

低温胁迫小麦苗冰结构蛋白纯化的研究

焦宇知^{1,2} 徐桃¹ 梁家冰³ 朱云¹ 何志勇⁴ 张晓晓¹ 刘永博⁵ 孙芝杨¹ 翟玮玮¹

(1.江苏食品药品职业技术学院,江苏淮安 223005;

2.Purdue University,West Lafayette,IN,USA 47907;

3.山东省莒县人民医院,山东莒县 276511;

4.江南大学,江苏无锡 214122;

5.山东朝能福瑞达生物科技有限公司,山东济南 250031)

摘要:以研究低温胁迫小麦苗冰结构蛋白(ISP)纯化为目的,以小麦苗为对象,经低温胁迫,并采用粗分离、饱和硫酸铵溶液沉淀、DEAE-Cellulose 52层析、sephadex-G75凝胶层析4个步骤对其中ISP进行纯化,分别采用差示扫描量热法(DSC)、热休克处理法和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定各纯化步骤所得ISP的热滞活性(THA)、冰晶重结晶抑制能力(ICP)和分子质量(MW),并计算小麦苗存活率和各纯化步骤的得率。实验结果表明,梯度低温胁迫的小麦苗存活率与恒温低温胁迫相比提高了240%,小麦苗提取物(AWSE)中蛋白质含量与未低温胁迫小麦苗提取物(NAWSE)相比提高了7.8%;以THA表征的纯化倍数(T_1)和以ICP表征的纯化倍数(T_2)分别为451.15和137.60,得率为2.85%,THA为0.180℃(5 mg/mL),ICP为70.03%,分子质量范围为20.1~31.0 ku;与THA相比,ISP在较低浓度下即可达到ICP的峰值。小麦苗可作为制备冰结构蛋白的天然植物资源。

关键词:小麦苗,低温胁迫,冰结构蛋白,热滞活性,重结晶抑制能力

Studies on purification of ice structuring protein from cold-acclimated wheat seedlings

JIAO Yu-zhi^{1,2} XU Tao¹ LIANG Jia-bing³ ZHU Yun¹ HE Zhi-yong⁴,
ZHANG Xiao-xiao¹ LIU Yong-bo⁵ SUN Zhi-yang¹ ZHAI Wei-wei¹

(1.Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College,Huai'an 223005,China;

2.Purdue University,West Lafayette,IN,USA 47907;

3.Civil Hospital of Juxian,Juxian 276511,China;

4.Jiangnan University,Wuxi 214122,China;

5.Chaoneng Freda Bio Co.Ltd.,Jinan 250031,China)

Abstract: To investigate purification of ice structuring protein(ISP) from cold-acclimated wheat seedlings,wheat seedlings underwent cold acclimation and ISP from cold-acclimated wheat seedlings was purified by 4 sequential steps including coarse separation,saturated ammonium sulphate precipitation,DEAE-Cellulose 52 chromatography and sephadex-G75 gel filtration chromatography.Differential scanning calorimetry(DSC),heat shock treatments and polyacrylamide gel electro-phoresis(SDS-PAGE) were employed respectively for determination of thermal hysteresis activity(THA),ice recrystallization inhibition power(ICP) and molecular weight(MW) of ISPs during process of purification.Survival rate of cold-acclimated wheat seedlings and purification times of ISP during each purification step were calculated as well.Results showed an increase of 240% in survival rate of wheat seedlings using gradient cold-acclimation compared with constant cold-acclimation.Protein content of cold-acclimated wheat seedlings extract(AWSE) was increased by 7.8% in comparison to non-cold-acclimated wheat seedlings extract(NAWSE).Eventual purification times based on THA and ICP were 451.15 and 137.60 respectively.Yield,THA at 5 mg/mL,ICP and MW range of ISP were 2.85%,0.180℃,70.03% and 20.1~31.0 ku respectively.Maximal ICP of ISP was achieved at lower concentration compared with THA.Wheat seedlings can be a potential plant resource in production of ISP.

Key words: wheat seedlings; cold-acclimation; ISP; THA; ICP

中图分类号: TS229

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)03-0102-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.03.011

收稿日期: 2016-09-29

作者简介: 焦宇知(1979-),男,硕士,副教授,研究方向:植物功能因子开发 E-mail: ningmen3749574@163.com。

基金项目: 淮安市产学研协同创新计划(HAC2015006);江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人计划(苏教师(2014)23号);淮安市食品技术研究院(HAP201301);江苏省首批高校优秀中青年教师境外研修计划(苏教师[2011]34号);企业委托横向项目(苏食院合字(2015)432号)。

