

聚丙烯酰胺凝胶电泳研究猪血清蛋白 硫酸铵分级盐析

罗磊, 朱雅东, 丁霄霖*
(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 本文通过聚丙烯酰胺凝胶电泳研究了盐析时各种猪血清蛋白溶解度与硫酸铵饱和度的关系, 结果显示猪血清蛋白析出区间为 25%~70% 硫酸铵饱和度, 各种猪血清蛋白具有各自的沉淀区间。10 倍稀释猪血清白蛋白最佳硫酸铵沉淀方案为: pH 值 7.4, 调节硫酸铵饱和度到 50%, 离心除去沉淀, 调清液 pH 值至 4.5, 硫酸铵饱和度至 55%, 沉淀白蛋白。pH 值 7.4, 35% 饱和度硫酸铵沉淀猪血清时, IgG 得率为 69.5%, 纯度为 76%; 40% 饱和度时, IgG 得率为 91.8%, 纯度为 61.6%。

关键词: 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 猪血清; 硫酸铵; 白蛋白; G 型免疫球蛋白(IgG)

Study of Ammonium Sulfate Fractionation of Porcine Serum Protein by Polyacrylamide Gel Electrophoresis

LUO Lei, ZHU Ya-dong, DING Xiao-lin*
(School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: This paper studied the relation between porcine serum protein and ammonium sulfate saturation when salt fractionation by Polyacrylamide Gel Electrophoresis, the result showed the main deposition scope of porcine serum protein is 25%~70% ammonium sulfate saturation, each porcine serum protein has respective deposition scope. The best ammonium sulfate fractionation method of decuple dilute porcine serum albumin is pH 7.4, adjust ammonium sulfate saturation to 50%, remove deposition by centrifugation, and adjust the pH of clear liquid to 4.5, the ammonium sulfate saturation to 55%, then albumin was deposited. In the porcine serum protein which was deposited by 35% saturation of ammonium sulfate when pH is 7.4, the IgG yield rate is 69.5% and purity is 76%, when the ammonium sulfate saturation is 40%, the IgG yield rate is 91.8% and purity is 61.6%.

Key words Polyacrylamide Gel Electrophoresis; porcine serum; ammonium sulfate; albumin; immunoglobulin G(IgG)
中国分类号: Q503 Q592.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2006)02-0218-05

盐析作为一种重要的沉淀手段, 在实验室中常被用来分离纯化蛋白质, 特别是对原料的初步分离。蛋白质分子上离子基团周围水分子的数目, 即蛋白质的水合程度, 决定了它在水中的溶解度。因此可以通过加入无机盐来控制蛋白质的水合程度, 实现蛋白质的沉淀。由于各种蛋白质表面极性基团的数目和分布不同, 随着无机盐加入量的增加, 不同蛋白质在析出顺序上有先后差异, 因此可以通过控制无机盐加入量, 以分级盐析的方式, 实现蛋白质的分离纯化。硫酸铵(Ammonium

Sulfate 简称 AS) 是盐析最常用的无机盐, 它具有以下优点: 溶解度大(25℃时可达 4.1mol/ml), 随温度变化小; 对蛋白质有保护作用, 高浓度时可抑制微生物和蛋白酶的活性, 价格低廉。

在血清中加入硫酸铵, 当饱和度为 28%~33% 时, 优球蛋白析出; 33%~55% 时, 拟球蛋白析出; 饱和度大于 50% 后, 白蛋白析出, 这是硫酸铵分级盐析血清蛋白的一般规律, 但不同动物之间血清蛋白的析出规律有所不同, 有的还有较大差异。Herbert 在研究硫酸

