



## 研究报告

## 高原链带藻抗氧化蛋白分离纯化与结构鉴定

韩志萍<sup>1</sup> 程慧莹<sup>2,3</sup> 王润东<sup>1</sup> 李贵丽<sup>2,3</sup> 王飞<sup>2</sup> 李甜甜<sup>3</sup> 杨娟<sup>\*1</sup>

1 岭南师范学院食品科学与工程学院 广东 湛江 524048

2 中国热带农业科学院农产品加工研究所 广东 湛江 524001

3 华中农业大学食品科学技术学院 湖北 武汉 430000

**摘要:**【背景】微藻 *Desmodesmus* sp. QL96 从我国西藏地区分离得到, 经形态鉴定隶属于链带藻属。前期研究发现, 这种链带藻在 4 °C 和 25 °C 下均可生长, 在 25 °C 生长时, 干细胞中蛋白质含量可高达 71.68% (质量分数), 而且蛋白粗提物具有一定的抗氧化活力。【目的】分离纯化 *Desmodesmus* sp. QL96 细胞中具有抗氧化活力的蛋白质, 并对其结构进行鉴定。【方法】应用柱层析的方法分离纯化 *Desmodesmus* sp. QL96 细胞中具有抗氧化活力的蛋白质, 通过化学发光法和细胞学实验对该蛋白的抗氧化活性进行检测, 并通过质谱技术对其一级结构进行检测。【结果】*Desmodesmus* sp. QL96 细胞中抗氧化蛋白的含量占微藻细胞干重的 11.40% (质量分数); 纯化的 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白在一定浓度范围内对 OH<sup>-</sup>、DPPH、ABTS 自由基和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 具有较好的清除率(超过 60%), 细胞学实验显示其对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤具有抑制作用, 验证了其抗氧化功能; 通过质谱技术检测了 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白的氨基酸序列, 并进行了生物信息学分析, 结果显示, 这种蛋白质的理论分子量为 44.8 kD、pI 5.79, 与 NCBI 中目前已知的其他物种蛋白质的相似性不超过 59%。【结论】*Desmodesmus* sp. QL96 可能生产一种具有抗氧化活性的新蛋白质, 后续将其转录本进行分析, 验证其遗传信息的同源性, 并分析其规模化生产和应用前景。

**关键词:** 西藏高原, 链带藻, 抗氧化蛋白, 蛋白纯化, 蛋白结构

## Purification and structure determination of an antioxidant protein from plateau microalga *Desmodesmus* sp.

HAN Zhiping<sup>1</sup> CHENG Huiying<sup>2,3</sup> WANG Rundong<sup>1</sup> Li Guili<sup>2,3</sup> WANG Fei<sup>2</sup>  
LI Tiantian<sup>3</sup> YANG Juan<sup>\*1</sup>

1 College of Food Science and Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China

2 Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524001, China

3 College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430000, China

**Abstract:** [Background] Microalga *Desmodesmus* sp. QL96 was isolated from Tibet Plateau, China. We

**Foundation items:** Science and Technology Innovation Project of Lingnan Normal University (ZL2012, ZL1615)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-759-3183176; E-mail: yangjuan198192@163.com

**Received:** 16-07-2020; **Accepted:** 15-09-2020; **Published online:** 25-11-2020

**基金项目:** 岭南师范学院校级科研项目(ZL2012, ZL1615)

**\*通信作者:** Tel: 0759-3183176; E-mail: yangjuan198192@163.com

**收稿日期:** 2020-07-16; **接受日期:** 2020-09-15; **网络首发日期:** 2020-11-25

had previously found that the microalga was able to grow at both 4 °C and 25 °C, and produced 71.68% (*W/W*) cellular proteins which showed antioxidant activities. **[Objective]** Herein, an antioxidant protein in *Desmodesmus* sp. QL96 cells was purified and its structure was analyzed. **[Methods]** Purification of the antioxidant protein was performed through chromatography. The antioxidant activity of the purified protein was determined using chemiluminescence assays and *in vitro* cell cultures. The structure of the purified protein was then analyzed using mass spectrometry. **[Results]** The antioxidant protein took up 11.40% (*W/W*) of the dry microalgal cells. The purified protein demonstrated scavenging capacity to free radicals of OH<sup>-</sup>, DPPH, ABTS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (over 60% scavenged). *In vitro* cell cultures using liver carcinoma cell HepG2 demonstrated that the *Desmodesmus* sp. QL96 antioxidant protein could reduce oxidative damage to the cells. The amino acid sequence of the protein determined using a mass spectrometry showed that the molecular weight of the antioxidant protein was 44.8 kD with a pI of 5.79. The homologous rate of the protein with the known proteins in NCBI was below 59%. **[Conclusion]** Microalga *Desmodesmus* sp. QL96 produces a previously uncharacterized protein which demonstrates antioxidant activity. The transcript of the protein will be analyzed to verify the genetic sequence similarity in the future, as well as its potential function and industry applications.

**Keywords:** Tibet Plateau, *Desmodesmus* sp., antioxidant protein, protein purification, protein structure

微藻是微型藻类生物, 生长在各种水域中, 在自然界中营自养生活, 通过光合作用将环境中无机物转化成藻体细胞中的有机物, 其细胞组分包括多糖、蛋白质、脂类、 $\beta$ -胡萝卜素等多种高价值的营养成分和化工原料<sup>[1]</sup>。长期以来, 人们不断地从自然界筛选出各种微藻, 以期获得新的或性能更佳天然产物<sup>[2]</sup>。例如, 缪锦来等研究了 4 种南极冰藻, 发现它们的蛋白质和脂质含量均高于常温藻, 特别是多不饱和脂肪酸总含量超过 70% (相对于总脂肪酸), 而灰分含量低于常温藻, 具有保健品和水产饵料开发潜力<sup>[3]</sup>。裂壶藻藻油(DHA 含量>90%)可以显著降低小鼠腹部脂肪积累并改善血脂, 在肥胖症防治中具有应用前景<sup>[4]</sup>。耐热链带藻(*Desmodesmus* sp. F2)在特定的生长条件下, 细胞中脂质产量达到 263 mg/(L·d), 是所有文献报道中产油率最高的微藻, 具有生物能源开发潜力<sup>[5]</sup>。小球藻的产物多肽可以在体外激活 NF- $\kappa$ B 通路介导癌细胞凋亡, 可抑制肿瘤发展, 有望开发为新的抗癌药物<sup>[6-7]</sup>。赵冰冰等从巢湖蓝藻中分离了一种荧光蛋白, 可作为基因标记物应用于生命科学研究<sup>[8]</sup>。

