

驴乳中蛋白质组分的分离纯化与鉴定

苏薇¹, 杨洁^{2,*}, 沈晓丽³, 蒋新月³

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:目的: 分离纯化并鉴定驴乳乳清中蛋白质组分, 为进一步研究驴乳用于辅助治疗疾病, 以及为作为人乳替代品提供参考。方法: 采用DEAE-52离子交换层析和Sephadex G-100凝胶层析分离纯化驴乳乳清中蛋白质组分, 并通过十二烷基硫酸钠——聚丙烯酰胺凝胶电泳法和高效凝胶渗透色谱法对所纯化蛋白质进行鉴定。结果: 与牛乳乳清中蛋白组分相对比, 发现驴乳乳清中存在3种未知蛋白质, 分子质量分别为32、70.1、72.2kD。结论: 驴乳中除了含有与牛乳相似的营养成分外, 还具有其他生物活性成分, 它们可能是一些保护性蛋白, 在机体的抗病机制方面起着重要作用。

关键词: 驴乳; 蛋白质组分; 分离; 纯化

Purification and Identification of Donkey's Milk Protein Fractions

SU Wei¹, YANG Jie^{2,*}, SHEN Xiao-li³, JIANG Xin-yue³

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China)

Abstract: Objective: To provide a theoretical basis for further exploring the exploitability of donkey milk as an adjuvant for disease treatment or as a substitute for human milk. Methods: The protein fractions of donkey whey were separated and purified by DEAE-52 anion-exchange chromatography and Sephadex G-100 gel-filtration chromatography. The purified protein fractions were identified by SDS-PAGE and high-performance gel permeation chromatography. Results: Three unknown proteins having molecular masses of 32, 70.1 kD and 72.2 kD were found to be present in donkey whey in comparison with the protein composition profile of cow's milk whey. Conclusion: Along with the similar nutritional components to those in cow's milk, other bioactive components were also contained in donkey's milk, which might be some protective proteins playing an important role in protecting the organism against diseases.

Key words: donkey's milk; protein fraction; separation; purification

中图分类号: TS252

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0044-05

近年来, 驴乳因其独特的营养价值, 已成为一种值得开发的宝贵资源, 并作为一种新兴的乳品引起了世界奶业研究人员的关注。有研究表明, 驴乳具有很高的营养价值和药用价值, 可作为牛乳蛋白过敏患者及婴幼儿的营养品, 并可以辅助治疗动脉硬化, 促进心血管疾病患者的康复^[1-2]。驴乳中溶菌酶和乳糖的含量较高, 有益于益生乳酸杆菌的生长, 高含量的乳糖能促进肠对钙的吸收, 有利于在婴幼儿时期骨骼的生长^[3]。驴乳中脂质组成与人乳相似, 其中亚油酸和亚麻酸含量较高^[4-5]。同时, 驴乳中矿物质含量和蛋白质总量也接近人乳和马乳^[6-7]。因而, 驴乳的开发利用有着巨大的经济价值和社会价值。

本实验采用DEAE-52离子交换层析和Sephadex G-100

凝胶层析分离纯化驴乳乳清中蛋白质组分, 并通过十二烷基硫酸钠——聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)和高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)对所纯化蛋白质进行鉴定。以期新疆驴乳用于辅助治疗疾病, 以及作为人乳替代品提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

驴乳采自新疆乌鲁木齐市郊区, -20℃储藏; DEAE-52纤维素 Whatman公司; Sephadex G-100 Pharmacia公司; Fermentas非预染Marker 上海生物工程技术有限公司。

1.2 仪器与设备

收稿日期: 2010-09-28

作者简介: 苏薇(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生化工程。E-mail: suwei658@sina.com

*通信作者: 杨洁(1963—), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向为生物化学。E-mail: xindayangjie@sina.com

BioLogic Lp 层析系统 美国 Bio-Rad 公司; 真空冷冻干燥机 德国贺利氏公司; Heal Force NW 系列超纯水系统 上海力新仪器有限公司; Mini ProteinII 垂直电泳系统 美国 Bio-Rad 公司; Alphamager2200 凝胶处理及分析系统 AlphaInnotech 公司。

1.3 方法

1.3.1 驴乳蛋白的粗分^[8]

驴乳 4℃ 解冻, 10000r/min 离心 15min 脱脂。

脱脂乳与 2mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液等体积混合, 用 10% 乙酸调 pH 4.6, 40℃ 水浴 20min, 8000r/min 离心 15min, 收集上清液(乳清), 冻干、备用。沉淀(酪蛋白)用蒸馏水冲洗 3 次, 冻干, 备用。

1.3.2 离子交换层析分离驴乳乳清蛋白^[9]

称取冻干乳清粉约 0.3g 溶于 5mL 蒸馏水中, 5000r/min 离心 10min, 取上清液 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液加入 DEAE-52 层析柱(1.5cm × 20cm), 用 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8) 洗脱未被吸附的蛋白质, 用含 0.1~0.4 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)连续洗脱被吸附的蛋白质, 洗脱速度为 0.5mL/min。收集洗脱峰, 透析、冻干、备用。