铵沉淀兔、羊、山羊、马、大鼠、小鼠、豚鼠、猴子、黑猩猩、猪、鸡和牛的血清蛋白时发现,不同动物 γ -球蛋白盐析沉淀的最佳硫酸铵饱和度不尽相同。硫酸铵分级盐析在人和各种动物血清蛋白的分离纯化中得到了广泛的应用,特别是在人,犊牛以及常见试验动物(如小鼠、兔、猴等)血清蛋白硫酸铵盐析分离方面研究较多,对猪血清蛋白却缺乏系统深入的研究。为了充分开发利用猪血清中的蛋白资源,特别是一些具有生物活性的蛋白质,有必要对不同硫酸铵饱和度下各种猪血清蛋白的溶解度变化情况进行深入研究。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide Gel Electrophoresis, 简称PAGE)是分析蛋白质的常用手段,通过对其电泳方法的改进和参数优化(数据另报道),在分析猪血清蛋白时能够电泳出近20条带,经过扫描分析可以看到猪血清蛋白电泳后分为九个部分(见图1)。由标样可以确定3为G型免疫球蛋白(简称IgG),9为白蛋白。由于PAGE能够对蛋白进行定性定量分析,揭示血清蛋白的组成情况,因此,将此法用于分析猪血清蛋白硫酸铵沉淀样品,就可以准确地掌握随硫酸铵饱和度变化各种猪血清蛋白组成变化情况,得到分离纯化特定猪血清蛋白最佳硫酸铵盐析方法及参数。

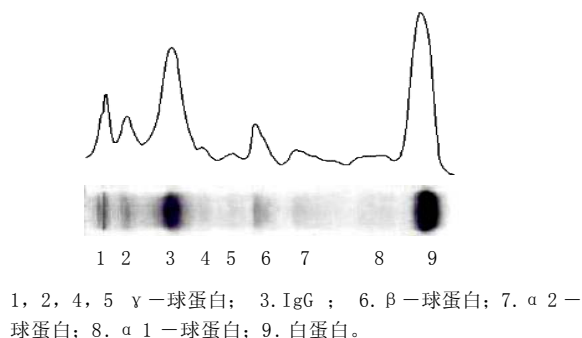


图1 猪血清电泳扫描图谱

Fig.1 Analysis of the porcine serum electrophoresis

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

猪血采自无锡肉联厂, 4℃ 4000r/min 离心10min, 除去血球和纤维蛋白原, 得到血清。

TGL16 台式高速冷冻离心机; UV-2102 PCS 型紫外可见分光光度计; DY-501 型电泳仪; DYCZ-24D 型电泳槽; AcerScan 620P 扫描仪。

Sephacrose G-25 Pharmacia公司; 猪IgG、白蛋白标样 Sigma 公司; 其它药品均为分析纯。

1.2 试剂

饱和硫酸铵(SAS)A: 量取500ml水, 加热至80℃。称取硫酸铵400g溶于水中, 搅拌20min, 冷却后上清即为饱和硫酸铵。再取28%氨水调pH值至7.4。

饱和硫酸铵(SAS)B: 量取500ml水, 加热至80℃。称取硫酸铵400g溶于水中, 搅拌20min, 冷却后上清即为饱和硫酸铵。再取0.5mol/L H_2SO_4 调pH值至4.5。

缓冲液A: 称取NaCl 76.5g、柠檬酸 $\cdot H_2O$ 11.52g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 16.18g, 溶于水, 调pH值为4.5, 定溶于1000ml。

缓冲液B: 称取NaCl 76.5g、柠檬酸 $\cdot H_2O$ 1.92g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 32.54g, 溶于水, 调pH值为7.4, 定溶于1000ml。

1.3 方法

1.3.1 样品准备

根据试验安排, 按照(式1)配制样品底液, 混匀后加入1ml血清, 轻轻振荡混匀, 4℃冷藏过夜。

$$1ml \text{缓冲液} + 10X \text{ml SAS} + (8-10X) \text{ml 水} \quad (1)$$

X 为样品所需硫酸铵饱和度。

样品中血清蛋白浓度均为原来的1/10, 因此样品为10倍稀释血清样品。

1.3.2 离心

取4ml样品4℃离心10min, 转速8000r/min。收集上清, 沉淀溶于4ml 0.85% NaCl 溶液中。

1.3.3 脱盐

Sephacrose G-25 凝胶柱, 上样1ml, 流速2ml/min, 洗脱液为0.85% NaCl 溶液。

1.3.4 蛋白质定量

Folin-酚法进行蛋白质定量。

1.3.5 蛋白质组成分析

将脱盐收集液处理后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对电泳胶扫描并进行图谱分析。

1.3.6 得率和纯度

根据电泳扫描结果, 按照以下公式计算目标蛋白的得率(Yield Rate)和纯度(Purity):

$$\text{得率} = \frac{\text{目标蛋白沉淀量}}{\text{血清中目标蛋白总量}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{纯度} = \frac{\text{目标蛋白沉淀量}}{\text{血清蛋白沉淀总量}} \times 100\% \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 硫酸铵饱和度与猪血清蛋白沉淀总量的关系

