

# 正北芪中一种免疫活性蛋白质提取工艺的优选

陈秀红, 任晋宏, 魏砚明, 薛慧清\*, 武福云, 李敏, 梁锐  
(山西中医学院 实验管理中心, 山西 晋中 030619)

**[摘要]** 目的: 优选正北芪中一种免疫活性蛋白 AmPR10-16 (16.0 kDa) 的提取工艺。方法: 以正北芪中 AmPR10-16 的可溶性蛋白二级结构的圆二色性考察提取温度, 在单因素试验基础上, 以 AmPR10-16 在 SDS-PAGE 胶图中的蛋白条带吸光度 (峰面积) 为指标, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验考察提取温度、料液比、提取时间、提取溶剂、粒度、提取次数对 AmPR10-16 提取工艺的影响, 辅以 BCA 法测定可溶性蛋白含量作为佐证。结果: AmPR10-16 最佳提取工艺为药材粉末过 4 号筛, 加 16 倍量 pH 8.0 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl) 于 40 °C 常压水浴提取 60 min, 每 10 min 搅拌 1 次。AmPR10-16 提取率 0.063 g·g<sup>-1</sup>。结论: 优化的提取工艺能正确反映 AmPR10-16 提取率的最高相对量, 为 AmPR10-16 的进一步研究提供了稳定、合理、可行的提取工艺。

**[关键词]** 正北芪; 蛋白质; 蛋白质二级结构; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 二喹啉甲酸法

**[中图分类号]**      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0013-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050013

## Optimization of Extraction Technology of An Immune Active Protein from Astragali Radix

CHEN Xiu-hong, REN Jin-hong, WEI Yan-ming, XUE Hui-qing\*, WU Fu-yun, LI Min, LIANG Rui  
(Experiment Management Center, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of an immune active protein (AmPR10-16) with a molecular weight of 16.0 kDa from Astragali Radix. **Method:** Extraction temperature was investigated by circular dichroism of water-soluble protein involving in AmPR10-16 with secondary structure from Astragali Radix. Extraction technology was optimized by single factor test and orthogonal test with gray value of AmPR10-16 as index which was determined by gel graphical analysis software. In this study, effects of temperature, solid-liquid ratio, time, solvent, granularity and times on gray value were investigated, for which determination of water-soluble protein was determined as an evidence by BCA method. **Result:** Optimum extraction process of AmPR10-16 was as follows: with Tris-HCl with pH 8.0 as solvent, solid-liquid ratio of 1:16, extraction time of 60 min with temperature at 40 °C, medicinal powder over the 4<sup>th</sup> sieve, stirring once every 10 min. Yield of AmPR10-16 was 0.063 g·g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** This optimal extraction technology can accurately reflect relative amounts of AmPR10-16 maximum extraction rate, it provides a stable, reasonable and feasible extraction process for further study of AmPR10-16.

**[Key words]** Astragali Radix; protein; secondary structure of protein; SDS-PAGE; BCA method

黄芪始载于《神农本草经》, 为临床常用补气药, 含有黄酮类、多糖类、皂苷类、氨基酸及微量元素

**[收稿日期]** 20151030(006)

**[基金项目]** 国家国际科技合作专项(2013DFA30700)

**[第一作者]** 陈秀红, 在读硕士, 从事中药提取分离纯化及活性成分研究, Tel:0351-3179766, E-mail: chenxh@126.com

**[通讯作者]** \* 薛慧清, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药及天然药物的提取分离纯化及活性研究, Tel:0351-3179766, E-mail: xuehuiqing@sina.com