1.3.3 十二烷基硫酸钠——聚丙烯酰胺凝胶电泳

将 DEAE-52 离子交换层析收集所得蛋白质洗脱峰的冻干粉, 进行非连续 SDS-PAGE 凝胶电泳, 浓缩胶 5%, 分离胶为 12%, 恒流电流为 15mA, 电泳时间为 1~2h。当染料距底边 1cm 时, 停止电泳。经染色、脱色, 将凝胶放入 Alphamager2200 凝胶处理及分析系统中照相。

1.3.4 凝胶层析分离纯化蛋白

Sephadex G-100 层析柱(1.6cm × 55cm)用 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)平衡, 洗脱速度为 0.5mL/min, 取 DEAE-52 柱层析的各洗脱峰收集所得蛋白冻干粉 10mg 分别溶于 3mL 磷酸盐缓冲液, 5000r/min 离心 10min, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 上样, 收集洗脱峰, 透析, 冻干, 备用。

1.3.5 高效凝胶渗透色谱(HPGPC)^[10]

采用 TOSOH TSK-G4000PWXL (300mm × 7.8mm) 色谱柱对 Sephadex G-100 凝胶层析所得蛋白质洗脱峰的冻干粉进行检测, 流速为 0.5mL/min, 流动相为 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.9), 检测波长为 280nm, 进样量为 20 μL。

标准蛋白的制备: 标准蛋白(牛免疫球蛋白 G: 170 kD; 甘氨酸氧化酶: 150 kD; 牛血清白蛋白: 66.2 kD; 卵清蛋白: 45.0kD; 胰蛋白酶: 24kD; 溶菌酶: 14.4kD) 分别溶于 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.9), 质量浓度为 1mg/mL, 离心, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 加入 TOSOH TSK-G4000PWXL (300mm × 7.8mm) 色谱柱进行检测。

2 结果与分析

2.1 驴乳乳清蛋白的离子交换层析图谱分析

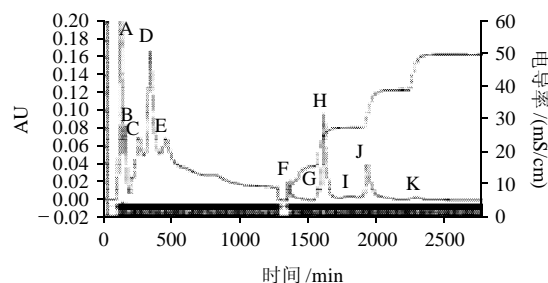


图1 乳清蛋白的 DEAE-52 离子交换层析图

Fig.1 DEAE-52 chromatographic fractionation of donkey's milk whey proteins

由图 1 可知, DEAE-52 离子交换层析对驴乳乳清蛋白进行分离纯化, 出现 11 个蛋白质峰。用 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)洗脱, 得到 5 个洗脱峰, 即峰 A、B、C、D、E; 用含 0.1~0.4mol/L NaCl 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)连续洗脱, 得到 6 个洗脱峰, 即峰 F、G、H、I、J、K。

2.2 离子交换层析的 SDS-PAGE 电泳图谱分析

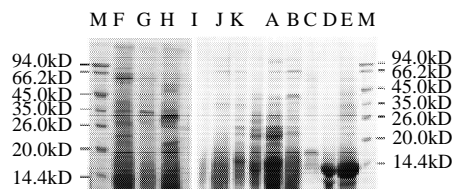


图2 DEAE-52 离子交换层析各蛋白质峰的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE of protein fractions of donkey's milk whey obtained after DEAE-52 chromatographic fractionation

通过 SDS-PAGE 凝胶电泳检测 DEAE-52 离子交换层析所得蛋白组分(图 2), 结果表明, 只有峰 G 出现了一条单一蛋白条带。而其余各峰均出现多条蛋白条带, 故需对所得蛋白质组分进一步分离纯化。

2.3 凝胶层析分离纯化蛋白图谱分析

由于从 DEAE-52 离子交换层析收集所得蛋白组分得率较低, 故只对部分蛋白组分进行 Sephadex G-100 凝胶层析。图 3~8 为驴乳乳清蛋白经 DEAE-52 离子交换层析所得部分洗脱峰的 Sephadex G-100 凝胶层析图。峰 A、H、I、K 的洗脱曲线为单一峰(图 3、6、7、8), 命名为 A₁、H₁、I₁、K₁。峰 F 存在 2 个洗脱峰(图 4), 说明其中存在 2 个不同分子量的蛋白组分 F₁、F₂。峰 G 存在 1 个洗脱峰(图 5), 说明峰 G 为单一蛋白组分。峰 J 存在 3 个洗脱峰(图 7), 说明其中存在 3 个不同分子量的蛋白组分, 分别命名为 J₁、J₂、J₃。