硫酸铵能够削弱血清中蛋白质的水合程度, 降低其溶解度, 从而使蛋白质沉淀出来。从图2、3可以看到, 随着硫酸铵饱和度的增加, 蛋白质析出量逐渐增加, 溶液中蛋白质含量逐渐减少。不同pH环境中蛋白

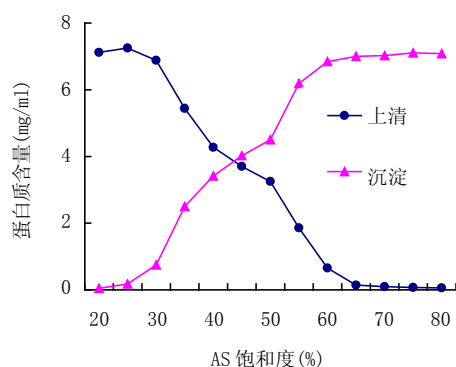


图2 硫酸铵分级盐析血清蛋白 (pH4.5)

Fig.2 Ammonium sulfate fractionation of porcine serum protein (pH4.5)

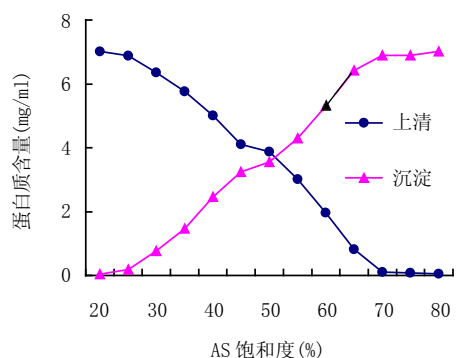


图3 硫酸铵分级盐析血清蛋白 (pH7.4)

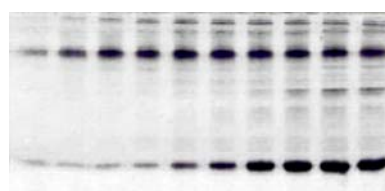
Fig.3 Ammonium sulfate fractionation of porcine serum protein (pH7.4)

质含量的变化情况略有差异: pH 为 4.5 时, 蛋白质在 25% 硫酸铵饱和度时开始析出, 到 65% 时几乎所有的蛋白质都沉淀下来, 所以 pH 值 4.5 时猪血清蛋白的硫酸铵析出区间为 25%~65%; pH 为 7.4 时, 蛋白质在 25% 饱和度时开始析出, 到 70% 时几乎所有的蛋白质都沉淀下来, 所以 pH 值 7.4 时猪血清蛋白的硫酸铵析出区间为 25%~70%, 比 pH4.5 稍慢。

2.2 硫酸铵饱和度与猪血清蛋白沉淀组成的关系

由于不同蛋白质的表面极性基团数目和分布不同, 所以随着硫酸铵饱和度的增加, 各种蛋白质溶解度的变化存在着或多或少的差异, 因此可以通过改变硫酸铵饱和度来实现蛋白质的分离纯化。在前面试验的基础上, 对 25%~70% (间隔 5%) 硫酸铵饱和度血清蛋白沉淀样品进行电泳分析。考虑到等电点将促进蛋白质沉淀, 选择了 4.5 (白蛋白) 和 7.4 (IgG) 两个 pH 值环境进行硫酸铵盐析。

由试验结果可知 (见图 4、5、6、7, 表 1), 随着硫酸铵饱和度的变化, 不同猪血清蛋白的主要沉淀区间不尽相同, 有的差异较大 (如 γ -球蛋白与白蛋白), 有的相互重叠 (如 γ -球蛋白之间)。同时, 不同的 pH



沉淀电泳扫描图

从左到右依次为 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70% 硫酸铵饱和度猪血清蛋白沉淀样品。

图4 硫酸铵分级盐析猪血清蛋白 (pH4.5)

Fig.4 The electrophoresis picture of ammonium sulfate fractionate porcine serum protein (pH4.5)