高原链带藻(*Desmodesmus* sp. QL96)从我国西藏那曲青龙乡普保巴村巴木错湖分离得到<sup>[9]</sup>。该

地区属高原亚寒带半干旱气候区, 年平均气温低、空气密度低、太阳辐射强, 在该地区生长的植被和藻类, 其生长速率和细胞组分都与平原地区的作物有很大差异<sup>[10]</sup>。例如, 拟球状念珠藻(*Nostoc sphaeroides*)生长于青藏高原定结湿地时蛋白质含量为 54.08% (质量分数), 而生长于千岛湖时蛋白质含量只有 31.60% (质量分数)<sup>[11]</sup>。我们前期研究发现, *Desmodesmus* sp. QL96 于常温常压条件下在 BG11 培养基中生长 6 d 时, 藻体细胞中蛋白质含量达 71.68% (质量分数), 而且蛋白粗提物具有一定的抗氧化性, 对 OH<sup>-</sup> 和 DPPH 自由基的清除能力超过 30%<sup>[9,12]</sup>。

抗氧化和人体健康有直接关系, 细胞内过氧化物质活性体的变化会引起细胞功能和基因表达的变化, 甚至可以导致细胞凋亡和坏死<sup>[13]</sup>。抗氧化物通过清除体内自由基, 抑制脂质过氧化, 减少组织氧化, 起到保护机体的作用; 天然产物蛋白和多肽的副作用小, 与合成物相比, 降低了对免疫系统活性和防御机制的干扰, 预防了促氧化效应<sup>[14]</sup>。

人们对天然产物蛋白和多肽的氧化应激作用研究由来已久, 其中对小球藻、巴夫藻、赤藻蛋白及多肽的研究最多<sup>[6]</sup>。蛋白核小球藻和赤藻的

蛋白提取物经木瓜酶水解制备的多肽混合物,对自由基和皮肤成纤维细胞均显示了高强的抗氧化活性。从该多肽混合物中纯化的多肽 Val-Glu-Cys-Tyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Glu-Phe 和 Leu-Asn-Gly-Asp-Val-Trp, 对 DPPH 具有很高的清除能力(>97%)<sup>[15-16]</sup>。

本文在前期研究的基础上,收集 *Desmodesmus* sp. QL96 藻体细胞,盐析制备蛋白粗提物,通过柱层析色谱分离纯化蛋白,收集其中的抗氧化蛋白,质谱法检测其氨基酸序列,并通过计算机模拟预测其高级结构。研究结果有助于全面了解高原链带藻的抗氧化蛋白,可为后续的规模化生产和应用研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*Desmodesmus* sp. QL96 为本实验室保存。

BG11 培养基(g/L): 硝酸钠 1.500, 磷酸氢二钾 0.040, 七水硫酸镁 0.075, 七水氯化钙 0.036, 碳酸钠 0.020, 柠檬酸 0.006, 柠檬酸铁铵 0.006, EDTA 0.001, 微量元素溶液 1 mL (含硼酸 2.86 g, 四水氯化锰 1.81 g, 钼酸钠 0.39 g, 五水硫酸铜 0.39 g, 六水硝酸钴 0.049 g)。

DEAE-Sepharose FF, GE 公司; DMEM 完全培养基, 西陇科学股份有限公司; HepG2 细胞, 武汉普赛诺生命科技有限公司; 超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)及噻唑蓝[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]细胞毒性检测试剂盒及抗氧化活性检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; Western 及 IP 细胞裂解液试剂盒、不含酶抑制剂, 南京森贝伽生物科技有限公司; Trypsin/Lys-C 混合酶液、Sequencing Grade, Promega 公司。

恒温光照培养箱、二氧化碳培养箱, 上海知楚仪器仪器有限公司; ÄKTAPrime 蛋白纯化系

统、层析柱、装柱器, GE Healthcare 公司; 酶标仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.2 *Desmodesmus* sp. QL96 的培养及蛋白粗提

在 500 mL 摇瓶中加入 250 mL BG11 培养液, 微藻接种浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 在温度  $25 \pm 1$  °C、光照强度 8 000 lx、光暗周期 12 L:12 D 的培养条件下培养 6 d, 抽滤收集藻细胞, 冻干备用。取 50 mg 收集的冻干微藻细胞粉放入研钵中, 置于冰水浴上充分研磨后, 用 pH 7.4 磷酸缓冲液 10 mL 洗脱研磨藻粉于烧杯中, 充分混匀, 4 °C、 $2\,000 \times g$  离心 5 min 取上清液, 用磷酸盐缓冲液定容到 10 mL。加入硫酸铵至其饱和度的 80%, 搅拌均匀, 低温下静置 30 min, 4 °C、 $10\,000 \times g$  离心 15 min 收集蛋白沉淀。粗蛋白用 pH 7.4 的磷酸缓冲液复溶, 选用切向流超滤系统及 Biomax 改良聚醚砜复合膜包, 膜包截留分子质量为 500 kD, 超滤脱盐, 收集流出液, 再经 10 kD 膜包浓缩, 收集浓缩液, 超滤过程中控制温度为  $4 \pm 1$  °C, 将获得的浓缩液装至 50 mL 的离心管中,  $-80$  °C 保存。使用 BCA 试剂盒检测蛋白质含量。

### 1.3 抗氧化蛋白分离纯化

将蛋白浓缩液的浓度调节为 20 mg/mL, 使用 ÄKTAPrime 蛋白纯化系统, 填料柱为 DEAE-Sepharose FF 离子交换凝胶, 上样量 1 mL, 使用 0–1.0 mol/L 氯化钠溶液(溶于 0.01 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0)梯度洗脱, 洗脱流速 1 mL/min, 分别收集各峰组分, 间隔时间为 1 min, 在 280 nm 测定蛋白吸光度, 对蛋白含量高的组分测其自由基清除活力。离子交换结束后, 选取抗氧化活力较好的组分浓缩冻干, 使用磷酸缓冲液复溶, 使蛋白浓度为 8 mg/mL。填料柱用再生溶液 1 mol/L 氯化钠和 1 mol/L 氢氧化钠分别冲洗 5 倍柱体积, 调节洗脱条件, 将收集到的抗氧化蛋白再进行一次分离纯化。

