

牛初乳中 IGF-I 分离纯化过程中 前处理条件的优化研究

杨 巍, 陈庆森*, 符 浩, 金美玲

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘 要: 本实验从牛初乳中分离纯化胰岛素样生长因子-I (IGF-I), 重点对分离获取高水平 IGF-I 的前处理条件进行了较为细致的条件优化, 每一步骤中 IGF-I 的质量浓度检测均采用放射免疫法测定。为后续工作中采用超滤法规模化、高水平生产 IGF-I 提供了实验依据。

关键词: 牛初乳; 胰岛素样生长因子-I (IGF-I); 前处理

Optimal of Pretreatment Conditions in Separated and Purified of Insulin-like Growth
Factor-I in Bovine Colostrums

YANG Wei, CHEN Qing-sen*, FU Hao, JIN Mei-ling

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science,
Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: In this study, the insulin-like growth factor-I (IGF-I) in bovine colostrums was separated and purified. Especially, the study focused on the optimization of pretreatment conditions in the separation to access high level of IGF-I. The content of IGF-I in each process was detected by radio-immunoassay (RIA). Provide the basis for follow-up work to further purified with scale ultra-filtration and high-level production of IGF-I in the future.

Key words colostrums; insulin-like growth factor-I (IGF-I); pretreatment

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0154-04

1957 年, Daughaday 和 Salman 发现正常大鼠血清中含有一种可介导生长激素的物质, 命名为“生长介质”(somatomedins)。后来, 因其在结构上与胰岛素前体有高度的同源性, 具有胰岛素的一些功能和特性, 1978 年该物质被正式命名为“胰岛素样生长因子”(insulin-like growth factor, IGF), 并根据分子结构将 IGF 划分为 IGF-I 和 IGF-II 两类。到目前为止, 研究较多的是 IGF-I (分子量为 7649D, 等电点是 8.4) 和 IGF-II (分子量为 7500D, 等电点是 6.3), IGF-I 和 IGF-II 与胰岛素分别享有 70% 和 45% 的同源性^[1]。

牛初乳是指奶牛分娩后 7d 内特别是 3d 内所分泌的乳汁。初乳中不仅含有丰富的营养物质, 而且还含有大量的生物活性物质^[2]。近些年的研究表明, IGF-I 除了在组织细胞存在外, 还在牛初乳中大量存在, 是牛初乳中最重要的促生长因子。由于不同的研究中采集牛

初乳的条件存在着较大差异, 报道的 IGF-I 的质量浓度多在 50~200 $\mu\text{g/L}$ 之间, 最高达到 1000 $\mu\text{g/L}$, 而常乳 IGF-I 的质量浓度不足 10 $\mu\text{g/L}$, 在人血清中质量浓度为 180~230 $\mu\text{g/L}$, 肝脏中质量浓度为 380~770 $\mu\text{g/L}$ ^[3]。

IGF-I 是一类广谱性的促生长因子, 含有 A、B、C、D 四个结构域, 其分子有三个 α -螺旋以及三对二硫键。C 域亲水性强, D 域有发夹结构, 正因为 C、D 区域的不规则性, 使得 IGF-I 与其它蛋白结合的比较紧密, 游离的 IGF-I 很少, 对分离纯化造成一定困难^[4]。目前国内外主要采用高压液相色谱技术和离子交换层析技术来进行分离纯化, 成本较为昂贵^[5-6]。本实验采用酸醇沉淀、减压浓缩等前处理方法, 以及利用中空纤维膜超滤技术, 实现了方便、快捷、经济的分离纯化 IGF-I 的方法。并重点对影响 IGF-I 得率的前处理条件进行了较为细致的探索, 为今后规模化生产 IGF-I 提供了实验依据。

收稿日期: 2007-11-30

作者简介: 杨巍(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳品及生物活性物质。E-mail: jojovi@126.com

*通讯作者: 陈庆森(1957-), 男, 教授, 研究方向为发酵生物技术与生物活性物质开发。E-mail: chqsen@tjcu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料及试剂