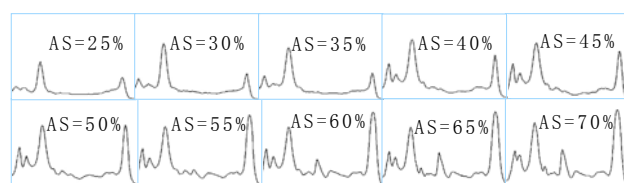
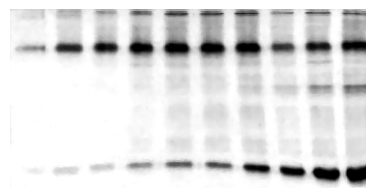


图5 硫酸铵分级盐析猪血清蛋白沉淀电泳条带扫描图 (pH4.5)

Fig.5 The electrophoresis band scan picture of ammonium sulfate fractionate porcine serum protein (pH4.5)



沉淀电泳扫描图

从左到右依次为 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70% 硫酸铵饱和度猪血清蛋白沉淀样品。

图6. 硫酸铵分级盐析猪血清蛋白 (pH7.4)

Fig.6 The electrophoresis picture of ammonium sulfate fractionate porcine serum protein (pH7.4)

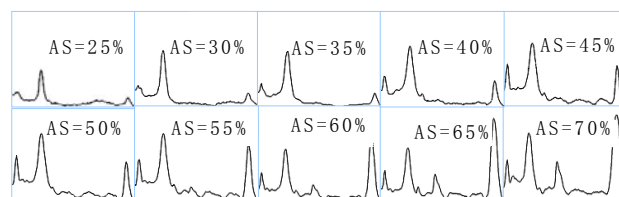


图7 硫酸铵分级盐析猪血清蛋白沉淀电泳条带扫描图 (pH7.4)

Fig.7 The electrophoresis band scan picture of ammonium sulfate fractionate porcine serum protein (pH7.4)

环境对蛋白质的溶解度具有较大影响, 等电点时蛋白质更容易沉淀下来。

2.3 硫酸铵饱和度与猪血清白蛋白沉淀的关系

白蛋白约占血清蛋白总量的 50%, 是猪血清中含量最高的一种蛋白质。为了掌握白蛋白溶解度与硫酸铵饱和度和之间的关系, 找到沉淀分离的最佳方法, 对白蛋

表1 猪血清蛋白硫酸铵沉淀区间
Table 1 The ammonium sulfate deposition scope of porcine serum protein

编号	名称	主要沉淀区间	
		pH4.5	pH7.4
1	γ -球蛋白	25%~40%	25%~40%
2	γ -球蛋白	30%~45%	30%~45%
3	IgG	25%~45%	25%~40%
4	γ -球蛋白	30%~45%	30%~45%
5	γ -球蛋白	35%~45%	35%~45%
6	β -球蛋白	55%~70%	55%~65%
7	α 2-球蛋白	35%~50%	40%~50%
8	α 1-球蛋白	40%~50%	40%~50%
9	白蛋白	40%~60%	40%~70%

注：蛋白质编号参照图1。

白随硫酸铵饱和度增加其纯度与得率之间的相互关系进行了研究。

为了得到较高纯度的白蛋白，首先要尽可能的沉淀除去血清中的其它蛋白质，从表1中可以看到， α -球蛋白的主要沉淀区间为35%~50%， γ -球蛋白的主要沉淀区间为25%~45%，因此应先用50%饱和度的硫酸铵沉淀除去血清中这部分蛋白质，然后再通过提高上清中的硫酸铵饱和度沉淀白蛋白。从图8、9中可以看到，由于等电点能够促进蛋白质的沉淀，环境pH值4.5时白蛋白的沉淀速度要比7.4时高。50%硫酸铵饱和度，pH值4.5时超过一半的白蛋白已经沉淀下来，而7.4时沉淀中白蛋白的得率只有25.8%。因此，从得率角度考虑，为了下一步沉淀得到更多的白蛋白，必须在50%饱和度时使更多的白蛋白保持溶解状态，因此沉淀除去 α 、 γ -球蛋白应在pH值为7.4的环境中进行。由于 β -球蛋白的沉淀区间为55%~65%，为了提高白蛋白的纯度，沉淀白蛋白所用的饱和度应尽量避免和这一区间重合，pH4.5时，55%饱和度能沉淀77%的白蛋白，而pH值7.4时只有46.7%沉淀下来，所以应该将50%饱和度血清样品离心后得到的清液pH值调节到4.5，然后