冰结构蛋白(ISP)作为一类对冰晶生长和重结晶有抑制能力的蛋白质,可非依数性的降低溶液冰点而不影响其熔点,从而引起熔点与冰点差异,这种差异被称为热滞活性(THA)^[1]。ISP添加到冷冻面团^[2-4]、冷冻肉制品^[5]和冰淇淋^[6-7]等冷冻食品或原料中,可通过吸附到冰晶表面并使冰晶的生长和重结晶而受到抑制,降低冰点,从而改善冷冻食品的质构和原料加工特性,应用潜力巨大。

目前已发现分布于植物、海洋鱼类、昆虫和微生物中的5类ISP,且发现和鉴定了越来越多不同来源的ISP,如沙棘^[8]、黑麦草^[9]、沙冬青^[10]、白斑狗鱼^[11]和光滑鳖甲^[12]等。获取ISP的纯化方法主要有层析分离法^[9]、电泳分离法^[13]、冰特异性吸附分离法^[14-15]、核磁共振法^[16]和浊点萃取法^[17]等。

由于ISP降低冰点幅度有限且产量小,与传统食用抗冻剂相比,ISP的高成本限制了其在食品中的广泛应用。因此,转基因^[18]、低温胁迫^[19-21]等诱导ISP合成的方法和探究更为廉价的ISP来源成为研究热点。植物由于原料广泛、易得和廉价,且其中的ISP具有良好的冰晶重结晶抑制能力(ICP),已成为生产ISP的重要原料之一^[22]。小麦苗作为一种廉价易得植物,对其低温胁迫诱导产生具有抑制重结晶的蛋白质在国内外已有公开报道^[6,9,23]。但麦种来源和低温胁迫条件不同,ISP结构和活性可能有较大差异^[22]。本工作拟以淮麦33为麦种,以低温胁迫诱导产生ISP,利用粗分离、饱和硫酸铵溶液沉淀、DEAE-Cellulose 52层析、sephadex-G75凝胶层析对其进行纯化,采用差示扫描量热法(DSC)、热休克处理法和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法分别测定纯化各步骤所得ISP的THA、ICP和分子质量,计算低温胁迫小麦苗存活率以筛选最优低温胁迫方法,计算各纯化步骤的得率以评价纯化效果,以期小麦苗来源的ISP开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

淮麦33 淮南市农科院提供; DEAE-Cellulose 52、考马斯亮蓝 G250、N,N,N',N'-四甲基乙二胺 美国 sigma; sephadex-G75 瑞典 Pharmacia 公司; 鸡蛋清溶菌酶、胰蛋白酶抑制剂、牛碳酸酐酶、兔肌动蛋白、牛血清白蛋白、兔磷酸化酶 B 上海普欣生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠(SDS)、巯基乙醇、溴酚蓝、甘油、过硫酸铵、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、硫酸铜、硫酸钾、氯化钾、硫酸、溴酚蓝、硫酸铵、盐酸等 国药集团; 透析膜上海生工生物,截留分子质量 MWCO 3.5 ku。

DSC-7 差热分析仪 美国 PE 公司; GTOP-158D 光照培养箱 浙江托普仪器公司; DW-86L288 超低温冰箱 海尔公司; CX41 显微镜、DP20 成像系统 日本 OLYMPUS 公司; HCS410 冷热台 美国 INSTRON; GL-20G-II 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; K9840/SH220N 凯氏定氮仪 济南海能仪器公司; HDB-3 紫外检测仪、TH-1000 梯度混合器、EBS-20 自动部份收集器和记录仪 上海沪西仪器

厂; FD-1 台式冷冻干燥机 上海艾科仪器公司; BG 垂直电泳仪 北京百晶生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小麦苗的低温胁迫 参照文献[6]的方法稍作改动。小麦苗长至一叶一心后,采用梯度低温胁迫,降温至8℃培育24h,然后降至6℃培育48h,再降至4℃培育96h,昼夜温度一致。解除低温胁迫72h后取小麦苗并超低温保存备用,以未低温胁迫处理的小麦苗和4℃低温胁迫168h作为对照。以解除低温胁迫后72h后恢复长势的小麦苗计算存活率(SR)。

$$SR(\%) = \frac{N_R}{N_{NCA}} \times 100$$

其中: N_R 为解除低温胁迫后72h后恢复长势的小麦苗数, N_{NCA} 为低温胁迫前小麦苗数。

1.2.2 小麦苗初提物(AWSE)的制备 每次称取150g超低温小麦苗,加600mL预冷缓冲液(25mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 0.1mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF, 0.1mol/L KCl) 搅拌粉碎,提取液于13000r/min条件下冷冻离心30min,上清液75℃水浴15min后,于冰水浴中冷却,13000r/min冷冻离心30min,上清液冷冻干燥得AWSE,用同样方法制备未低温胁迫小麦苗初提物(NAWSE)。

1.2.3 饱和硫酸铵溶液沉淀初分离 AWSE复溶后用100%饱和度的硫酸铵溶液4℃低温沉淀10h后,于13000r/min条件下冷冻离心15min。沉淀用超纯水复溶,用透析膜(MWCO 3.5 ku)对纯水透析过夜后浓缩冻干。