### 1.4 蛋白质电泳分析

参照 Sun 等的微藻蛋白电泳分析方法<sup>[17]</sup>, 使用梯度 4%–12.5% (质量体积分数) Tris-Glycine 电泳胶

对 *Desmodesmus* sp. QL96 进行分离, 将 21  $\mu\text{L}$  蛋白溶液与 7  $\mu\text{L}$  4 $\times$ NuPAGE LDS 缓冲液混合, 上样到电泳胶上; 随着蛋白纯化度的增加, 上样蛋白从 30  $\mu\text{g}$  递减到 10  $\mu\text{g}$ , 在 120 V 下分离 1 h; 之后将胶在 2.5% (体积分数) Triton-X 100 中清洗 2 次, 每次 30 min; 然后用纯净水清洗 3 次, 使用考马斯亮蓝 G-250 对胶片染色, 并用 1% (体积分数) 的醋酸脱色。

### 1.5 蛋白抗氧化活力检测

取每个柱分离过程中收集到的各峰组分, 使用 Solarbio 总抗氧化能力检测试剂盒, 以及羟自由基( $\text{OH}^\cdot$ )、DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除能力检测试剂盒, 按照说明分别检测蛋白纯化物的总抗氧化水平以及  $\text{OH}^\cdot$ 、DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力。

过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )清除能力检测按照 Nna 等的方法<sup>[18]</sup>, 将不同浓度的检测样品 1.7 mL 与 0.3 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40 mmol/L, 溶于 pH 7.4 磷酸缓冲液)混匀, 常温下孵化 10 min, 以磷酸缓冲液为空白溶液, 检测各样品在 230 nm 下的吸光度,  $\text{H}_2\text{O}_2$  清除能力计算方法:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 清除率}(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

式中:  $A$  代表样品吸光度,  $A_0$  代表空白溶液吸光度。

### 1.6 细胞学实验验证 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白的抗氧化活性

建立  $\text{H}_2\text{O}_2$  体外诱导氧化损伤细胞模型, 将处于对数生长期的 HepG2 细胞消化成单细胞悬液, 按每孔  $1 \times 10^4$  个接种到 96 孔板中, 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的条件下在 DMEM 完全培养基中培养, 当细胞融合度达 70%–80% 时, 用磷酸缓冲液清洗 2 次, 各孔中加入新培养液 200  $\mu\text{L}$ , 再添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 20  $\mu\text{L}$ , 使  $\text{H}_2\text{O}_2$  终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ 。

为了研究 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用, 各孔中添加新培养液后, 再添加抗氧化蛋白溶液

10  $\mu\text{L}$ , 使培养液中抗氧化蛋白浓度为 0.5 mg/mL; 再添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 10  $\mu\text{L}$ , 使  $\text{H}_2\text{O}_2$  的终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ ; 继续培养 8 h, MTT 法测细胞活力。

所有关于抗氧化活性的检测, 均以维生素 C 为阳性对照, 以蛋白自身煮沸灭活(99  $^\circ\text{C}$ , 10 min)和 BSA 蛋白为阴性对照。

### 1.7 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白处理后细胞 MDA 水平和 SOD、CAT 活力的检测

HepG2 细胞经 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白处理后, 分别收集细胞和细胞培养液, 使用磷酸缓冲液清洗细胞 2 次, 加入细胞裂解液, 裂解结束后 10 000 $\times g$  离心 5 min, 取上清液使用试剂盒测定 SOD 酶活力, 并使用试剂盒测定细胞培养液中 MDA 和 CAT 水平。

### 1.8 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白氨基酸序列分析

将 10  $\mu\text{g}$  纯化的 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白用 50 mmol/L TEAB 缓冲液复溶, 加入 0.2  $\mu\text{g}$  Trypsin/Lys-C 混合酶液, 在 37  $^\circ\text{C}$  条件下酶解 6 h, 产物多肽经 Ziptip 枪头除盐后, 低温真空干燥, 使用 1% 的乙腈溶液复溶, 产物进行二级质谱检测(Q-Exactive nanoLC-MS/MS)。使用 Global Proteome Machine 软件 X!Tandem algorithm 对质谱数据进行搜库分析, 根据酶切规律进行蛋白的组装。

### 1.9 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白二、三级结构分析

一级结构的基础上, *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白的高级结构使用 Phyre2 在线程序进行模拟分析<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白分离纯化

整个分离纯化过程在 4  $^\circ\text{C}$  条件下进行, *Desmodesmus* sp. QL96 蛋白粗提物经超滤浓缩后, 通过补充缓冲液使其浓度为 10 mg/mL, 经 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱分离后, 得到 3 个

主要的蛋白峰, 洗脱体积为 22–77 mL 时洗脱液显示了抗氧化活力(图 1A)。蛋白相对含量由 AKTA 系统自动检测( $OD_{280}$ ), 检测间隔体积为 1  $\mu$ L, 抗氧化活力的检测间隔时间为 1 mL, 检测结果分别对应图 1A 中的曲线和散点。吸光度超过 1.5 AU 的数值与蛋白浓度之间没有线性关系, 其对应洗出液的蛋白浓度由 BCA 法检测。由于 4 个蛋白含量较高的峰的分离效果不佳, 因此需进行进一步的分离。

将含有抗氧化蛋白的洗脱液合并到一起, 冻干后由磷酸缓冲液复溶, 制备成蛋白浓度为 8 mg/mL 的溶液, 再次使用 DEAE-Sepharose FF 填料进行分离, 上样量 1 mL, 将洗脱液 pH 调节为 6.0, 洗脱液中盐浓度调节为 0–1.2 mol/L 梯度洗脱, 洗脱液流速为 0.6 mL/min, 其中流出体积为 19–21 mL 的洗脱液显示了抗氧化活力(图 1B)。抗氧化蛋白得到较好的分离, 抗氧化蛋白总质量为 5.7 mg, 忽略含量检测和电泳分析过程中损耗的蛋白, *Desmodesmus* sp. QL96 细胞中抗氧化蛋白的含量

为 11.40% (质量分数, 干重)。

将 *Desmodesmus* sp. QL96 蛋白粗提物和柱分离的产物进行电泳分析。结果显示, *Desmodesmus* sp. QL96 蛋白粗提物在 SDS-PAGE 上形成的条带少于 10 条, 而且这些蛋白的分子量均小于 100 kD, 粗蛋白中可能含有蛋白碎片, 在电泳胶底部堆积(图 1C, 泳道 4), 说明粗蛋白中含有某种蛋白酶; 超滤分离去掉了这些蛋白碎片, 但对其他蛋白无明显影响(泳道 2); 第一次离子交换将分子量约为 60、30 和 23 kD 的蛋白分离(泳道 3), 改进洗脱条件进行第 2 次离子交换后, 分离得到单一条带的抗氧化蛋白, 其分子量接近 45 kD (泳道 4)。

