

羟自由基诱导蛋白质氧化损伤的研究

章银良, 杨慧, 安巧云

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 作者利用 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ 氧化体系制备羟自由基, 通过分光光度法、荧光分光光度法及 FT-IR, 研究不同浓度过氧化氢 (H_2O_2) 对牛血清蛋白 (BSA) 巯基及活性巯基、表面疏水性、羰基含量及蛋白质的二级结构的影响。结果表明: 总巯基及活性巯基的含量都有着不同程度的减少, 表面疏水性和羰基含量均随着氧化剂浓度的增加和氧化时间的延长而增加, 蛋白质的二级结构也发生了改变。

关键词: 羟自由基; 牛血清蛋白; 理化性质; 蛋白质氧化

中图分类号: Q 51 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)03-0313-06

Study on Protein Oxidation Induced by Hydroxyl Radicals

ZHANG Yin-liang, YANG Hui, AN Qiao-yun

(School of Food and Biology Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this manuscript, with a hydroxyl radical-generating system prepared by $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$ as model, the effect of H_2O_2 concentration on the total sulfhydryls and active sulfhydryls, surface hydrophobicity, carbonyl and secondary structure of bovine serum albumin (BSA) were investigated by spectrophotometric, fluorescence and FT-IR. The results showed that the contents of total sulfhydryls and active sulfhydryls decreased in various degrees, as the concentrations of oxidant increased and the time prolonged, both surface hydrophobicity and carbonyl increased, secondary structure of BSA also changed.

Key words: hydroxyl radical, bovine serum albumin (BSA), physicochemical properties, protein oxidation

目前在肉类及鱼类的加工过程中, 脂肪氧化对肌肉品质的影响是众所周知的, 但是随着研究的发现, 蛋白质成为我们关注的另一个目标, 蛋白质氧化也是导致肌肉品质恶化的一个重要因素。

由于肌肉组织中含有大量的不饱和脂肪酸、亚铁血红素、金属离子或其它促进氧化因子^[1], 这些因子可以诱导产生各种活性氧自由基, 或成为直接诱导蛋白质氧化的催化剂, 从而使肉类或鱼类的品

质恶化^[2]。有些已经通过模拟体系的研究证实, 活性氧自由基能够氧化蛋白质, 对蛋白质造成损伤, 如使蛋白质的肽键断裂、使蛋白质分子发生交联聚合而生成变性高聚物、使蛋白质结构上的氨基酸发生氧化脱氧及改变蛋白质的结构, 从而失去生物活性^[3]。

作者利用羟自由基氧化体系作用于牛血清蛋白, 并对其理化性质及二级结构进行研究。通过对

收稿日期: 2011-04-07

基金项目: 河南省基础及前沿计划研究项目(112300410145); 郑州轻工业学院博士基金项目(2007BSJJ007)。

作者简介: 章银良(1963-), 男, 浙江上虞人, 工学博士, 教授, 主要从事食品化学与品质控制方面的研究。E-mail: zhyinliang@163.com

总巯基、活性巯基、表面疏水性、羰基含量及二级结构等指标的探讨,根据它们的变化规律及相互关系揭示羟自由基对牛血清蛋白的氧化机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛血清蛋白(BSA):瑞士 Roche 试剂公司;乙二胺四乙酸二钠(EDTA):分析纯,天津市光复科技发展有限公司;5,5'-二硫代双硝基苯甲酸(DTNB):分析纯,北京 Solarbio 试剂公司;8-苯氨基-1-萘磺酸(ANS):分析纯,梯希爱化成工业发展有限公司;2,4-二硝基苯肼(DNPH):分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;盐酸胍:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;尿素、KCl、氯化铁、过氧化氢(H_2O_2),抗坏血酸(Asc) 三氯乙酸(TCA)、乙醇、乙酸乙酯、磷酸二氢钾和氢氧化钠:均为分析纯。

1.2 仪器设备

数显三用恒温水箱(HH-W420 型):金坛市医疗仪器厂;紫外-可见分光光度计(T6 型):北京普析通用仪器有限公司;荧光分光光度计(F-7000 型):日本 Hitachi 公司;FT-IR 傅立叶红外光谱仪(Nicolet 5700 型):美国 Thermo 公司;真空冷冻干燥机(CoolSafe 55-4 型):Cooling Trap Pro。