1.2.4 DEAE-Cellulose 52层析 参照文献[24]方法并作改动。层析柱(2.5cm×45cm)经缓冲液(5mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 0.1mmol/L EDTA, 0.1mol/L KCl)平衡后,用缓冲液配制20mg/mL的样品,经0.45μm微滤膜过滤后进行离子交换层析:上样量5mL,先用25mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH7.8)洗脱1h,再用0~1mol/L的KCl溶液(含5mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 0.1mmol/L EDTA)进行梯度洗脱,流速1mL/min,检测波长280nm,收集热滞活性组分,对纯水透析过夜后浓缩冻干。

1.2.5 Sephadex-G75凝胶层析 参照文献[25]方法并作改动。经离子交换层析纯化后的冻干样品20mg溶于0.5mL洗脱液中(5mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 0.1mmol/L EDTA, 0.1mol/L KCl)中,经0.45μm微滤膜过滤后进行凝胶层析:层析柱(1.5cm×50cm)先用洗脱液充分平衡,上样量0.5mL,流速0.2mL/min,检测波长280nm,收集热滞活性组分,对纯水透析过夜后浓缩冻干。

1.2.6 THA测定 采用DSC法测定,参照文献[26]方法并作改动。取经离子交换和凝胶层析纯化的ISP组分各5mg,用1mL蒸馏水复溶,取10μL溶液密封于铝制坩埚中,置于DSC仪器样品池中央,以空池为参比。仪器稳定后,首先以1℃/min降温至-25℃,然后升温至25℃,再降温至-25℃,从扫描曲线上得到结晶温度(T_c , 结晶放热峰起始点温度)、

体系结晶热 (ΔA_m) 和熔点 (T_m , 融化吸热峰值温度)。以 $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至保持温度 (T_h , 样品熔融峰所涵盖温度区间的某一温度), T_h 保持 5 min 后再降温至 $-25\text{ }^\circ\text{C}$ 。记录扫描曲线上结晶放热峰初始温度 T_0 和体系结晶热 (ΔA_f)。设定 ΔA_f 为 $60\% \pm 10\%$ 时的 T_h 为实验保留温度。冰晶含量 (φ) 的计算公式和热滞活性 THA 计算公式分别如下:

$$\varphi = 1 - \frac{\Delta A_f}{\Delta A_m}$$

$$\text{THA} = T_h - T_0$$

1.2.7 ICP 测定 参照文献 [6] 方法并稍作改动。冰淇淋中 AWSE 和 NAWSE 添加量均为 10 mL ($5\text{ mg}/\text{mL}$) 其与水的总体积保持 75 mL 不变, 以基础配方为对照。冰淇淋硬化后置于程序制冷器中, 待冰淇淋升温至 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 后进行热休克处理, 以 $1.67\text{ }^\circ\text{C}/\text{h}$ 加热至 $-10\text{ }^\circ\text{C}$ 后保温 42 h , 再以相同的速度冷却至 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 并保温 42 h , 每周共 96 h 8 个周期后测定热休克始末冰淇淋冰晶大小均值 X_{50} , 冰晶大小增长百分比 (IGP) 定义为热休克处理周期末与周期始相比 X_{50} 增加百分比; 小麦苗 ICP 定义为与参照物水相比 AWSE 降低 IGP 的百分比 ICP 计算公式如下:

$$\text{ICP}(\%) = \frac{\text{IGP}_{\text{参照}}}{\text{IGP}_{\text{参照}} - \text{IGP}_{\text{AWSE}}} \times 100$$

1.2.8 ISP 分子质量测定 采用 SDS-PAGE 电泳法, 参照文献 [27] 方法并作改动。样品的制备: 凝胶层析纯化后冻干样品 10 mg 溶于 1 mL 蒸馏水, $10000\text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min , 取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 上清液加等体积样品缓冲液, 沸水浴 3 min 后取出立刻离心并取上清液。浓缩胶浓度 5% , 分离胶浓度 12% 。

1.2.9 纯化倍数计算 各纯化步骤所获得样品与 AWSE 的质量比值定义为得率。各纯化步骤所获得单位质量样品与单位质量 AWSE 的 THA 比值定义为纯化倍数 T_1 [25], 各纯化步骤所获得单位质量样品与单位质量 AWSE 的 ICP 比值定义为纯化倍数 T_2 。

1.2.10 蛋白质含量测定 参照 GB 5009.5-2010 采用凯氏定氮法测定。

1.3 数据统计分析

所有实验均重复 3 次, 采用 IBM SPSS 20 和 OriginPro 8 对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对小麦苗存活率的影响结果分析