## 2.2 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白对自由基的清除效果

*Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白对  $OH^\cdot$ 、DPPH、ABTS 和  $H_2O_2$  均具有清除效果, 其清除作用均不及维生素 C, 但比牛血清蛋白 BSA 强, 经热处理的 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白完

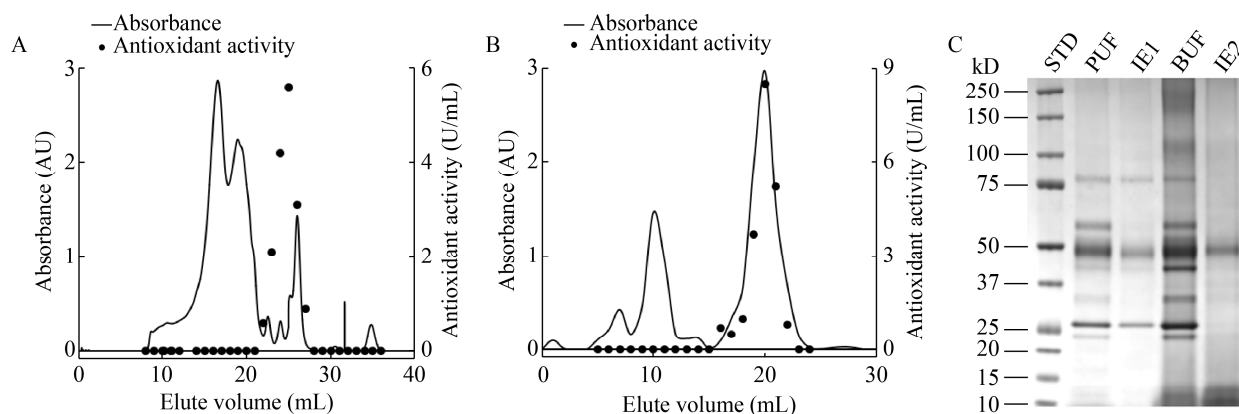


图 1 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白分离纯化

Figure 1 Isolation and purification of microalga *Desmodesmus* sp. QL96 antioxidant protein

注: A: 第 1 次 DEAE-Sepharose 离子交换图谱及蛋白抗氧化活力检测, 使用 0–1.0 mol/L 氯化钠溶液(溶于 0.01 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0)梯度洗脱, 洗脱流速 1 mL/min; B: 第 2 次 DEAE-Sepharose 离子交换图谱及蛋白抗氧化活力检测, 将洗脱液 pH 调节为 6.0, 洗脱液中盐浓度调节为 0–1.2 mol/L 梯度洗脱, 洗脱液流速为 0.6 mL/min; C: 电泳检测, STD 代表标准蛋白, PUF 代表经超滤分离后的粗蛋白, IE1 和 IE2 分别代表第 1、2 次 DEAE-Sepharose 纯化产物, BUF 代表粗蛋白

Note: A: The first round of DEAE-Sepharose fast flow ion exchange chromatography and antioxidant activity assay. Gradient elution was performed using 0–1.0 mol/L sodium chloride solution (in 0.01 mol/L phosphate buffer, pH 7.0) at a flow rate of 1 mL/min; B: The second round of DEAE-Sepharose fast flow ion exchange chromatography and antioxidant activity assay. Gradient elution was performed using 0–1.2 mol/L sodium chloride solution (in 0.01 mol/L phosphate buffer, pH 6.0) at a flow rate of 0.6 mL/min; C: SDS-PAGE of the purified oxidant protein. The ultrafiltration-filtered protein, filtrates from the two rounds of DEAE-Sepharose and the raw proteins were analyzed and labeled as PUF, IE1, IE2 and BUF respectively on the top of lanes

全失去抗氧化活性。在 0–0.4 mg/mL 的范围内, 其对  $\text{OH}^-$  自由基的清除效果随蛋白浓度的增加而增大, 达到 60.1%, 蛋白浓度继续增大对  $\text{OH}^-$  自由基的清除作用不再明显增加, 直到蛋白浓度超过 0.8 mg/mL 时对  $\text{OH}^-$  自由基的清除作用开始下降(图 2A)。关于抗氧化剂在高剂量时表现出的促氧化作用, 临床已有诸多报道, 但其中的机制还未明确<sup>[20]</sup>。

*Desmodium* sp. QL96 抗氧化蛋白对 DPPH 清除作用的变化规律和维生素 C 相似, 在抗氧化剂浓度为 0–0.2 mg/mL 的范围内, 清除作用随浓

度增加而增大, 之后在 0.2–1.0 mg/mL 的浓度范围内, 清除作用增加不明显, 清除率阈值分别为 92.7% (维生素 C) 和 72.7% (*Desmodium* sp. QL96 抗氧化蛋白) (图 2B)。*Desmodium* sp. QL96 抗氧化蛋白浓度超过 0.6 mg/mL 时, 其对 DPPH 的清除率均值有微小下降, 但下降不显著( $P>0.05$ )。

相较于维生素 C, *Desmodium* sp. QL96 抗氧化蛋白对 ABTS 自由基的清除作用很小 ( $P<0.05$ )。蛋白浓度在 0–8.0 mg/mL 的范围内增加时, 其清除作用保持缓慢上升, 之后清除作用不再增加, 清除率阈值 33.9% (图 2C)。

