

杏仁组织中蛋白质实验室提取方法优化

高芳*

(白城医学高等专科学校, 吉林 白城 137000)

[摘要] 目的: 优选杏仁组织中蛋白质的实验室提取方法。方法: 采用盐析法、分离蛋白法、反胶束法、碱溶酸沉法、盐碱法提取杏仁组织蛋白, 通过凯氏定氮法测定杏仁组织蛋白含量, 对比分析蛋白含量和蛋白提取率, 应用一维 SDS-PAGE 电泳对提取蛋白的种类进行测定。结果: 盐析法、分离蛋白法、反胶束法、碱溶酸沉法、盐碱法提取的组织蛋白提取率分别为 39.41%、25.63%、0.326%、40.02%、41.85%, 蛋白质量分数分别为 75.667%、44.986%、5.372%、60.056%、51.379%, 蛋白粉质量分别为 8.6、9.1、0.823、9.8、6.259 g, 盐析法提取杏仁组织中蛋白质含量和提取率最高。SDS-PAGE 电泳图谱显示碱溶酸沉法、分离蛋白法、反胶束法的电泳条带均为 4 条, 盐析法有 5 条, 盐碱法只有 3 条, 说明盐析法提取的蛋白质种类最多。结论: 在实验室条件下采用盐析法从杏仁组织中提取蛋白质效果最佳。

[关键词] 杏仁; 蛋白质; 提取方法; 提取率; 电泳法

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0038-03

[doi] 10.11653/syjf2013170038

Optimization of Laboratory Extraction Method for Tissue Proteins in Armeniaca Semen Amarum

GAO Fang*

(Baicheng Medical College, Baicheng 137000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize laboratory extraction method of tissue proteins in Armeniaca Semen Amarum. **Method:** Tissue proteins in Armeniaca Semen Amarum were extracted by salting-out method, protein separation method, reverse micelles method, alkali extraction and acid precipitation method, alkaline method, the content of tissue protein was determined by Kjeldahl method, comparative analysis of proteins content and proteins extraction rate was adopted, kinds of extraction proteins was measured by application of a one-dimensional SDS-PAGE electrophoresis. **Result:** Extraction rates of tissue proteins using salting-out method, protein separation method, reverse micelles method, alkali extraction and acid precipitation method, alkaline method were 39.41%, 25.63%, 0.326%, 40.02%, 41.85%, respectively; protein contents were 75.667%, 44.986%, 5.372%, 60.056%, 51.379%, respectively; weights of protein powder were 8.6, 9.1, 0.823, 9.8, 6.259 g, while salting-out method showed the highest of proteins content and proteins extraction rate. SDS-PAGE electrophoresis pattern showed 4 electrophoretic bands by alkali extraction and acid precipitation method, protein separation method, reverse micelles method, salting-out method had 5 electrophoretic bands, alkaline method only 3, indicating that there was the largest number of protein species by salting-out method. **Conclusion:** Under laboratory conditions, salting-out method had the best effect on extracting proteins from tissue of Armeniaca Semen Amarum.

[Key words] Armeniaca Semen Amarum; protein; extraction method; extraction rate; electrophoresis

[收稿日期] 20130407(004)

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金课题(2011153C86)

[通讯作者] *高芳, 学士, 副教授, 从事天然产物提取工艺研究, Tel: 1384350846, E-mail: admini@126.com

杏仁常用于治疗心烦燥热、头疼等病痛^[1]。现代研究表明杏仁具有降血糖、镇痛抗炎、镇咳平喘、抗肿瘤等活性,其主要药效成分为杏仁组织蛋白^[2]。目前,从杏仁组织中提取蛋白的最佳方法尚无定论,蛋白质提取效率普遍较低,导致原材料的严重浪费^[3]。本实验旨在探索实验室条件下提取杏仁组织蛋白的最佳方法,为杏仁蛋白的药效学研究提供参考。

1 材料

雷磁 ST-3 型 pH 计(江苏金城国胜实验仪器厂),AL204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),DS-3660 型凯氏定氮仪(江苏金城国胜实验仪器厂),PacBasic101 型电泳仪(日本三洋公司),GT-3F-1 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),8S-1 型磁力搅拌器(江苏金城国胜实验仪器厂)。

杏仁(产自河北承德杏园,经河北省食品药品监督管理局丘永丽高级鉴定师鉴定),聚乙二醇-2-乙基己基琥珀酸酯磺酸钠(AOT)(北京红星化工厂),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 杏仁组织蛋白的提取

