

文章编号 :1000 - 0615(2006)04 - 0549 - 05

仿刺参胶原蛋白的提取及理化性质

崔凤霞, 薛长湖, 李兆杰, 董平, 薛冬梅

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要 对仿刺参(*Stichopus japonicus*)胶原蛋白的提取及理化性质进行了研究。结果表明,低温提取可得到胃蛋白酶促溶且去除端肽(telopeptide)的酸溶性胶原蛋白(PSC)。紫外-可见扫描测得PSC的最大吸收峰位于220 nm。氨基酸分析发现,在1000个总氨基酸残基中,甘氨酸为329个,羟脯氨酸为66个,羟脯氨酸与脯氨酸之比为0.69。酪氨酸、苯丙氨酸及组氨酸的含量较低,可能不含胱氨酸,这些特性均符合I型胶原的特征。差示量热扫描法(DSC)测定仿刺参PSC的热稳定性温度(T_s)为57℃,低于牛皮I型胶原5℃。苯酚-硫酸及次甲基蓝法测得PSC的总糖及粘多糖含量分别为0.61%及0.48%。经DEAE-52纯化后,可得到除去粘多糖的蛋白纯品。SDS-PAGE显示,本研究所提取的仿刺参PSC不含杂蛋白,主要成分为胶原 β 及 α 链,含少量 γ 链,其中 α 链类似于脊椎动物I型胶原 α_1 链,PSC分子组成为 $(\alpha_1)_3$ 。

关键词 仿刺参;胶原蛋白;氨基酸组成;粘多糖;SDS-PAGE

中图分类号 S 917;Q 959.269 文献标识码 A

Extraction and the physical and chemical characterization of collagen in *Stichopus japonicus*

CUI Feng-xia, XUE Chang-hu, LI Zhao-jie, DONG Ping, XUE Dong-mei

(College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Sea cucumbers (*Stichopus japonicus*) belonging to the phylum Echinodermata are traditional tonic consumed by Chinese and Japanese. The major edible parts of sea cucumber are the body wall mainly consisting of collagen and mucopolysaccharides. More than 21 types of collagen have so far been identified in various tissues and their roles have been investigated. In invertebrate, at least 2 types of collagen, type I and type V are found to exist. There is little information about the collagen of sea cucumber except for few reports on *S. japonicus* and *Cucumaria frondosa*, respectively. However, results of the former findings were not consistent with that of the latter about the molecular composition of the sea cucumber collagen. In this paper, the intact collagens were isolated from the body wall of *S. japonicus* by a new method and their physical and chemical characterization were studied. The results showed that pepsin-solubilized collagen (PSC) without telopeptide could be prepared at low temperature. Through the ultraviolet scanning spectra from 190 to 400 nm, the PSC presented maximum absorption at 220 nm which was consistent with that of type I collagen. The compositional features of the amino acid were with the high contents of glycine (329 residues/1000) and hydroxyproline (66 residues/1000), but with low contents of tyrosine, phenylalanine and histidine. No cysteine was detected. The ratio of hydroxyproline to proline was 0.69. It was concluded that PSC was typical type I collagen. This was the first report about the thermal stability temperature (T_s) of sea cucumber collagen which was 57℃ as measured by DSC, about 5℃ lower than that of type I collagen of calf. The content of total polysaccharide determined with phenol-sulfuric acid method was 0.61% and the glycosaminoglycan measured with cationic dye of methylene blue was 0.48%. The collagen could be separated from glycosaminoglycan by DEAE-52.

收稿日期 2005-05-23

资助项目 国家自然科学基金资助(30471319)教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0642)

作者简介 崔凤霞(1976-),女,山东济宁人,博士研究生,从事胶原蛋白研究。Tel 0532-2032274 E-mail: fengxiacui@163.com

通讯作者 薛长湖, Tel 0532-2032274 E-mail xuech@mail.ouc.edu.cn

Based on SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the purities of PSC were higher. Judging from their electrophoretic patterns, PSC contained β , α and a few γ chains, while α chain resembled α_1 chain of type-I collagen of vertebrate, however, the presence of $(\alpha_1)_3$ trimers was evident.

