

中国大鲵可溶性蛋白制备 及SDS-PAGE电泳分析

陈易彬,马小燕*

(陕西科技大学生命科学与工程学院,陕西西安 710021)

摘要:采用超声法制备大鲵可溶性蛋白质;从提取温度、时间、液料比方面确定适宜的工艺参数,并对所得可溶性蛋白的分子量进行研究。均匀设计实验结果表明:在提取温度为 45℃、提取时间为 30min、液料比为 10:1 时,大鲵可溶性蛋白溶出量最多,达 63.57mg/g。SDS-PAGE 电泳分析可溶性蛋白的组成表明,大鲵可溶性蛋白亚基分布广泛,分子量低,易于消化吸收,为优质的营养蛋白。

关键词:大鲵可溶性蛋白,SDS-PAGE 电泳

Preparation and SDS-PAGE analysis of soluble protein of *Andrias davidianus*

CHEN Yi-bin, MA Xiao-yan*

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: Ultrasonic method was used to extract the soluble proteins of *Andrias davidianus*, and with a simple factor experiment and a uniform design, the preparation procedures were investigated. The results showed that the optimal extraction temperature, time, and the ratio of water to material were 45℃, 30min and 10:1, respectively, and the content of soluble proteins in *Andrias davidianus* could reach 63.57mg/g. SDS-PAGE analysis showed that the subunit molecular weight of soluble proteins was in a wide range, which were also low and easy to be absorbed.

Key words: *Andrias davidianus* soluble protein; SDS-PAGE

中图分类号:TS254.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2010)04-0296-03

中国大鲵 (*Andrias davidianus*), 俗称“娃娃鱼”^[1], 肉质鲜美, 含有优质的蛋白质和丰富的氨基酸、微量元素, 经常食用可以聪明益智、延缓衰老、提高造血和免疫功能, 对防止心脑血管系统、恶性贫血和恶性肿瘤有很好的作用^[2]。近年来, 随着人工驯养和繁殖技术的发展, 大鲵产量大增, 其食用和药用价值也引起人们越来越多的重视。本工作采用超声法制备大鲵可溶性蛋白, 考察提取温度、时间及液料比对制备效果的影响, 确定其适宜的工艺参数, 并对可溶性蛋白的分子量进行研究, 为大鲵资源的进一步研究开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

大鲵 实验室提供; 牛血清标准蛋白 北京奥博星生物技术有限责任公司; 考马斯亮蓝 G-250 天津市科密欧化学试剂开发中心; 低分子量标准蛋白 香港昊柏技术有限公司; 其它试剂 均为分析纯。

KQ-200KDE 型可调数控超声仪 昆山市超声仪器有限公司; UV-1800 紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司; DDY-10Cz 型电泳仪、DYCZ-22A 垂直板电泳槽 北京六一仪器厂; Bandscan 5.0 软件。

1.2 实验方法

1.2.1 超声法制备大鲵鱼肉中的可溶性蛋白

1.2.1.1 工艺流程 低温取样→加提取液研磨→超声提取→离心→收集上清液→低温储藏^[3]

1.2.1.2 单因素考察 分别以不同提取温度、时间及液料比做单因素实验, 考察单因素对可溶性蛋白含量的影响。

1.2.1.3 均匀设计实验 在单因素实验基础上, 确定均匀设计实验因素与水平^[4]。以可溶性蛋白含量为指标, 对大鲵可溶性蛋白的制备工艺条件进行优化。

1.2.2 大鲵可溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳 采用 15% 分离胶、5% 浓缩胶对可溶性蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析^[5]。拍照并用 Bandscan 5.0 软件分析。

1.2.3 可溶性蛋白含量测定 采用 Bradford 法测定可溶性蛋白含量^[6]。

1.2.4 蛋白质分子量的测定 在 Laemmli^[7]方法中, 蛋白质分子量的对数 (lg) 与其相对迁移率呈良好的

收稿日期: 2009-05-12 * 通讯联系人

作者简介: 陈易彬 (1955-), 男, 本科, 副教授, 研究方向: 天然产物的分离与修饰。

线性关系,因此,以标准蛋白质的分子量对迁移率作图,得标准曲线。根据未知蛋白的迁移率,从标准曲线中查出其分子量。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