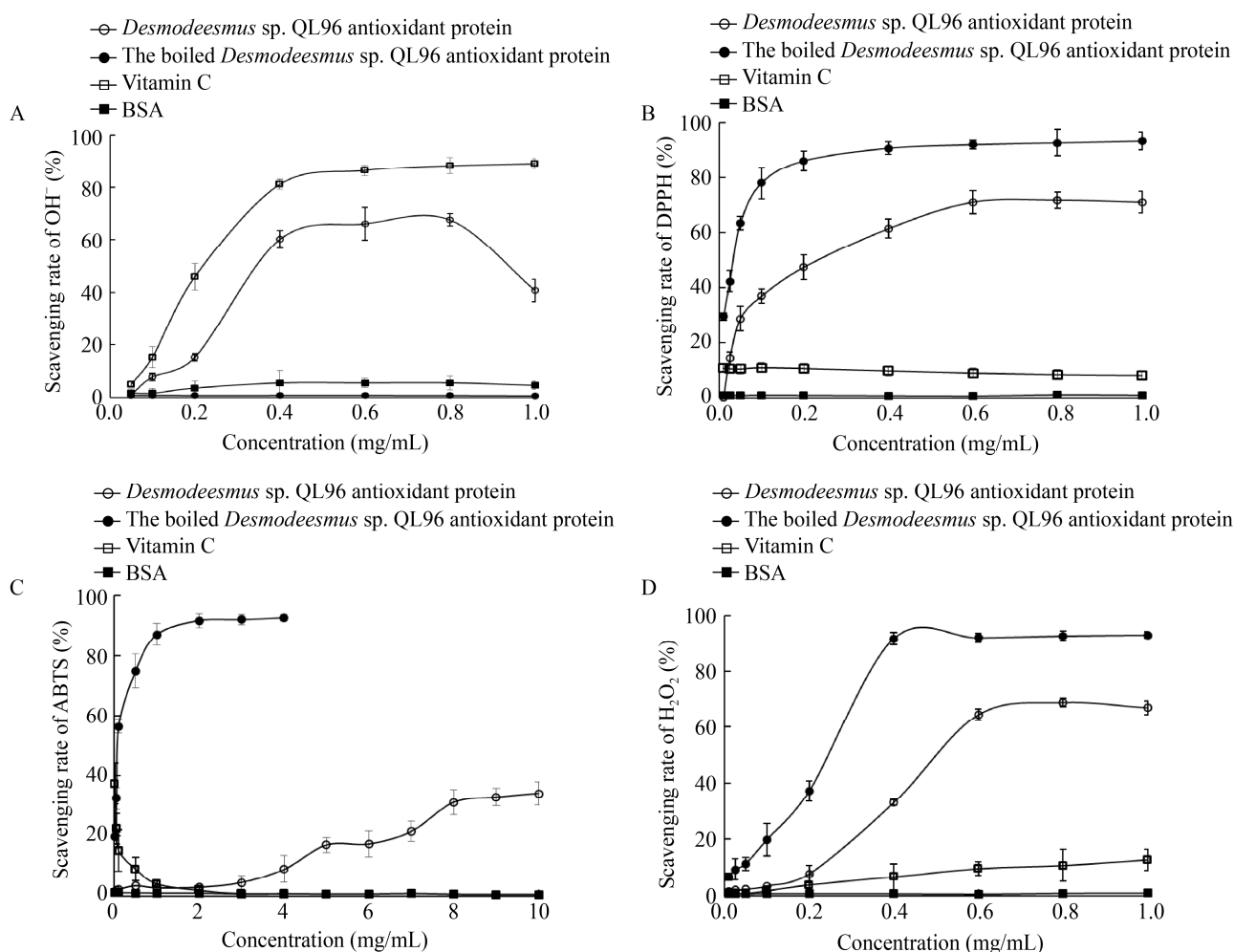


图 2 *Desmodium* sp. QL96 抗氧化蛋白对  $\text{OH}^-$ 、DPPH、ABTS、 $\text{H}_2\text{O}_2$  自由基的清除效果

Figure 2  $\text{OH}^-$ , DPPH, ABTS and  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging activity of *Desmodium* sp. QL96 antioxidant protein

注: 图 A、B、C、D 分别表示 *Desmodium* sp. QL96 抗氧化蛋白对  $\text{OH}^-$ 、DPPH、ABTS、 $\text{H}_2\text{O}_2$  自由基的清除效果

Note: The figures of A, B, C, D showed the scavenging activity of *Desmodium* sp. QL96 antioxidant protein to  $\text{OH}^-$ , DPPH, ABTS,  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectively

*Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白对过氧化氢具有直接清除作用, 从而抑制其对细胞的氧化作用。*Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白浓度低于 0.2 mg/mL 时其清除作用不明显; 在 0.2–0.6 mg/mL 的范围内, 其清除作用随蛋白浓度增加快速上升, 最大清除率 64.5%; 之后清除作用不再增加 (蛋白浓度 0.6–1.0 mg/mL) (图 2D)。

### 2.3 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白对细胞氧化损伤的保护作用

与对照组比较,  $H_2O_2$  处理使细胞存活率显著下降到 54.06%。经过 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白预处理后, 细胞平均存活率提高到 79.31% ( $P<0.05$ ), 表明 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白能够抑制  $H_2O_2$  诱导的细胞氧化损伤, 但其平均抑制效果不及公认的抗氧化剂维生素 C (细胞活力提高到 87.75%)。结果见图 3。

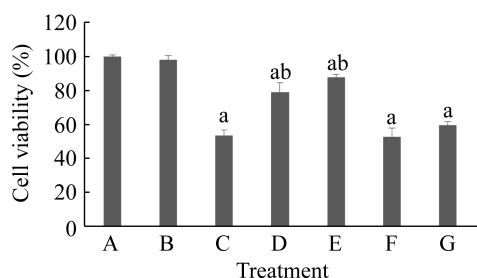


图 3 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白对  $H_2O_2$  诱导的 HepG2 细胞存活率下降的抑制作用

Figure 3 The prevention of decrease in cell viability induced by  $H_2O_2$  by microalgae *Desmodesmus* sp. QL96 antioxidant protein

注: A: 未处理, 对照组; B: *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白处理 (0.5 mg/mL); C:  $H_2O_2$  处理 (50  $\mu$ mol/L); D: *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白+ $H_2O_2$  处理; E: 维生素 C (0.5 mg/mL)+ $H_2O_2$  处理; F: 经热处理的 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白 (0.5 mg/mL)+ $H_2O_2$  处理; G: BSA (0.5 mg/mL)+ $H_2O_2$  处理。a: 与处理 A 差异显著性分析结果 ( $P<0.05$ ); b: 与处理 C 差异显著性分析结果

Note: A: Control, no treatment applied; B: Cells treated by *Desmodesmus* sp. QL96 antioxidant protein (0.5 mg/mL); C: Cells treated by  $H_2O_2$ ; D: Cells treated by *Desmodesmus* sp. QL96 antioxidant protein prior to  $H_2O_2$ ; E: Cells treated by vitamin C (0.5 mg/mL) prior to  $H_2O_2$ ; F: Cells treated by boiled *Desmodesmus* sp. QL96 antioxidant protein (0.5 mg/mL) prior to  $H_2O_2$ ; G: Cells treated by BSA (0.5 mg/mL) prior to  $H_2O_2$ . The letters of a and b represent the significant differences from treatment A and treatment C respectively ( $P<0.05$ )