Key words: *Stichopus japonicus* collagen; amino acid composition; mucopolysaccharide; SDS-PAGE

仿刺参 (*Stichopus japonicus*) 隶属于棘皮动物门 (Echinodermata) 海参纲 (Holothurioider) 木盾手目 (Aspidochirota)。全世界约有 900 多种海参, 我国约有 140 多种, 其中可供食用者约有 40 多种, 在我国一向被视为佐膳佳肴, 被列为“八珍之一”^[1], 其可食部位的主要成分为体壁中的胶原蛋白。胶原蛋白类型较多, Gelse 等^[2]于 2003 年报道, 胶原蛋白家族有 21 种不同类型的胶原, 水产无脊椎动物中存在的胶原蛋白主要可分为两种, 类 I 型及类 V 型^[3]。国外学者对海胆胶原蛋白研究较多^[4-6], 发现海胆胶原由两条不同的 α 链组成, 分子量约为 100 kD, 分子组成为 $(\alpha_1)_2\alpha_2$, 类似于脊椎动物 I 型胶原。和海胆相比, 海参胶原蛋白的研究则较少。Saito 等^[7]及 Trotter 等^[8]曾分别对仿刺参及加州海参 (*Cucumaria frondosa*) 胶原特性进行研究, 但得到的胶原构型结果不一致。本文从中国产仿刺参中提取胶原蛋白, 对其理化性质进行了初步研究, 并与两位学者的研究结果进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

活仿刺参购于青岛南山水产品市场。胃蛋白酶比活力为 1:10 000, Sigma Chemical Co. 产品。

1.2 实验方法

胶原蛋白的提取 参照文献^[8]的方法, 并加以改进。把仿刺参除去肠等内脏, 用剪刀剔除内壁肌肉层, 剩余仿刺参体壁用刀切成碎块 (湿重约 50 g), 于 500 mL 蒸馏水中搅拌 30 min, 用纱布滤出, 加入 500 mL 蒸馏水重洗, 然后将仿刺参碎块放于 500 mL 的 4 mmol·L⁻¹ EDTA 和 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中, 搅拌过夜。用纱布过滤后, 再用蒸馏水洗 2 次, 置于 500 mL 蒸馏水中搅拌过夜, 溶液中即充满絮状胶原纤维, 用纱布滤出未解离的海参块, 将溶液以 9 000 × g 转速离心 30 min。所得胶原纤维沉淀加入 25 倍体积的 0.1 mol·L⁻¹ NaOH, 搅拌 3 d。9 000 × g 离心 1 h, 沉淀水洗至中性, 加入 25 倍体积的 0.5 mol·L⁻¹

乙酸, 加入 0.5% 胃蛋白酶, 搅拌、消化 2 d。12 000 × g 离心 1 h, 上清液缓慢加入研磨精细的 NaCl (终浓度为 0.8 mol·L⁻¹), 搅拌过夜。3 000 × g 离心 10 min, 去上清, 沉淀加入少许 0.5 mol·L⁻¹ 乙酸溶解, 转入透析袋内对 0.02 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ (pH 8.0) 透析, 透析时每隔 5 h 换一次溶液, 透析 2 d。透析液 3 000 × g 离心 10 min, 去上清, 沉淀用少许 0.5 mol·L⁻¹ 乙酸溶解, 转入透析袋内对 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸透析 2 d, 用 PEG8000 浓缩, 冷冻干燥后即得胃蛋白酶促溶的酸溶性胶原 PSC。以上所有操作均在 4℃ 下进行。将胶原冻干品溶于 0.1 mol·L⁻¹ Na₃PO₄ (pH 7.2) 缓冲液中, 过夜, 离心, 上清液用于 SDS-PAGE 分析。

胶原蛋白的紫外分光吸收测定 采用 751 UVGD 的紫外可见分光光度计测定。

氨基酸分析 取新鲜仿刺参体壁, 烘干后磨成粉末。准确称取一定量干粉及仿刺参 PSC, 精确到 0.0001 g, 用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪对其主要氨基酸组成进行分析。

热稳定性温度 (T_s) 测定 采用差示量热扫描 (DSC 200 PC 型) 法测定 (以 I 型胶原标准为对照)。

总糖及多糖含量测定 苯酚-硫酸法测定总糖含量^[9], 多糖含量采用次甲基蓝法^[10]。

DEAE-52 阴离子交换层析 取一定量的 PSC 溶解于 0.2 mol·L⁻¹ NaCl, 0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.8) 的缓冲液中, 加入用同样缓冲液平衡的 DEAE-52 纤维素层析柱上, 柱体积约 40 mL, 先用同一缓冲液洗脱, 紫外 (220 nm) 监测至洗脱峰回到基线, 再用 NaCl 步进洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹, 次甲基蓝法检测多糖, 收集蛋白峰, 进行 SDS-PAGE。

