

马氏珠母贝黏液糖蛋白分离纯化及其抗氧化活性研究

余 蔚¹, 欧阳彤¹, 罗碧琦¹, 伍 彬¹, 郑惠娜^{1,2,3}, 曹文红^{1,2,3},
林海生^{1,2,3}, 章超桦^{1,2,3}, 秦小明^{1,2,3}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学深圳研究院, 广东 深圳 518108; 3. 国家贝类加工技术研发分中心(湛江)/广东省水产品加工与安全重点实验室/广东省海洋生物制品工程实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 该研究采用直接醇沉法、盐提醇沉法和水提醇沉法提取马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 黏液中的糖蛋白, 优选直接醇沉法粗品 (DAS), 进一步采用 Sephacryl S-200 纯化获得直接醇沉纯品 (DAPS), 同时测定 DAS 及 DAPS 的体外抗氧化活性。结果显示, DAS 的糖和蛋白质得率均最高, 且 3 种方法提取的糖蛋白粗品蛋白质组成无明显差异; DAPS 的总糖和蛋白质质量分数分别为 (22.72±0.26)% 和 (71.18±0.62)%, 分子量主要集中在 245 kD; DAS 和 DAPS 对羟自由基的清除能力显著, 在 0.8 mg·mL⁻¹ 下两者对羟自由基的清除率均高于 90%, 对超氧阴离子自由基及 DPPH 自由基也有一定清除能力。研究结果可为探索马氏珠母贝黏液功效组分提供理论基础数据。

关键词: 马氏珠母贝黏液; 糖蛋白; 抗氧化活性

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on extraction and purification of glycoprotein from *Pinctada martensii*' mucus and its antioxidant activity

YU Wei¹, OUYANG Tong¹, LUO Biqi¹, WU Bin¹, ZHENG Huina^{1,2,3}, CAO Wenhong^{1,2,3},
LIN Haisheng^{1,2,3}, ZHANG Chaohua^{1,2,3}, QIN Xiaoming^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen 518108, China; 3. National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang)/Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety/Guangdong Province Engineering Laboratory for Marine Biological Products, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In this study, we used direct alcohol precipitation, salt extraction and alcohol precipitation, water extraction and alcohol precipitation to extract the glycoprotein from *Pinctada martensii*' mucus, and the direct alcohol precipitation sample (DAS) was preferred. We obtained the direct alcohol precipitation and purification sample (DAPS) by Sephacryl S-200 and determined antioxidant activity of DAS and DAPS *in vitro*. The results show that DAS had the highest yields of sugar and protein, and there is no significant difference in the protein composition of the crude glycoproteins extracted by the three methods. The total sugar and protein contents of DAPS were (22.72±0.26)% and (71.18±0.62)%, respectively, and the molecular weight was mainly 245 kD. Both DAS and DAPS had certain antioxidant activity. The scavenging abilities of DAS and DAPS to hydroxyl radical were significant, and their scaven-

收稿日期: 2020-02-19; 修回日期: 2019-04-10

资助项目: 广东省自然科学基金项目 (2016A030313810); 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目 (2019KJ146); 广东省科技计划项目 (2013B020312006); 国家贝类产业技术体系项目 (CARS-49); 广东海洋大学大学生创新创业训练计划项目 (CXXL2019155)

作者简介: 余 蔚 (1998—), 女, 本科生, 研究方向为食品科学与工程。E-mail: 1283168739@qq.com

通信作者: 郑惠娜 (1979—), 女, 博士, 副教授, 从事海洋生物资源高值化利用研究。E-mail: zhenghn@gdou.edu.cn

ging rates to hydroxyl radical were higher than 90% at 0.8 mg·mL⁻¹. Both had scavenging activity to superoxide anion free radical and DPPH free radical. The results provide theoretical basis data for exploring the active components of *P. martensii*' mucus.

Key words: *Pinctada martensii*' mucus; Glycoprotein; Antioxidant activity

马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 又称合浦珠母贝, 是我国南方海水珍珠养殖的主要品种。珍珠自古以来就记载有美容、抗衰老、抗氧化等功效。目前, 已有相关以马氏珠母贝肉为基料提取各种功效(如抗氧化、提高免疫力、抗炎等)组分的研究^[1-4]; 而有关珠母贝黏液中活性功效物质的研究尚未见报道。珠母贝黏液是马氏珠母贝在珍珠形成过程中其外套膜不断分泌的液体, 黏度较高, 该黏液促使珍珠质形成, 存在于软体和贝壳之间^[5]。因此, 基于黏液与珍珠形成的密切关系, 探索黏液中可能存在的一些功能物质将极大促进资源的充分利用。水产动物体表黏液的物质构成及生化功能最早在鱼类中有报道, 主要含有黏多糖、糖蛋白、水解性酶类, 而双壳类的体表黏液细胞的类型与分布与鱼类较为相似^[5]。珠母贝黏液是其产出优质珍珠的关键, 其中糖蛋白可能起到重要作用^[5]。