### 2.4 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白处理对细胞 MDA 水平和 SOD、CAT 活力的影响

氧化胁迫促使脂质过氧化, 产生细胞毒性物质丙二醛(MDA), 其可破坏细胞膜完整性, 间接引起内源性抗氧化酶 SOD 和 CAT 失活。MDA、SOD、CAT 可指示出体内氧自由基代谢情况及细胞受自由基攻击的程度, 其水平可反映出组织或细胞受氧化损伤的程度<sup>[21-22]</sup>。与对照组对比,  $H_2O_2$  处理使细胞的 MDA 含量显著增加, 而 SOD 和 CAT 活力显著下降。*Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白预处理, 抑制了  $H_2O_2$  诱导的 MDA 水平增加和 SOD、CAT 活力下降, 但平均抑制效果不及维生素 C, 高温处理可以完全抑制 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白对 MDA、SOD 和 CAT 水平的影响 (表 1)。

### 2.5 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白的结构

质谱分析显示, *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白由 408 个氨基酸按一定序列组成, ExPasy 在线程序 (<https://web.expasy.org/blast/>) 分析显示, 该蛋白质的理论分子量为 44.8 kD, pI 5.79。生物信息学分析显示, 该蛋白与克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*) 谷胱甘肽过氧化物酶 (Uniprot ID: O96763; PDB Entry: d1uula\_) 具有同源性, 其中 59% 的氨基酸序列完全一致 (193 个氨基酸, 置信度 100%) (图 4)。

## 3 讨论与结论

青藏高原的典型气候特点是紫外辐射强、氧分压低、年均气温低, 在此环境中生长的生物形成了多途径的抗氧化抗寒生理反应和低氧适应方式, 在抗性物质代谢、膜脂过氧化能力和抗氧化酶系统等方面展现了与平原生物不同的特性<sup>[23]</sup>。有研究表明, 随着海拔的升高, 青藏高原上动植物产品的抗氧化能力也呈增长趋势, 例如海拔从 3 016 m 上升到 4 621 m, 山生柳的 DPPH 清除能力从 16 029  $\mu$ mol/L 增长到 29 914  $\mu$ mol/L, 而 ABTS 的清除率从 367 542  $\mu$ mol/L 增长到

表 1 *Desmodemus* sp. QL96 抗氧化蛋白处理对 HepG2 细胞 MDA 水平和 SOD、CAT 活力的影响  
Table 1 Effect of the *Desmodemus* sp. QL96 antioxidant protein on the levels of MDA, SOD and CAT in HepG2 cells

组别 Groups	SOD 活力 Activity of SOD (U/mg-protein)	MDA 含量 Content of MDA (nmol/mg-protein)	CAT 活力 Activity of CAT (U/mg-protein)
未处理组 No treatment	21.01±0.32	0.35±0.08	5.21±0.18
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treatment	12.78±0.22a	0.66±0.12a	3.31±0.43a
抗氧化蛋白+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Antioxidant protein+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	17.36±0.25ab	0.51±0.18ab	4.69±0.22ab
阳性对照+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Positive control+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20.65±0.15b	0.36±0.06b	5.13±0.20b
阴性对照 I+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Negative control I+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13.27±0.71a	0.63±0.29a	3.44±0.11a
阴性对照 II+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Negative control II+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12.29±0.52a	0.67±0.30a	3.22±0.27a

注：a：与未处理组比较  $P<0.05$ ；b：与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较  $P<0.05$ 。阳性对照为维生素 C，阴性对照 I 和 II 分别为 BSA 和经热处理的抗氧化蛋白，各对照的终浓度均为 0.5 mg/mL

Note: a: Significant difference compared to no treatment group  $P<0.05$ ; b: Significant difference compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Vitamin C was used as a positive control; BSA and the boiled *Desmodemus* sp. QL96 antioxidant protein were used as negative controls; The working concentration of all the controls in cell cultures was 0.5 mg/mL

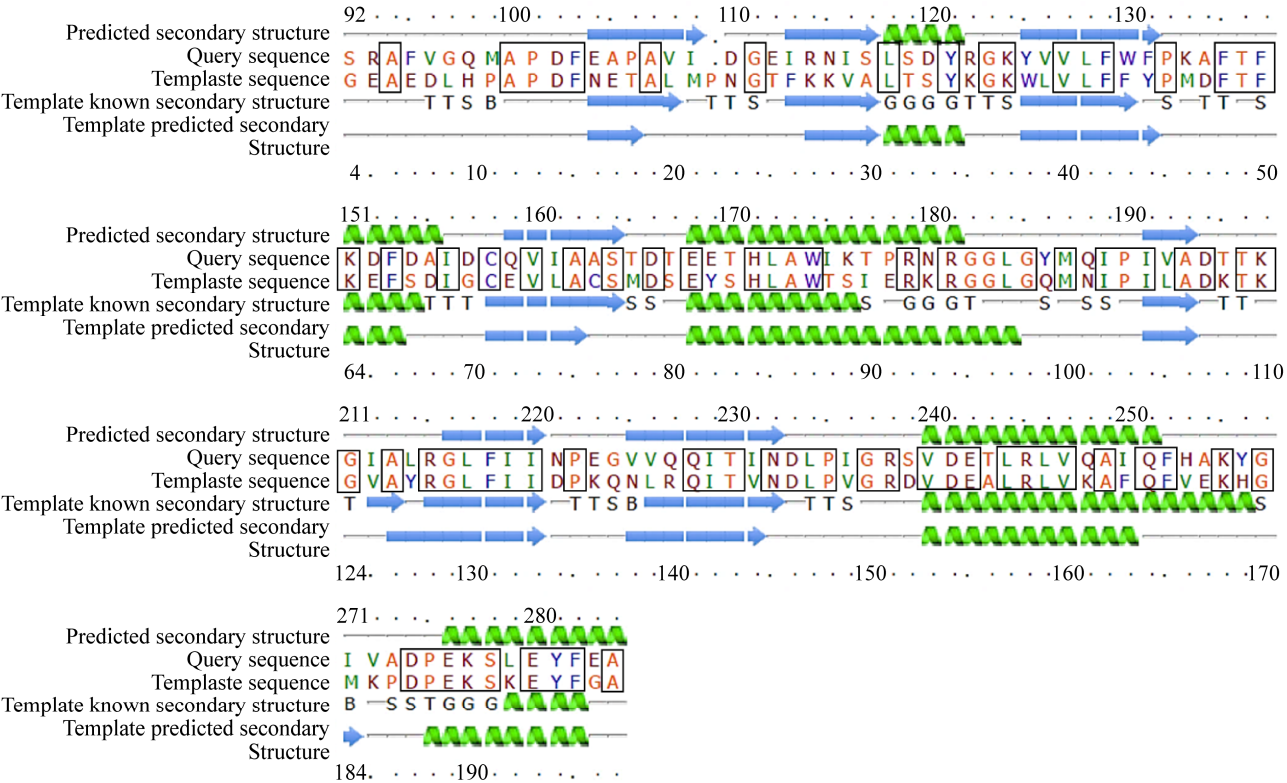


图 4 *Desmodemus* sp. QL96 抗氧化蛋白的结构分析  
Figure 4 The structure of *Desmodemus* sp. QL96 antioxidant protein

