

文章编号:1673-1689(2008)04-0075-04

DEAE 纤维素分离猪血清蛋白

罗磊¹, 樊金铃¹, 丁霄霖²

(1. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 对 DEAE 纤维素 52(简称 DE52)分离猪血清蛋白进行了研究。结果表明: pH 7.4 时, 以 0~0.3 mol/L 的 NaCl 磷酸盐缓冲液梯度洗脱, DE52 可以将血清蛋白分为 7 个部分。在梯度洗脱的基础上, 分别以 NaCl 浓度 0、0.05、0.08、0.1、0.12、0.15、0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液进行阶段洗脱, 将血清蛋白分为 8 个部分。

关键词: 猪血清蛋白; DEAE 纤维素 52; 分离纯化

中图分类号: Q 503; Q 592.1

文献标识码: A

Study of Porcine Serum Protein Fractionated by Diethylaminoethyl Cellulose

LUO Lei¹, FAN Jin-ling¹, DING Xiao-lin²

(1. College of Food and Biotechnology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This manuscript studied the porcine serum protein fractionated by Diethylaminoethyl Cellulose 52. The result showed seven fractions were obtained eluted with 0~0.3mol/L NaCl PBS when pH is 7.4. Eight Parts of porcine serum protein were obtained by Phase Elution and the concentration of NaCl in PBS are 0,0.05,0.08,0.1,0.12,0.15,0.2 mol/L.

Key words: Porcine Serum protein; Diethylaminoethyl Cellulose 52; separate

猪血由红细胞和血浆组成, 其中血浆蛋白约占血液总量的 4.6%。在除去纤维蛋白原的血清中, 蛋白质组成非常复杂, 其中白蛋白含量最高, 其次为免疫球蛋白。除了免疫球蛋白, 猪血清中的运铁蛋白、溶菌酶均具有生物活性。根据国家统计局的数据, 2004 年我国猪血产量达到 140 万吨, 而这些猪血并没有得到有效的利用, 因此从猪血中提取各种活性蛋白具有“变废为宝”的作用。目前, 对于猪血中各种活性蛋白的应用, 正日益引起人们的重视^[1]。

猪血清中 G 型免疫球蛋白(简称 IgG)的等电点为 7.4, 当洗脱液 pH 值为 7.4 时 IgG 不带电, 而此时血清中其它蛋白质带负电荷, 为阴离子。根据各种猪血清蛋白与 DEAE 纤维素 52(简称 DE52)结合程度强弱的不同, 通过改变离子强度, 可以将不同的蛋白质分别洗脱下来, 达到分离纯化的目的^[2,3]。为了充分开发猪血资源, 特别是对血清中各类具有生物活性蛋白质的利用, 作者以 DEAE 纤维素 52 对猪血清蛋白进行了分离纯化研究^[4]。

收稿日期: 2007-07-27.

作者简介: 罗磊(1976-), 男, 河南南阳人, 工学博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生物保健食品、药食同源食品的应用与开发, 以及天然活性物质的研究. Email: Luolei_cn@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

DEAE 纤维素 52, 美国 Whatman 公司产品; HD-3 型紫外检测仪, 上海沪西仪器厂制造; DB-3 型层析谱数据分析系统, 南京新校园生物技术研究所以制造; HL-1 型恒流泵, BSZ-100 型自动分步收集器, 上海沪西仪器厂制造; TB20-1000 型梯度搅拌器, 上海新波无线电厂制造; MK3 型酶标仪, 上海雷勃仪器厂制造; DYCZ-24D 型电泳槽, 北京市六一仪器厂制造。猪血采自无锡市肉联厂, 4 ℃ 8 000 r/min 离心 10 min, 除去血球和纤维蛋白原, 得到血清。猪 IgG, 白蛋白标样自 Sigma 公司购得。

1.2 试验方法

1.2.1 DE52 色谱柱的制备

1) 称取一定量的 DE52, 加入 20 倍体积 0.5 mol/L 的 HCl 中, 放置 50 min 并轻轻搅拌。将 DE52 移入布氏漏斗抽滤并用蒸馏水洗至 pH 大于 4。

