

伍贤军, 杨红, 盛怡, 等. 3种蓝细菌藻蓝蛋白 $\beta$ 亚基脱辅基蛋白基因的克隆、表达及重组蛋白的抗氧化活性[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 998-1004.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.05.005

### 3种蓝细菌藻蓝蛋白 $\beta$ 亚基脱辅基蛋白基因的克隆、表达及重组蛋白的抗氧化活性

伍贤军, 杨红, 盛怡, 冷倩男, 李萍萍

(南京林业大学生物与环境学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 为研究蓝细菌藻蓝蛋白脱辅基蛋白的抗氧化活性, 分别从3种蓝细菌 *Spirulina subsalsa*、*Mastigocladus laminosus* 和 *Nostoc* PCC 7120 中克隆 C-藻蓝蛋白 $\beta$ 亚基编码基因 *cpcB<sub>Sp</sub>*、*cpcB<sub>Ma</sub>* 和 *cpcB<sub>No</sub>*, 在大肠杆菌中表达, 获得了重组蛋白 CpcB<sub>Sp</sub>、CpcB<sub>Ma</sub> 和 CpcB<sub>No</sub>。通过测定其对羟基自由基和 DPPH 自由基的清除率, 比较它们的抗氧化活性。结果显示: 3种重组蛋白对羟基自由基和 DPPH 自由基的清除率都随着蛋白质质量浓度的增加而升高。当蛋白质浓度达到 250 mg/L 时, CpcB<sub>Sp</sub>、CpcB<sub>Ma</sub> 和 CpcB<sub>No</sub> 对羟基自由基的清除率分别为 82%、89% 和 93%, 对 DPPH 自由基的清除率分别为 43%、49% 和 58%。以上结果表明, 3种重组藻蓝蛋白脱辅基蛋白都具有较高的抗氧化活性, 有潜力作为医疗上使用的抗氧化试剂, 不同蓝细菌的同源藻蓝蛋白的抗氧化能力存在一定差异, 选择不同蓝细菌的藻蓝蛋白是提高重组藻蓝蛋白抗氧化能力的有效途径。

**关键词:** 藻蓝蛋白; 抗氧化活性; 重组蛋白; 自由基

**中图分类号:** TS202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)05-0998-07

### Cloning, expression and antioxidant activities of apo-c-phycocyanin $\beta$ -subunits from three cyanobacteria species

WU Xian-jun, YANG Hong, SHENG Yi, LENG Qian-nan, LI Ping-ping

(College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** In order to study the antioxidant activity of apo-phycocyanin, the genes (*cpcB<sub>Sp</sub>*, *cpcB<sub>Ma</sub>* and *cpcB<sub>No</sub>*) encoding phycocyanin (C-PC) were cloned from three cyanobacteria species, *Spirulina subsalsa*, *Mastigocladus laminosus* and *Nostoc* PCC 7120. The recombinant proteins, CpcB<sub>Sp</sub>, CpcB<sub>Ma</sub> and CpcB<sub>No</sub>, were obtained from *Escherichia coli*, where the *cpcB<sub>Sp</sub>*, *cpcB<sub>Ma</sub>* and *cpcB<sub>No</sub>* genes were expressed respectively. The antioxidant capacities of recombinant CpcB<sub>Sp</sub>, CpcB<sub>Ma</sub> and CpcB<sub>No</sub> were evaluated by measuring their hydroxyl radical scavenging activity and DPPH radical scavenging activity. The results showed that the hydroxyl radical and DPPH radical scavenging activity of recombinant proteins increased with

the increasing of protein concentration. At a concentration of 250 mg/L, the removal rate of hydroxyl radicals by CpcB<sub>Sp</sub>, CpcB<sub>Ma</sub> and CpcB<sub>No</sub> were 82%, 89% and 93%, respectively, whereas CpcB<sub>Sp</sub>, CpcB<sub>Ma</sub> and CpcB<sub>No</sub> exhibited DPPH radicals scavenging activity of 43%, 49% and 58%. In conclusion, all three recombinant phycocyanins have high antioxidant activity, and can be used as potent

收稿日期: 2018-03-14

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (14ZR1401500); 江苏省自然科学基金青年基金项目 (BK20150884); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目 (201610298103X); 江苏省高校优势学科建设工程项目 (PAPD)

作者简介: 伍贤军 (1981-), 男, 湖南新宁人, 博士, 讲师, 主要从事环境生物学研究。 (E-mail) xianjunwu2006@163.com

antioxidants in medical treatments. Phycocyanin from different cyanobacteria has some differences in the antioxidant abilities. The choice of C-PC from different algae is an effective way to increase the antioxidant capacities of recombinant phycocyanin.