2.1.1 盐析法 将杏仁去皮、粉碎,称取适量的杏仁粉,用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液进行溶解,杏仁粉和缓冲液按 1:11 配置溶液,放置 1 h,超声粉碎 30 min(为避免蛋白质高温变性,同时应用冰浴对溶液进行间隙冷却,每 1 s 间隙 3 s),于 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min(3~4 °C,下同),取上清液,按 $151 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末,使溶液的饱和度达 25%,于 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,取上清液,按 $160 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末,使溶液的饱和度达 50%,于 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,收集沉淀,用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液将收集的沉淀进行溶解,放入相对分子质量 4000 的透析袋中 24 h,预冻,晾干^[4]。

2.1.2 分离蛋白法 将杏仁去皮、粉碎,称取一定量研磨好的杏仁粉放入烧杯中,用 20 倍量水进行溶解,磁力搅拌 45 min,于 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,取上清液,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调 pH 5.0,用玻璃棒搅拌 20 min,于 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,收集沉淀,用水冲洗 6~7 次,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调 pH 7.0,冷冻存放 12 h,干燥^[5]。

2.1.3 反胶束法 按配置 $0.09 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 反胶束溶液的标准称取 AOT,置于锥形瓶中,加入适量异辛烷,于磁力搅拌下将表面活性剂溶解完全,加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 缓冲液(每 1 mL 反胶束溶液中加 0.05

mL),磁力搅拌 1.5 h,于 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,观察溶液,如呈透明状则反胶束配置成功,反之失败。取配置好的反胶束溶液 1 L,加入研磨好的杏仁粉 30 g,于 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 2.5 h(35 °C),离心,得去除杏仁杂质的前萃溶液。向该溶液中加入等体积的 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液和 pH 7.6 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液,于 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 1.5 h,于 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取下层溶液放入透析袋中除盐,真空冷冻干燥^[6]。

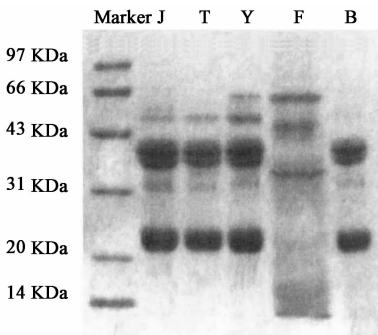
2.1.4 碱溶酸沉法 按 NaOH-杏仁粉质量比 30:1 的规格在研磨好的杏仁粉末中加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液,调 pH 9.0,于 50 °C 水浴锅中加热 45 min,每 5 min 用玻璃棒搅拌 1 次,用两层布氏漏斗过滤,将杏仁残渣去除,于 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、3 °C 离心 20 min,收集上清液,用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 调 pH 5.0,相同条件离心,取沉淀,将收集的沉淀用水溶解,调 pH 7.0,冷冻 12 h,干燥^[7]。

2.1.5 盐碱法 称取一定量研磨好的杏仁粉在 PBS 缓冲液中溶解,搅拌 45 min,超声击碎,于 50 °C 水浴加热 45 min, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、3 °C 离心 20 min,取沉淀物和上清液。将沉淀物用碱法处理,上清液用盐析法处理,将得到的沉淀混合,用水溶解,透析,冷冻干燥^[8]。

2.2 蛋白质的含量测定 采用凯式定氮法对上述 5 种方法提取的蛋白质进行测定。在试管内放入样品 0.1 g,分别加入 CuSO_4 和 K_2SO_4 0.1, 5 g,加入 H_2SO_4 10 mL,于 200 °C 微火加热至样品炭化,当样品停止冒泡后用强火于 35 °C 加热 45 min,当瓶内液体澄清后停止。称取 3 份 Na_2CO_3 分别放入 3 个锥形瓶中,各加入 3 滴甲基红指示剂和水 60 mL,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 进行滴定。硝化后的样品用凯式定氮仪测量,记录蛋白纯度^[9]。结果采用盐析法、分离蛋白法、反胶束法、碱溶酸沉法、盐碱法提取的蛋白质量分数分别为 75.667%, 44.986%, 5.372%, 60.056%, 51.379%, *t* 检验显示盐析法与另外 4 种方法提取的蛋白质含量有统计学差异($P < 0.05$)。计算各方法得到的蛋白粉质量分别为 8.6, 9.1, 0.823, 9.8, 6.259 g,应用凯式定氮法测得杏仁蛋白纯度 41.38%,根据公式计算提取率分别为 39.41%, 25.63%, 0.3264%, 40.02%, 41.85%,显示盐碱法提取率最高,同盐析法和碱溶酸沉法间无统计学差异。

提取率 = 提取蛋白粉质量 × 蛋白含量(粉) / 杏仁质量 × 蛋白含量(杏仁)