配制最终浓度为 0、20、40、60、70、80、100 μg/mL 的标准蛋白质溶液,各取标准液 1mL,加入考马斯亮蓝 5mL,混合反应 2min 后,在 595nm 波长下比色测定吸光度,以蛋白质含量(μg)为横坐标,以吸光度为纵坐标,得到的标准曲线方程为 $y = 0.005x + 0.011$, $R^2 = 0.998$,线性范围为 10~100 μg/mL。

2.2 单因素对超声法制备大鲵可溶性蛋白的影响

2.2.1 提取温度的影响 在时间为 30min,液料比为 10:1 的条件下,不同提取温度对可溶性蛋白溶出量的影响如图 1 所示。

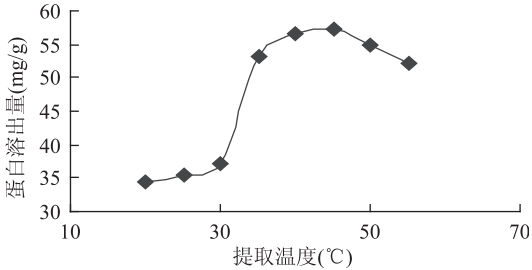


图 1 提取温度对提取效果的影响

由图 1 可以看出,当温度低于 30℃时,蛋白质溶出量增加趋势平坦;从 30℃开始蛋白质溶出量增加趋势变得显著;超过 45℃后,蛋白质溶出量开始下降。因此,45℃是提取可溶性蛋白质的适宜温度。

2.2.2 提取时间的影响 在温度为 45℃,液料比为 10:1 条件下,不同作用时间对可溶性蛋白溶出量的影响如图 2 所示。

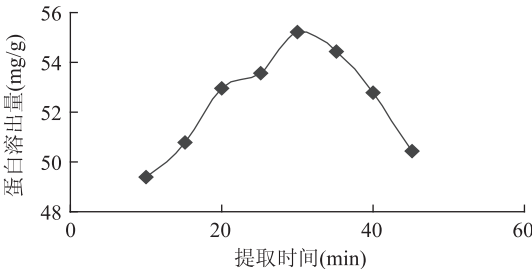


图 2 提取时间对提取效果的影响

从图 2 可以看出,提取时间为 30min 时,可溶性蛋白溶出量最多;提取时间低于 30min 时,随着提取时间的延长,可溶性蛋白溶出量增多,当到达 30min 后,可溶性蛋白溶出量反而降低。因此,提取时间为 30min 为宜。

2.2.3 液料比的影响 在提取时间为 30min,提取温度为 45℃条件下,不同液料比对可溶性蛋白溶出量的影响如图 3 所示。

从图 3 可以看出,可溶性蛋白溶出量随液料比增加而迅速增加,在液料比 10:1 以上时,可溶性蛋白溶出量增加缓慢。因此,液料比选择 10:1 较为合适。

2.3 均匀设计实验优化结果

根据单因素实验结果,分别以提取温度、提取时

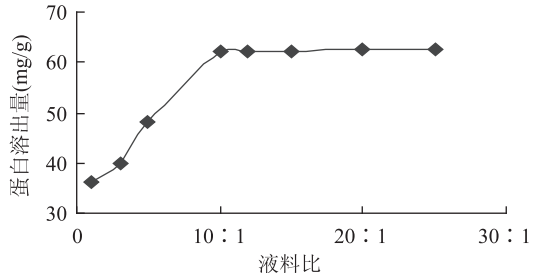


图 3 液料比对提取效果的影响

间、液料比为影响因素,以可溶性蛋白溶出量为指标,选择 3 因素 5 水平的均匀设计实验,实验结果见表 1。

表 1 均匀实验设计和实验结果

实验号	X ₁ 温度(℃)	X ₂ 时间(min)	X ₃ 液料比	蛋白溶出量(mg/g)
1	30	25	20:1	46.47
2	35	35	15:1	56.73
3	40	20	12:1	57.87
4	45	30	10:1	63.57
5	50	40	25:1	55.08