与对照组相比, 低温胁迫处理后, 小麦苗虽出现枯萎或长势明显下降的现象 (表 1), 但采用梯度低温胁迫后, 仍有 76.8% 的小麦苗存活并在测定期内恢复长势; 与 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温低温胁迫相比, 梯度低温胁迫小麦苗存活率显著提高 (表 1 $p < 0.05$) 相比较提高了 240% 。由于恒温低温胁迫小麦苗的存活率低, 后期实验未将其作为研究对象。梯度低温胁迫后, AWSE 的蛋白质含量显著上升 (表 1 $p < 0.05$) 相比较提高了 7.8% 。原因可能是, 蛋白质作为植物细胞保护物质之一, 在低温胁迫下可通过调节渗透浓度从而启动脱落酸的合成, 诱发新蛋白质的合成以提高抗寒性 [28]。研究者常使用体内标记和 mRNA 体外翻译等

方法分离出低温诱导蛋白并获得其氨基酸序列, 从而筛选出特异性基因用于作物抗冻性能和材料冷冻储藏性能的改良 [29]。

表 1 低温胁迫对小麦苗存活率和 AWSE 蛋白质含量的影响
Table 1 Changes of survival rate of wheat seedling and protein content in AWSE after chilling stress

小麦苗	存活率 (%)	AWSE 蛋白质含量 (g/100 g)
对照组 (未低温胁迫)	98.5 ± 1.3^a	42.90 ± 0.39^d
梯度低温胁迫	76.8 ± 1.8^b	46.26 ± 0.28^c
$4\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温低温胁迫 168 h	22.6 ± 1.5^c	未测

注: abcde 值同一列不同字母差异性显著 ($p < 0.05$), 数据为 3 次平行实验的均值 \pm 标准偏差, 表 2~表 4 同。

2.2 小麦苗 ISP 分离纯化结果分析

2.2.1 各纯化阶段得率和纯化倍数结果分析 AWSE 经过饱和硫酸铵沉淀、离子交换和凝胶层析等纯化步骤后, ISP 得率达到 2.85% 。以 THA 表征的纯化倍数 T_1 和以 ICP 表征的纯化倍数 T_2 分别为 451.15 和 137.60 (表 2), 两者存在较大差异的原因可能是 AWSE 初提物中 ISP 浓度低从而导致 DSC 仪器测定中取值方式的误差增加。由于除初始冰晶含量和一定范围内蛋白浓度等部分可控因素对 ISP 的 THA 测定结果有一定影响外, THA 测定结果较为稳定, 因此, 本工作仍将 THA 变化作为纯化倍数的计算依据之一。有研究表明, 低温胁迫诱导产生的 ISP 热稳定性高 [30-31], 因此本实验在制备 AWSE 时, 加热处理去除了部分热不稳定蛋白, 为 ISP 的后续纯化提供了便利, 理论上提高了纯化倍数。

经低温胁迫后, AWSE 初提物的质量高于 NAWSE 初提物 (表 2), 表明低温胁迫诱导了新蛋白的合成, 这与 2.1 的实验结果一致。

凝胶层析后的 AWSE 在 $5\text{ mg}/\text{mL}$ 时 THA 达到了 $0.180\text{ }^\circ\text{C}$, 与 Jia Chunli 等 [32] 报道植物源 ISP 的活性在 $0.1\sim 0.6\text{ }^\circ\text{C}$ 之间一致。随着纯化的进行, AWSE 中 ISP 浓度升高, THA 也随之增加, 表明 ISP 降低溶液冰点虽具有非依数性, ISP 的 THA 与其浓度仍有一定的关系, 这与张晖等 [33] 报道 ISP 非依数性约为具有依数活性物质的 500 倍, 但在一定浓度范围内 THA 随浓度缓慢变化的结果一致 [27]。

纯化过程中, ISP 的 ICP 从 AWSE 初提物的 17.83% 增加至离子交换层析纯化后的 69.65% (表 2, $p < 0.05$)。表明随着 ISP 浓度增加, AWSE 对冰晶重结晶抑制能力显著增强。凝胶层析后, AWSE 中的 ISP 浓度进一步增加, 但其 ICP 增加不显著 ($p > 0.05$), 说明 ISP 的非依数性存在极限浓度, 达到该浓度时, 其活性趋于饱和 [33]。原因可能是, 根据“吸附-抑制”模型和“石头压海绵”模型理论, ISP 分子在与冰淇淋冰晶表面结合时会导致冰晶局部表面曲率发生变化, 覆盖的 ISP 分子之间存在尺度空间, 覆盖率无法达到 100% , 同时冰淇淋冰晶分子表面积本身也有限, 从而导致 ISP 的 THA 和 ICP 都存在阈值。与 ISP 的 THA 活性相比, AWSE 的 ISP 在相对较低浓度下即可达到 ICP 最大值, 因此可预测 AWSE 抑制

