液(20 mM Na₂HPO₄, 50 mM 咪唑, 500 mM NaCl, pH 7.4)洗杂,再用洗脱缓冲液(20 mM Na₂HPO₄, 300 mM 咪唑, 500 mM NaCl, pH 7.4)洗脱。收集蛋白峰,用G-25脱盐柱脱盐,得到重组蛋白样品。

1.3.2 天然别藻蓝蛋白的制备

将收集的嗜热聚球藻藻体悬浮于磷酸钾缓冲液中,超声波破碎细胞,提取液经硫酸铵沉淀,脱盐柱脱盐,然后用羟基磷灰石柱纯化,收集A₆₅₀/A₆₂₀大于4的样品。具体方法见参考文献^[5]。

1.3.3 吸收光谱和荧光发射光谱的测定

使用紫外可见分光光度计测定 holo-apcB 样品的吸收光谱,扫描速度 240 nm/min,扫描范围 250 nm~700 nm;用荧光分光光度计测定 holo-apcB 样品的荧光发射光谱,激发光波长为 590 nm,扫描速度 240 nm/min,扫描范围为 600 nm~700 nm。

1.3.4 热稳定性的测定

重组 holo-apcB 溶解于 20 mM 磷酸钠缓冲液中,样品置于 55℃水浴锅中进行热处理,每隔 1 h 取出部分样品,测定 holo-apcB 的 640 nm 处的荧光值。根据荧光值随处理时间的衰减,计算 holo-apcB 的半衰期。

1.3.5 清除自由基能力的测定

1.3.5.1 清除羟自由基能力测定

参照Ge等^[4]的研究方法。

1.3.5.2 清除氢过氧自由基能力测定

参照Bhat等^[6]的研究方法。

1.4 数据分析

各实验均重复至少3次,运用SPSS 7.5软件进行统计分析,利用t检验(student's test)进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性。

2 结果与讨论

2.1 重组别藻蓝蛋白(holo-apcB)的表达与合成



图1 重组别藻蓝蛋白 holo-apcB 的表达与分离纯化

Fig.1 The expression and purification of recombinant holo-apcB

注:左图为大肠杆菌菌液,中间为菌液离心后得到的重组大肠杆菌菌体,右图为经分离纯化制备的 holo-apcB 蛋白溶液。

如图1所示,经IPTG诱导后重组大肠杆菌菌液的颜色变成墨绿色,这表明藻蓝胆素已经在大肠杆菌体内积累。菌液经过离心收集菌体,菌体的颜色呈蓝色,表明别藻蓝蛋白β亚基已经表达,并且共价结合了藻蓝胆素辅基。菌体经过破碎,经亲和层析分离纯化制备得到 holo-apcB 样品。Holo-apcB 溶液呈蓝色,与天然别藻蓝蛋白颜色一致,在可见光的照射下可见

表1 重组别藻蓝蛋白 holo-apcB 的理化性质

Table 1 The physicochemical property of recombinant holo-apcB.

吸收峰 λ_{max}/nm	发射峰 λ_{max}/nm	摩尔消光系数 $/(M^{-1} \cdot cm^{-1})$	荧光量子产率 Φ_F	半衰期 $t_{1/2}/h$	等电点 pI
615	640	87500±500	0.26±0.07	31.9±2.8	6.8

别藻蓝蛋白β亚基上结合了藻蓝胆素,因而蛋白溶液呈蓝色。测定了重组别藻蓝蛋白β亚基(holo-apcB)的吸收光谱和荧光发射光谱,结果如图3所示。holo-apcB最大吸收峰为615 nm,最大荧光发射峰为640 nm,holo-apcB的光谱学特性与天然别藻蓝蛋白β亚基一致。这表明我们利用大肠杆菌成功表达合成了与天然藻胆蛋白相一致的重组藻胆蛋白^[7]。holo-apcB的摩尔消光系数为 $87500 M^{-1} \cdot cm^{-1}$, 荧光量子效率为