糖蛋白是由糖类和蛋白质或多肽以共价键连接构成的化学物质, 动植物、微生物和病毒均含有糖蛋白^[6-8]。糖蛋白是一类重要的具有生物活性的物质, 郁迪等^[9]研究发现菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 糖蛋白质量浓度达 30 mg·mL⁻¹ 时癌细胞抑制率高达 72.49%, 具有一定的抗肿瘤作用; 陈淑敏等^[10]提取出的曼氏无针乌贼 (*Sepiella japonica*) 缠卵腺抗菌糖蛋白对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 及金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 具有显著抑菌效果; 糖蛋白还具有降血脂、降血糖、抗氧化、增强免疫调节等功能^[11-14]。因此, 本研究对马氏珠母贝黏液中的糖蛋白进行提取、分离纯化, 并对其抗氧化活性进行评价, 以期探索马氏珠母贝黏液相关功效物质提供理论基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料预处理: 将从雷州市珍珠贝养殖场购置的马氏珠母贝肉与其黏液进行分离过滤, 将黏液分装于 250 mL 塑料瓶中, -20 ℃ 冻藏备用。Sephacryl S-200 High Resolution (GE Healthcare Bio-Science); 2,2-联苯基-1-苦基肼基 (DPPH, 上海麦克林生化科技有限公司); 牛血清蛋白 (Bovine serum

albumin, BSA, GENVIEW); Folin-酚甲 I、Folin-酚 II、Folin-酚乙、预染蛋白 Marker (10~245 kD, 北京鼎国昌盛生物技术责任有限公司); 考马斯亮蓝染色液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)、电泳液 (Tris-Gly, Powder)、凝胶配制试剂盒、Protein Ladder (10~200 kD, 非预染), 碧云天生物技术; 无水乙醇、氯化钠 (NaCl)、抗坏血酸、30% 过氧化氢、冰醋酸、氢氧化钠、葡萄糖、苯酚、硫酸、盐酸 (HCl)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、硫酸亚铁 (七水)、水杨酸钠、焦性没食子酸均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

PS-40A 超声波清洗机 (济南鑫贝西生物技术有限公司); FDU-1100 真空冷冻干燥机 (东京理化器械株式会社); LD-50G-D 超纯水机 (重庆利迪实验仪器设备有限公司); CR22G II 高速冷冻离心机 (日立工机株式会社); BSA124S-CW 型电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); SHB-B95A 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); JIDI-20R 型台式高速冷冻离心机 (广州吉迪仪器有限公司); BS-100A 自动部分收集器、HL-2 型数字恒流泵 (上海青浦沪西仪器厂); JY5002 电子天平 (上海衡平仪器仪表厂); DK-98-II 型电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司); UV-2550 型紫外分光光度计 (日本岛津公司); DYY-8C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 珠母贝黏液糖蛋白的粗提 将黏液解冻后, 于 4 ℃ 下 6 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液。分别用直接醇沉法、盐提醇沉法、水提醇沉法得到 3 种黏液糖蛋白的粗品, 计算得率。公式为:

$$W = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中 W 表示糖蛋白粗品得率; m 表示糖蛋白粗品质量 (g); M 表示马氏珠母贝黏液冻干粉质量 (g)。

直接醇沉法粗品 (Direct alcohol precipitation sample, DAS) 提取^[15]: 取 200 mL 黏液加入 90% 乙醇至体积分数为 70%, 4 ℃ 静置 18 h, 于 4 ℃ 下 7 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取沉淀, 于空气中静置挥发乙醇后, 真空冷冻干燥 24 h 后得到 DAS。

盐提醇沉法粗品 (Salt extraction and alcohol precipitation sample, SAS) 提取^[16-18]: 取 200 mL 黏液加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液使质量体积比为 1:16, 于 4°C 下静置 12 h, 4°C , $7\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 取上清液, 加乙醇至 70%, 4°C 静置醇沉 12 h 后, 于 4°C 下 $7\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取沉淀冷冻干燥 24 h, 得到 SAS。

水提醇沉法粗品 (Water extraction and alcohol precipitation sample, WAS) 提取^[19]: 取 200 mL 黏液加水在质量体积比 1:20 下 50°C 水浴 6 h, 4°C 下 $7\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液加乙醇至 70%, 4°C 静置 18 h 后, 4°C 、 $7\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取沉淀, 冷冻干燥 24 h, 得到 WAS。

1.3.2 糖、蛋白质含量测定 总糖含量测定采用苯酚硫酸法, 参考张金豫等^[20]稍作修订, 分别取 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL 于试管中并用水补足 1 mL, 各加入 6% 苯酚 1 mL, 再加入 5 mL 浓硫酸 (H_2SO_4) 后迅速摇匀, 静置 10 min 后, 沸水浴 15 min 取出, 冷水浴 30 min, 于 490 nm 处测定吸光值, 以葡萄糖质量 (mg) 为横坐标, 吸光度 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线。测得该标准曲线方程为 $y=10.057x+0.0985$, $R^2=0.9983$ 。取 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的粗品样品 1.0 mL 于试管中, 参照以上步骤测定样品吸光度。取 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的纯化品样品 1.0 mL 于试管中, 参照以上步骤测定吸光度。可溶性蛋白质含量测定采用 Folin-酚法^[21], 于试管中分别加入 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BSA, 加蒸馏水至 1 mL, 加入 5 mL 试剂甲, 混匀, 室温静置 10 min, 加入 0.5 mL 的试剂乙后立即摇匀, 室温放置 30 min, 于 500 nm 处比色测定吸光度, 以 BSA 质量 (mg) 为横坐标, A 为纵坐标, 绘制标准曲线。测得该标准曲线方程为 $y=1.5698x+0.0628$, $R^2=0.9988$ 。取 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 粗品样品 1.0 mL 于试管中, 按以上方法测定样品吸光度。取 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纯化品样品 1.0 mL 于试管中, 按以上方法测定吸光度。