将表 1 得到的实验结果进行逐步回归分析^[8],得到回归方程为: $Y = 45.7 + 0.441X_1 + 0.264X_2 - 0.931X_3$,复相关系数 $r = 0.9973$ 。由以上方程可以看出:液料比对制备效果影响最大,且液料比越大,制备效果越差。其次为超声温度;超声时间对制备效果影响最小。由此得出最佳超声制备方案为:温度 45℃,时间 30min,液料比为 10:1。

2.4 大鲵可溶性蛋白质的 SDS-PAGE 电泳

采用 15% 分离胶、5% 浓缩胶对大鲵可溶性蛋白质进行 SDS-PAGE 分析,用相机拍照并用 Bandscan5.0 软件分析所得到的电泳图谱如图 4 所示。

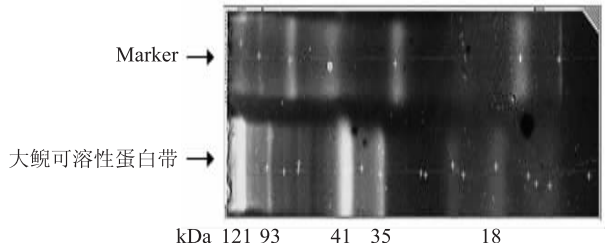


图 4 大鲵可溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

对大鲵可溶性蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳分析图谱显示,大鲵可溶性蛋白质亚基分子量位于 121~5kDa 范围内,共有 14 条带,分子量分别为 121、93、78、67、41、35、29、19、18、14、12、9、6、5kDa,皆为低分子量的蛋白。其中分子量为 41kDa 的蛋白含量最多,分子量为 35kDa 和 93kDa 的蛋白含量也较多。

3 结论

3.1 通过对影响大鲵蛋白溶出量的超声提取时间、提取温度和液料比进行了均匀设计实验,结果表明:液料比对蛋白溶出量的影响最大,其次为温度和时间。最佳制备工艺条件为:提取温度 45℃,时间 30min,液料比为 10:1。

3.2 SDS-PAGE 电泳图谱显示,大鲵可溶性蛋白组分种类较多,营养价值高,其分子量较小,有利于人

(下转第 301 页)