2) 将抽滤后的 DE52 移入 20 倍体积 0.5 mol/L 的 NaOH 中, 放置 50 min 并轻轻搅拌。将 DE52 移入布氏漏斗抽滤并用蒸馏水洗至 pH 小于 8。

3) 将 DE52 移入 20 倍体积缓冲液中, 真空脱气后装柱, 用 1 000 mL pH 7.4 的 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液平衡。

1.2.2 猪血清蛋白样品的色谱分离

1) 猪血清蛋白的梯度洗脱: 取 0.5 mL 离心后的血清上样, 以 250 mL pH 7.4 的 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液和 250 mL pH 7.4、NaCl 浓度为 0.3 mol/L 的 0.01 mol/L 磷酸盐 NaCl 缓冲液梯度混合洗脱, 体积流量 0.5 mL/min。

2) 猪血清蛋白的阶段洗脱: 取 0.5 mL 离心后的血清上样, 以 pH 7.4 并选取合适 NaCl 浓度的 0.01 mol/L 磷酸盐 NaCl 缓冲液进行阶段洗脱, 体积流量 1 mL/min。

1.2.3 DE52 色谱柱的再生和平衡 用 1 000 mL 20 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱再生, 用 1 000 mL pH 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液平衡, 然后即可再次上样。

1.2.4 样品洗脱峰蛋白组成检测 用非变性 PAGE 电泳检测, 电泳条带扫描后用分析软件分析^[5]。

1.2.5 IgG 定性检测 用 ELISA 法测定样品蛋白 IgG 含量, 鉴定样品蛋白是否是 IgG^[6]。

2 结果与分析

2.1 猪血清 DE52 梯度洗脱

血清中蛋白质种类很多, 组成复杂, 为了研究 DE52 对血清蛋白的分离效果, 在保持洗脱液 pH 7.4 的前提下, 通过线性改变 NaCl 浓度进行梯度洗脱试验。梯度洗脱时, 洗脱液盐浓度变化太快会使不同蛋白一起洗脱下来, 不能达到分离的目的; 如果洗脱液盐浓度变化太慢, 蛋白质洗脱峰太平, 不同蛋白洗脱峰相互交叉, 洗脱分离效果也不好。为了提高洗脱分辨率, 获得较好的洗脱效果, 梯度洗脱时必须选择合适的体积流量、上样量和盐浓度梯度。通过预试验得知, 当 NaCl 浓度大于 0.3 mol/L 时, 猪血清蛋白已全部洗脱下来, 所以采用 0.5 mL 血清上样, 以 250 mL 磷酸盐缓冲液和 250 mL 0.3 mol/L 的 NaCl 磷酸盐缓冲液梯度混合进行洗脱, 体积流量为 0.5 mL/min。

2.2 猪血清 DE 52 阶段洗脱

从梯度洗脱图(图 1)上可以看到, DE52 可以将猪血清蛋白分为 7 个部分。由于梯度洗脱时, 各蛋白洗脱峰相互交叉, 分离效果不是太好。所以在梯度洗脱的基础上进行了阶段洗脱试验。通过预试验发现, 洗脱液为 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液时, 梯度洗脱时首先出现的两个峰就可以被分离出来。因此选择了 NaCl 浓度分别为 0、0.05、0.08、0.1、0.12、0.15、0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液进行阶段洗脱。

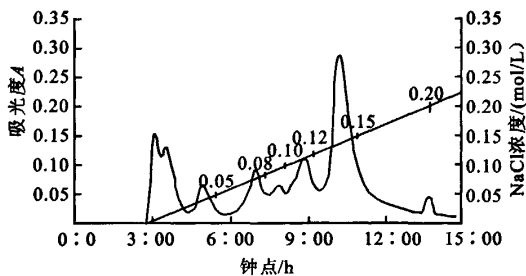


图1 猪血清 DE52 梯度洗脱效果

Fig. 1 The result of porcine serum protein gradient elution by DE52

2.3 猪血清 DE 52 阶段洗脱峰电泳分析

由图 2 可以看出, 通过阶段洗脱, 不同的蛋白质可以得到很好的分离。对每一阶段的洗脱峰, 收集脱盐后进行电泳分析。由试验结果可以看出, DE52 分离猪血清蛋白所得吸收峰样品的电泳条带(见图 3 和图 4), 在血清电泳图中都可以找到对应