根据测定所得粗品的糖及蛋白质含量, 计算粗品的糖、蛋白质得率, 公式为:

$$w=\frac{m_1}{M} \times 100\% \quad (2)$$

式中 w 表示糖蛋白粗品的糖或蛋白质得率;

m_1 表示粗品的糖或蛋白质含量 (g); M 表示马氏珠母贝黏液冻干粉质量 (g)。

1.3.3 糖蛋白的分离纯化 选择最佳糖蛋白粗品提取方法后, 将该粗品溶于水, 于 4°C 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 Sephacryl S-200 柱层析法进行分离纯化。

调节上样样品的可溶性蛋白质质量浓度至 $3 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样体积为 4 mL, 填料柱高 70 cm (层析柱 $\phi 1.7 \times 80 \text{ cm}$), 流动相为 0.05% NaCl, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 每 5 mL 收集 1 管, 于 280 nm 波长下测吸光值, 同时采用苯酚硫酸法于 490 nm 下测吸光值, 做出洗脱曲线, 收集所需组分, 冷冻干燥 24 h, 得到直接醇沉纯化品 (Direct alcohol precipitation and purification sample, DAPS)^[22]。

1.3.4 SDS-PAGE 电泳 粗品的电泳: 将 DAS、SAS、WAS 同时进行 SDS-PAGE 电泳, 配制样品质量浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样体积为 10 μL , Maker 体积为 7 μL , 12% 分离胶, 5% 浓缩胶。起始电压为 80 V, 进入分离胶后电压为 120 V^[23]。电泳结束后采用考马斯亮蓝染色液染色 1 h, 10% 冰醋酸脱色液脱色 2 h 后, 结果拍照分析。

纯化品的电泳: 调整样品质量浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样体积为 8 μL , Maker 体积为 8 μL , 10% 分离胶, 5% 浓缩胶。参照以上方法进行电泳。

1.3.5 抗氧化活性测定 分别配制质量浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 V_C (阳性对照)、最佳提取方法糖蛋白粗品、糖蛋白纯化品。

羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除能力测定: 参考黄来珍等^[17]的方法并进行一定改进, 于各试管中加入 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸亚铁 (FeSO_4) 溶液 1 mL 及 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水杨酸钠溶液 1 mL, 再加入 2 mL 的样液, 混匀, 加入 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢 (H_2O_2) 溶液 1 mL 启动反应, 于 37°C 下水浴 1 h, 于 510 nm 处测得吸光度 A_{i1} ; 蒸馏水代替 H_2O_2 测得 A_{j1} ; 蒸馏水代替样液测得 A_{01} , 计算自由基清除率公式为:

$$\cdot\text{OH清除率} = \frac{[A_{01} - (A_{i1} - A_{j1})]}{A_{01}} \times 100\% \quad (3)$$

超氧阴离子自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$) 清除能力测定: 采用邻苯三酚法, 参考张金豫等^[20]及常飞等^[24]的方法并略修改, 于各试管中加入 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 (25°C 预热) 4.5 mL, 再加入 1 mL 的样液及 $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚溶液 (25°C 预热, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 配制) 0.5 mL, 混匀, 25°C 静置 6 min 后, 加

入 2~3 滴 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 终止反应, 于 320 nm 处测得吸光度 A_{i2} ; 蒸馏水代替邻苯三酚测得 A_{j2} ; 蒸馏水代替样液测得 A_{02} 。计算清除能力公式为:

$$\cdot\text{O}_2\text{清除率} = \frac{[A_{02} - (A_{i2} - A_{j2})]}{A_{02}} \times 100\% \quad (4)$$

DPPH 自由基清除能力测定: 参考 Noumi 等^[25]的方法。于各试管中加入 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 乙醇溶液 2 mL, 再加入 2 mL 样液, 混匀后放置黑暗处 30 min, 于 517 nm 处测得吸光度 A_{i3} ; 蒸馏水代替 DPPH 测得 A_{j3} ; 蒸馏水代替样品测得 A_{03} 。测定清除能力的公式为:

$$\text{DPPH清除率} = \frac{[A_{03} - (A_{i3} - A_{j3})]}{A_{03}} \times 100\% \quad (5)$$

1.3.6 实验数据分析 上述每个样品进行 3 次平行实验 ($n=3$), 实验数据采用 Excel 2010 软件做图分析, 采用 SPSS Statistics 19.0 软件进行 One-Way ANOVA 显著性差异分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 3 种不同糖蛋白粗提方法比较