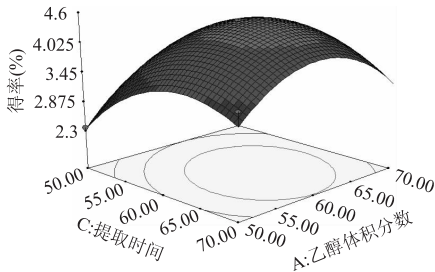


图7 得率 = $f(A, C)$ 的响应面
提取条件: B 提取温度 40℃, D 液料比 14:1

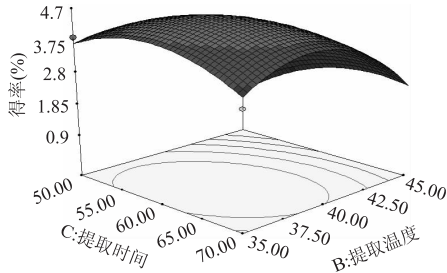


图8 得率 = $f(B, C)$ 的响应面
提取条件: A 乙醇体积分数 60%, D 液料比 14:1

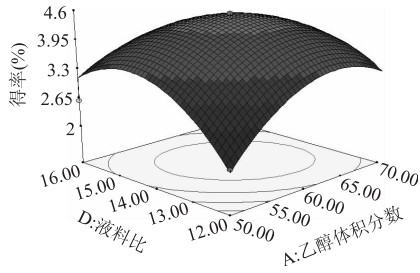


图9 得率 = $f(A, D)$ 的响应面
提取条件: B 提取温度 40℃, C 提取时间 60min

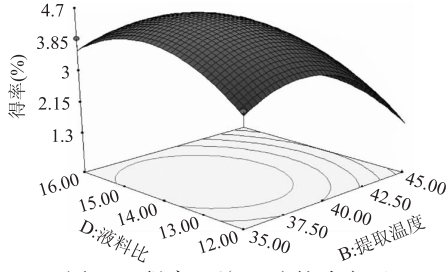


图10 得率 = $f(B, D)$ 的响应面
提取条件: A 乙醇体积分数 60%, C 提取时间 60min
件为: 乙醇体积分数 60.18%, 提取温度 38.11℃, 液料比 14.25:1, 提取时间 58.56min。在此条件下, 多酚得率理论值为 4.65%。为检验相应曲面法所得结果的

(上接第 297 页)

体对蛋白质的消化吸收, 是一种优质的营养蛋白。

参考文献

[1] 中国野生动物保护协会, 费梁. 中国两栖动物图鉴[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1999: 38-40.
[2] 高士贤, 戴定远, 范勤德. 常见药用动物[M]. 上海: 上海科技出版社, 1984: 14.
[3] 乔志刚, 等. 中国大鲵消化系统 13 种器官的蛋白水解酶种类和活性分析[J]. 动物学报, 2003, 49(4): 537-539.

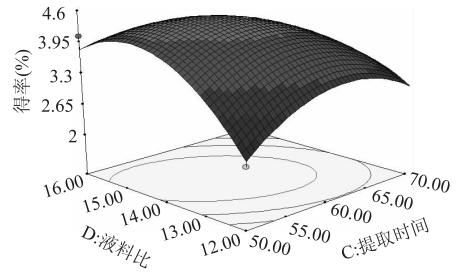


图11 得率 = $f(C, D)$ 的响应面
提取条件: A 乙醇体积分数 60%, B 提取温度 40℃

可靠性, 采用上述优化提取条件进行提取, 考虑到实际条件, 调整为乙醇体积分数 60%, 提取温度 39℃, 液料比 14:1, 提取时间 59min, 做三次平行, 得出多酚提取得率平均值为 4.59%, 与预测值 4.65% 相近。

3 结论

根据响应曲面对燕麦中多酚的提取影响因素分析, 确定最佳提取工艺为乙醇体积分数 60%, 提取温度 39℃, 液料比 14:1, 提取时间 59min, 在此条件下, 燕麦多酚得率可达 4.59%。响应曲面法对燕麦多酚的提取工艺进行优化, 不仅科学合理, 准确可靠, 而且快速可行, 该方法对工艺方面的研究具有一定的意义。

参考文献

[1] 梁敏. 燕麦的功能性及保健食品的开发[J]. 粮油加工与食品机械, 2006(4): 67-69.
[2] 郭新竹, 宁正祥. 天然酚类化合物及其保健作用[J]. 食品工业, 2002(3): 28-29.
[3] 张云竹, 袁成宇, 等. 腰果梨中多酚物质的提取研究[J]. 现代食品科技, 2008(24): 904-906.
[4] Brandvik P J, Daling P S. Optimization of oil spill dispersant Composition by mixture design and response surface methods[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1998, 42(1): 63-72.
[5] 王如, 宿文斌, 王承明, 等. 黄连木饼粕多酚提取的响应面法优化研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 160-165.
[6] 周跃勇, 王岸娜, 等. 从猕猴桃中提取多酚的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 56-60.
[7] 周纪芾. 实用回归分析方法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 77-79.
[8] 王钦德, 杨坚. 食品实验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 405-414.

[4] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 25-78.
[5] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 112-158.
[6] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004: 136-138.
[7] Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(259): 680-685.