表2 AWSE 纯化过程参数变化

Table 2 Variation of parameters during purification process of AWSE

纯化步骤	质量(mg)	得率(%)	THA(°C)	纯化倍数 T ₁	ICP(%)	纯化倍数 T ₂
NAWSE 初提物	5348 ± 75 ^a	1 ^a	0.001 ± 0.005 ^a	1 ^a	1.33 ± 0.71 ^a	1 ^a
AWSE 初提物	5686 ± 106 ^b	1 ^a	0.014 ± 0.005 ^b	1 ^a	17.83 ± 2.27 ^b	1 ^a
饱和硫酸铵沉淀初分离	2284 ± 53 ^c	40.18 ± 0.24 ^b	0.032 ± 0.006 ^c	5.75 ± 1.46 ^b	47.78 ± 4.79 ^c	6.67 ± 0.63 ^b
离子交换层析	886 ± 45 ^d	15.58 ± 0.50 ^c	0.138 ± 0.004 ^d	63.26 ± 12.34 ^c	69.65 ± 4.50 ^d	25.07 ± 3.98 ^c
凝胶层析	162 ± 23 ^e	2.85 ± 0.35 ^d	0.180 ± 0.006 ^e	451.15 ± 53.54 ^d	70.03 ± 4.11 ^e	137.60 ± 15.46 ^d

注: 停留温度 T_h = -2.00 °C。表3、表4同。

冰晶重结晶能力要比其热滞活性更高,这与 Hassas-Roudsari M 等^[1]报道一致,植物来源 ISP 主要作用不是阻止冰晶形成,而是抑制重结晶和降低过冷点^[9,22]。经过8个周期的热休克处理后,NAWSE 也检测出 1.33% 的 ICP,可能是由于 NAWSE 的加入导致冰淇淋混合溶液冰点下降。

2.2.2 离子交换层析分离纯化结果分析 饱和硫酸铵沉淀所得 AWSE 在离子交换色谱图上出现 8 个洗脱峰(图 1)。其中 P₁、P₂ 和 P₃ 与饱和硫酸铵沉淀初分离后 AWSE 相比,THA 显著增加,ICP 显著增加并接近或达到最高值(表 3)。AWSE 所含 ISP 在 120 min 内即可洗脱完全,这与公开报导的结果不完全一致^[34]。这可能与小麦苗品不同有关,另外低温胁迫方法不同诱导产生的 ISP 的结构和性质可能也存在较大差异^[22],从而导致离子交换特性发生变化。P₄ 的 THA 和 ICP 较无活性的 P₅~P₈ 要高(表 3),可能是由于组分分步收集时,微量 P₃ 组分混入 P₄ 所致,也有可能是 DSC 仪器测定中取值方式的误差所致。

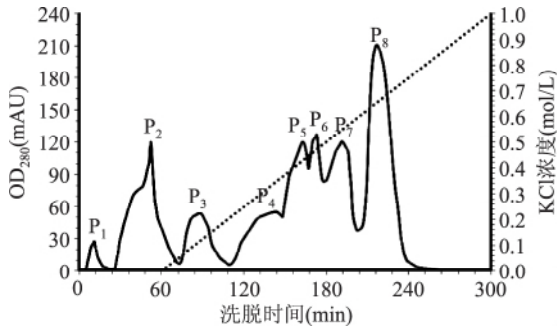


图1 AWSE 离子交换层析图

Fig.1 Ion exchange chromatography profile of AWSE

注: 层析柱 2.5 cm × 45 cm, 上样量 5 mL, 25 mmol/L Tris-HCl (pH7.8) 洗脱 1 h 后 0~1 mol/L 的 KCl 溶液梯度洗脱, 流速 1 mL/min。

2.2.3 凝胶层析分离纯化结果分析 对离子交换色谱获得的 P₁、P₂ 和 P₃(图 1) 进行凝胶层析分离后。P₁₃、P₂₃ 和 P₃₃ 显示出 THA 和 ICP(图 2~图 4)。与凝胶色谱纯化前相比,THA 显著增加,ICP 达到饱和(表 4)。电泳实验结果显示, P₁₃、P₂₃ 和 P₃₃ 的洗脱时间虽然存在差异,但电泳结果显示 P₁₃、P₂₃、P₃₃ 分子质量范围相同,为 20.1~31.0 ku(图 5),这与公开报道的结果 20~40^[9] 和 20~34 ku^[34] 一致但不完全相同,可能与麦种和低温胁迫方法的不同导致诱导产生的 ISP 不同有关系。P₁₃、P₂₃ 略有拖尾现象,可能是因为样品是具有相近相对分子质量的蛋白质混合物,也可能是

表3 AWSE 离子交换纯化后参数变化

Table 3 Parameters variation after purification of AWSE by ion exchange chromatography