SDS-PAGE 分析 取 20 μ L 胶原上清液, 加入 5 μ L 5 × 样品缓冲液 (60 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液, 25% 甘油, 2% SDS, 14.4 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇, 0.1% 溴酚蓝), 100℃ 煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE 垂直板电泳。浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 9%, 电极缓冲液采用 SDS-Tris-甘氨酸系统,

以 30 mA 胶恒流电泳直至溴酚兰前沿离凝胶下端 1 cm 左右时结束。

2 结果

2.1 仿刺参胶原的紫外-可见吸收光谱

对所提取的 PSC 在 200~400 nm 的近紫外光区进行宽扫测试,由图 1 可见,PSC 的最大吸收波长约为 220 nm,符合胶原蛋白的特征吸收^[11],这表明所提取的胶原蛋白有较高的纯度。

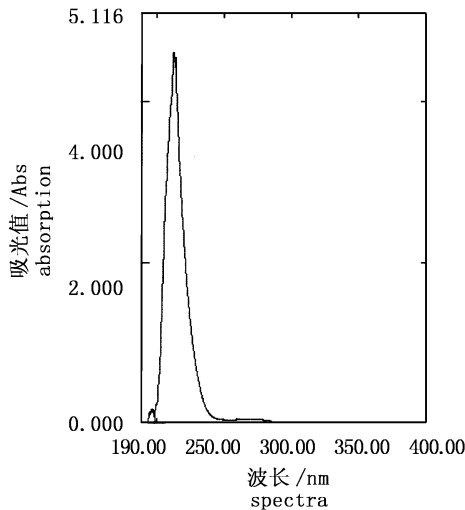


图 1 仿刺参胶原的紫外吸收光谱

Fig.1 The ultraviolet absorption spectra of PSC

2.2 仿刺参胶原的氨基酸组成

仿刺参 PSC 及体壁蛋白氨基酸组成见表 1。

由表 1 可知,在仿刺参 PSC1000 个总氨基酸残基中,甘氨酸为 329,羟脯氨酸为 66,羟脯氨酸与脯氨酸之比为 0.69,酪氨酸,苯丙氨酸及组氨酸的含量较低,可能不含胱氨酸,这些氨基酸的构成比符合 I 型胶原的特征,并显示有较高的纯度。

2.3 仿刺参胶原的热稳定性温度(T_s)

仿刺参胶原及脊椎动物 I 型胶原的热稳定性温度测定结果见图 2,仿刺参胶原 T_s 为 57 °C,脊椎动物 I 型胶原 T_s 为 62 °C。

2.4 仿刺参胶原含糖量

仿刺参中含有岩藻糖、氨基半乳糖和葡萄糖醛酸等。对仿刺参胶原总糖及多糖含量的测定结果表明,仿刺参体壁胶原的总糖含量为 0.61%,酸性粘多糖含量为 0.48%。

表 1 仿刺参体壁、PSC 及人的氨基酸组成
(残基/1000 个氨基酸总残基)

Tab.1 Amino acid composition of sea cucumber body wall and PSC compared with human collagens
(residues per 1 000 residues)

| 氨基酸 amino acid | 海参体壁胶原 body wall collagen | 海参 PSC | 人 $\alpha_1(\text{I})$ 型胶原* $\alpha_1(\text{I})$ of human |
|-------------------|------------------------------|-----------|--|
| Asp | 76 | 60 | 42 |
| Thr | 44 | 34 | 16 |
| Ser | 49 | 45 | 34 |
| Glu | 106 | 104 | 73 |
| Gly | 265 | 329 | 333 |
| Ala | 97 | 111 | 115 |
| Val | 34 | 24 | 21 |
| Met | 15 | 9 | 7 |
| Ile | 25 | 18 | 6 |
| Leu | 32 | 19 | 19 |
| Tyr | 21 | 8 | 1 |
| Phe | 21 | 7 | 12 |
| Lys | 23 | 5 | 26 |
| His | 7 | 3 | 3 |
| Arg | 48 | 53 | 50 |
| Pro | 76 | 95 | 124 |
| Hyp | 52 | 66 | 109 |
| Hyl | 9 | 10 | 9 |

aNimni and Harkness(1988)