暗红色的荧光。

为了确认 holo-apcB 的分子量,对 holo-apcB 样品进行 SDS-PAGE 电泳。重组脱辅基别藻胆蛋白β亚基的分子量为 17.3 ku,藻蓝胆素的分子量为 0.6 ku,holo-apcB 的 N 端共价融合了 6×His 标签,其分子量的大小为 1.5 ku,因此重组别藻蓝蛋白 holo-apcB 理论分子量的大小为 19.4 ku。如图2所示,SDS-PAGE 电泳图显示样品中只有一个蛋白条带,其大小与 18.4 ku 的条带相近,与 holo-apcB 的理论分子量吻合。该结果也表明纯化后 holo-apcB 蛋白纯度很高,达到电泳纯。

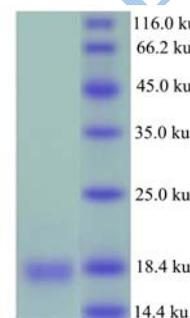


图2 重组别藻蓝蛋白 holo-apcB 的蛋白电泳

Fig.2 SDS-PAGE analysis of holo-apcB.

注:图中左侧条带为别藻蓝蛋白 holo-apcB 电泳条带;右侧为蛋白 Marker。

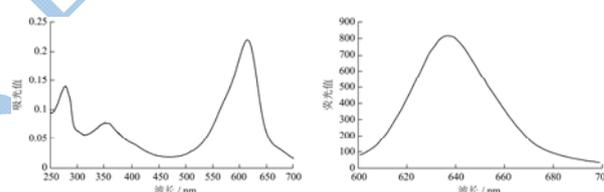


图3 重组别藻蓝蛋白 holo-apcB 的吸收光谱(左)和荧光发射光谱(右)

Fig.3 The absorbance (left) and fluorescence emission (right) spectrum of holo-apcB

0.26(表1)。由于holo-apcB的脱辅基蛋白基因来自嗜热聚球藻,我们测定了holo-apcB的热稳定性,在55℃条件下,其半衰期为31.9 h(表1),这表明holo-apcB具有很强的热稳定性。

目前在食品工业上,大量的人工合成色素作为添加剂应用于食品的着色。这些人工合成色素具有色泽鲜艳、着色力强、价格便宜等优点,但是这些色素合成过程中,不可避免的带入苯酚、乙醚、硫酸盐等有

肌物和砷、铅、铜等重金属,长期使用对人体会产生一定的危害。藻胆蛋白来源于藻类,对人体无毒副作用,由于结合了藻胆色素而呈现出不同的颜色,是理想的天然色素。在美国,藻胆蛋白被食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)列为安全性产品。在日本和欧洲一些发达国家,藻胆蛋白已被应用于食品和化妆品的添加剂。藻胆蛋白从藻类提取制备,纯化步骤较多,难以大规模工业化生产,致使藻胆蛋白的商品价格昂贵在应用上受的一定的限制。利用基因工程的方法在大肠杆菌菌体内表达是藻胆蛋白制备的一条新的途径。本实验中,我们在大肠杆菌中同时表达别藻蓝蛋白β亚基(holo-apcB)表达与合成。由于重组蛋白N端融合了6×His标签,利用金属螯合亲和层析的方法,一步纯化就可以得到高纯度的 holo-apcB(图1),分离制备方法简单。Holo-apcB呈现出蓝色,具有非常高的热稳定性,具有开发为食品(如蛋糕)色素添加剂的潜力。