1.3 方法

1.3.1 羟自由基氧化体系的制备 应用 $Fe/H_2O_2/Asc$ 体系通过铁的氧化还原反应产生的羟自由基^[4]。用 $FeCl_3/H_2O_2$ 和 Asc,在 50 mmol/L 的磷酸缓冲液中进行(pH 6.0),该体系中 $FeCl_3$ 和 Asc 浓度均为 1 mmol/L, H_2O_2 的浓度分别选择 0,1,5,10,15,20 mmol/L。

1.3.2 牛血清蛋白的氧化体系 在上述各个氧化体系中加入牛血清蛋白(BSA),使得蛋白质的最终质量浓度为 5 mg/mL,然后在 50 °C 分别氧化 1、3 和 5 h,使牛血清蛋白进行不同程度的氧化。

1.3.3 总巯基和活性巯基的测定 参考 Youngsawatdigul^[5] 方法并略作修改,测定总巯基的方法是将 1 mL 氧化后的蛋白质液样加入 9 mL、50 mmol/L 磷酸缓冲液(其中包括 0.6 mol/L KCl, 10 mmol/L EDTA, 8 mol/L 的尿素,pH 7)。取 4 mL 上述混合液加入体积分数 0.1%的 DTNB 0.4 mL,

然后将混合液在 25 °C 保温 25 min,在 412 nm 下测定吸光度即为总巯基的吸光度。而活性巯基的测定是在不存在尿素的情况下,将反应混合液在 4 °C 反应 1 h,然后在 412 nm 处测定其吸光度。

计算总巯基的分子吸光系数 $13\ 600\ mol \cdot cm/L$,因为是模拟实验,所以实验采用其吸光值来代替巯基含量的变化趋势。

1.3.4 表面疏水性的荧光强度测定 用 1-苯胺基-8-萘基磺酸盐(ANS)荧光探针^[6] 将 0.4 mL 氧化的蛋白液与 1.6 mL 含 0.6 mol/L KCl 的磷酸缓冲溶液(pH 7.0)混匀(最终使蛋白质质量浓度在 0~1 mg/mL 范围内),加入 10 μL 8 mmol/L ANS 后混合均匀,在暗处放置 10 min,然后用荧光分光光度计测定其荧光强度。测定条件为:激发波长 374 nm,发射波长 485 nm,狭缝 2.5 nm,扫描速度为 1 200 nm/min,设定扫描范围为 396~600 nm。

1.3.5 蛋白质二级结构的测定 先将氧化的蛋白液放入高速冷冻器(约-70 °C)中冷冻约 4 h,再放入真空冷冻干燥机中干燥 8 h 即可得固态粉末。然后对这些固态粉末进行压片,放入傅立叶红外光谱仪(FT-IR)中进行扫描,收集光谱。扫描条件为:扫描范围从 650 cm^{-1} 扫到 4 000 cm^{-1} ,扫描次数为 256 次,分辨率 4 cm^{-1} 。

1.3.6 羰基含量的测定 测定羰基含量是参照 Oliver 等人^[7] 的方法并略加改动。方法如下:取 3 mL 质量浓度为 5 mg/mL 的氧化的蛋白液放入离心管中,每管中加入 1 mL 浓度 10 mmol/L 的 2,4-二硝基苯肼(DNPH),室温下在黑暗处静止放 1 h(每隔 10 min 旋涡 1 次),然后加入 1 mL 质量分数 20%的三氯乙酸(TCA),然后在 10 000 r/min 离心 15 min,弃清液,用 1 mL 乙酸乙酯:乙醇(v/v=1:1)洗涤沉淀,洗 3 次,以去除未反应的试剂,加 4 mL 盐酸胍溶液(6 mol/L),在 37 °C 下溶解沉淀 20 min,最后在 10 000 r/min 下离心 5 min,取上清液在 370 nm 处测吸光值。对照组开始时用 1 mL 浓度为 2 mol/L 的 HCl 代替 DNPH 处理,其余操作相同。离心和弃上清液前均要静止 10 min^[8]。

计算羰基的分子吸光系数 $22\ 000\ mol/cm$,因为是模拟实验,所以实验采用其吸光值来代替羰基含量的变化趋势。

2 结果与分析

2.1 总巯基和活性巯基的变化

巯基($-SH$)和二硫键($-S-S-$)是蛋白质中具有最高反应活性的基团,蛋白质的结构稳定性、酶的催化作用及在蛋白质的成膜特性^[9-11]等,这些都与巯基和二硫键的变化有很大的关联,因此,我们在探讨蛋白质的性质时,巯基和二硫键的变化是一项重要的测定指标^[12]。