等化学成分,具有促进机体代谢、促进血清和肝脏蛋白质更新、增强和调节机体免疫、增强心肌收缩功能、降血糖、抗肿瘤等药理作用<sup>[1-2]</sup>。本课题组前期已从黄芪中分离得到了具有明显免疫抑制作用的糖蛋白类化合物 HQGP<sup>[3-4]</sup>, AmGP-2<sup>[5]</sup>, AmGP-3<sup>[6]</sup> 及 AmPR10-16。药理学初步研究证明这 4 种黄芪蛋白对小鼠脾淋巴细胞有抑制作用,能够显著改善实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的发病,减轻炎性浸润,并可抑制髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 35-55 多肽诱导的脾淋巴细胞增殖反应<sup>[7]</sup>。本实验拟优选 AmPR10-16 的提取工艺,采用圆二色谱法<sup>[8-9]</sup> 考察提取温度,单因素方差分析筛选显著性因素,通过正交试验优化提取工艺,以 AmPR10-16 在聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶图中的蛋白条带吸光度为定量指标,利用 BCA 法测定显著性因素与正交试验中各样品的可溶性蛋白含量来证明所筛选提取工艺的合理性,为 AmPR10-16 的进一步研究提供稳定可行的提取工艺条件。

## 1 材料

MOS-500 型圆二色光谱仪(法国 Bio-Logic 公司), BIO-RAD3000 型电泳系统(美国 Bio-Rad 公司), SpectraMax 190 型酶标仪(美国 MD 公司), PHS-3C 型 pH 计(上海精科公司), HL-200 型高速多功能粉碎机(上海塞耐机械有限公司), A-1000S 型水流抽气机(上海爱朗仪器有限公司)。

正北芪购自山西浑原黄芪种植基地,经山西中医学院刘计权副教授教授鉴定为 4~5 年生豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根;4-羟乙基哌嗪乙磺酸,十二烷基硫酸钠(SDS)和二喹啉甲酸(BCA)蛋白质定量试剂盒均购自博士德生物公司;牛血清白蛋白(BSA)对照品(博士德生物公司,批号 20150116),非预染中低分子量标准蛋白 Marker(美国 Thermo 公司),三羟甲基氨基甲烷(Tris,北京索莱宝科技有限公司),水为双蒸水,试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 可溶性蛋白的圆二色性考察

**2.1.1 蛋白质标准溶液的配制** 取 BSA 对照品 10 mg,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)溶解并定容至 1 mL。取  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 蛋白标准溶液  $10.0 \mu\text{L}$ ,加 PBS 定容至 100 mL,得  $0.001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蛋白质标准溶液。

**2.1.2 测定条件** 室温  $18 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $45\% \sim 75\%$ 。圆二色(CD)光谱测试条件为样品质

量浓度  $0.001 \sim 0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,液池厚度 1 mm,起始波长 190 nm,终止波长 250 nm,步长 1 nm,重复 1 次,采集时间 1 s,CD 参数  $\pm (100 \sim 300) \text{ mD}$ ,CD 单位为椭圆率,狭缝宽度 2.0 nm。

**2.1.3 精密度试验** 吸取  $0.001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 标准溶液 250  $\mu\text{L}$ ,注入到 1 mm 石英比色池中,测定 CD 值,重复操作 6 次,以 PBS 溶液为空白,计算蛋白质标准溶液二级结构比率的 RSD 2.7%,表明仪器精密度良好。

**2.1.4 提取温度考察** 称定药材粉末(过 3 号筛)7 份,每份 5.0 g,各加入 PBS 50 mL,称定,分别在 4, 25, 40, 55, 70, 85, 100  $^\circ\text{C}$  时水浴提取 60 min,4  $^\circ\text{C}$  于冰箱中浸提 60 min,每 10 min 搅拌 1 次,静置片刻,冷至室温,称定,加 PBS 补足质量。取提取混合液置于布氏漏斗抽滤装置中抽滤,滤液过  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜,得滤液作为待测溶液,吸取待测溶液 250  $\mu\text{L}$  置于 1 mm 石英比色池中,测定 CD 值,见图 1。结果显示 4, 100  $^\circ\text{C}$  有明显的二级结构 CD 谱;其他温度的蛋白质的 CD 谱图为一趋向于 X 轴的曲线。说明随着温度的升高,可溶性蛋白中部分蛋白的二级结构在发生折叠变化,4  $^\circ\text{C}$  时样品的蛋白质二级结构为  $\alpha$ -螺旋(222 nm),100  $^\circ\text{C}$  时为  $\beta$ -转角(212 nm)。