洗脱峰	峰洗脱时间 (min)	KCl 浓度 (mol/L)	THA (°C)	ICP (%)
P ₁	11.2	0	0.085 ± 0.004 ^a	67.14 ± 4.05 ^a
P ₂	52.3	0	0.126 ± 0.005 ^b	69.46 ± 3.35 ^b
P ₃	88.6	0.119	0.152 ± 0.007 ^c	70.20 ± 3.17 ^b
P ₄	143.6	0.348	0.009 ± 0.005 ^d	3.43 ± 1.22 ^c
P ₅	163.4	0.431	0.002 ± 0.004 ^e	1.32 ± 0.57 ^d
P ₆	173.1	0.471	0.003 ± 0.005 ^e	1.28 ± 0.75 ^d
P ₇	191.8	0.549	0.002 ± 0.005 ^e	1.24 ± 0.73 ^d
P ₈	217.4	0.656	0.003 ± 0.006 ^e	1.31 ± 0.63 ^d

由于在浓缩胶中蛋白质浓度过高而导致沉淀。P₁₂、P₂₂ 和 P₃₂ 的 THA 和 ICP 较 P₁₁、P₂₁ 和 P₃₁ 高(表 4),可能是由于分步收集时,微量活性组分混入 P₁₂、P₂₂ 和 P₃₂ 所致,也有可能是 DSC 仪器测定中取值方式的误差所致。

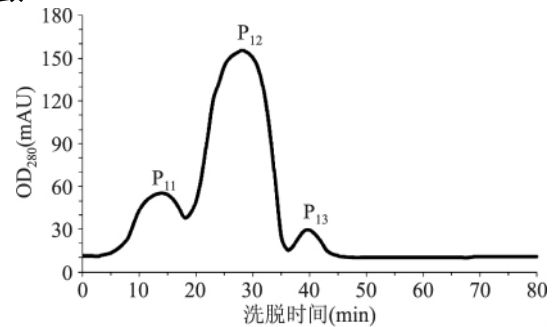


图2 P₁ 凝胶过滤色谱图

Fig.2 Gel filtration chromatography profile of P₁

注: 图 2~图 4 层析条件为层析柱 1.5 cm × 50 cm, 洗脱液为 5 mmol/L Tris-HCl pH7.8, 上样量 0.5 mL, 流速 0.2 mL/min。

3 结论

以低温胁迫小麦苗为对象,采用粗分离、饱和硫酸铵溶液沉淀、DEAE-Cellulose 52 层析、sephadex-G75 凝胶层析对其中的 ISP 进行纯化,测定了纯化过程中样品的 THA、ICP 和分子质量,计算了小麦苗存活率和各纯化步骤的得率。梯度低温胁迫小麦苗存活率与恒温低温胁迫相比提高了 240%,AWSE 中蛋白质含量与 NAWSE 相比提高了 7.8%;以 THA 表征的纯化倍数(T₁) 和以 ICP 表征的纯化倍数(T₂) 分别

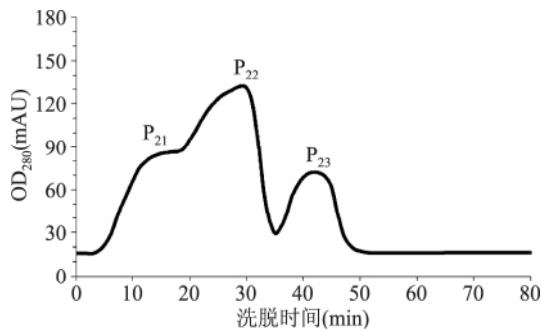
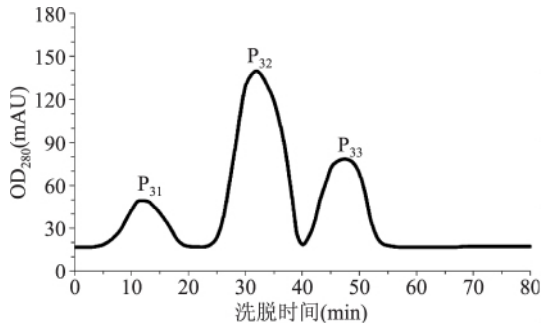
图3 P₂ 凝胶过滤色谱图Fig.3 Gel filtration chromatography profile of P₂图4 P₃ 凝胶过滤色谱图Fig.4 Gel filtration chromatography profile of P₃

表4 AWSE 凝胶层析纯化后参数变化

Table 4 Parameters variation during purification of AWSE by ion exchange chromatography