蛋白质中的游离巯基包括2种:暴露在蛋白质表面的巯基和包埋在疏水基团内部的巯基。5,5-二硫代-2-硝基苯甲酸(DTNB)可以与游离 $-SH$ 反应,生成在波长412 nm处有最大吸收峰的黄色物质,然后用分光光度计测其吸光度^[13]。而某些有机化合物如尿素和盐酸胍的高浓度水溶液(4~8 mol/L)可以导致蛋白质分子氢键的断裂,使球状蛋白质从天然状态转变至变性状态的中点,从而使蛋白质发生不同程度的变性。这些有机化合物的水溶液还可以增大疏水氨基酸残基在水溶液的溶解度,降低疏水相互作用,从而使包埋于疏水基团内部的巯基暴露,这样就可以通过加入尿素或盐酸胍的方法测定总巯基的含量^[14]。图1和图2分别是不同氧化体系在不同氧化时间对总巯基和活性巯基的影响。

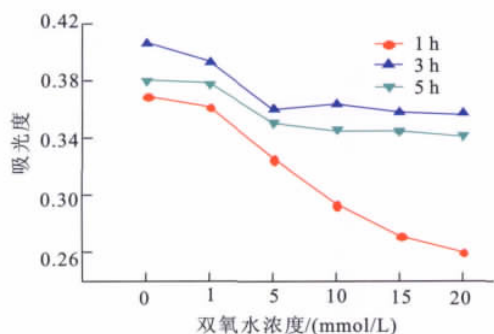


图1 双氧水浓度对总巯基含量的影响

Fig. 1 Effect of H_2O_2 concentration on total sulfhydryls changes

从图1可以看出,在相同的氧化时间内,随着双氧水浓度的增加,总巯基含量呈现降低的趋势,这可能是因为 $\cdot OH$ 氧化蛋白质的过程中,巯基被氧化生成二硫键,或进一步氧化成磺酸类等产物,从而导致蛋白质结构表面的总巯基含量的下

降。从氧化时间上来看,3 h和5 h时的总巯基含量比1 h高,这可能是因为此时蛋白质分子发生了氧化变性,巯基氧化成二硫键后,分子间又发生了重排,暴露出更多巯基的缘故。当氧化3 h时,与低浓度相比,当双氧水的浓度 ≥ 10 mmol/L时,这可能是因为此时蛋白质分子发生了重排,内部的巯基暴露,导致短时间内总巯基数量增加的缘故。而当氧化3 h和5 h时,随着双氧水浓度的增加,此时总巯基含量降低缓慢,这可能是因为此时蛋白质分子发生重排,使得暴露出来的基团保持恒定,总巯基含量不再明显降低;也可能是因为羟自由基氧化体系只氧化暴露出来的特定的巯基,在氧化剂浓度较高或反应时间较长的情况下氧化达到了平衡,从而使总巯基趋于恒定。

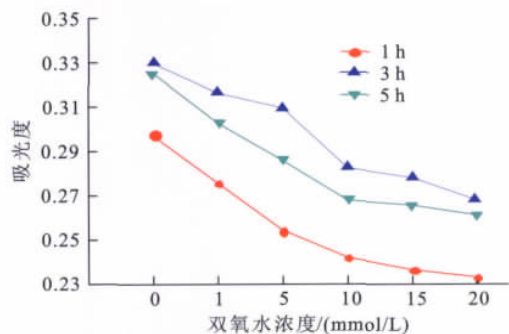


图2 双氧水浓度对活性巯基的影响

Fig. 2 Effect of H_2O_2 concentration on active sulfhydryls changes

从图2中可以看到,与总巯基一样,活性巯基也产生了类似的结果。在相同的氧化时间内,随着双氧水浓度的增加,活性巯基的减少意味着蛋白质分子间与分子内二硫键的形成,或形成氢键和疏水键进而掩盖了活性巯基。与1 h相比,3 h和5 h时活性巯基的含量又增加,这意味着蛋白质的折叠被打开,二级结构随着发生改变,内部的活性巯基暴露出来。

2.2 蛋白质表面疏水性的变化

蛋白质结构的特征是亲水/疏水间的平衡,稳定蛋白质结构的因素有很多,譬如疏水作用、氢键、盐键、范德华力以及肽链内的肽键、二硫键和含有金属元素的配位键等,而最重要的是疏水作用^[15]。在蛋白质分子中,其中酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸残基能受到激发而产生内源荧光,从而可测定其荧光强度,而其他氨基酸则不产生内源荧光,通过对