从总得率、蛋白质及糖得率比较 3 种方法的提取效果, 结果见图 1。DAS 的总得率为 $(24.59 \pm 0.78)\%$, 远高于 SAS $[(6.19 \pm 0.81)\%]$ 及 WAS $[(1.68 \pm 0.55)\%]$ ($P<0.05$); 测得 WAS 中可溶性蛋白质含量 $(79.03 \pm 0.61)\%$ 远高于 SAS $[(42.82 \pm 1.00)\%]$ 及 DAS

$[(25.46 \pm 0.79)\%]$ ($P<0.05$); DAS、SAS、WAS 的糖质量分数分别为 $(3.67 \pm 0.16)\%$ 、 $(4.40 \pm 0.58)\%$ 、 $(4.00 \pm 0.51)\%$, 无显著性差异 ($P>0.05$)。

直接醇沉法中, 糖蛋白未经过盐、水等的提取, 乙醇直接将糖蛋白连同非糖、非蛋白质成分一起沉淀下来从而使 DAS 总得率相对较高, 相同质量的黏液原料中可提取出的可溶性蛋白质及总糖的得率分别为 $(6.26 \pm 0.20)\%$ 和 $(0.90 \pm 0.04)\%$, 均远高于 WAS $[(1.33 \pm 0.01)\%$ 和 $(0.07 \pm 0.01)\%]$ 以及 SAS $[(2.65 \pm 0.07)\%$ 和 $(0.27 \pm 0.03)\%]$ ($P<0.05$)。水提醇沉法提取糖蛋白粗品的总得率远低于其他两种方法 ($P<0.05$)。由于水提可最大限度地溶出糖蛋白而不破坏其稳定性, 糖蛋白所含有的多糖具有亲水性使其易溶于水^[26], 但是由于除水溶性蛋白外还有盐溶性蛋白, 因此, WAS 蛋白质含量虽较高但总得率较低, 该结果与范秀萍等^[19]的研究结果一致。而盐提醇沉法中, 因 NaCl 具有的盐离子与蛋白质部分结合具有保护蛋白质使其不易变性的特点^[26], 使糖蛋白在稀盐溶液中溶解度相对较高, 优选适当 pH 及盐浓度条件可进一步提高盐提效果, 因此 SAS 总得率因此高于 WAS。与珍珠贝肌肉提取糖蛋白所采用的硫酸铵沉淀法^[3]相比较, 本研究的得率较低, 这可能与原料本身所含的糖蛋白浓度有关, 由于黏液本身为液体性状, 含水量较高, 因此相对提取率偏低。

综上, 相同质量黏液, DAS 的蛋白质、糖得率远高于 SAS 和 WAS ($P<0.05$), 提取效果较好。因此, 优选直接醇沉法进行糖蛋白粗提。

2.2 SDS-PAGE 电泳图谱分析

研究发现提取方式不同可能导致提取糖蛋白组成存在差异^[17]。李敏等^[15]发现不同方法提取黄芪糖蛋白的 SDS-PAGE 图谱存在明显的差异, 张洪梅等^[27]分析 SDS-PAGE 图谱发现不同方法提取的蝉花粗蛋白的蛋白种类差异显著。由图 2 结果可见 3 种糖蛋白粗品的图谱无明显差异。其中, WAS 在 15~20 kD、>70 kD 处均有较深条带, 其条带颜色在 <30 kD 的区域相对较深, 说明 WAS 蛋白质分子量相对较小的部分含量较高; SAS 的条带在 >30 kD 的区域较为明显, 说明 SAS 所提取出的蛋白质的分子量相对较大的部分含量较高; DAS 除在 15~20 kD 区间条带颜色相对较浅外, 其余区域的条带特征与 WAS 和 SAS 无明显差异。

综合分析图 1、图 2 的结果, 直接醇沉法可提

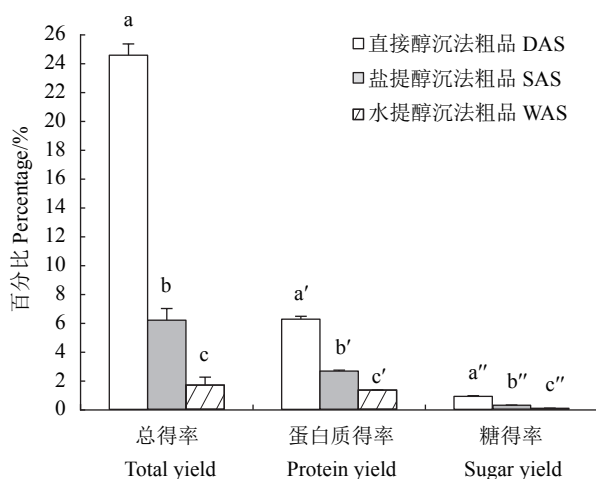


图1 3种糖蛋白粗品提取方法比较
同一指标中不同字母表示不同样品间的显著性差异 ($P<0.05$), 后图同此

Figure 1 Comparison of three crude glycoprotein extraction methods

Different letters indicate significant difference among different samples with the same indicators ($P<0.05$).

The same case in the following figures.