2.3 SDS-PAGE 电泳 称取丙烯酰胺 29.7 g 和甲叉双丙烯酰胺 1 g, 用 100 mL 水溶解, 过滤, 于 5 ℃ 棕色瓶中保存, 得丙烯酰胺贮液; 称取三羟甲基氨基甲烷 8.9 g, 用 50 mL 水溶解, 用 5 mol·L⁻¹ 的 HCl 调 pH 9.0, 加水定容至 60 mL, 得分离胶缓冲液; 称取三羟甲基氨基甲烷 6.01 g, 用 50 mL 水溶解, 用 5 mol·L⁻¹ 的 HCl 调 pH 6.7, 加水定容至 60 mL, 得浓缩胶缓冲液。按《生化实验技术》中配胶方法进行 20% 分离胶和 5% 浓缩胶的配制。取待测的蛋白样品 1 mg, 加入缓冲液 1 mL, 水浴煮沸 5 min, 点样, 电泳, 染色和脱色处理至可看见清晰的蛋白条带, 见图 1。结果显示碱溶酸沉法、分离蛋白法、反胶束法的电泳条带均为 4 条, 盐析法有 5 条, 盐碱法只有 3 条。标准蛋白中已知相对分子质量 (*Mr*) 为 97, 31, 14, 66, 43, 20 kDa, 根据相对迁移率 (*r*) 和标准蛋白 *Mr* 作标准曲线 $\log Mr = -1.0175r + 2.1225$, 计算显示 *Mr* 在 7~62 kDa 的亚基通过不同方式组成了杏仁蛋白。应用不同提取方法得到的杏仁蛋白种类各不相同, 根据 Sathe 等^[10] 研究证实杏仁蛋白中 *Mr* 在 12~99 kDa 的蛋白质为杏仁组织蛋白, 同时研究证实用 SDS-PAGE 电泳计算得到的 *Mr* 和杏仁组织蛋白质量间存在等价性^[11]。



J. 碱溶酸沉法; T. 分离蛋白法; Y. 盐析法; F. 反胶束法; B. 盐碱法
图 1 杏仁蛋白质的 SDS-PAGE 电泳

3 讨论

通过比较实验室提取杏仁组织蛋白常用的 5 种方法, 发现盐析法提取的杏仁组织蛋白质量分数最高, 盐碱法和碱溶酸沉法的蛋白提取率略高于盐析法, 但差异无统计学意义; 通过 SDS-PAGE 电泳发现盐析法提取的蛋白质种类数最多, 故确定盐析法为实验室提取杏仁组织蛋白的最佳方法。最新研究

发现杏仁组织蛋白具有抑制癌细胞活性的药用活性^[12], 通过有效提高杏仁组织蛋白的得率, 可减少杏仁组织蛋白药效学研究的成本, 为抗癌活性药物的开发提供新方向。

[参考文献]

[1] 张金艳, 何萍, 李贻奎. 苦杏仁、桔梗及二者配伍止咳、祛痰作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 173.

[2] 李成, 姚品, 徐赫. 哺乳期锌缺乏对小鼠海马锌离子含量影响的研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2011, 12(3): 304.

[3] 王世君, 刘保国, 李志英, 等. 复方杏仁面膜对黄褐斑患者血清 SOD、MDA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(9): 71.

[4] 王巍杰, 徐长波, 程红燕. 盐析法分离藻蓝蛋白的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(5): 238.

[5] Hiroyuki F, Tomohide Y, Kazunori O. Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and borderline and mildly hypertensive subjects[J]. Nutr Res, 2010, 21(8): 1149.

[6] 王聪慧, 邱仁扬, 李敏, 等. 栗山天牛提取物主要营养成分分析与评价[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2011, 12(3): 326.

[7] Ames M M, Moyer T P, Kovach J S, et al. Pharmacology of amygdalin (laetrile) in cancer patients[J]. Cancer Chemoth Pharm, 2002, 6(1): 51.

[8] 刘刚, 王春燕, 宋阳成. 葵花籽粕中蛋白质提取工艺的优化[J]. 长春师范学院学报, 2011, 30(3): 82.

[9] Zdybel E, Iwaniak A. Food proteins as the source of peptides with antihypertensive activity[J]. Nat Sci, 2000, 15(6): 25.

[10] Sathe S K, Sze K W C. Thermal aggregation of almond protein isolate[J]. Food Chem, 1997, 59(1): 95.

[11] ZHANG Z L, ZHANG Z D, ZHANG X N, et al. An ultrasound-assisted extraction technology of almond dregs protein[J]. Front Agric China, 2010, 4(1): 69.

[12] Serbecic N, Beutelspacher S C. Anti-oxidative vitamins prevent lipid-peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells[J]. Cell Tissue Res, 2005, 320(3): 465.

[责任编辑 仝燕]