注：顶部数值代表序列所在位置；模板蛋白为其同源蛋白 d1uula<sub>1</sub>；绿色螺旋结构代表  $\alpha$  螺旋，蓝色箭头代表  $\beta$  转角，灰色细线代表无规则卷曲；在模板蛋白已知二级结构中，G 代表螺旋-转角-螺旋结构(3<sub>10</sub> Helix)，T 代表氢键转向，B 代表分离的  $\beta$ -桥中的残基，S 代表弯曲；方框中的氨基酸序列一致

Note: The position in the sequence is indicated in the top line; The template is the homolog d1uula<sub>1</sub>; Green helices represent  $\alpha$ -helices; Blue arrows indicate  $\beta$ -strands and faint lines indicate coil; In the “Template known secondary structure” section, G=3-turn helix (3<sub>10</sub> helix), T=hydrogen bonded turn, B=residue in isolated  $\beta$ -bridge, S=bend; Identical residues in the alignment are highlighted with dark frame

401 760  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[24]</sup>。 *Desmodesmus* sp. QL96 从我国西藏那曲地区巴木错湖分离得到, 当地海拔 4 555 m, 我们在前期研究中发现这种链带藻的蛋白粗提物具有抗氧化活性<sup>[9]</sup>, 本文对这种抗氧化蛋白进行了分离提纯和结构鉴定研究。

*Desmodesmus* sp. QL96 蛋白粗提物经过 DEAE-Sephrose FF 离子交换层析分离, 收集具有抗氧化活性的组分, 调整离子交换洗脱液的 pH 为 6.0, 同时增大洗脱液中盐浓度并降低洗脱流速, 抗氧化蛋白最终得到较好的分离, 在电泳凝胶上显示单独条带, 分子量约为 50 kD。结构鉴定显示, 这种抗氧化蛋白由 408 个氨基酸组成, 理论分子量为 44.8 kD, 与电泳分析结果一致, pI 为 5.79, 反向说明了离子交换洗脱液 pH 为 6.0 时洗脱效果最好的缘由。生物信息学分析显示, 这种抗氧化蛋白的结构主要呈  $\alpha$  螺旋或  $\beta$  转角状, 部分肽键呈无规则卷曲状。

纯化的 *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白在一定的浓度范围内(0–0.8 mg/mL)对  $\text{OH}^-$ 、DPPH、ABTS 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  具有清除作用, 但清除效果不及维生素 C, 说明这种蛋白具有低于维生素 C 的抗氧化活性。 *Desmodesmus* sp. QL96 蛋白的抗氧化活性与样品浓度具有量效关系, 其模式与牛血清蛋白 BSA 不同。BSA 的抗氧化活性有赖于其结构中半胱氨酸所含的二硫键<sup>[25]</sup>, 而 *Desmodesmus* sp. QL96 蛋白结构中不含半胱氨酸, 其氧化还原的机理不同。细胞学实验也发现, *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HepG2 细胞氧化损伤具有保护作用, 其保护效果不及维生素 C, 热处理可使该蛋白完全失去抗氧化活性和对氧化损伤的保护作用。

当蛋白浓度超过 0.8 mg/mL 时, *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白对  $\text{OH}^-$  自由基的清除作用开始下降, 这种抗氧化剂在高剂量时表现出的促氧化作用或抗氧化能力下降的现象, 在维生素 C、黄酮等常见的抗氧化剂中也存在。例如, 临床研

究发现, 给一个健康人员每日静脉注射螯合维生素 C 超过 5 g, 可在机体内产生促氧化效应, 造成 DNA 氧化损伤<sup>[26]</sup>。黄酮是一种源于天然产物的抗氧化剂, 其中槲皮素在植物界广泛分布, 其对自由基有很强的清除作用, 可防止机体脂质过氧化反应, 动物实验显示具有抗衰老、保护心血管健康的功效, 然而细胞学实验显示, 当环境中槲皮素浓度超过 300  $\mu\text{mol/L}$  时细胞内活性氧水平升高, 产生细胞毒性<sup>[27]</sup>。虽然已有一些研究报道了抗氧化剂在高剂量使用时会产生促氧化效应, 造成机体损伤, 但其中的机理还未知, 多数研究仍集中在抗氧化剂对机体有益的方面。针对抗氧化效应到促氧化效应的转化, 人们还需深入研究, 保障抗氧化类药物的安全使用<sup>[28]</sup>。

本研究从高原 *Desmodesmus* sp. QL96 的细胞中提取纯化了具有抗氧化活性的蛋白, 检测了这种蛋白对各种自由基的清除能力, 并通过细胞学实验验证了其对细胞氧化损伤的保护作用, 最后对蛋白的氨基酸序列进行了检测分析, 并通过计算机模拟预测了其高级结构。生物信息学分析显示, *Desmodesmus* sp. QL96 抗氧化蛋白与目前已知的其他物种蛋白的相似性最高为 59%, 后续研究将对其抗氧化蛋白的转录本进行挖掘, 分析其是否是一种新的功能蛋白, 并探讨规模化制备的前景。

## REFERENCES

- [1] Hughes RN, Hughes DJ, Smith IP. Oceanography and Marine Biology[M]. Boca Raton: CRC Press, 2016: 55-94
- [2] Bux F. Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value Added Products[M]. Boca Raton: CRC Press, 2013: 12-40
- [3] Miao JL, Shi HQ, Jiang YH, Zhang BT, Hou XG. Studies on biochemical composition of antarctic ice-microalgae and its relation to the cold acclimation[J]. Advances in Marine Science, 2002, 20(4): 43-50 (in Chinese)  
缪锦来, 石红旗, 姜英辉, 张波涛, 侯旭光. 南极冰藻生化组成及其与低温适应性关系的研究[J]. 海洋科学进展, 2002, 20(4): 43-50
- [4] Yu JH, Wang Y, Peng ZY, Bian F, Jia WB, Liu YY, Shi S,