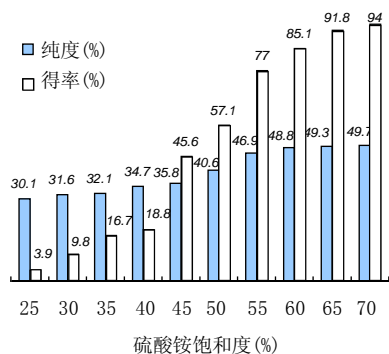


图8 硫酸铵分级盐析猪血清白蛋白纯度与得率关系 (pH4.5)

Fig.8 The purity and yield rate of ammonium sulfate fractionate porcine serum albumin (pH4.5)

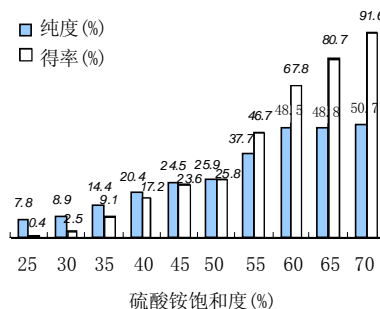


图9 硫酸铵分级盐析猪血清白蛋白纯度与得率关系 (pH7.4)

Fig.9 The Purity and Yield Rate of Ammonium Sulfate Fractionate Porcine Serum Albumin (pH7.4)

提高硫酸铵饱和度，沉淀分离猪血清白蛋白。

因此，硫酸铵沉淀法分离猪血清白蛋白的最佳试验方法为：环境pH为7.4时，调节硫酸铵饱和度达到50%，离心除去沉淀，1%柠檬酸调节清液pH值到4.5，调节硫酸铵饱和度至55%，沉淀白蛋白。

2.4 硫酸铵饱和度与猪血清IgG沉淀的关系

IgG约占血清蛋白总量的20%，是猪血清中含量第二多的蛋白质。为了掌握IgG溶解度与硫酸铵饱和度之间的关系，找到最佳分离沉淀参数，对IgG纯度与得率随硫酸铵饱和度增加的变化情况进行了研究。

从试验结果可知(见图10、11)，当pH值为4.5时，IgG得率随硫酸铵饱和度的增加而逐渐增加，到45%时其得率达到90%以上，随后基本保持不变；当pH值为7.4时，随着硫酸铵饱和度的增加，IgG得率的增加速度要更高一些，40%饱和度时其得率就超过90%，这是由于IgG的等电点为7.4，其它条件不变时，此pH值IgG的溶解度最小。而且pH值7.4时，IgG的纯度也普遍高于pH值4.5时，这是由于血清蛋白中含量最大的白蛋白等电点为4.5，pH值为7.4时，由于避开了它的等电点，白蛋白的溶解性更好一些，因此它的沉淀速度要小于pH值4.5时(见图8、9)。所以硫酸铵沉淀分离猪血清蛋白中IgG的最适pH值为7.4。

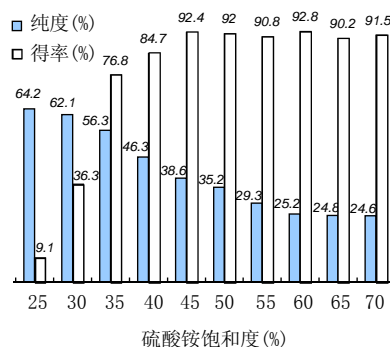


图10 硫酸铵分级盐析猪血清IgG纯度与得率关系 (pH4.5)

Fig.10 The purity and yield rate of ammonium sulfate fractionate porcine IgG (pH4.5)

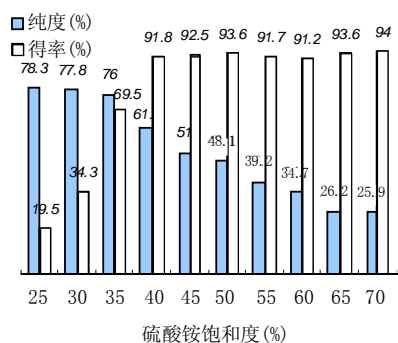


图 11 硫酸铵分级盐析猪血清 IgG 纯度与得率关系 (pH7.4)

Fig.11 The purity and yield rate of ammonium sulfate fractionate porcine IgG (pH7.4)