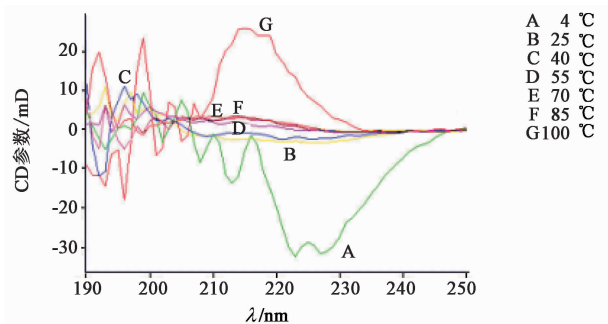


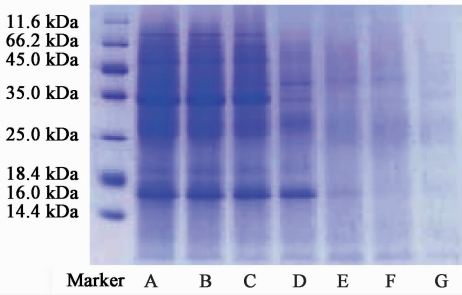
图 1 不同提取温度对黄芪中可溶性蛋白 CD 谱的影响

Fig. 1 CD spectra of soluble protein in Astragali Radix at 4, 25, 40, 55, 70, 85, 100  $^\circ\text{C}$

### 2.2 单因素试验考察

**2.2.1 提取温度** 称定药材粉末(过 3 号筛)7 份,每份 5.0 g,按 2.1.4 项下条件提取。配制 15% 分离胶和 5% 浓缩胶,加样 10  $\mu\text{L}$  和 Marker 7.0  $\mu\text{L}$ ,电泳条件为电压  $80 \sim 120 \text{ V}$ ,采用 Image 软件与 SPSS 17.0 统计学软件对蛋白条带进行分析,见图 2。计算 AmPR10-16 蛋白质条带的吸光度分别为 14 542.590, 13 149.429, 12 594.312, 9 863.528, 4 656.852, 2 609.401, 948.753。结果显示随着温度的升高,AmPR10-16 蛋白质色带依次变浅,蛋白质

杂色带依次也变浅,故提取温度的选择水平定为 40,55,70 °C。

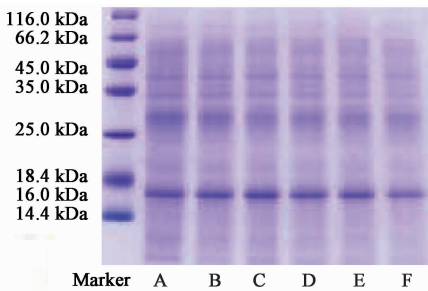


A. 4 °C ; B. 25 °C ; C. 40 °C ; D. 55 °C ; E. 70 °C ; F. 85 °C ; G. 100 °C

图 2 不同温度提取的 AmPR10-16 的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE gel diagram of AmPR10-16 under different extraction temperature

**2.2.2 料液比** 称定药材粉末(过 3 号筛)6 份,每份 5.0 g,分别加入 PBS 30,40,50,60,70,80 mL,称定,于 55 °C 时水浴提取,其他条件同 2.1.4 项,见图 3。结果 AmPR10-16 蛋白质条带的吸光度依次为 15 227.804,18 227.543,23 474.811,24 402.127,27 675.161,23 747.473。说明随着料液比的逐渐增大,AmPR10-16 蛋白质色带先深后浅,故料液比水平选择 1:12,1:14 和 1:16。