牛初乳 天津海河乳业有限公司奶源基地; 小牛皱胃酶 购于美国; 木瓜凝乳蛋白酶 广西南宁庞博生物有限公司; IGF-I放射免疫试剂盒 天津九鼎生物有限公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒 北京市天来生物有限公司。

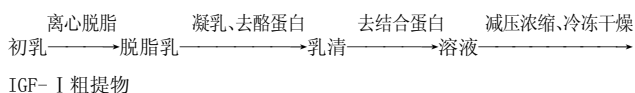
1.1.2 仪器

Beckman 高速冷冻离心机 美国贝克曼公司; DL-6000B型低速冷冻离心机 上海安亭科学仪器总厂; 3K15型Sigma离心机 Sigma公司; Thermo Multiskan MK3 酶标仪 芬兰雷勃公司; FD-1型冷冻干燥机 郑州长城科工贸有限公司; RE52-05 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 79.3 型磁力恒温搅拌器 常州国华电器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验总体工艺流程^[7]

前处理实验方案主要包括以下几个部分:



本实验将对以上几个部分分别进行条件优化。具体步骤有: 初乳经离心后使之脱脂, 将脱脂乳凝乳后离心, 取上清液即得乳清, 将乳清中加入一定体积的酸醇溶液, 静置15min左右后, 离心(3000r/min, 30min), 将上清液减压浓缩后, 调溶液pH值至6.4, 静置约30min后离心(3000r/min, 15min), 将上清液冷冻干燥, 即得IGF-I粗提物。

1.2.1.1 制备脱脂乳的条件优化方法

制备脱脂乳设计了不同的离心条件: 转速(1000、1500、2000、2500、3000、4000、5000r/min), 时间(5、10、15、20、25、30min), 温度(4、25、36℃), 对制备脱脂乳的过程进行条件优化。并测定每步中IGF-I的质量浓度, 从中选出最适条件。

1.2.1.2 制备乳清的条件优化方法

乳清的制备过程包括: 脱脂乳凝乳后离心, 去除沉淀酪蛋白, 取上清液即得乳清。其中, 对凝乳这一步骤采用: “凝乳酶法”凝乳; 以及“调pH值至4.6法”凝乳。并在“凝乳酶法”中, 分别采用木瓜凝乳蛋白酶及小牛皱胃酶进行凝乳。测定每步中IGF-I的质量浓度, 从中选出最适方法。具体步骤如下:

“凝乳酶法”制备乳清: 取一定量酶液(现用现配)加入脱脂乳中→静置→离心去除沉淀(酪蛋白)→取上清液(即乳清)。

“调pH值至4.6法”制备乳清: 脱脂乳调pH值到4.6(1mol/L HCl)→静置→离心去除沉淀(酪蛋白)→取上清液(即乳清)。

1.2.1.3 去除IGF-I结合蛋白的条件优化方法

采用两种方法进行结合蛋白的去除:

“搅拌乳清法”去除IGF-I结合蛋白条件的探索: 采用三种不同搅拌乳清的方法去除IGF-I结合蛋白, 即乳清直接离心后, 取上清液; 乳清先经过低温搅拌, 再离心、取上清液; 乳清先离心、取上清液后, 再低温搅拌。对三种方法进行比较, 选出最适条件。

“酸醇沉淀法”去除IGF-I结合蛋白条件的探索: 将1.2.1.3中得到的溶液加入酸醇溶液(HCl-乙醇), 用以进一步去除IGF-I结合蛋白, 其中对乳清与所加酸醇溶液的体积比采用不同倍数(1:4、1:6、1:9), 以及不同温度条件下(常温、低温)的酸醇溶液, 进行结果比较, 从中选出最适体积比及温度。