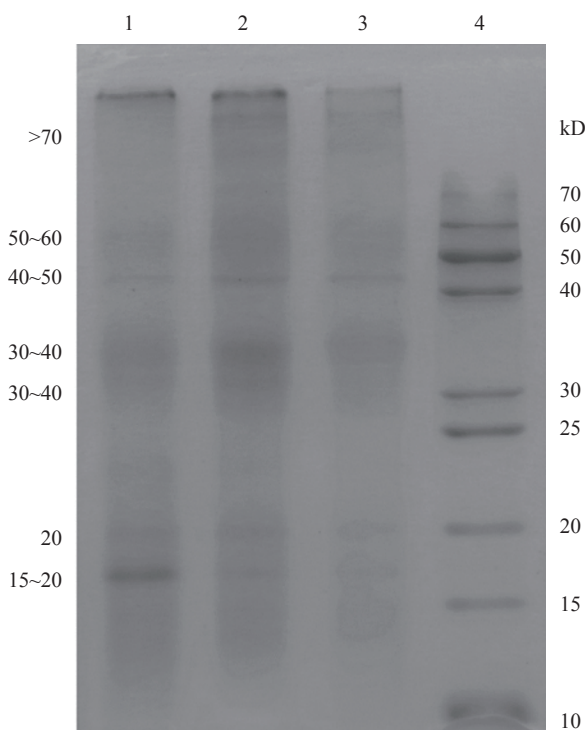


图2 3种糖蛋白粗品SDS-PAGE电泳图

1. 水提醇沉法粗品; 2. 盐提醇沉法粗品; 3. 直接醇沉法粗品; 4. 蛋白质分子量标准 (kD)

Figure 2 SDS-PAGE electrophoresis of three crude glycoproteins

1. WAS; 2. SAS; 3. DAS; 4. Protein marker

取出的糖及蛋白质含量最高, 且 DAS 蛋白质组成与 SAS、WAS 无明显差异, 其粗提效果相对较好, 选择 DAS 进行进一步分离纯化。

2.3 Sephacryl S-200 柱层析法纯化结果

DAS 经洗脱后, 在 280 nm 处蛋白质主要呈现 3 个峰 (图 3)。在 490 nm 处糖呈现的峰数较多。其中, 第一个主峰在 280 nm 及 490 nm 处均有最大吸光值, 且重合性好, 收集此主峰部分, 冷冻干燥后得到白色粉末 DAPS, 其溶解性好。测得 DAPS 的总糖质量分数为 $(22.72 \pm 0.26)\%$, 可溶性蛋白质质量分数为 $(71.18 \pm 0.62)\%$ 。图 3-b 结果显示 DAPS 分子量集中在 245 kD 处, 分子量较大。李雨哲等^[3]从马氏珠母贝肌肉中提取分离纯化的糖蛋白分子量为 11.2 kD, 两者差别较大, 说明珍珠贝黏液中的功效组分与肌肉功效成分本身仍存在明显差异, 对珍珠贝黏液作进一步的拓展研究非常必要。

2.4 抗氧化活性分析

2.4.1 $\cdot\text{OH}$ 清除能力 研究表明, $\cdot\text{OH}$ 不仅能与生物大分子产生反应引起细胞损伤, 还会促进活性氧的生成而引起组织的氧化损伤^[28]。图 4-a 结果显

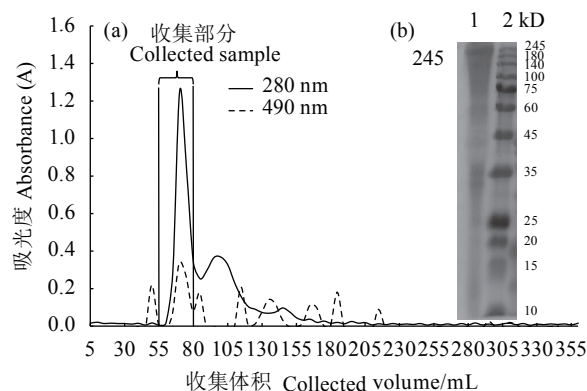


图3 DAS纯化结果

a. DAS 的 Sephacryl S-200 柱层析洗脱曲线; b. DAPS 的 SDS-PAGE 电泳图; 1. 直接醇沉纯化品; 2. 蛋白质分子量标准 (kD)

Figure 3 Purification results of DAS

a. Elution curve of Sephacryl S-200 column chromatography about DAS; b. SDS-PAGE electrophoresis of DAPS; 1. DAPS; 2. Protein marker

示, 在质量浓度介于 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, DAS 和 DAPS 清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力随着浓度的增大而显著提升 ($P < 0.05$)。在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度下, DAS 和 DAPS 的 $\cdot\text{OH}$ 清除率分别为 $(65.70 \pm 0.19)\%$ 和 $(66.34 \pm 0.90)\%$, 两者清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力显著优于同浓度的 V_C $[(46.88 \pm 1.13)\%]$ ($P < 0.05$)。在 $0.1 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, DAPS 清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力与 DAS 无显著性差异 ($P > 0.05$), 可能由于 DAS 中除含有 DAPS 外还含有其他清除 $\cdot\text{OH}$ 的物质, 如多糖、疏水性氨基酸等, 而多糖、氨基酸本身也具有较强抗氧化性^[29-30]。当 DAS 及 DAPS 的质量浓度达到 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 两者的 $\cdot\text{OH}$ 清除率均已高于 90%, 说明黏液中含有的糖蛋白具有很强的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。张金豫等^[20]研究大鲵 (*Andrias davidianus*) 黏液糖蛋白时发现, 其纯品质量浓度达到 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, $\cdot\text{OH}$ 清除率低于 50%。显然, 不同来源的糖蛋白对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力存在显著性差异。据报道, 多糖分子可通过与 $\cdot\text{OH}$ 结合形成稳定基团从而直接终止自由基链反应, 多糖的单糖组成、分子量、糖苷键及理化性质对其 $\cdot\text{OH}$ 清除活性有一定影响^[31], 糖蛋白对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的差异性可能与其糖链的多样性相关。