2.2 重组别藻蓝蛋白(holo-apcB)的抗氧化活性

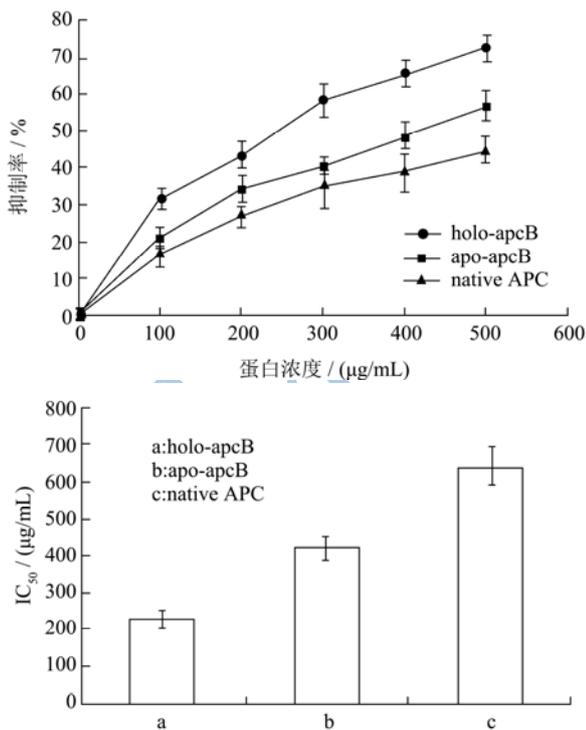


图4 各蛋白对羟基自由基的清除能力比较

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging activities of holo-apcB, apo-apcB, native APC

注:左图为各蛋白在不同浓度下对羟基自由基清除能力,右图为各蛋白质对羟基自由基半数抑制浓度IC₅₀值。

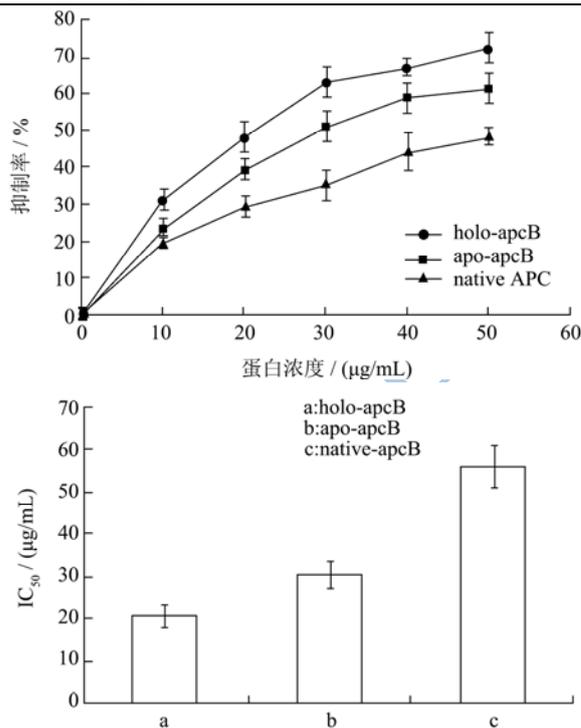


图5 各蛋白对氢过氧自由基的抗氧化活性比较

Fig.5 Peroxyl radical scavenging activities of holo-apcB, apo-apcB, native APC

注:左图为各蛋白在不同浓度下对氢过氧自由基清除能力,右图为各蛋白质对氢过氧自由基半数抑制浓度IC₅₀值。

研究表明,天然别藻蓝蛋白(APC)和脱辅基别藻蓝蛋白β亚基(apo-apcB)均具有较好的抗氧化活性^[4]。我们以这两种藻胆蛋白为对照,研究了别藻蓝蛋白β亚基(holo-apcB)的抗氧化能力,结果如图4和图5所示。Holo-apcB表现出较强的清除羟基自由基和氢过氧自由基的能力,抗氧化活性随着浓度的加大而增加,呈现出明显的剂量效应。Holo-apcB清除羟基自由基的IC₅₀值为224.9 μg/mL,清除氢过氧自由基的IC₅₀值为20.6 μg/mL,均低于apo-apcB和天然APC。按IC₅₀值大小排序:天然APC>apo-apcB> holo-apcB,这说明holo-apcB具有更强的抗氧化活性。

Holo-apcB是在apo-apcB的基础上共价结合藻蓝胆素形成的,藻蓝胆素的结合增强了重组藻胆蛋白的抗氧化能力,这表明藻蓝胆素对氢过氧自由基及羟基自由基也具有清除作用。Bhat等实验证明藻蓝蛋白中色素(即藻蓝胆素)与脱辅基蛋白均具有抗氧化活性^[8]。Romay^[9]和Huang^[10]等也对天然别藻蓝蛋白中色素PCB与脱辅基蛋白的抗氧化活性进行研究,证明藻蓝胆素具有抗氧化的作用。藻蓝胆素是开环四吡咯结构的化合物,在蛋白酶的作用下即使Holo-apcB的脱辅基蛋白降解,藻蓝胆素仍可以维持一定的抗氧化活性。