1.2.1.4 最适减压浓缩条件的探索

考虑到“减压浓缩后, 调pH值至6.4”这一过程中, 总是伴有IGF-I部分损失。根据此现象, 设计一组试验: 溶液直接减压浓缩, 冷冻干燥得冻干粉, 即IGF-I粗提物; 溶液先减压浓缩, 再调pH值至6.4, 静置15~30min, 离心(3000r/min, 15min), 将上清液冷冻干燥得IGF-I粗提物; 溶液先调pH值至6.4, 静置15~30min, 离心(3000r/min, 15min)取上清液, 再减压浓缩, 将浓缩液冷冻干燥得IGF-I粗提物。

1.2.2 实验各步中IGF-I的质量浓度及活性的测定

测定方案有^[8]: 检测各步中IGF-I的质量浓度, 其测定采用放射免疫法, 利用放射免疫试剂盒进行检测; 考虑到每步中溶液体积的变化、以及其它杂蛋白含量的变化, 故引用“相对浓度”来辅助检测, 即:

$$\text{IGF-I的相对浓度}(\text{ng/mg}) = \frac{\text{IGF-I质量浓度}(\text{ng/ml})}{\text{总蛋白质量浓度}(\text{mg/ml})}$$

其中, 每步中总蛋白的质量浓度, 采用BCA试剂盒检测。

2 结果与分析

2.1 制备脱脂乳试验的结果与分析

初乳经离心脱脂后得脱脂乳, 在这一过程中, 始终伴随有IGF-I与离心沉淀物共沉淀现象, 造成IGF-I的部分损失, 针对这一现象, 依据1.2.1.1所确立的优化方法, 研究观测不同离心条件下, 各步中IGF-I的质量浓度, 以确立最适离心条件。实验结果与分析分别见表1~3所示。

2.1.1 离心转速的确定

表1 不同离心转速下 IGF-I 的质量浓度
Table 1 Concentration of IGF-I in centrifugation at different speed

指标	初乳	离心转速(r/min)						
		1000	1500	2000	2500	3000	4000	5000
IGF-I质量浓度(ng/ml)	15.1	19.16	19.29	20.08	21.12	29.97	25.86	19.30
总蛋白质量浓度(mg/ml)	36.41	34.58	34.42	33.72	32.10	19.55	18.19	16.32
IGF-I相对浓度(ng/mg)	0.42	0.55	0.56	0.60	0.66	1.53	1.42	1.18

表2 不同离心时间下 IGF-I 的质量浓度
Table2 Concentration of IGF-I in centrifugation within different time

指标	初乳	离心时间(min)					
		5	10	15	20	25	30
IGF-I质量浓度(ng/ml)	15.1	15.27	18.73	41.79	35.50	26.49	14.05
总蛋白质量浓度(mg/ml)	34.85	34.27	33.72	22.34	18.59	11.47	5.05
IGF-I相对浓度(ng/mg)	0.43	0.45	0.56	1.87	1.91	2.31	2.78

可以看出,随着离心转速的增加,IGF-I 的质量浓度也逐渐增加,转速 3000r/min 时,IGF-I 的质量浓度和相对浓度均达到最大。当转速继续增加时,IGF-I 与沉淀物共沉现象也愈加严重,IGF-I 的质量浓度开始降低,故选定 3000r/min 为最适离心转速。

2.1.2 离心时间的确定

可以得出,离心 15min 时,IGF-I 的质量浓度最高,随着离心时间的增加,沉淀量增加,IGF-I 与沉淀物共沉现象加剧,IGF-I 的质量浓度逐步下降,虽然 IGF-I 的相对浓度逐渐增加,但也损失较多 IGF-I。考虑到后续工作中,将对产品进行进一步分离纯化,以去除其它杂蛋白来提高其相对浓度,故目前工作暂以 IGF-I 的质量浓度高低为标准,所以采用离心 15min 为最适离心时间。

2.1.3 离心温度的确定

随着离心温度的增加,乳中脂的黏度下降、离心时沉淀量降低,故 IGF-I 与沉淀物共沉现象减少,脱脂乳中 IGF-I 的质量浓度和相对浓度均逐渐增加,所以选定 36℃ 为最适离心温度。