的条带。其中第 1、2、4、7、8 吸收峰的电泳结果为单一条带;而 3、5、6 吸收峰的结果为多条电泳条带,这说明这些吸收峰由两种或两种以上蛋白质组成。

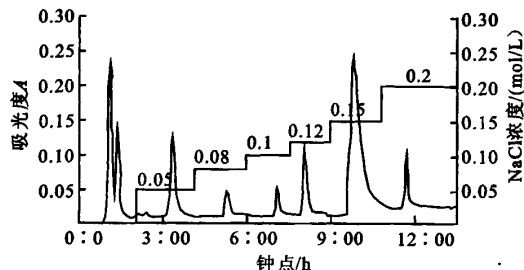
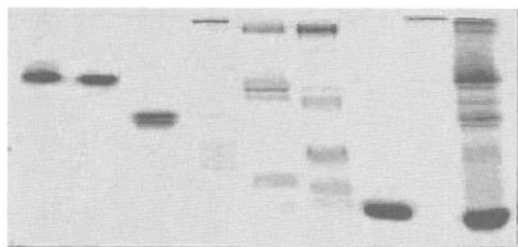


图 2 猪血清 DE 52 阶段洗脱效果

Fig. 2 The result of porcine serum protein phase elution by DE52



注:从左到右电泳样品依次为阶段洗脱所得第 1、2、3、4、5、6、7、8 吸收峰和血清。

图 3 猪血清 DE 52 阶段洗脱峰电泳图

Fig. 3 The electrophoresis picture of porcine serum protein phase elution peak by DE52

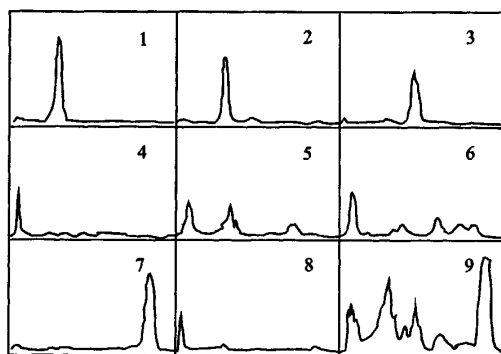


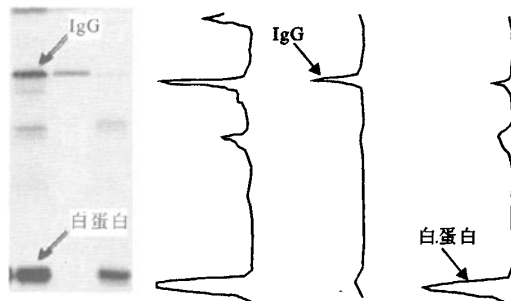
图 4 猪血清 DE 52 阶段洗脱峰电泳条带扫描

Fig. 4 The electrophoresis scan picture of porcine serum protein phase elution peak by DE52

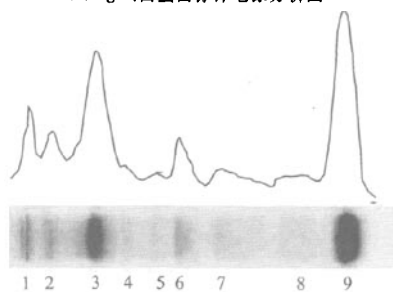
DEAE 纤维素是根据一定 pH 值条件下不同蛋白质所带电荷的不同,以及与纤维素上带电基团结合强度的差异进行蛋白质分离的。因此,如果血清