内源荧光的测定,我们可以获得有关蛋白质分子的信息。然而除了内源荧光外,我们还可以借助外援荧光,从而了解蛋白质分子更多的信息。现阶段测定外源荧光最常用荧光探针是 ANS (1-苯胺基萘-8-磺酸),ANS 已经广泛用于检测暴露在蛋白质表面疏水位点,表征蛋白质构象的变化^[16-17]。图 3 为不同氧化体系在不同时间下的相对荧光强度变化曲线。

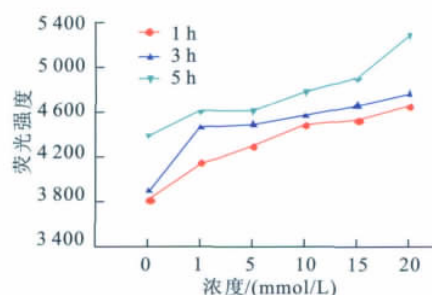


图 3 双氧水浓度对荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of H_2O_2 concentration on the fluorescence intensity

从图 3 可以看出,无论是随着双氧水浓度的增加还是氧化时间的延长,牛血清蛋白的相对荧光强度呈增加趋势,即表面疏水性升高。这可能是随着氧化剂浓度的增加,生成更多的 $\cdot\text{OH}$ 氧化蛋白质,使得蛋白质分子内部的疏水键和氢键暴露出来,蛋白质原有的天然结构被打破,构象发生改变,一些疏水性的脂肪族和芳香族氨基酸侧链基团暴露,从而增加了蛋白质的疏水性。另外随着时间的延长,50 $^\circ\text{C}$ 和高浓度的氧化剂这些条件也加速了蛋白质的氧化变性。还有研究表明,牛血清蛋白质含有一些疏水性较强的非极性基团如 Phe 残基,这些基团的暴露也会使表面疏水性增加。

2.3 蛋白质二级结构的变化

在检测水溶液和固态中多肽和蛋白质的构象时,FT-IR 是一种实用而又灵敏的工具,它具有分辨率好、灵敏度高、扫描速度快、样品用量少等一系列优点。蛋白质和多肽在红外区有 9 个特征吸收带,其中酰胺 I 带(1 600~1 700 cm^{-1})对二级结构的研究最有价值。

通常我们认为,1 600~1 640 cm^{-1} 为 β -折叠(β -sheet);1 640~1 650 cm^{-1} 为无规卷曲(random);1 650~1 658 cm^{-1} 为 α -螺旋(α -helix);1 660~1 695 cm^{-1} 为 β 转角(β -turn)。目前研究的比较成熟的是,酰胺 I 带经过谱峰拟合后各子峰与

二级结构的对应关系。

通过对蛋白质酰胺 I 带进行去卷积、二阶导数和拟合之后,然后观察到氧化变性的蛋白质构象的变化,包括新构象的产生、部分或全部去折叠引起的二级结构的破坏、二级结构相对含量的变化等。

作者选用当双氧水浓度为 10 mmol/L 时的氧化体系,对该体系经不同的氧化时间(1 h、3 h 和 5 h)后蛋白质的 FT-IR 图谱用 peakfit 4.12 软件分析,选择波数在 1 600~1 700 cm^{-1} ,得到如图 4 所示的红外图谱经过自动去卷积后的酰胺 I 带分布,表 1 表示二级结构的变化。