2.2 脱脂乳制备乳清实验的结果与分析

依据 1.2.1.2 所确立的优化方法,观察并分析不同凝乳法中 IGF-I 的质量浓度,从中选出最适方法。

观察冻干粉中 IGF-I 的质量浓度,可以明显看出,上述方法中,使用木瓜凝乳蛋白酶制备乳清的效果较优。

表3 不同离心温度下 IGF-I 的质量浓度
Table 3 Concentration of IGF-I in centrifugation at different temperature

指标	初乳	离心温度(℃)		
		4	25	36
IGF-I质量浓度(ng/ml)	15.1	20.68	24.05	35.71
总蛋白质量浓度(mg/ml)	33.72	6.14	5.05	4.05
IGF-I相对浓度(ng/mg)	0.45	3.37	4.76	8.82

表4 制备乳清实验各步中 IGF-I 的质量浓度(ng/ml)
Table 4 Concentration of IGF-I in preparation of whey(ng/ml)

步骤	凝乳酶法		调 pH 值至 4.6 法
	木瓜凝乳蛋白酶	小牛皱胃酶	
初乳	24.74	24.74	24.74
乳清	49.82	22.52	11.50
酸醇沉淀后离心取上清	19.58	18.7	16.43
真空浓缩	46.67	41.34	20.54
调 pH 值后离心取上清	25.02	22.58	8.82
冻干粉	89.2	20.16	10.52

2.3 去除 IGF-I 结合蛋白实验的结果与分析

牛初乳中的 IGF-I 主要与 6 种结合蛋白结合在一起,故首先应该将这些结合蛋白除去。研究依据 1.2.1.3 所确立的优化方法,分析不同条件下各步中 IGF-I 的质量浓度,以确立最适条件。实验结果与分析分别见表 5~6 所示。

2.3.1 不同搅拌条件下去除 IGF-I 结合蛋白方法的探索

表5 不同搅拌条件下 IGF-I 的质量浓度
Table 5 IGF-I concentration in different vortex method

指标	初乳	脱脂乳	凝乳酶凝乳后		
			直接离心法	先低温搅拌再离心法	先离心再低温搅拌法
IGF-I质量浓度(ng/ml)	510.68	108.86	114.19	194.47	149.30
总蛋白质量浓度(mg/ml)	91.32	61.27	58.86	69.36	64.74
IGF-I相对浓度(ng/mg)	5.59	1.78	2.25	2.80	2.31

从表 5 中可以看出,搅拌过程中,无论是“先低温搅拌再离心法”,还是“先离心再低温搅拌法”,结果均优于“直接离心法”。其中,“先低温搅拌再离心法”较好,可定为最适方法。实验说明温度在提制高活力水平的 IGF-I 是一个重要的参数。

2.3.2 酸醇沉淀去结合蛋白中,不同体积比及温度条件下结果的比较

可以得出,选取低温的酸醇溶液的实验结果优于使

表6 不同体积比和不同温度条件下 IGF-I 的质量浓度(ng/ml)
Table 6 The concentration of IGF-I at different volume ratio/
temperature(ng/ml)

指标	乳清与所加酸醇溶液体积比			
	1:4(常温)	1:4(低温)	1:6(低温)	1:9(低温)
IGF-I质量浓度(ng/ml)	27.36	27.80	30.92	33.46
总蛋白质量浓度(mg/ml)	1.16	0.94	0.93	0.90
IGF-I相对浓度(ng/mg)	23.66	29.57	33.24	37.18

用常温酸醇溶液;乳清与所加酸醇溶液体积比1:9的结果较好,其次为体积比1:6。但考虑到使用乙醇作为成本的经济效益,且体积比1:6与体积比1:9结果相差不多。综上所述,故采用体积比1:6(低温)作为最适体积比。