2.4.2 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除能力 氧源自由基介导的自由基氧化会对 DNA、脂质和蛋白质造成损伤, 并对细胞的防御系统产生危害, 活性氧与炎症、心血管疾病、阿尔茨海默症等多种常见疾病及退行性疾病相关, $\cdot\text{O}_2^-$ 便为活性氧之一^[31]。图 4-b 显示, 在 $0.1 \sim$

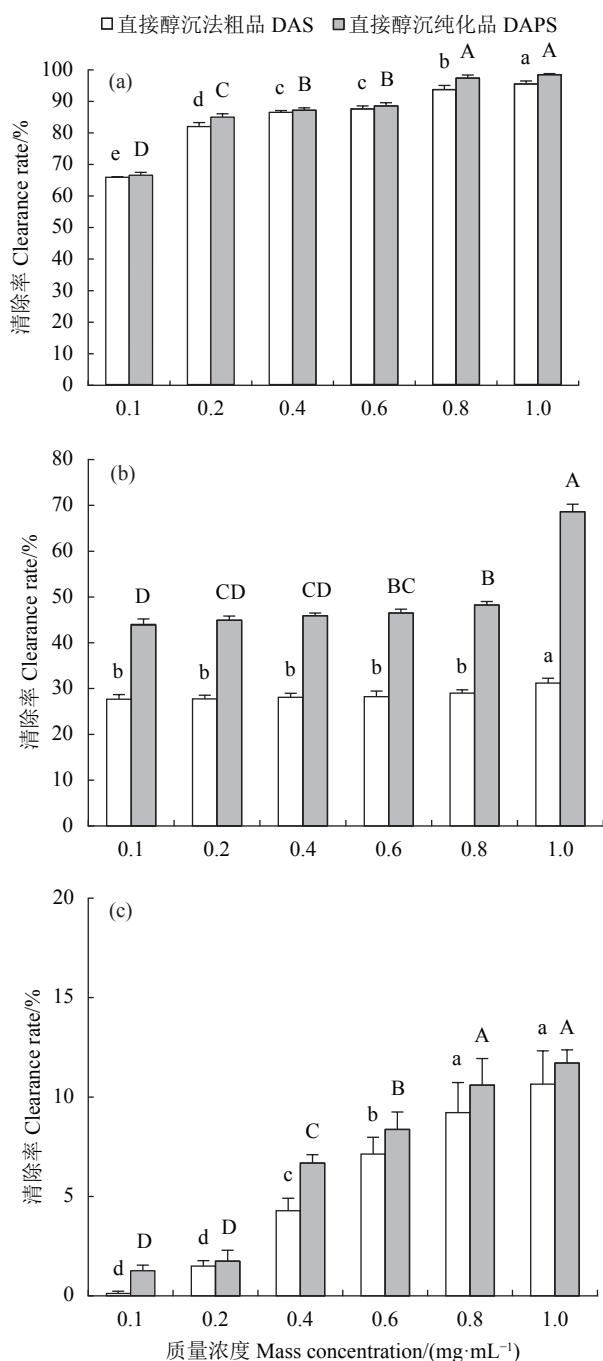


图4 羟自由基 (a)、超氧阴离子自由基 (b) 和DPPH自由基 (c) 清除能力

Figure 4 Scavenging activities of hydroxyl radical (a), superoxide anion free radical (b) and DPPH free radical (c)

0.8 mg·mL⁻¹ 范围内, DAS 清除·O₂⁻的能力并未随着浓度的增大而显著增强, 当质量浓度达到 1.0 mg·mL⁻¹ 时, 其抗氧化能力出现明显提升 ($P < 0.05$), 清除率达到 (31.19±1.06)%; DAPS 的·O₂⁻清除能力同样随着浓度的增大而增强, 当其质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 时, 清除率达到最高 [(68.61±1.65)%]。在 0.1~0.8 mg·mL⁻¹ 范围内, DAS、DAPS