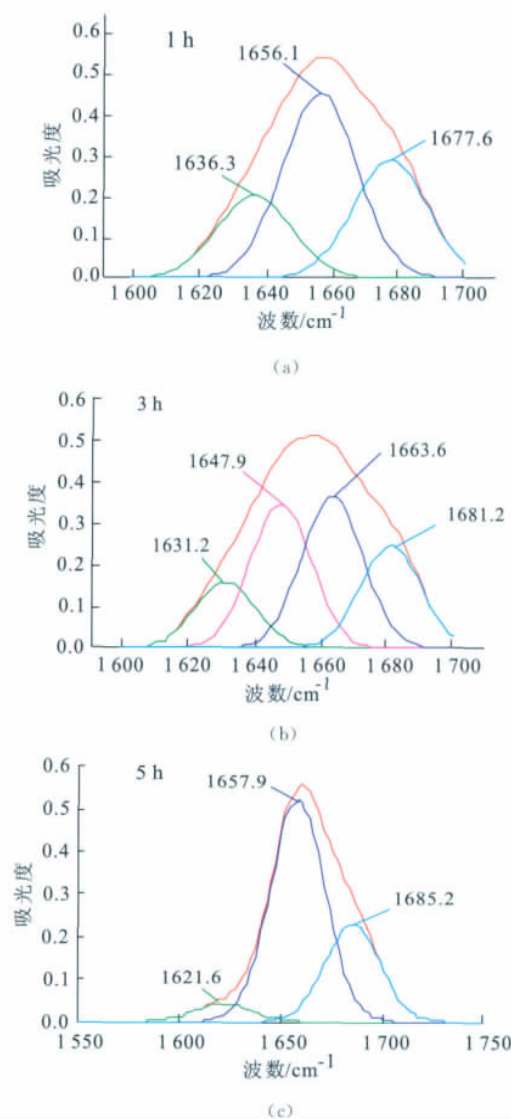


图 4 图谱经过自动去卷积后的酰胺 I 带分布图

Fig. 4 Assignments amid I band of infra-red self-deconvolved spectra

表 1 不同反应时间同一体系中蛋白质酰胺 I 带的分析
Tab. 1 Assignments amid I band of BSA in different reaction time

时间/ h	面积比/%			
	β -折叠	无规卷曲	α -螺旋	β -转角
1	21.50	0	47.84	30.66
3	14.17	31.14	0	54.69
5	5.23	0	65.89	28.88

当氧化 1 h 时, β -折叠, α -螺旋分别占了 21.50%和 47.84%,无规则卷曲为 0,说明此时牛血清蛋白有着稳定且有序的结构。当氧化 3 h 时, β -折叠减少, α -螺旋降低为 0,无规则卷曲则增加到 31.14%, β -转角也增加。无规则卷曲的增加和 α -螺旋的减少说明引起了蛋白质分子内或分子间的相互作用,进而引起了蛋白质的变性^[18],这说明了羟自由基对牛血清蛋白的二级结构产生影响。随着氧化时间的继续延长,发现 β -折叠、 α -螺旋和 β -转角的量在变化着。无规卷曲的减少和 α -螺旋的增加,这可能是因为随着 Fenton 反应趋于结束,生成的亚铁离子又与蛋白质发生作用,与巯基形成稳定的化合物,或成为蛋白质分子或分子缔合物的组成部分,增加了蛋白质的稳定性^[14]。

2.4 蛋白质羰基含量的变化

在蛋白质氧化损伤的过程中,生成的活性氧自由基会攻击分子中的氨基,从而生成 NH_3 以及相应的羰基衍生物。测定蛋白质羰基含量常用的方法有 4 种,分别是 2,4-二硝基苯肼法(DNPH)、硼氢化钠法、荧光素肼法和荧光胺法。其中 2,4-二硝基苯肼法(DNPH)是测定羰基含量最经典的方法,它是利用羰基与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙,这种物质可以通过分光光度法测定,从而

测定出蛋白质羰基的含量。图 5 为不同氧化体系在不同时间下的蛋白质羰基含量的变化。

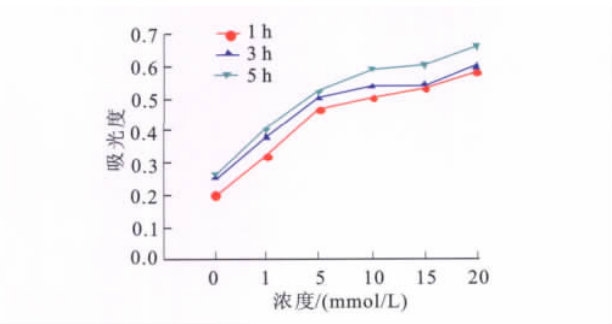


图 5 双氧水浓度对羰基含量的影响
Fig. 5 Effect of H_2O_2 concentration on carbonyl content

从图 5 可以看出,随着双氧水浓度的增加和氧化时间的延长,羰基含量整体呈现增加的趋势。这可能是因为随着双氧水浓度的增加,生成的羟自由基进攻氨基酸分子中自由氨基或亚氨基,氧化反应后生成相应的 NH_3 和相应的羰基衍生物^[19];由于本反应是在 50 °C 水浴条件下进行的,且体系中存在高浓度的氧化剂,随着反应时间的延长,这些条件也可加速了蛋白质氧化的程度和强度;另外,赖氨酸和抗坏血酸反应也能引入外源性的羰基。