**Key words:** phycocyanin; antioxidant activity; recombinant protein; free radical

藻蓝蛋白(Phycocyanin, PC)是某些藻类中结合四吡咯色素分子,具有蓝色的捕光色素蛋白复合物<sup>[1]</sup>,C-藻蓝蛋白(C-PC)是其主要类型。C-PC由 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基组成,在天然条件下,通常以 $(\alpha\beta)$ 、 $(\alpha\beta)_3$ 或 $(\alpha\beta)_6$ 等多聚体的形式存在<sup>[2]</sup>。藻蓝蛋白亚基由藻蓝色素和相应的脱辅基蛋白共价偶联而成<sup>[3]</sup>。C-PC具有良好的生物相容性、无毒性、水溶性、独特的颜色以及在可见光区强烈的吸收和荧光,所以广泛使用在食品、化妆品、生物技术和生物医药等领域<sup>[4-5]</sup>。C-PC展现强烈的抗氧化效应,比如对过氧化氢自由基、烷基自由基和羟基自由基的清除活性<sup>[6-8]</sup>。同时C-PC也有抗炎症、抗病菌、抗癌细胞以及保护神经的医疗效用<sup>[9-11]</sup>。由于大多数病理特征伴随着活性氧自由基(ROS)的产生,所以,这些医疗特性也和C-PC的抗氧化性密切相关。

C-PC一般从天然的藻类中直接提取,也能在大肠杆菌中重组产生<sup>[5]</sup>。研究表明,重组C-PC比天然的C-PC具有更强的抗氧化能力<sup>[12-14]</sup>。C-PC的抗氧化机理最初主要认为仅是色素的抗氧化性<sup>[15]</sup>,通过克隆藻蓝蛋白的编码基因,在大肠杆菌中表达藻蓝蛋白脱辅基蛋白,验证了脱辅基蛋白也具有抗氧化活性<sup>[16]</sup>。这表明C-PC的抗氧化性不仅有色素的作用,还包括脱辅基蛋白的贡献。色素蛋白的生物合成过程复杂且不稳定,不仅需要藻蓝蛋白脱辅基蛋白,还需要与血红素氧化酶、色素还原酶以及裂合酶共表达,而仅用藻蓝蛋白脱辅基蛋白则更为简单可靠<sup>[17]</sup>。

尽管藻蓝蛋白脱辅基蛋白具有抗氧化特征,但其抗氧化机制尚不清楚。不同藻类藻蓝蛋白的蛋白质结构和氨基酸组成存在一定的差异,这些差异可能会影响其抗氧化能力。本研究从螺旋藻 *Spirulina subsalsa*、层理鞭枝藻 *Mastigocladus laminosus* 和鱼腥藻 *Nostoc* PCC 7120 中克隆藻蓝蛋白 $\beta$ 亚基 CpcB<sub>Sp</sub>、CpcB<sub>Ma</sub> 和 CpcB<sub>No</sub> 的编码基因,分别在大肠杆菌中表达,产生重组蛋白,并通过测定重组蛋白对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除能力评估不同蓝细菌重组蛋白的抗氧化活性,为研究藻蓝蛋白的抗氧化性

机理提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

螺旋藻 *Spirulina subsalsa*、层理鞭枝藻 *Mastigocladus laminosus* 和鱼腥藻 *Nostoc* PCC 7120 购自中国科学院水生生物研究所,克隆载体 pUC19 购自 TaKaRa 公司,表达载体 pETDuet-1 购自 Novagen 公司。表达宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 为本实验室提供。