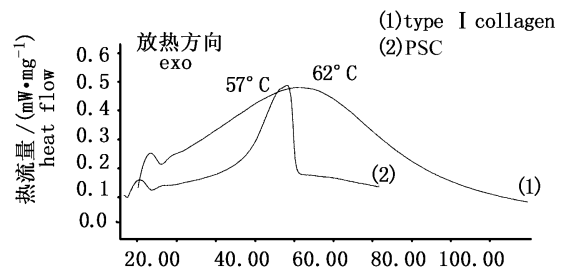


图 2 仿刺参胶原的 DSC 吸收曲线

Fig. 2 Thermal denaturation curve of sea cucumber collagen as measured by DSC

2.5 PSC 的纯化

PSC 经 DEAE-52 纯化的结果见图 3。由图可知 PSC 经 DEAE-52 纯化后,得到除去多糖及粘蛋白的胶原纯品(峰 1),仿刺参粘多糖(峰 2)约在 NaCl 浓度为 0.6 mol·L⁻¹时流出。

2.6 仿刺参胶原类型及分子量

图 4 为仿刺参胶原 PSC 的 SDS-PAGE 电泳图谱。由图可知,PSC 不含杂蛋白,具有很高的纯度,主要含胶原 β 及 α 链,少量 γ 链,其中 α 链类似于脊椎动物 I 型胶原 α_1 链,分子组成为(α_1)₃。

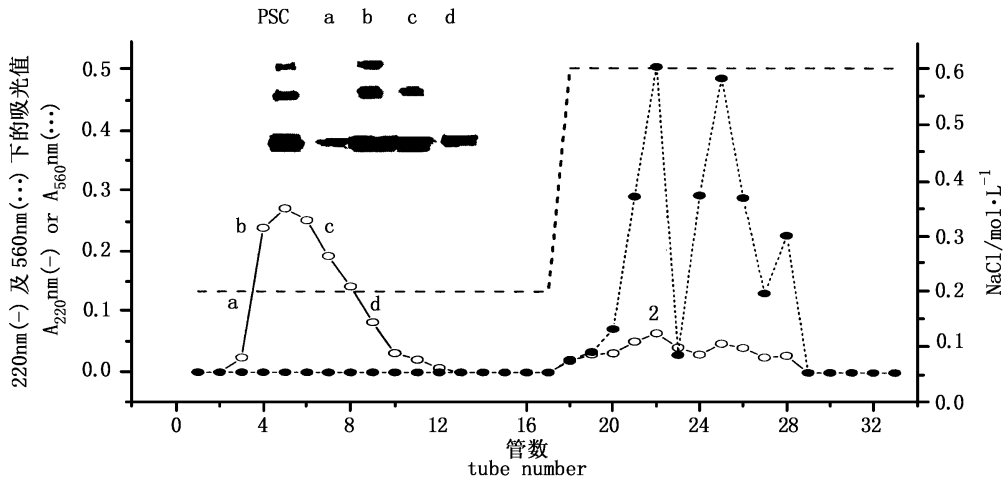


图3 仿刺参胶原 PSC 的 DEAE

Fig.3 Chromatograph of PSC on DEAE-52

峰 1 为胶原(最大吸收位于 220 nm) 峰 2 为粘多糖(和次甲基蓝反应后,最大吸收位于 560 nm),在 0.6 mol·L⁻¹ NaCl 处流出,插入图为 PSC 及峰 1 中 a, b, c 和 d 部分的电泳图

Collagen (absorbance at 220 nm) was eluted in the peak 1, whereas GAG (absorbance at 560 nm after reaction with methylene blue) was eluted at about 0.6 mol·L⁻¹ NaCl (peak 2). The inset shows SDS-PAGE, Coomassie blue-stained, of the PSC, a, b, c and d of peak 1

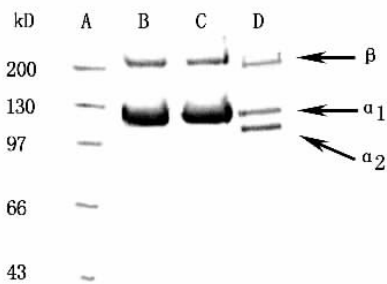


图 4 仿刺参胶原及 I 型胶原标准品的电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE of sea cucumber collagen and type I collagen markers

A: 次高分子量标准; B: 仿刺参胶原(样品溶解液无 β-巯基乙醇); C: 仿刺参胶原(样品溶解液含 β-巯基乙醇); D: 牛皮 I 型胶原标准.