- Ding HF, Bi YP. Effects of docosahexaenoic acid from *Schizochytrium* sp. on high fat diet induced obesity in mice[J]. Microbiology China, 2017, 44(11): 2679-2688 (in Chinese)
- 于金慧, 王瑜, 彭振英, 边斐, 贾文斌, 刘园园, 石帅, 丁汉凤, 毕玉平. 裂殖壶藻藻油 DHA 对高脂饮食诱导肥胖小鼠的影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2679-2688
- [5] Ho SH, Chang JS, Lai YY, Chen CNN. Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions[J]. Bioresource Technology, 2014, 156: 108-116
- [6] Barkia I, Saari N, Manning SR. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition[J]. Marine Drugs, 2019, 17(5): 304
- [7] Messmer MN, Snyder AG, Oberst A. Comparing the effects of different cell death programs in tumor progression and immunotherapy[J]. Cell Death and Differentiation, 2019, 26(1): 115-129
- [8] Zhao BB, Zhang FY, Chen Y, Wang JQ. Extraction by four steps' salting-out and stability of phycocyanin from fresh blue alage in Lake Chaohu[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(5): 2302-2308 (in Chinese)
- 赵冰冰, 张发宇, 陈裕, 汪家权. 四步盐析提取巢湖新鲜蓝藻中藻蓝蛋白及其稳定性[J]. 环境工程学报, 2016, 10(5): 2302-2308
- [9] Li GL, Wei XY, Zhou W, Li JH, Han ZP. Comparative on the metabolites of two high protein-producing microalgae[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(4): 781-786 (in Chinese)
- 李贵丽, 魏晓奕, 周伟, 李积华, 韩志萍. 2 株高产蛋白微藻细胞代谢物的比较[J]. 热带作物学报, 2019, 40(4): 781-786
- [10] Chu D, Deji YZ, Pubu CR, Bian D, Li C. The response of typical vegetation growth to climate conditions in North Tibetan Plateau[J]. Journal of Applied Meteorological Science, 2007, 18(6): 832-839 (in Chinese)
- 除多, 德吉央宗, 普布次仁, 边多, 李春. 西藏藏北高原典型植被生长对气候要素变化的响应[J]. 应用气象学报, 2007, 18(6): 832-839
- [11] Su KY, Tang YW, Yuan Y, Qu N, Ni L, Bao B, Wang G, Wu WH. Analysis of protein and trace components of *Nostoc globosa* in Qinghai Tibet Plateau[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2015, 42(6): 328-333 (in Chinese)
- 苏开燕, 汤玥雯, 袁易, 曲宁, 倪玲, 包斌, 王格, 吴文惠. 青藏高原拟球状念珠藻蛋白质和微量成分分析[J]. 水产科技情报, 2015, 42(6): 328-333
- [12] Li GL. Cultivation of *Desmodesmus* sp. QL96 and characterization of intracellular proteins[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- 李贵丽. 链带藻 *Desmodesmus* sp. QL96 的优化培养及其蛋白质特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2019
- [13] Kandola K, Bowman A, Birch-Machin MA. Oxidative stress: a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2015, 37(Suppl2): 1-8
- [14] Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells[J]. Cell Death and Differentiation, 2008, 15(1): 171-182
- [15] Wang XQ, Zhang XW. Separation, antitumor activities, and encapsulation of polypeptide from *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Biotechnology Progress, 2013, 29(3): 681-687
- [16] Samarakoon KW, O-Nam K, Ko JY, Lee JH, Kang MC, Kim D, Lee JB, Lee JS, Jeon YJ. Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(5): 1595-1606
- [17] Sun A, Hasan MT, Hobba G, Nevalainen H, Te'o J. Comparative assessment of the *Euglena gracilis* var. *saccharophila* variant strain as a producer of the  $\beta$ -1,3-glucan paramylon under varying light conditions[J]. Journal of Phycology, 2018, 54(4): 529-538
- [18] Nna VU, Abu Bakar AB, Md Lazin MRML, Mohamed M. Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin induced diabetic rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 120: 305-320
- [19] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. Nature Protocols, 2015, 10(6): 845-858
- [20] Salehi B, Martorell M, Arbiser JL, Sureda A, Martins N, Maurya PK, Sharifi-Rad M, Kumar P, Sharifi-Rad J. Antioxidants: positive or negative actors?[J]. Biomolecules, 2018, 8(4): 124
- [21] El-Aal HAHMA. Lipid peroxidation end-products as a key of oxidative stress: effect of antioxidant on their production and transfer of free radicals[A]/Catala A. Lipid Peroxidation[C]. Croatia: In Tech Press, 2012: 63-89
- [22] Zhu YZ, Huang SH, Tan BKH, Shun J, Whiteman M, Zhu YC. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a

- biochemical perspective[J]. *Natural Product Reports*, 2004, 21(4): 478-489
- [23] Han F, Yue XG, Shi SB, Wu B, Li YK. Physiological characteristics in cold resistance of several alpine plants in Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2005, 25(12): 2502-2509 (in Chinese)  
韩发, 岳向国, 师生波, 吴兵, 李以康. 青藏高原几种高寒植物的抗寒生理特性[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(12): 2502-2509
- [24] Cui GX. Antioxidant property of alpine plants and yak milk on Qinghai-Tibetan Plateau[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou University, 2016 (in Chinese)  
崔光欣. 青藏高原高寒植物及牦牛奶抗氧化特性研究[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2016
- [25] Lackmann JW, Baldus S, Steinborn E, Edengeiser F, Kogelheide S, Langklotz S, Schneider L, Leichert LIO, Benedikt J, Awakowicz P, et al. A dielectric barrier discharge terminally inactivates RNase A by oxidizing sulfur-containing amino acids and breaking structural disulfide bonds[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2015, 48(49): 494003
- [26] Hininger I, Waters R, Osman M, Garrel C, Fernholz K, Roussel AM, Anderson RA. Acute prooxidant effects of vitamin C in EDTA chelation therapy and long-term antioxidant benefits of therapy[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 38(12): 1565-1570
- [27] Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics[J]. *Toxicology*, 2002, 177(1): 91-104
- [28] Fan XY, Zhang QQ, Li C, Wang AP, Jin HT. The transformation from anti-oxidant to oxidant[J]. *Food and Drug*, 2016, 18(5): 364-369 (in Chinese)  
范潇予, 张倩倩, 李超, 王爱平, 靳洪涛. 抗氧化剂抗氧化活性到促氧化作用的转变[J]. *食品与药品*, 2016, 18(5): 364-369