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、BCA 蛋白质定量分析试剂盒购自美国 Thermo 公司,DNA marker、蛋白质 Marker 购自安诺伦(北京)生物科技有限公司,质粒小提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、Taq 酶、dNTP 和其他 PCR 试剂均购自天根(北京)生物科技有限公司,IPTG(异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷)购自博奥拓达(北京)科技有限公司,蛋白胨(Tryptone)和酵母粉(Yeast Extract)为英国 OXOID 公司产品,氨苄西林为韩国 Biosharp 公司产品,其他常规试剂均为国产分析纯。引物合成和基因测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

### 1.2 仪器与设备

Labcyler PCR 仪,德国 SensoQuest 公司产品;Lambda 365 紫外/可见分光光度计,美国 Perkin Elmer 公司产品;LS55 荧光分光光度计,美国 Perkin Elmer 公司产品;MIKRO 200R 小型微量冷冻离心机,德国 Hettich 公司产品;GenoSens1850 凝胶成像系统,上海勤翔科技有限公司产品;恒温混匀器,美国 Grant 公司产品;JY96-II N 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司产品;Bio-Rad 蛋白质电泳仪,美国伯乐公司产品;DNA 电泳仪,北京六一生物科技有限公司产品。

### 1.3 蓝细菌的培养和基因组 DNA 的提取

参照文献[18]、[19]的方法培养蓝细菌 *Spirulina subsalsa*、*Mastigocladus laminosus* 和 *Nostoc* PCC 7120。

蓝细菌基因组 DNA 的提取参照朱万鹏的方

法<sup>[20]</sup>。离心收集的蓝细菌重悬于 TE (pH 8.0) 缓冲液中,向重悬的菌液中加入适量十二烷基硫酸钠 (SDS) 和石英砂,在振荡器上振荡,尽量使细胞全部破碎。用酚/氯仿/异戊醇 (体积比 25 : 24 : 1) 的混合液抽提 2 次,离心取上清液,再用氯仿抽提 1 次,离心取上清液,加入 2 倍体积无水乙醇, -20 ℃ 沉淀 30 min,离心沉淀 DNA,溶于 20 μl TE 缓冲液备用。

#### 1.4 引物设计及 PCR 扩增

根据 NCBI 数据库中 *Nostoc* PCC 7120 C-藻蓝蛋

白编码基因 *cpcB<sub>No</sub>* (GenBank 登录号: NC\_003272)、*Mastigocladus laminosus* C-藻蓝蛋白编码基因 *cpcB<sub>Ma</sub>* (GenBank 登录号: WP\_009454964) 和 *Spirulina subsalsa* C-藻蓝蛋白编码基因 *cpcB<sub>Sp</sub>* (GenBank 登录号: AY804216) 的 DNA 序列设计引物,引物序列见表 1。PCR 条件: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最终 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳确认后,送至金斯瑞基因公司测序。

表 1 PCR 扩增藻蓝蛋白编码基因 *cpcB* 的引物序列

Table 1 Prime sequences for PCR amplification of *cpcB* encoding phycocyanin

基因名称	引物序列	酶切位点
<i>cpcB<sub>No</sub></i>	P1: 5'-CTCGAGCTCGATGACATTAGACGT-3'	<i>Sac</i> I
	P2: 5'-CACAAAGCTTCTCGAGTTAACCAACA-3'	<i>Hind</i> III
<i>cpcB<sub>Ma</sub></i>	P3: 5'-TAAGAGCTCGCATACGATGTATTACCAAG-3'	<i>Sac</i> I
	P4: 5'-AAGCTTAGTAAATTTAAGCAACTGCAG-3'	<i>Hind</i> III
<i>cpcB<sub>Sp</sub></i>	P5: 5'-CAGGAGCTCTATGTTTGACGCATTTACAAGGGTTG-3'	<i>Sac</i> I
	P6: 5'-TATAAGCTTTTAGGCAACAGCAGCAGCAGCG-3'	<i>Hind</i> III

#### 1.5 表达载体的构建及转化

为了构建表达载体,鉴定后的 PCR 产物用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切,插入经过同样双酶切的空载体 pETDuet-1,用  $\text{CaCl}_2$  法转化到已经制备好的感受态细胞 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在加有氨苄抗生素的 LB 固体培养基上,置于恒温培养箱 37 ℃ 过夜倒置培养 16 h,挑取单菌落于 5 ml LB 液体培养基,37 ℃、250 r/min 振荡 8 h,小量提取重组质粒,用 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切质粒,进行琼脂糖凝胶电泳验证。重组质粒用  $\text{CaCl}_2$  法转入表达宿主菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中,获得含重组质粒的重组菌株,并用 50% 的甘油与菌液以体积比为 1 : 2 的比例混匀, -20 ℃ 保存备用。