从holo-apcB与天然别藻蓝蛋白APC的抗氧化能力

比较结果可以看出,天然APC抗氧化能力显著低于holo-apcB。Guan等^[1]在藻蓝蛋白抗氧化活性试验中也发现,天然PC抗氧化能力不如重组藻蓝蛋白单亚基结构 α 亚基。Ge等^[4]认为脱辅基别藻蓝蛋白 α 和 β 亚基形成的单体掩盖了彼此的活性区域,从而导致其APC抗氧化活性的降低。我们推测,共价结合藻蓝胆素的holo-apcB的抗氧化基团均暴露出来,具有了更强的抗氧化能力。因此,与人工合成色素相比,holo-apcB具有着色和抗氧化的作用,此外holo-apcB含有人体所需的氨基酸,如开发为食用色素,将具有较好的功效和的市场竞争力。

3 结论

通过重组大肠杆菌发酵表达合成重组别藻蓝蛋白holo-apcB,利用亲和层析的方法可以分离制备高纯度的重组holo-apcB,该纯化方法具有操作步骤少、成本低、易于放大等优点。重组holo-apcB与天然的别藻蓝蛋白 β 亚基具有相同的分子量和光谱学性质,蛋白溶液呈现鲜艳的蓝色。抗氧化实验结果表明,重组别藻蓝蛋白holo-apcB具有较强的清除羟基自由基和氢过氧自由基的能力,其抗氧化活性大于脱辅基别藻蓝蛋白和天然别藻蓝蛋白,证明holo-apcB是从脱辅基蛋白和藻蓝胆素两个水平上清除自由基。重组holo-apcB具有鲜艳的颜色和较强的抗氧化活性,分离纯化简单,具备较好的开发为食用色素的潜力。

参考文献

- [1] Romay C, Armesto J, Ramirez D, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae [J]. *Inflammation Research*. 1998, 47(1): 36-41
- [2] 俞丽君,李永明,陈艳丽,等. 钝顶螺旋藻藻胆蛋白的纯化及其清除氧自由基的作用[J]. *台湾海峡*. 1999, 18(2): 172-176
YU Li-jun, LI Yong-ming, CHEN Yan-li, et al. Studies on phycobiliprotein of *Spirulina platensis* for its purification and ability to scavenge active oxygen radical [J]. *Journal of Oceanography in TaiWan Strait*. 1999, 18(2): 172-176
- [3] 陈美珍,张永雨,余杰,等. 龙须菜藻胆蛋白的分离及其清除自由基作用的初步研究[J]. *食品科学*. 2004, 25(3): 159-162
CHEN Mei-zhen, ZHANG Yong-yu, YU Jie, et al. Studies on separation and scavenging activities on free radicals of phycobiliproteins from *Gracilaria Lemaneiformis* [J]. *Food Science*. 2004, 25(3): 159-162
- [4] Ge BS, Qin S, Han L, et al. Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in *Escherichia coli*. [J]. *Photochemistry Photobiology B: Biology*. 2006, 84(3): 175-180
- [5] Siegelman H W, Kycia J H. *Algal biliproteins: handbook of phycollogical method* [M]. Combridge University press. 1978
- [6] Bhat V B, Madyastha K M. C-Phycocyanin: A potent peroxyl radical scavenger *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000, 275(1): 20-25
- [7] McGregor A, Klartag M, David L, et al. Allophycocyanin trimer stability and functionality are primarily due to polar enhanced hydrophobicity of the phycocyanobilin binding pocket [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 384, 406-421
- [8] Bhat V B, Madyastha K M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 285(2): 262-266
- [9] Romay Ch, Gonzalez R, Ledon N, et al. C-phycoerythrin: A biliprotein with antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective effects [J]. *Current Protein and Peptide Science*, 2003, 4(3): 207-216
- [10] Huang Z, Guo BJ, Wong RNS, et al. Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis* [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(3): 1137-1143
- [11] GUAN XY, ZHANG WJ, ZHANG XW, et al. A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant a-phycoerythrin of *Spirulina* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106: 1093-1100