A: Protein standard molecular markers; B: PSC (the sample solution without mercaptoethanol); C: PSC (the sample solution with mercaptoethanol); D: Type I collagen

3 讨论

3.1 胶原蛋白的提取

胶原蛋白是由 3 条 α 多肽链形成的 3 股螺旋结构,包括 N-端肽(N-telopeptide)、3 股螺旋区、C-端肽(C-telopeptide)。α 链的端肽形成胶原蛋白的球状结构区,3 条 α 链借助范德华力、氢键及共价交联聚合成 3 股螺旋结构,成为难溶性胶原蛋

白^[12]。仿刺参在系统发生上属于前口动物,与以脊椎动物为代表的后口动物相比,其胶原显著难溶,提取时可先用胃蛋白酶消化水解去末端,再用稀醋酸溶液提取溶出,称作胃蛋白酶促溶的胶原蛋白(PSC)^[13]。

盐析时,需将研细后的 NaCl 在搅拌下加入。若加入块状结晶 NaCl,会使胶原包绕着 NaCl 结晶块而沉淀下来,使块状 NaCl 难以溶解。同时,搅拌不要过于剧烈,以免产生气泡而使部分胶原变性。对 PSC 粗提液进行透析,不仅可以脱盐、除去小分子糖类及其它杂质,还能使胶原进一步溶解,主要包括对 Na₂HPO₄ 和低浓度乙酸透析。对 Na₂HPO₄ 透析时,透析液 pH 要达到 8.0 以上,以使胃蛋白酶彻底失活;对乙酸透析时,用 AgNO₃ 检验 Cl⁻。

3.2 胶原蛋白的鉴定

胶原蛋白的紫外光谱分析 胶原只含少量芳香族氨基酸,在 280 nm 处基本无吸收,而胶原肽链所含有的 C-O, -COOH, CO-NH₂ 都是生色基团,可以在 220 nm 附近产生大的光吸收。本研究所提取的胶原蛋白的最大吸收波长约为 220 nm,这与已报道胶原蛋白的光吸收特征相一致^[11]。

胶原蛋白的氨基酸组成分析 氨基酸含量的测定结果表明,仿刺参胶原中天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸含量较

高,可能不含胱氨酸、芳香族氨基酸、组氨酸含量极微。其中甘氨酸约占总氨基酸残基的 30% 左右,羟脯氨酸与脯氨酸之和约为 16%,羟脯氨酸与脯氨酸之比约为 0.7,类似于脊椎动物 I 型胶原,这显示所提取的胶原蛋白具有较高的纯度,并且其氨基酸组成和人 I 型胶原蛋白的氨基酸组成相近。

3.3 胶原蛋白的性质表征

胶原蛋白的热变性 天然状态下的胶原由 3 条多肽链缠绕而成,其被加热时,氢键断裂,导致胶原分子解缠绕,天然构象被破坏,这些状态的变化过程都会伴随着能量的变化。胶原热变性过程是在一个窄的温度间隔内 3 股螺旋的解缠绕过程,用 DSC 进行测量就可以得到其热稳定性信息^[14]。

胶原的热稳定性可由胶原纤维的 T_s 来表达。本研究测得牛皮 I 型胶原的 T_s 为 62 °C,而海参胶原蛋白的 T_s 为 57 °C,脊椎动物 I 型胶原的 T_s 一般为 60~65 °C。海参胶原的脯氨酸含量约为人胶原脯氨酸含量的 76.7%,相应的羟脯氨酸含量约为 60.6%,表明热收缩温度与全部亚氨基酸(脯氨酸+羟脯氨酸)的含量存在正相关性。这是由于亚氨基酸的吡咯环对二级结构所起的固定化以及由羟脯氨酸的羟基所形成的氢键对胶原螺旋的稳定化起着很大的作用。