#### 1.6 目的蛋白的表达、纯化及 SDS-PAGE 电泳

将重组菌株接种到 5 ml 含 100 mg/L 氨苄抗生素的 LB 液体培养基中,置于恒温摇床 37 ℃、250 r/min 培养 10 h,接种 3 ml 浓菌液到 300 ml 液体 LB 培养基中,37 ℃、250 r/min 继续培养,直到  $OD_{600}$  为 0.4~0.5 左右,冰浴 30 min,加入终浓度为 1 mmol/L 的诱导剂 IPTG 置于摇床诱导表达,摇床转速为 150 r/min,表达温度为 20 ℃,表达时间为 12 h。用台式离心机 6 500 r/min 收集表达后的细胞,用去离子水

清洗 3 遍,加入磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ +500 mmol/L NaCl, pH 7.2) 充分悬浮细胞,取少量的细胞制备样品,进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳,对重组蛋白进行分析和鉴定。其余通过超声破碎仪裂解破碎 (400 W, 超声 5 s, 间歇 10 s, 共超声 15 min),裂解液 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min,收集包含可溶性目的蛋白的上清液。

由于表达载体的 N 端融合了组氨酸 His 标签,故可以利用镍离子亲和层析柱 (GE Healthcare) 进行蛋白质的纯化。结合镍离子的亲和层析胶用 Start buffer 平衡液处理后,加入收集到的上清液,用 10 倍的 Start buffer 平衡液冲洗,再用 2 倍体积包含 50 mmol/L 咪唑的 Start buffer 进行冲洗,最后用包含 500 mmol/L 咪唑的 Start buffer 收集重组蛋白溶液。蛋白质溶液装入透析袋,置于透析缓冲液 (50 mmol/L KPB 缓冲液, 500 mmol/L NaCl, pH 7.2) 中透析 8~12 h 以充分去除咪唑,透析期间更换透析液。使用 BCA 蛋白定量分析试剂盒按照标准方法测定蛋白质浓度。取少量蛋白质制备样品,进行 SDS-PAGE 电泳,对重组蛋白进行分析和鉴定。

#### 1.7 羟基自由基清除率测定

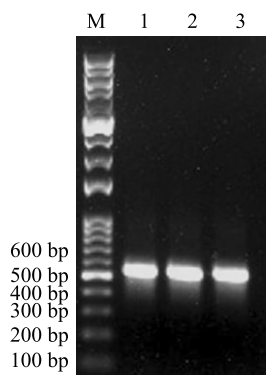
利用稍作修改后的脱氧核糖法<sup>[13]</sup>评估蛋白质

利用 CLUSTALW (2.1) 软件将 3 种蓝细菌 *Spirulina subsalsa*、*Mastigocladus laminosus* 和 *Nostoc* PCC 7120 的 C-藻蓝蛋白  $\beta$  亚基 (CpcB<sub>Sp</sub>、CpcB<sub>Ma</sub> 和 CpcB<sub>No</sub>) 氨基酸序列进行同源性比较。结果 (图 1) 显示, 3 种 C-藻蓝蛋白  $\beta$  亚基的氨基酸序列同源性为 79%。其中, CpcB<sub>Sp</sub> 和 CpcB<sub>Ma</sub> 的同源性为 84%, CpcB<sub>Sp</sub> 和 CpcB<sub>No</sub> 的同源性为 85%, CpcB<sub>Ma</sub> 和 CpcB<sub>No</sub> 的同源性为 90%。它们之间表现出较高的同源性, 但也具有一定的差异。

PCC 7120 基因组 DNA 为模板,P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳后获得 500 bp 左右的 DNA 条带(图 2),PCR 产物测序结果显示其碱