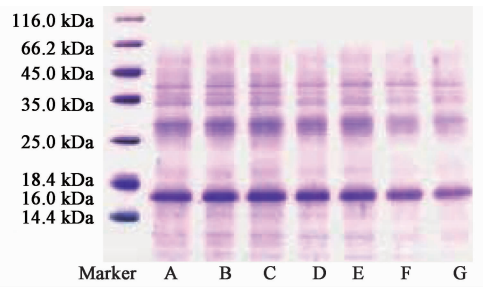
A. 1:6 ; B. 1:8 ; C. 1:10 ; D. 1:12 ; E. 1:14 ; F. 1:16

图 3 不同料液比提取的 AmPR10-16 的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE gel diagram of AmPR10-16 under different solid-liquid ratio

**2.2.3 提取时间** 称定药材粉末(过 3 号筛)7 份,每份 5.0 g,各加入 PBS 50 mL,于 55 °C 水浴提取 30,40,50,60,70,80,90 min,其他条件同 2.1.4 项,见图 4。计算 AmPR10-16 蛋白质条带的吸光度分别为 11 436.130,11 140.890,12 770.767,9 705.470,9 269.729,6 799.570,5 893.863。结果显示随着提取时间的延长,AmPR10-16 蛋白质色带先深后浅,吸光度先升高后降低,故提取时间水平选择 40,50,60 min。

**2.2.4 提取溶剂种类** 称定药材粉末(过 3 号筛)5 份,每份 5.0 g,分别加入 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸-乙酸

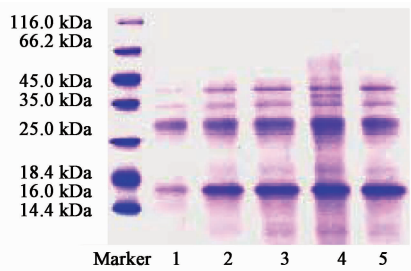


A. 30 min ; B. 40 min ; C. 50 min ; D. 60 min ; E. 70 min ; F. 80 min ; G. 90 min

图 4 不同时间提取的 AmPR10-16 的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE gel diagram of AmPR10-16 under different extraction time

铵缓冲液(pH 5.0),25 mmol·L<sup>-1</sup> 2-(N-吗啉代)乙烷磺酸缓冲液(MES,pH 6.0),25 mmol·L<sup>-1</sup> 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(HEPES,pH 7.0),PBS 缓冲液(pH 7.4),25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)各 50 mL,提取温度 55 °C,其他条件同 2.1.4 项,见图 5。计算 AmPR10-16 蛋白质条带的吸光度分别为 691.007,3 538.375,4 556.253,4 795.594,4 977.576。说明随着 pH 的增大,AmPR10-16 蛋白质色带依次加深,吸光度依次增大,故提取溶剂选择 HEPES,PBS 和 Tris-HCl。



1. 乙酸-乙酸铵缓冲液;2. MES;3. HEPES;4. PBS;5. Tris-HCl

图 5 不同溶剂提取的 AmPR10-16 的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE gel diagram of AmPR10-16 with different extraction solvent

**2.2.5 粒度** 称定 1~6 号筛药材粉末各 5.0 g,各加入 PBS 50 mL,提取温度 55 °C,其他条件同 2.1.4 项,见图 6。计算 AmPR10-16 蛋白质条带的吸光度依次为 7 669.247, 9 139.089, 11 662.712, 17 780.570,13 414.209,13 060.268。说明随着粉末粒度的减小,AmPR10-16 蛋白质色带先深后浅,吸光度先增大后减小,故选用 4 号筛粉末。

**2.2.6 提取次数** 称定药材粉末(过 4 号筛)5.0 g,提取温度 55 °C,其他条件同 2.1.4 项,提取 3 次,每次滤液单独放置。结果 AmPR10-16 蛋白质条带的吸光度依次为 11 233.693,2 302.423,1 179.976。