中某些蛋白质的带电性质以及与纤维素上带电基团的结合强度相同或者相近,通过离子交换色谱分离时就会一起洗脱下来,不能得到有效地分离,如第 3、5、6 洗脱所得吸收峰就由多种蛋白质构成(见图 3 及图 4 的 3、5、6)。这部分蛋白质可以通过凝胶过滤或者亲和层析作进一步的分离。

IgG 的等电点为 7.4,因此用 pH 值为 7.4 的缓冲液洗脱 DE52 色谱柱时,IgG 不带电荷,与纤维素上的带电基团没有结合,应该随洗脱液直接洗脱下来。从图 5 可以看到,当洗脱液为 pH 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液时,有两个紧邻的吸收峰出现,通过电泳分析显示两个吸收峰的电泳条带位置上基本一致,均为 IgG 所在的位置;酶联免疫吸附检测也证实这两个吸收峰所对应的蛋白质均为猪 IgG。由于 IgG 由不同的亚类组成,如人 IgG 就是由 4 种亚类构成的,故此认为由于猪 IgG 不同亚类之间的性质差异,离子交换色谱分离时形成了两个洗脱峰。



(a) IgG、白蛋白标样电泳分析图



(b) 猪血清蛋白分析图

1、2、4 γ -球蛋白; 3. IgG; 5、6 β -球蛋白; 7 α_2 -球蛋白; 8 α_1 -球蛋白; 9. 白蛋白

图 5 猪血清蛋白电泳结果及扫描图

Fig. 5 The electrophoresis scan picture of porcine serum protein

对照 IgG 和白蛋白标样的电泳结果,结合资料报道的血清蛋白电泳结果^[2],得到了缓冲液 pH 7.4 时,不同盐浓度 DE52 洗脱下来的蛋白质的组成(见表 1):

表 1 猪血清 DE52 阶段洗脱 NaCl 浓度与蛋白质组成的关系

Tab. 1 Relationship between NaCl concentration protein ingredient of porcine serum phase elution peak by DE52

NaCl 浓度/(mol/L)	蛋白质组成
0	IgG
0.05	β-球蛋白
0.08	γ-球蛋白
0.1	γ-球蛋白, α ₁ -球蛋白
0.12	γ-球蛋白, α ₁ -球蛋白, α ₂ -球蛋白
0.15	白蛋白
0.2	γ-球蛋白

3 结 语

pH 7.4 时,以 0~0.3 mol/L 的 NaCl 磷酸盐缓冲液梯度洗脱,DE52 可以将血清蛋白分为 7 个部分。在梯度洗脱的基础上,以 NaCl 浓度分别为 0、0.05、0.08、0.1、0.12、0.15、0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液进行阶段洗脱,将血清蛋白分为 8 个部分。

通过电泳分析,DE52 分离猪血清的第 1、2、4、7、8 吸收峰均为单一组成,而 3、5、6 吸收峰由多种血清蛋白构成。结合酶联免疫吸附检测结果,第 1、2 两个吸收峰所对应的蛋白质均为猪血清 IgG。

参考文献(References):

[1] Ramos Clamont G, Fernandez Michel S, Vazquez Moreno L. Functional properties of protein fractions isolated from porcine blood[J]. *J Food Sci*, 2003, 68(4): 1196—1200.

[2] 林钧材. 血液生物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 11—13.

[3] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 47—65.

[4] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 189—196.

[5] 罗磊, 朱雅东, 丁霄霖. 聚丙烯酰胺凝胶电泳研究猪血清蛋白硫酸铵分级盐析[J]. *食品科学*, 2006, 2(27): 218—222.

LUO Lei, ZHU Ya-dong, DING Xiao-lin. Study of ammonium sulfate fractionation of porcine serum protein by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *Food Sci*, 2006, 2(27): 218—222. (in Chinese)

[6] 罗磊, 丁霄霖. 直接酶联免疫吸附法检测猪血清 IgG 时某些影响因素的考察与优化[M]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(2): 97—101.

LUO Lei, DING Xiao-lin. Investigation and optimization of some factors on measuring IgG in porcine serum by direct enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(2): 97—101. (in Chinese)

(责任编辑: 秦和平, 杨 萌)