基序列与已报道的 *Nostoc* PCC 7120 中的 *cpcB* 完全一致,命名为 *cpcB<sub>No</sub>*;以 *Mastigocladus laminosus* 基因组 DNA 为模板,P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳后获得 500 bp 左右的 DNA 条带,PCR 产物碱基序列与已报道的 *Mastigocladus laminosus* 中的 *cpcB* 完全一致,命名为 *cpcB<sub>Ma</sub>*;以 *Spirulina subsalsa* 基因组 DNA 为模板,P5 和 P6 为引物进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳后获得 500 bp 左右的 DNA 条带,PCR 产物测序结果显示其大小为 519 bp,与目的基因大小一致,命名为 *cpcB<sub>Sp</sub>*,其基因碱基序列与已报道的 *Spirulina subsalsa* 中 *cpcB* 的相似度为 90%,翻译后的氨基酸序列相似度为 95%,跨度为 100%。



M: Marker; 1: *cpcB<sub>No</sub>*; 2: *cpcB<sub>Ma</sub>*; 3: *cpcB<sub>Sp</sub>*。

图2 藻蓝蛋白 $\beta$ 亚基编码基因 PCR 扩增

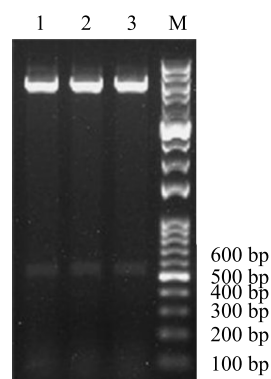
Fig.2 PCR amplification of phycocyanin  $\beta$ -subunit gene

### 2.3 重组质粒 pETDuet-*cpcB<sub>No</sub>*、pETDuet-*cpcB<sub>Ma</sub>* 和 pETDuet-*cpcB<sub>Sp</sub>* 的构建

将扩增得到的目的基因 *cpcB<sub>No</sub>*、*cpcB<sub>Ma</sub>*、*cpcB<sub>Sp</sub>* 和表达载体 pETDuet-1 分别进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳纯化并回收酶切产物,过夜连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,置于恒温培养箱中过夜培养,挑取单克隆菌落,提取重组质粒 pETDuet-*cpcB<sub>No</sub>*、pETDuet-*cpcB<sub>Ma</sub>* 和 pETDuet-*cpcB<sub>Sp</sub>*。新质粒分别用 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切。琼脂糖凝胶电泳检测结果(图3)显示,在 500 bp 左右处观察到 DNA 条带,与预测的目的基因大小一致,表明重组质粒构建成功。

### 2.4 重组藻蓝蛋白的表达和纯化

将重组质粒 pETDuet-*cpcB<sub>No</sub>*、pETDuet-*cpcB<sub>Ma</sub>* 和 pETDuet-*cpcB<sub>Sp</sub>* 转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,在 IPTG 的诱导下表达,产生重组蛋白 CpcB<sub>No</sub>、CpcB<sub>Ma</sub> 和 CpcB<sub>Sp</sub>。收集的细胞进行 SDS-PAGE 电泳

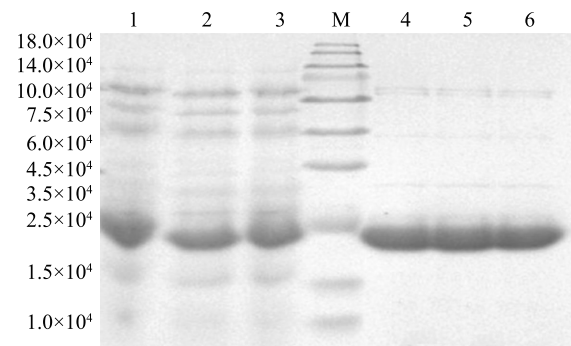


1: *cpcB<sub>No</sub>*; 2: *cpcB<sub>Ma</sub>*; 3: *cpcB<sub>Sp</sub>*; M: Marker。

图3 重组质粒酶切产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of enzyme-digested products of the recombinant plasmids

检测,结果(图4)显示目的蛋白分子量为  $2.0 \times 10^4$  左右,与预期基本相符。用亲和层析法提纯重组蛋白后,进一步进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果(图4)显示蛋白质大小和预期的基本一致,目的条带清晰,没有杂带,纯度较高。