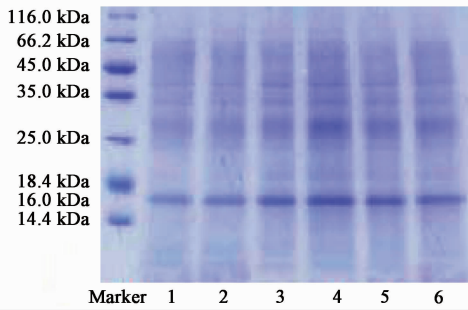


图 6 粒度对 AmPR10-16 的 SDS-PAGE 的影响

Fig. 6 SDS-PAGE gel diagram of AmPR10-16 under different granularity

说明随着提取次数的增多, AmPR10-16 蛋白质色带由深至浅, 吸光度由大变小, 提取 1 次即可将大部分的 AmPR10-16 蛋白质浸提出来, 故在规模生产中, 建议提取 2 次。

### 2.3 AmPR10-16 的提取工艺优选

**2.3.1 正交试验设计** 选择提取温度、料液比、提取时间、提取溶剂为考察因素, 每个因素设 3 个水平, 选用  $L_9(3^4)$  正交表, 以 AmPR10-16 蛋白质条带的吸光度为指标。称定药材粉末(过 4 号筛)9 份, 每份 5.0 g, 按一定条件提取, 试验安排及结果见表 1 和图 7, 方差分析见表 2。由直观分析可知, 各因素影响提取工艺的顺序为  $A > D > C > B$ 。以极差最小的因素 C 为误差项进行方差分析, 结果发现因素 A, D 具有极显著性差异, 因素 B 则无显著性影响, 选择最佳提取工艺条件为  $A_1B_3C_3D_3$ , 即向药材粉末(过 4 号筛)中加 16 倍量 pH 8.0 的 Tris-HCl 于 40 °C 常压水浴提取 60 min, 每 10 min 搅拌 1 次。

表 1 正北芪中 AmPR10-16 蛋白质提取条件正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction conditions of AmPR10-16 in Astragali Radix

No.	A 提取温度/°C	B 料液比	C 提取时间/min	D 提取溶剂	吸光度
1	40	1:12	40	HEPES	429 464. 724
2	40	1:14	50	PBS	468 670. 529
3	40	1:16	60	Tris-HCl	776 509. 848
4	55	1:12	50	Tris-HCl	574 881. 345
5	55	1:14	60	HEPES	346 246. 395
6	55	1:16	40	PBS	368 923. 721
7	70	1:12	60	PBS	113 741. 295
8	70	1:14	40	Tris-HCl	436 618. 203
9	70	1:16	50	HEPES	110 531. 627

**2.3.2 精密度试验** 吸取 Marker 7.0  $\mu\text{L}$ , 用 Image 软件分别计算 14.4, 18.4 kDa 标准蛋白在 SDS-PAGE 胶图中蛋白条带吸光度的 RSD 分别为 2.2%, 2.0%, 表明仪器精密度良好。

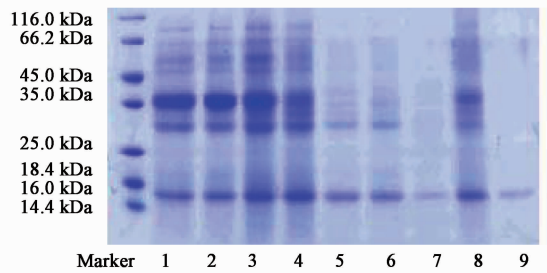


图 7 正交试验各样品的 SDS-PAGE

Fig. 7 SDS-PAGE gel diagram of different samples in orthogonal test

表 2 AmPR10-16 蛋白质提取条件方差分析

Table 2 ANOVA on extraction conditions of AmPR10-16

方差来源	SS	F	MS	P
A	$1.75 \times 10^{11}$	117.78	$8.73 \times 10^{10}$	<0.01
B	$4.09 \times 10^9$	2.76	$2.05 \times 10^9$	>0.05
C(误差)	$1.48 \times 10^9$	1.00	$7.41 \times 10^8$	
D	$1.69 \times 10^{11}$	113.73	$8.43 \times 10^{10}$	<0.01