仿刺参胶原的含糖量及除糖 仿刺参富含的粘多糖(GAG)可通过共价键与蛋白接合,是多聚阴离子,具有羧基与硫酸基团^[15]。次甲基蓝是一种异染性染料(metachromatic dye),低浓度时可与负离子亲水胶体相作用形成溶于水的异染变色配合物,从而导致染料颜色的变化,通过测定吸光值的变化可以比较简单的定量计算海参中粘多糖的含量^[9]。本文测得 PSC 粘多糖含量高达 0.48%,必须过柱纯化才可得到纯品。海参胶原在中性盐缓冲液平衡的 DEAE-52 柱上形成穿过峰,胶原所带粘多糖吸附柱上,从而可得到除去粘多糖的纯胶原制品,为下一步胶原活性研究打下了基础。

仿刺参胶原的类型及组成 胶原蛋白类型较多,Trotter 等^[8]研究发现,加州海参(*Cucumaria frondosa*)胶原蛋白组成为 $(\alpha_1)_3$,而 Saito 等^[7]则认为仿刺参(*Stichopus japonicus*)胶原的分子组成为 $(\alpha_1)_2\alpha_2$ 。本研究的 SDS-PAGE 结果表明,仿刺参胶原由 3 条相同的类 α_1 链组成,类似于 Trotter 等报道的加州海参胶原结构。Saito 等的研究结果可

能是提取过程中,胶原 α 链发生降解所致。比较图 4 中的蛋白样品 B(样品溶解液无 β -巯基乙醇)及 C(样品溶解液含 β -巯基乙醇)的电泳图谱发现,两个样品的电泳图谱完全一致,巯基乙醇的添加对胶原蛋白的提取无影响,这说明在仿刺参胶原蛋白三螺旋区无二硫键。

从 PSC 电泳谱图还发现,经考马斯亮蓝 R-250 染色后,胶原呈紫红色(metachromatically),而其他蛋白呈蓝紫色(orthochromatically)。以上结果均说明所提取的仿刺参 PSC 为典型的胶原蛋白。

参考文献:

- [1] 廖玉麟. 我国的海参[J]. 生物学通报, 2001, 35(9): 1-4.
- [2] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55: 1531-1546.
- [3] 郭晓风, 邹胜祥(译). 水产利用化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992. 276-277.
- [4] Omura Y, Urano N, Kimura S. Occurrence of fibrillar collagen with structure of $(\alpha_1)_2\alpha_2$ in the test of sea urchin *Asthenosoma ijimai* [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 115B, 1: 63-68.
- [5] Robinson J J. Comparative biochemical analysis of sea urchin peristome and rat tail tendon collagen[J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 117B, 2: 307-313.
- [6] Cluzel C, Lethias C, Garrone R, et al. Sea urchin fibrillar collagen 2 α chain participates in heterotrimeric molecules of $(1\alpha)_22\alpha$ stoichiometry[J]. Matrix Biology, 2000, 19: 545-547.
- [7] Saito M, Kunisaki N, Urano N, et al. Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Food Chemistry and Toxicology, 2002, 67, 4: 1319-1322.
- [8] Trotter J A, Lyons-Levy G, Thurmond F A, et al. Covalent composition of collagen fibrils from the dermis of the sea cucumber, *Cucumaria frondosa*, a tissue with mutable mechanical properties [J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 112A, 3/4: 463-478.
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 16-17.
- [10] 刘红英, 薛长湖, 李兆杰, 等. 海带岩藻聚糖硫酸酯测定方法的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2): 236-240.
- [11] 赵苍碧, 黄玉东, 李艳辉. 从牛腱中提取胶原蛋白的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 36(4): 516-519.
- [12] 陶凯忠, 陈尔瑜, 丁光宏. 胶原纤维的结构和生物力学[J]. 解剖科学进展, 1998(4), 4: 289-293.
- [13] Ramachandran G N. Stereochemistry of collagen[J]. J Peptide Protein Res, 1988, 31: 1-16.
- [14] Schubring R. DSC studies on deep frozen fishery products[J]. Thermochimica Acta, 1999, 337: 89-95.
- [15] 陈菊娣, 樊绘曾, 邢蕊凝, 等. 花刺参酸性粘多糖的分离研究[J]. 中国海洋药物, 1994, 1: 24-26.