1: 包含 CpcB<sub>No</sub> 的细胞; 2: 包含 CpcB<sub>Ma</sub> 的细胞; 3: 包含 CpcB<sub>Sp</sub> 的细胞; M: Marker; 4: 纯化后 CpcB<sub>No</sub>; 5: 纯化后 CpcB<sub>Ma</sub>; 6: 纯化后 CpcB<sub>Sp</sub>。

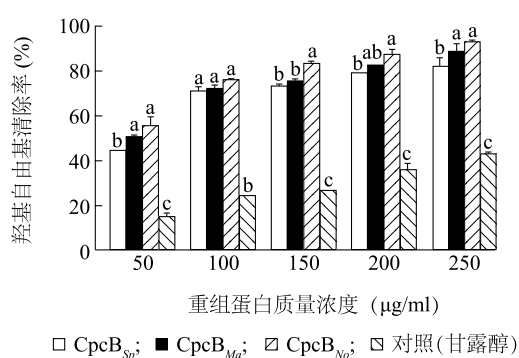
图4 包含重组蛋白的大肠杆菌细胞和纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the *Escherichia coli* cells and purified products containing recombinant proteins

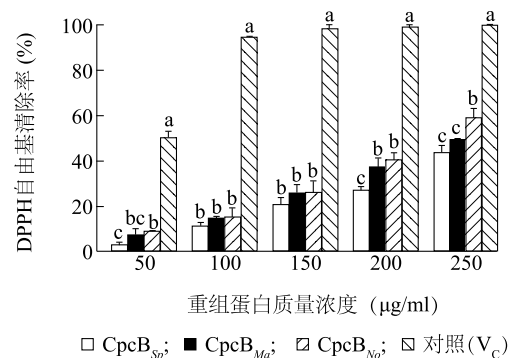
### 2.5 3 种重组藻蓝蛋白的抗氧化性

测定不同质量浓度的重组蛋白 CpcB<sub>No</sub>、CpcB<sub>Ma</sub> 和 CpcB<sub>Sp</sub> 的抗氧化能力,包括对羟基自由基和 DP-PH 自由基的清除能力。结果(图5)表明,重组蛋白对羟基自由基的清除率依赖于所测重组蛋白的质量浓度,随着重组蛋白的质量浓度的增加而不断升高。质量浓度为 50  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ 、150  $\mu\text{g/ml}$ 、200

$\mu\text{g/ml}$ 、250  $\mu\text{g/ml}$ 的  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$  对羟基自由基的清除能力分别为 45%、71%、73%、79% 和 82%, 不同质量浓度  $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  对羟基自由基的清除能力分别为 51%、72%、76%、83% 和 89%, 不同质量浓度  $\text{CpcB}_{\text{No}}$  对羟基自由基的清除能力分别为 56%、76%、83%、88% 和 93%。在各种蛋白质质量浓度下,  $\text{CpcB}_{\text{No}}$  对羟基自由基的清除率均显著高于  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$ ; 在 100  $\mu\text{g/ml}$ 、150  $\mu\text{g/ml}$ 、200  $\mu\text{g/ml}$  的质量浓度下,  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$  和  $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  对羟基自由基的清除率无显著差异; 在 50  $\mu\text{g/ml}$  和 250  $\mu\text{g/ml}$  的质量浓度下,  $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  对羟基自由基的清除能力显著高于  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$ 。重组蛋白对羟基自由基的清除能力都高于对照甘露醇。



重组蛋白对 DPPH 自由基的清除能力也随着重组蛋白浓度的升高而逐步提高(图 5)。重组蛋白质量浓度为 50  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ 、150  $\mu\text{g/ml}$ 、200  $\mu\text{g/ml}$ 、250  $\mu\text{g/ml}$  时,  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$  对 DPPH 自由基的清除能力分别为 3%、11%、20%、27% 和 43%,  $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  对 DPPH 自由基的清除能力分别为 7%、14%、25%、37% 和 49%,  $\text{CpcB}_{\text{No}}$  对 DPPH 自由基的清除能力分别为 8%、15%、26%、40% 和 58%。在较高浓度(250  $\mu\text{g/ml}$ )时,  $\text{CpcB}_{\text{No}}$  明显比  $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  和  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$  具有更强的 DPPH 自由基清除能力, 但是它们的清除能力都低于对照抗坏血酸。3 种重组蛋白对羟基自由基的清除能力比对 DPPH 自由基的清除能力都要强。