2.4 减压浓缩条件实验的结果与分析

依据1.2.1.4所建立的实验方法,研究观测不同减压浓缩条件下,各方法中IGF-I的质量浓度。实验结果分别见表7~9所示。

2.4.1 直接浓缩法

2.4.2 先浓缩法

表7 “直接浓缩法”中 IGF-I 的质量浓度
Table 7 Concentration of IG-I in direct enrichment method

步骤	IGF-I的质量浓度(ng/ml)
乳清	49.82
酸醇沉淀取上清	42.02
浓缩液	71.96
冻干粉	100.70

2.4.3 先调 pH 值法

表8 “先浓缩法”中 IGF-I 的质量浓度
Table 8 Concentration of IGF-I in first enrichment method

步骤	IGF-I的质量浓度(ng/ml)
乳清	49.82
酸醇沉淀取上清	42.02
浓缩液	86.32
调 pH 值后离心取上清	101.38
冻干粉	94.30

从冻干粉中 IGF-I 的质量浓度可以看出,“直接浓缩法”效果较好,其次为“先浓缩法”;考虑到“直接浓缩法”中,浓缩液未调 pH 值,酸度太大,可能使其它有益蛋白变性,故不采用此方法,而采用“先浓缩法”。

表9 “先调 pH 值法”中 IGF-I 的质量浓度
Table 9 Concentration of IGF-I in first adjust pH method

步骤	IGF-I的质量浓度(ng/ml)
乳清	49.82
酸醇沉淀取上清	42.02
调 pH 值后离心取上清	52.14
浓缩液	83.33
冻干粉	85.32

3 结论与讨论

本实验最终确定的分离纯化牛初乳中 IGF-I 前处理试验的最适条件为:采用 3000r/min, 15min, 36℃ 离心条件下制备脱脂乳;采用木瓜凝乳酶制备乳清;乳清先在低温下搅拌后,再进行酸醇溶液洗脱(去结合蛋白);乳清与酸醇溶液的体积比为 1:6,且酸醇溶液为低温;洗脱后的溶液先进行减压浓缩,再调 pH 值至 6.4,静置后离心,将上清液冷冻干燥,进而得到 IGF-I 的粗提品。本研究取得的优化条件,为采用规模化技术方法生产 IGF-I 产品,从而更加有效地、合理地利用牛初乳资源奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] 孙侃, 俞茂华. 胰岛素样生长因子-I与糖尿病[J]. 国外医学内科学分册, 1997, 24(1): 6-9.
- [2] 杨巍, 陈庆森. 胰岛素样生长因子对胃肠道影响的研究与展望[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(10): 38-42.
- [3] 张兰威, 郭明若. 牛初乳成分、性质以及产品研制[J]. 食品工业: 乳制品工业特辑, 1998(1): 20-22.
- [4] MORTENSEN D L. Differential long term effects on insulin-like growth factor-I, growth hormone, and IGF-I plus GH on body growth and IGF binding proteins in hypophysectomized Rats[J]. Endocrinology, 1997, 138(5): 2073.
- [5] ZHANG W, FRANKEL W L, ADAMSON W T, et al. Insulin-like growth factor-I improves mucosal structure and function in transplanted rat small intestine[J]. Transplantation, 1995, 59(5): 755-761.
- [6] KARINF. Effect of insulin-like growth factor-I on the small intestine: a comparison between oral and subcutaneous administration in the weaned rat [J]. Growth factors, 1997, 14: 81-88.
- [7] LIDIA ELFSTRAND. Immunoglobulin, growth factors and growth hormone in bovine colostrums and the effects of processing[J]. International Dairy Journal, 2002, 12: 879-887.
- [8] BANG P, ERIKSSON U, SARA V. Comparison of acid ethanol extraction and acid gel filtration prior to IGF-I and radio-immunoassays: improvement of determination acid ethanol extractions by use of truncated IGF-I as radio-ligand[J]. Acta Endocrinology, 1991, 124: 620-629.