洗脱峰	峰洗脱时间 (min)	THA (°C)	ICP (%)
P ₁₁	14.7	0.003 ± 0.002 ^a	1.35 ± 0.57 ^a
P ₁₂	28.6	0.005 ± 0.005 ^b	1.96 ± 0.44 ^b
P ₁₃	40.3	0.178 ± 0.005 ^c	70.28 ± 3.22 ^c
P ₂₁	16.1	0.003 ± 0.003 ^a	1.33 ± 0.53 ^a
P ₂₂	30.0	0.009 ± 0.004 ^d	3.20 ± 0.62 ^d
P ₂₃	42.4	0.180 ± 0.006 ^c	70.48 ± 3.07 ^c
P ₃₁	12.2	0.003 ± 0.003 ^a	1.28 ± 0.71 ^a
P ₃₂	32.1	0.010 ± 0.004 ^d	3.28 ± 0.75 ^d
P ₃₃	47.7	0.181 ± 0.006 ^c	70.18 ± 3.37 ^c

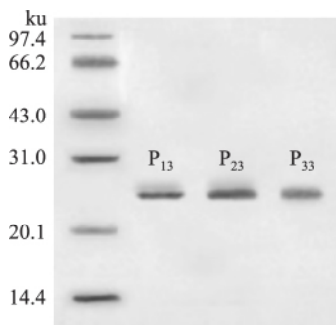


图5 凝胶层析后 AWSE 各活性峰电泳图

Fig.5 SDS-PAGE profile of P₁₃、P₂₃ 和 P₃₃ after gel filtration of AWSE

为 451.15 和 137.60, 得率为 2.85%, THA 为 0.180 °C (5 mg/mL), ICP 为 70.03%, 分子质量 (MW) 范围为

20.1~31.0 ku; 与 THA 相比, ICP 在较低浓度下即可达到 ICP 的峰值。

参考文献

- [1] Hassas-Roudsari M, Goff H.D. Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application [J]. Food Research International 2012, 46(1): 425-436.
- [2] JIA Chunli, HUANG Weining, WU Chao, et al. Frozen bread dough properties modified by thermostable ice structuring proteins extract from Chinese Privet (*Ligustrum vulgare*) leaves [J]. Cereal Chemistry 2012, 89(3): 162-167.
- [3] Zhang Yanjie, Zhang Hui, Wang Li, et al. Extraction of oat (*Avena sativa* L.) antifreeze proteins and evaluation of their effects on frozen dough and steamed bread [J]. Food & Bioprocess Technology 2015, 8(10): 2066-2075.
- [4] Ding Xiangli, Zhang Hui, Wang Li, et al. Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 47(5): 32-40.
- [5] Olijve L.L., Meister K., DeVries A.L., et al. Blocking rapid ice crystal growth through nonbasal plane adsorption of antifreeze proteins [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(14): 3740-3745.
- [6] 焦宇知, 翟玮玮. 低温胁迫小麦苗在小麦苗汁冰淇淋中的应用 [J]. 食品科学 2014, 35(12): 249-253.
- [7] Regent A, Goff H.D. Ice Recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass [J]. Journal of Dairy Science 2006(89): 49-57.
- [8] Gupta R, Deswal R. Low temperature stress modulated secretome analysis and purification of antifreeze protein from *Hippophae rhamnoides* a Himalayan wonder plant [J]. Journal of Proteome Research 2012, 11(5): 2684-96.
- [9] Gupta R, Deswal R. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site [J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 416(5): 713-724.
- [10] Deng Longqun, Yu Haoqiang, Liu Yanping, et al. Heterologous expression of antifreeze protein gene AnAFP from *Ammopiathus nanus* enhances cold tolerance in *Escherichia coli* and tobacco [J]. Gene 2014, 539(1): 132-140.
- [11] 巩子路, 田童童, 张建, 等. 白斑狗鱼鱼肉中抗冻蛋白的分离纯化 [J]. 中国酿造 2015, 34(2): 120-125.
- [12] MAO Xianfang, LIU Zhongyuan, MA Ji, et al. Characterization of a novel β -helix antifreeze protein from the desert beetle *Anatolica polita* [J]. Cryobiology, 2011, 62(2): 91-99.
- [13] 丁香丽. 大麦籽粒抗冻蛋白的制备及抗冻机制的研究 [D]. 无锡: 江南大学 2015: 128-32.
- [14] Kuiper M.J., Lankin C., Gauthier S.Y., et al. Purification of antifreeze proteins by adsorption to ice [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications 2003, 30(3): 645-648.
- [15] Gupta R., Deswal R. Low temperature stress modulated secretome analysis and purification of antifreeze protein from

Hippophae rhamnoides, a Himalayan wonder plant [J]. Journal of Proteome Research 2012, 11(5): 2684-2696.

[16] Brown J.R., Seymour J.D., Brox T.I., et al. Recrystallization inhibition in ice due to ice binding protein activity detected by nuclear magnetic resonance [J]. Biotechnology Reports 2014, 3: 60-64.

[17] Becker J S, Thomas O R T, Franzreb M. Protein separation with magnetic adsorbents in micellar aqueous two-phase systems [J]. Separation and Purification Technology, 2009, 65(1): 46-53.