3 结 语

通过研究可以看出,羟自由基使牛血清蛋白的理化性质发生了改变,如总巯基和活性巯基含量的减少,表面疏水性和羰基含量的增加,并且通过 FT-IR 红外分析表明了羟自由基对蛋白质分子中的氨基酸残基和二级结构的影响,能够诱导蛋白质变性和结构的变化。因此,羟自由基对牛血清蛋白模拟体系的研究,对进一步揭示活性氧自由基氧化蛋白质的机制有着非常重要的意义。

参考文献(References):

[1] Johns A M, Birkinshaw L H, Ledward D A. Catalysts of lipid oxidation in meat products [J]. *Meat Science*, 1989, 25:209—220.
[2] 崔旭海. 肉蛋白氧化机制及氧化对肉制品品质和功能性的影响[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(6):337—341.
CUI Xu-hai. Mechanism of protein oxidation from muscle and the effects of oxidation on muscle food quality and functional properties [J]. *Food Industrial Science and Technology*, 2009, 30(6):337—341(in Chinese)
[3] 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M]. 北京:化学工业出版社,2004:7—8.
[4] Srinivasan S, Hultin H O. Chemical, physical & functional properties of cod proteins modified by a nonenzymic free-radical generating system[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45:310—320.

- [5] Yongsawatdigul J, Park J W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin[J]. **Food Chemistry**, 2003,83:409—416.
- [6] Saeed S, Howell N K. Rheological and differential scanning calorimetry studies on structural and textural changes in frozen Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) [J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2004, 84:1216—1222.
- [7] Oliver C N, Alin B W, Moerman E J, et al. Age-related changes in oxidized proteins[J]. **J Biol Chem**, 1987,262:5488—5491.
- [8] 崔旭海,孔保华,熊幼翎. 自由基氧化引起乳清蛋白理化性质变化的研究[J]. 中国乳品工业 2008(9):31—34.
CUI Xu-hai, KONG Bao-hua, XIONG You-ling. Effect of protein oxidation on physicochemical properties of whey protein isolate [J]. **China Dairy Industry**, 2008(9):31—34 (in Chinese)
- [9] 万建荣,洪玉菁,奚印慈,等编译. 水产品食品化学分析手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1993.
- [10] Handa A, Genndios A, Hanna M A. Physiological and molecular properties of egg-white lipid films[J]. **J Food Sci**, 1999, 64(5):860—864.
- [11] 田其英, 谌卉, 华欲飞. Ellman's 试剂测定脱脂豆粕中巯基含量[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(06):107—110.
TIAN Qi-ying, CHEN Hui, HUA Yu-fei. Sulphydryl content of defatted soy flour determined by Ellman's reagent[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(06):107—110 (in Chinese)
- [12] 欧仕益, 郭乾初, 包惠燕, 等. 豆奶蛋白质中巯基含量的测定[J]. 中国食品学报, 2003, 3(2):59—61.
OU Shi-yi, GUO Qian-chu, BAO Hui-yan, et al. Determination of sulfhydryl content in soy protein [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2003, 3(2):59—61. (in Chinese)
- [13] Ellman G D. Tissue sulfhydryl group [J]. **Arch Biophys**, 1959. 82(1):70.
- [14] 谢笔钧. 食品化学[M]. 北京:科学出版社, 2008, 7:256—258.
- [15] 王克夷. 疏水作用和蛋白质生命的化学[J]. 1999, 19(5):233—235.
WANG Ke-yi. Hydrophobic interaction and protein[J]. **Chemistry of Life**, 1999, 19(5):233—235 (in Chinese)
- [16] Hayakawa S, Nakai S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins[J]. **Journal of Food Science**, 1985, 50(2):486—491.
- [17] Gerbanowski A, Malabat C, Rabiler C, et al. Grafting of aliphatic and aromatic probes on rapeseed 2S and 12S proteins: influence on their structural and physicochemical [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1999, 47:5218—5226.
- [18] Baddii F, Howell N K. Effect of antioxidants, citrate, and cryoprotectants on protein denaturation and texture of frozen cod [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002, 50:2053—2061.
- [19] 文镜, 张春华, 董雨, 等. 蛋白质羰基含量与蛋白质氧化损伤[J]. 食品科学, 2003, 24:153—157.
WEN jing, ZHANG Chun-hua, DONG yu, et al. Protein carbonyl content and protein oxidative injury[J]. **Food Science**, 2003, 24(10):153—157. (in Chinese)