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

**2.3.3 稳定性试验** 吸取供试品溶液 80.0  $\mu\text{L}$ , 加入 5  $\times$  SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 20.0  $\mu\text{L}$ , 按 2.1.4 项下方法操作, 测定样品在 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 min 的吸光度, 计算 RSD 2.0%, 表明 45 min 内样品稳定性良好。

**2.3.4 重复性试验** 吸取 6 份供试品溶液各 80.0  $\mu\text{L}$ , 加入 5  $\times$  SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 20.0  $\mu\text{L}$ , 按 2.1.4 项下方法操作, 结果样品吸光度的 RSD 1.6%, 表明该方法重复性良好。

### 2.4 可溶性蛋白的含量测定

**2.4.1 标准曲线的绘制** 依 BCA 试剂盒所示, 取 BSA 对照品 1 支, 加入 PBS 1 mL, 得 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  储备液。根据对照品和样品的数量, 按 BCA 试剂 A-BCA 试剂 B(50:1) 配制成适量 BCA 工作液, 充分混匀。吸取 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 储备液 10  $\mu\text{L}$ , 加入 PBS 至 1 mL, 取 25  $\mu\text{L}$  分别加入 96 孔板的微孔中, 各孔加入 BCA 工作液 200  $\mu\text{L}$ , 充分混匀, 盖上 96 孔板盖, 37 °C 孵育 30 min, 冷却至室温, 于 562 nm 处测定吸光度 A。重复操作 6 次, 计算 RSD 2.0%, 表明仪器精密度良好。依 BCA 试剂盒所示, 将储备液稀释至 25, 125, 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 按上述方法操作, 于 562 nm 处测定 A, 以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程  $Y = 0.890 5X + 0.036 5$  ( $R^2 = 0.998 4$ ), 线性范围 25 ~ 2 000  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.4.2 样品测定** 选取显著性影响因素提取温度和提取溶剂所得可溶性蛋白进行含量测定 ( $n = 3$ ),

结果不同提取温度样品中可溶性蛋白质量分数分别为 0.067, 0.063, 0.058, 0.054, 0.049, 0.038, 0.026  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 不同提取溶剂样品中则分别为 0.031, 0.050, 0.053, 0.054, 0.058  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。说明随着提取温度的升高, 可溶性蛋白的含量依次降低, 4  $^{\circ}\text{C}$  时最高; 随着溶剂的 pH 的升高, 可溶性蛋白的含量依次升高, Tris-HCl 的含量最高, 这一趋势与 AmPR10-16 蛋白的相一致。正交试验各样品(编号 1~9)中可溶性蛋白质量分数分别为 0.056, 0.061, 0.063, 0.056, 0.053, 0.053, 0.047, 0.050, 0.048  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。说明可溶性蛋白的含量高不完全代表 AmPR10-16 提取率高, 以目标蛋白的提取率为指标优选的提取条件更合理。

### 3 讨论

治疗自身免疫性疾病和器官移植抗排斥反应中, 免疫抑制剂使用量较大, 但临床上使用的西药类免疫抑制剂毒副作用大。中药历来以药效广泛、毒副作用小为优点, 可弥补西药的不足, 尤其对于长期用药的慢性排异、自身免疫性疾病。目前, 国内研究成熟的中药免疫抑制剂只有雷公藤多苷<sup>[10]</sup>, 国外有日本研发的冬虫夏草提取物修饰产品 FTY720<sup>[10]</sup>。提示中药免疫抑制剂的开发意义较大。

药理学研究证明黄芪蛋白对小鼠脾淋巴细胞有抑制作用<sup>[11-12]</sup>; 对佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 模型大鼠和实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 模型小鼠有治疗作用<sup>[7, 13-14]</sup>。同时淋巴细胞体外增殖试验显示, 黄芪蛋白抑制作用不同于雷公藤甲素、雷帕霉素、氢化考的松, 推测其具有独特的作用机制<sup>[15]</sup>。