同一质量浓度下不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 5 重组蛋白  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$ 、 $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  和  $\text{CpcB}_{\text{No}}$  对自由基的清除能力

Fig.5 Free radical scavenging capacity of recombinant  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$ ,  $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  and  $\text{CpcB}_{\text{No}}$

### 3 讨论

藻蓝蛋白具有抗氧化性,可以直接从蓝细菌中提取<sup>[21]</sup>。由于分子克隆技术的运用和藻蓝蛋白生物合成机制的解析,藻蓝蛋白也能重组产生,且表现出更好的抗氧化效应<sup>[12-14]</sup>。从大肠杆菌中提取蛋白质比从蓝藻中提取更为简单,故重组藻蓝蛋白引起广泛关注<sup>[4-5]</sup>。藻蓝蛋白的抗氧化性不仅与色素有关,也有脱辅基蛋白的贡献<sup>[22]</sup>。利用脱辅基蛋白的抗氧化能力可以避免复杂的色素蛋白合成过程,提高重组的稳定性和蛋白质产量。本研究中,我们在大肠杆菌中重组 3 种蓝细菌藻蓝蛋白 $\beta$ 亚基的脱辅基蛋白并评估其抗氧化能力。结果表明,3 种藻蓝蛋白对羟基自由基的清除效率均与质量浓度有关,当蛋白质质量浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$  时,  $\text{CpcB}_{\text{No}}$ 、 $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  和  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$  对羟基自由基的清除率均已超过 50%, 分别为 76%、72% 和 71%, 三者较为接近,它们

的蛋白质氨基酸序列有高达 79% 的同源性。Cherd-kiatikul 等<sup>[17]</sup>也报道钝顶螺旋藻  $\text{CpcB}$  的抗氧化性,样品质量浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$  时,对羟基自由基的清除率未超过 50%。这种差异可能并不完全反映其抗氧化能力的差异,也有试验过程的原因,但对照甘露醇对羟基自由基清除率与先前的报道<sup>[23]</sup>基本一致。3 种重组蛋白中  $\text{CpcB}_{\text{No}}$  的羟基自由基清除率最高。基于氨基酸序列的在线预测工具预测结果显示,  $\text{CpcB}_{\text{No}}$  的水溶性参数高于  $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  和  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$ , 它们的水溶性参数分别为 47%、35% 和 33%, 这是造成它们抗氧化性差异的原因之一,但也有可能是其抗氧化活性位点并未完全处在保守性区域,其分布表现同质性。藻蓝蛋白对 DPPH 自由基的清除率比对羟基自由基的清除率要低得多。质量浓度达到 100  $\mu\text{g/ml}$  时,  $\text{CpcB}_{\text{No}}$ 、 $\text{CpcB}_{\text{Ma}}$  和  $\text{CpcB}_{\text{Sp}}$  对 DPPH 自由基的清除率均未超过 15%, 分别为 15%、14% 和 11%。但对 DPPH 自由基清除能力仍表现为

CpcB<sub>No</sub>>CpcB<sub>Ma</sub>>CpcB<sub>Sp</sub>,其趋势与对羟基自由基清除能力一致。这也再次说明鱼腥藻 CpcB 具有较好的抗氧化潜力。