对·O₂⁻清除活性未表现出剂量浓度相关性, 可能与浓度设定范围存在一定关系^[32]。总体分析, DAS 清除·O₂⁻的能力相对较弱, 弱于同浓度的 V_C, 当 V_C 质量浓度达 0.2 mg·mL⁻¹ 时, 清除率高达 (96.71±0.13)%, V_C 浓度达 0.4 mg·mL⁻¹ 时, 清除率已接近 100%。DAS 和 DAPS 质量浓度要达 1.0 mg·mL⁻¹ 时才能表现出较强的·O₂⁻清除效果。黄来珍等^[17] 研究近江牡蛎 (*Ostrea rivularis*) 糖蛋白时发现用超声辅助盐浸提法提取出的糖蛋白质量浓度高达 6 mg·mL⁻¹ 时, 对·O₂⁻的清除率达到最高值, 也仅为 40.47%。而 0.1 mg·mL⁻¹ 的 DAPS 对·O₂⁻清除率已高于 40% [(44.03±1.18)%], 与同浓度下 V_C 的·O₂⁻清除率相近 (43.80±0.17)%。综上, DAS 和 DAPS 对·O₂⁻均有一定的清除能力, 但是相较于其清除·OH 效果略显弱势。

2.4.3 DPPH 自由基清除能力 DPPH 自由基作为一种较为稳定的自由基, 被广泛用于评价抗氧化剂的抗氧化活性。图 4-c 显示, 当 DAS 质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 时, DPPH 自由基的清除率仅有 (0.12±0.12)%, 几乎不具备清除能力。随着浓度的增大, DAS 和 DAPS 对 DPPH 自由基的清除率显著性提升, 存在明显的剂量相关性 ($P < 0.05$)。当质量浓度达到 1.0 mg·mL⁻¹ 时, DAS 的 DPPH 自由基清除率为 (10.65±1.67)%, DAPS 清除率为 (11.71±0.66)%。有研究发现 DPPH 自由基清除活性与样品的糖及蛋白质含量有密切相关性, 糖蛋白所含蛋白质在水解过程中, 氨基酸和肽链的大小、组成的变化影响了其抗氧化活性, 因此同一系列糖蛋白中, DPPH 自由基清除活性与样品蛋白质及糖含量呈正相关^[33]。该研究中 DAPS 的 DPPH 自由基清除能力显著优于 DAS ($P < 0.05$), 与本研究结果一致。与 V_C 相比, DAS 和 DAPS 的 DPPH 自由基清除能力相对较弱, 当 V_C 质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 时, DPPH 自由基的清除率已达到 (93.20±0.87)%, 随着浓度增大, V_C 的清除能力相近, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。相较于·OH、·O₂⁻的清除能力, DAS 及 DAPS 对 DPPH 自由基的清除能较弱, 这可能与有效浓度选择相关, 刘淑集等^[34] 研究翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 糖蛋白 PGFR 发现, PGFR 质量浓度为 8 mg·mL⁻¹ 时, 其对羟自由基的清除率为 100%; 而当 PGFR 质量浓度高达 30 mg·mL⁻¹ 时, 对 DPPH 自由基的清除率低于 90%。

3 结论

本研究结果表明, DAS 的总得率、糖及蛋白质得率远高于 SAS 和 WAS ($P<0.05$), 且 3 种糖蛋白粗品的蛋白质组成无明显差异, 优选直接醇沉法提取的珍珠贝黏液糖蛋白。通过分离纯化收集蛋白和多糖高度重叠部分, 获得 DAPS, 其分子量主要集中在 245 kD。然而 DAPS 的纯度不高, 仍需进一步优化纯化条件。体外抗氧化实验结果表明, DAS 及 DAPS 均具有一定抗氧化活性, 其中清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的效果尤为显著; DAS 和 DAPS 在质量浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时显示出较强的 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除效果, 但是在低浓度范围内无剂量相关性; 相较于 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基的清除能力, DAS 和 DAPS 对 DPPH 自由基的清除能力较弱。本研究从珍珠贝黏液中提取糖蛋白并评价其体外抗氧化活性, 研究结果为进一步探索马氏珠母贝黏液中的功效组分提供理论基础数据。

参考文献:

- [1] 郑惠娜, 章超桦, 吉宏武, 等. 马氏珠母贝高 F 值寡肽体外抗氧化研究 [J]. 食品与机械, 2010, 26(6): 63-66.
- [2] 邓志程, 张迪, 吉宏武, 等. 马氏珠母贝免疫活性肽的纯化与鉴定 [J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(4): 78-86.
- [3] 李雨哲, 任娇艳, 赵谋明. 马氏珍珠贝糖蛋白分离纯化及其抗氧化活性的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(10): 30-32.
- [4] 杨发明, 林海生, 秦小明, 等. 珍珠贝外套膜酶解产物促进皮肤创伤愈合效果研究 [J]. 南方水产科学, 2019, 15(5): 92-98.
- [5] 王梅芳, 余祥勇, 刘永, 等. 2 种珍珠贝的外套膜同工酶及粘液蛋白的电泳比较 [J]. 华中农业大学学报, 2004(5): 555-559.
- [6] ASTRAY R M, JORGE S A C, PEREIRA C A. Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein[J]. Arch Virol, 2017, 162(2): 323-332.
- [7] ZHAO Y, REN J, HARLOS K, et al. Toremifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein[J]. Nature, 2016, 535(7610): 169-172.
- [8] WEISS M D, HAMMER J, QUARLES R H. Oligodendrocytes in aging mice lacking myelin-associated glycoprotein are dystrophic but not apoptotic[J]. J Neurosci Res, 2015, 62(6): 772-780.
- [9] 郁迪, 杨永芳, 王加斌, 等. 菲律宾蛤仔糖蛋白提取及体外抗肿瘤活性研究 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2011, 30(4): 336-339.
- [10] 陈淑敏, 张玉琦, 龚芳芳, 等. 曼氏无针乌贼卵腺抗菌糖蛋白提取工艺优化 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(10): 1799-1806.
- [11] TAKAKURA D, HASHIJ N, KAWASAKI N. An improved in-gel digestion method for efficient identification of protein and glycosylation analysis of glycoproteins using guanidine hydrochloride[J]. Proteomics, 2014, 14(3): 196-201.
- [12] XU Y, BAILEY U M, PUNVADEERA C, et al. Identification of salivary N glycoproteins and measurement of glycosylation site occupancy by boronate glycoprotein enrichment and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2014, 28(5): 471-482.
- [13] STENFELT L, WESTMAN J S, HELLERG Å, et al. The P1 histo-blood group antigen is present on human red blood cell glycoproteins[J]. Transfusion, 2019, 59(3): 1108-1117.
- [14] 仇超颖, 荣婧, 胡晓, 等. 糖基化鸢乌贼肌原纤维蛋白体外消化产物抗氧化性研究 [J]. 南方水产科学, 2018, 14(6): 105-112.
- [15] 李敏, 薛慧清, 康宝玲, 等. 黄芪糖蛋白提取方法的比较及抗氧化性研究 [J]. 山西中医学院学报, 2018, 19(6): 31-35.
- [16] 李婷婷, 张晖, 吴彩娥, 等. 油茶籽糖蛋白提取工艺优化及抗氧化性 [J]. 农业机械学报, 2012, 43(4): 148-155.
- [17] 黄来珍, 钟敏, 胡雪琼, 等. 不同方式提取的近江牡蛎糖蛋白的体外抗氧化活性 [J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(3): 95-98.
- [18] 何晓梅, 乔德亮, 沈涛涛, 等. 三角帆蚌糖蛋白的盐溶液浸提及抗氧化活性 [J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(5): 517-523.
- [19] 范秀萍, 吴红棉, 王娅楠, 等. 波纹巴非蛤糖蛋白的分离提取及体外清除羟自由基活性的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2008(1): 138-140.
- [20] 张金豫, 刘豪, 孙会轻, 等. 大鲵黏液糖蛋白的提取纯化及其抗氧化性 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 175-181.
- [21] 邵泓, 吕晶, 陈钢. 蛋白质含量测定方法的规范化研究 [J]. 中国药品标准, 2011, 12(2): 135-138.
- [22] DAI H J, SUN Y L, ZHENG X L, et al. Extraction optimization, preliminary characterization and antioxidant activity of glycoproteins from the muscle of *Sepia pharaonis*[J]. Food Sci Technol Res, 2016, 22(1): 39-52.
- [23] 刘文, 张悦容, 张腾军, 等. 牡蛎体液糖蛋白的分离纯化及其理化性质分析 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(11): 179-184.
- [24] 常飞, 杨雪果, 肖士成, 等. 脱脂羊脑蛋白水解多肽的分离纯化及抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2016, 37(1): 33-39.
- [25] NOUMI E, SNOUSS M, HAJLAOUI H, et al. Chemical composition, antioxidant and antifungal potential of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils against oral *Candida* species[J]. J Med Plants Res, 2011, 5(17): 4147-4156.
- [26] 于志鹏, 武思佳, 赵文竹, 等. 海洋动物源性糖蛋白研究进展 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(13): 376-380, 385.
- [27] 张洪梅, 史晓飒, 刘腾飞, 等. 蝉花蛋白提取方法比较 [J]. 山东中医药大学学报, 2018, 42(5): 457-461.
- [28] JI X L, HOU C Y, YAN Y Z, et al. Comparison of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from jujube (*Ziziphus jujuba* Mill) fruit[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 149: 1008-1018.
- [29] 何荣军, 金巧艳, 刘高丹, 等. 珊瑚菌子实体多糖结构鉴定与抗氧化活性 [J]. 浙江工业大学学报, 2020, 48(1): 73-79.
- [30] 杨大俏, 王锦旭, 李来好, 等. 近江牡蛎膜分离联产制备多糖多

- 肽及其功能特性研究 [J]. 大连海洋大学学报, 2020(1): 126-133.
- [31] LI T T, WU C, MENG X Y, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a glycoprotein isolated from *Camellia oleifera* Abel seeds against D-galactose-induced oxidative stress in mice[J]. J Funct Food, 2020, 64: 103594. doi: 10.1016/j.jff.2019.103594.
- [32] KUDAT, KANEKON, YANOT, et al. Induction of superoxide anion radical scavenging capacity in Japanese white radish juice and milk by *Lactobacillus plantarum* isolated from aji-narezushi and kaburazushi[J]. Food Chem, 2010, 120: 517-522.
- [33] LI Z R, WANG B, CHI C F, et al. Purification and characterization of an antioxidant glycoprotein from the hydrolysate of *Mustelus griseus*[J]. Int J Biol Macromol, 2013, 52: 267-274.
- [34] 刘淑集, 潘裕添, 刘智禹, 等. 翡翠贻贝糖蛋白提取工艺优化及体外抗氧化活性 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2017, 42(4): 45-52.