本文在以往黄芪可溶性蛋白提取及纯化<sup>[3-6, 16-18]</sup>的基础上, 进一步提出以提高目标蛋白 AmPR10-16 的提取率及降低其纯化难度为目标, 从提取温度、料液比、提取时间、提取溶剂、药粉粒度、提取次数等因素进行考察。其中, 对提取温度的筛选, 采用圆二色谱法对可溶性蛋白的二级结构进行考察, 以求与所得纯品 AmPR10-16 (纯度 > 95%) 的蛋白质二级结构进行比照, 如果纯品 AmPR10-16 的蛋白二级结构拟合于  $\alpha$ -螺旋, 则提取温度 < 55  $^{\circ}\text{C}$  更合理, 反之则 > 55  $^{\circ}\text{C}$  更合理; 辅以 BCA 法测定可溶性蛋白含量, 结合温度因素的 SDS-PAGE 图与正交试验结果, 证明以目标蛋白的提取率为指标所选提取条件更科学合理。

#### [参考文献]

[1] 孙政华, 邵晶, 郭玫. 黄芪化学成分及药理作用研究

进展[J]. 中医临床研究, 2015, 7(25): 22-25.

- [2] 熊明彪. 黄芪的药理作用及临床研究进展[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(10): 70-71.
- [3] 冯前进, 薛慧清, 杨向竹, 等. 一种黄芪糖蛋白及其制备方法和用途: 中国, 101962402A[P]. 2012-04-11.
- [4] 周然, 冯前进, 薛慧清, 等. 一种黄芪糖蛋白及其制备方法和用途: 中国, CN103450354A[P]. 2013-12-18.
- [5] 李敏, 高丽, 岳晓华, 等. 黄芪糖蛋白的分离纯化及其理化性质、组成成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 48-51.
- [6] 张俊英, 薛慧清, 冯前进, 等. 正北芪中一种活性糖蛋白的分离纯化及理化性质研究[C]. 北京: 中国生物化学与分子生物学会中医药生物化学与分子生物学会学术年会, 2013.
- [7] 章培军, 郭敏芳, 张丽红, 等. 黄芪糖蛋白小鼠 EAE 的作用研究[J]. 山西大同大学学报: 自然科学版, 2012, 28(5): 42-44.
- [8] 盛家镛, 许管, 刘敏, 等. 大鼠园蛛丝腺蛋白二级结构的圆二色性研究[J]. 科学技术与工程, 2002, 2(6): 27-30.
- [9] 沈星灿, 梁宏, 何锡文, 等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展[J]. 分析化学, 2004, 32(3): 388-394.
- [10] 于晓红. 免疫抑制剂的研究进展[J]. 中华高血压杂志, 2015, 23(2): 343-344.
- [11] 杨向竹, 薛慧清, 冯前进, 等. 黄芪糖蛋白对 T 淋巴细胞增殖活性的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(5): 66-68.
- [12] 杨向竹, 薛慧清, 冯前进, 等. HQ0805 对小鼠淋巴细胞体外活化的抑制作用[J]. 山西中医, 2009, 25(8): 45-46.
- [13] 赵俊云, 刘亚明, 冯前进, 等. 黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠外周血细胞因子及关节滑膜组织形态学的影响[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5): 78-80.
- [14] 赵俊云, 杨向竹, 季新燕, 等. 黄芪糖蛋白诱导佐剂性关节炎大鼠体内细胞凋亡的研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1204-1207.
- [15] 杨向竹, 赵俊云, 崔向青, 等. 黄芪糖蛋白、雷公藤甲素、雷帕霉素和氢化考的松体外免疫抑制作用的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2411-2414.
- [16] 闫巧娟. 蒙古黄芪中多糖、皂甙及活性蛋白的提取分离[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [17] 齐笑玮. 蒙古黄芪中两种生物活性蛋白的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [18] 包华音, 刘杨. 单因素考察和正交试验结合优选黄芪药材蛋白质提取工艺[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(10): 2190-2193.

[责任编辑 刘德文]