[18] 陈亮亮, 王达, 张大伟, 等. 昆虫抗冻蛋白转基因植物表达载体的构建及转基因棉花 T1 代的检测 [J]. 新疆农业科学, 2012, 49(10): 1779-1786.

[19] Ding Xiangli, Zhang Hui, Chen Haiying, et al. Extraction, purification and identification of antifreeze proteins from cold acclimated malting barley (*Hordeum vulgare* L.). [J]. Food Chemistry 2015, 175(5): 74-81.

[20] Gupta R., Deswal R. Refolding of β -stranded class I chitinases of Hippophae rhamnoides enhances the antifreeze activity during cold acclimation [J]. Plos One 2014, 9(3): e91723.

[21] Ding Xiangli, Zhang Hui, Chen Haiying, et al. Extraction, purification and identification of antifreeze proteins from cold acclimated malting barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Food Chemistry 2015, 175(5): 74-81.

[22] 徐化能, 马淑凤, 张连富. 植物抗冻蛋白分离纯化方法的研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(4): 347-352.

[23] Regend A, Goff H D. Freezing and ice recrystallization properties of sucrose solutions containing ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract [J]. Journal of Food Science 2005(70): 552-556.

[24] 王维香, 魏令波, 张虎. 沙冬青热稳定抗冻蛋白的分离纯

(上接第 101 页)

rheological properties of gels from tilapia muscle proteins induced by high pressure and setting [J]. Food Chemistry 2007, 104(2): 746-753.

[21] Omana D A, Plastow G, Betti M. The use of β -glucan as a partial salt replacer in high pressure processed chicken breast meat [J]. Food Chemistry 2011, 129(3): 768-776.

[22] Inklaar P. Interaction between polyphosphates and meat [J]. Journal of Food Science, 1967, 32(5): 525-526.

[23] Voutsinas L P, Nakai S, Harwalkar V R. Relationships Between Protein Hydrophobicity and Thermal Functional Properties of Food Proteins [J]. Canadian Institute of Food Science & Technology Journal, 1983, 16(3): 185-190.

[24] Hugas M, Garriga M J, Monfort. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology [J]. Meat

Science 2002, 62(3): 359-371.

[25] 金周筠, 刘宝林. 小麦麸皮抗冻蛋白的纯化及理化性质的研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 159-164.

[26] 徐化能, 黄卫宁, 陈海英(江南大学). 一种植物冰结构蛋白的分离纯化方法 [P]. 中国: 200910033924.0 2009.5.27.

[27] 张超, 赵晓燕, 马越, 等. 使用差示扫描量热仪测定抗冻蛋白热滞活性方法的研究 [J]. 生物物理学报, 2008, 24(6): 465-473.

[28] Weiser C J. Cold resistance and injury in woody plants: knowledge of hardy plant adaptations to freezing stress may help us to reduce winter damage. [J]. Science, 1970, 169(3952): 1269-1278.

[29] 杨刚, 史鹏辉, 孙万仓, 等. 白菜型冬油菜质外体抗冻蛋白研究 [J]. 中国生态农业学报, 2016, 24(2): 210-217.

[30] Kazuoka T, Oeda K. Heat stable COR (cold-regulated) proteins associated with freezing tolerance in spinach [J]. Plant and Cell Physiology, 1992, 33(8): 1107-1114.

[31] Houde M, Danyluk J, Laliberté J.F., et al. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat [J]. Plant Physiology, 1992, 99(4): 1381-1387.

[32] Jia Chunli, Huang Weining, Wu Chao, et al. Characterization and yeast cryoprotective performance for thermostable ice-structuring proteins from Chinese Privet (*Ligustrum Vulgare*) leaves [J]. Food Research International, 2012, 49(1): 280-284.

[33] 张晖, 张艳杰, 王立, 等. 抗冻蛋白在食品工业中的应用现状及前景 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(9): 897-903.

[34] 郭丽红, 仝向荣, 王德斌, 等. 小麦幼苗抗冻蛋白的分离及其抗氧化活性的研究 [J]. 昆明师范高等专科学校学报, 2006, 28(4): 71-74.

Science 2002, 62(3): 359-371.

[25] Sun W, Zhao Q, Zhao M, et al. Structural evaluation of myofibrillar proteins during processing of Cantonese sausage by Raman spectroscopy. [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry 2011, 59(20): 11070-11077.

[26] Wu Z, Zhao Q, Zhao M, et al. Influence of aging and salting on protein secondary structures and water distribution in uncooked and cooked pork. A combined FT-IR microspectroscopy and ¹H NMR relaxometry study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006, 54(22): 8589-8597.

[27] Xu X, Han M, Fei Y, et al. Raman spectroscopic study of heat-induced gelation of pork myofibrillar proteins and its relationship with textural characteristic [J]. Meat Science 2011, 87(3): 159-164.