总之,3种重组蛋白具有显著的抗氧化潜力,可以开发为抗氧化试剂。不同蓝藻的重组藻蓝蛋白的抗氧化性较为接近,这归因于它们的氨基酸序列具有较高的同源性。重组藻蓝蛋白抗氧化性也存在一定差异,这表明通过选择不同蓝细菌藻蓝蛋白是提高重组藻蓝蛋白抗氧化能力的有效途径。藻蓝蛋白脱辅基蛋白的抗氧化机理还需更多的研究证实。研究不同藻种的藻蓝蛋白抗氧化能力及其差异是研究其抗氧化机制的重要途径。也可以通过蛋白质遗传改造的方式提高藻蓝蛋白的抗氧化活性,为藻蓝蛋白在食品加工和医疗上的广泛应用奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] PATEL A, MISHRA S, PAWAR R, et al. Purification and characterization of C-phycoerythrin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat [J]. Protein Expression & Purification, 2005, 40(2):248.
- [2] PATIL G, CHETHANA S, SRIDEVI A S, et al. Method to obtain C-phycoerythrin of high purity [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1127(1):76-81.
- [3] FUKUI K, SAITO T, NOGUCHI Y, et al. Relationship between color development and protein conformation in the phycoerythrin molecule [J]. Dyes & Pigments, 2004, 63(1):89-94.
- [4] ERIKSEN N T. Production of phycoerythrin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2008, 80(1):1-14.
- [5] KUDDUS M, SINGH P, THOMAS G, et al. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoerythrin [J]. Biomed Research International, 2013, 2013(3):742859.
- [6] KHAN M, VARADHARAJ S, SHOBHA J C, et al. C-phycoerythrin ameliorates doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat cardiomyocytes [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2006, 47(1):9-20.
- [7] PATEL A, MISHRA S, GHOSH P K. Antioxidant potential of C-phycoerythrin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp [J]. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2006, 43(1):25.
- [8] PALOMA B, ENRIQUE P, ÁNGELMA V. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycoerythrin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis* [J]. Food Chemistry, 2008, 110(2):436-445.
- [9] MITRA S, SIDDIQUI W A, KHANDELWAL S. C-phycoerythrin protects against acute tributyltin chloride neurotoxicity by modulating glial cell activity along with its anti-oxidant and anti-inflammatory property: A comparative efficacy evaluation with N-acetyl cysteine in adult rat brain [J]. Chemico-Biological Interactions, 2015, 238(3/4):138-150.
- [10] SIGAMANI S. Antibacterial activity of extracted phycoerythrin from *Oscillatoria* [J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2017, 7(3):62-67.
- [11] LIAO G, BING G, GAO Y, et al. Phycoerythrin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: Role of apoptosis and autophagy [J]. Scientific Reports, 2016, 6:34564.
- [12] GUAN X Y, ZHANG W J, ZHANG X W, et al. A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant  $\alpha$ -phycoerythrin of *Spirulina* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(4):1093-1100.
- [13] ZHANG W, GUAN X, YANG Y, et al. Biosynthesis of fluorescent allophycoerythrin  $\alpha$ -subunits by autocatalysis in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology & Applied Biochemistry, 2009, 52(2):135-140.
- [14] PING Y, PENG L, CHEN X, et al. Combinatorial biosynthesis of synechocystis, PCC6803 phycoerythrin holo- $\alpha$ -subunit (CpcA) in *Escherichia coli*, and its activities [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(12):5375-5388.
- [15] LISS E A, PIZARRO M, ASPEE A, et al. Kinetics of phycoerythrin bilin groups destruction by peroxy radicals [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2000, 28(7):1051.
- [16] PLEONSIL P, SOOGARUN S, SUWANWONG Y. Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycoerythrin and their protective effects on human erythrocytes [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60(6):393.
- [17] CHERDKIATIKUL T, SUWANWONG Y. Production of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of spirulina allophycoerythrin and C-phycoerythrin in *Escherichia coli*: A comparative study of their antioxidant activities [J]. Journal of Biomolecular Screening, 2014, 19(6):959-965.
- [18] 李全顺,徐成海,贾庆舒,等. 盐泽螺旋藻的生长及放氢的实验研究 [J]. 沈阳大学学报, 2009, 21(4):65-67.
- [19] 曹必涛,傅雪琳,蔡晓丹,等. 鱼腥藻 PCC7120 基因 *alr0267* 敲除及其功能的初步研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(6):157-166.
- [20] 朱万鹏. *Schizosaccharomyces pombe cdc2* 基因在产能微藻中的克隆与表达 [D]. 大连:大连工业大学, 2013.
- [21] BENEDETTI S, BENVENUTI F, PAGLIARANI S, et al. Antioxidant properties of a novel phycoerythrin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae* [J]. Life Sciences, 2004, 75(19):2353-2362.
- [22] SHOJA Z, MEMARI H R, ARDAKANI M R. Cloning and expression of beta subunit gene of phycoerythrin from spirulina platensis in *Escherichia coli* [J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2015, 8(8):e17809.
- [23] XU R, LI D, PENG J, et al. Cloning, expression and antioxidant activity of a novel collagen from *Pelodiscus sinensis* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(6):100.

(责任编辑:张震林)