因此, 硫酸铵沉淀分离猪血清 IgG 时, 根据试验需要, 在综合考虑得率和纯度的基础上选择合适的硫酸铵饱和度。如果要得到较高纯度的 IgG, 可以选择 37% 的硫酸铵饱和度, 此时 IgG 得率为 69.5%, 纯度为 76%; 如果更重视得率, 可以用 40% 饱和度, 此时 IgG 得率为 91.8%, 纯度为 61.6%。

3 结 论

3.1 pH 值 4.5 时猪血清蛋白的硫酸铵析出区间为饱和度 25%~65%; pH 值 7.4 时猪血清蛋白的硫酸铵析出区间为饱和度 25%~70%, 比 pH 值 4.5 时稍大。

3.2 猪血清中各种蛋白质主要沉淀区间不尽相同, 有的差异较大(如 γ -球蛋白与白蛋白), 有的相互重叠(如 γ -球蛋白之间)。

3.3 10 倍稀释猪血清白蛋白硫酸铵沉淀最佳试验方法为: pH 值 7.4 时, 调节硫酸铵饱和度到 50%, 离心除

去沉淀, 1% 柠檬酸调节清液 pH 值到 4.5, 调节硫酸铵饱和度至 55%, 沉淀白蛋白。

3.4 猪血清 IgG 硫酸铵沉淀的最适 pH 值为 7.4, 如果要得到较高纯度的 IgG, 可以选择 35% 的硫酸铵饱和度, 此时 IgG 得率为 69.5%, 纯度为 76%; 如果更重视得率, 可以用 40% 饱和度, 此时 IgG 得率为 91.8%, 纯度为 61.6%。

参考文献:

- [1] Hebert E A, P L Pelham, B Pittman. Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera[J]. Appl Microbiol, 1973, 25(1): 26-36.
- [2] Hebert. Ammonium sulfate fractionation of sera: mouse, hamster, guinea pig, monkey, chimpanzee, swine, chicken, and cattle[J]. Appl Microbiol, 1974, 27(2): 389-394.
- [3] 钟盛林, 等. 口服免疫球蛋白治疗婴幼儿腹泻病[J]. 实用儿科临床杂志, 1998, (1): 46-47.
- [4] 杨严俊, 等. 蛋黄免疫球蛋白的功能性研究与开发[J]. 中国食品添加剂, 1999, (2): 1-7.
- [5] 杨玉芬, 等. 新生仔猪免疫人工乳配方的研制及其生产效果的研究[J]. 内蒙古农业大学学报, 2003, 24(1): 34-38.
- [6] 蒋守群. 免疫球蛋白源对新生仔猪存活率、生长性能、血液因子和免疫因子的影响[J]. 饲料工业, 2000, 21(5): 11-15.
- [7] 杨严俊, 等. 免疫球蛋白资源的开发及其在食品应用中的最新进展[J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(2): 66-69.
- [8] 于善谦, 等. 免疫学导论[M]. 高等教育出版社, 1999. 41-51.
- [9] 岑宁, 等. 猪产品加工工艺学[M]. 中国农业出版社, 2002. 275-283.
- [10] 王重庆. 分子免疫学基础[M]. 北京大学出版社, 1997. 231-236.
- [11] 李建武, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京大学出版社, 1994. 189-196.
- [12] 林钧材. 血液生物化学[M]. 人民卫生出版社, 1998. 11-13.
- [13] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 科学出版社, 2000. 47-65.
- [14] 郑建仙. 功能性食品(第三卷)[M]. 中国轻工业出版社, 1999. 352-357.



ÎÒ¹ú×ÔÖ÷ÑĐ·ç´ó¶¹ëÄ³É¹!

关注食品营养、提高健康水平已成为生命科学家们研究的重要课题。20 世纪 80 年代, 美国、日本等国家很早就介入了大豆肽的研究, 因为大豆肽对人体有消除疲劳、增强肌肉、抑制胆固醇上升、降血压、平衡代谢功能等作用。我国也将大豆多功能肽列入“九五”攻关课题。据专家介绍, 大豆肽是以大豆蛋白为原料, 经生物技术提取得到的一类分子量介于蛋白质和氨基酸之间的特殊物质。在 2006 新年前夕, 我国自主研发的一种全新的营养食品—提能大豆肽已在北京、济南、青岛、烟台、杭州、宁波等 11 个城市率先面市。