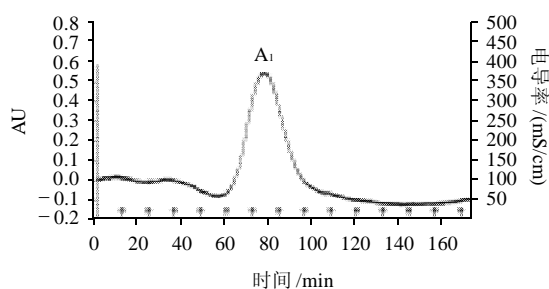


图3 峰A的Sephadex G-100凝胶层析图

Fig.3 Sephadex G-100 gel-filtration chromatographic purification of protein peak A

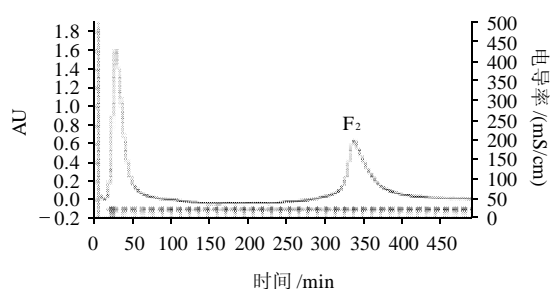


图4 峰F的Sephadex G-100凝胶层析图

Fig.4 Sephadex G-100 gel-filtration chromatographic purification of protein peak F

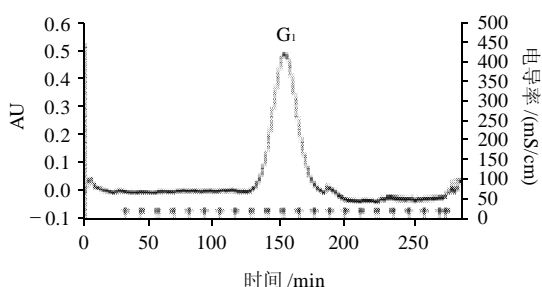


图5 峰G的Sephadex G-100凝胶层析图

Fig.5 Sephadex G-100 gel-filtration chromatographic purification of protein peak G

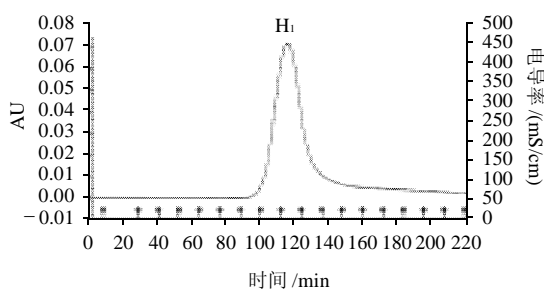


图6 峰H的Sephadex G-100凝胶层析图

Fig.6 Sephadex G-100 gel-filtration chromatographic purification of protein peak H

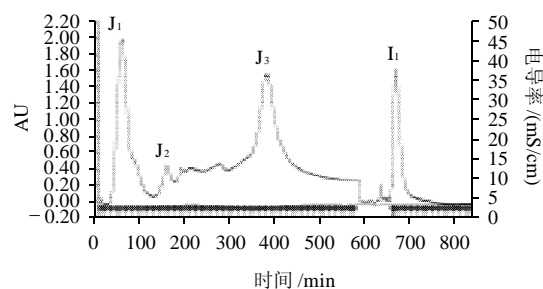


图7 峰J和I的Sephadex G-100凝胶层析图

Fig.7 Sephadex G-100 gel-filtration chromatographic purification of protein peaks J and I

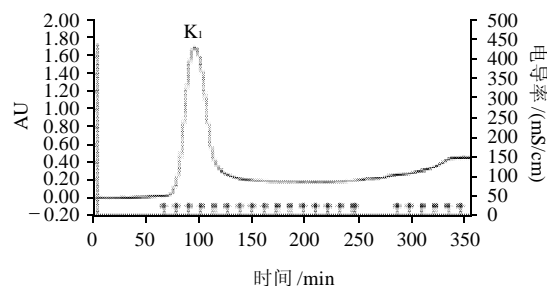


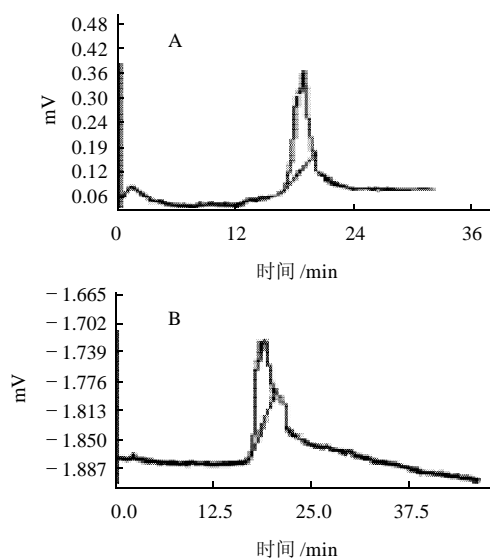
图8 峰K的Sephadex G-100凝胶层析图

Fig.8 Sephadex G-100 gel-filtration chromatographic purification of protein peak K

2.4 蛋白质分子质量的确定

根据5种标准蛋白质分子质量的对数值与TOSOH TSK-G4000PW_{XL} (300mm×7.8mm)色谱柱中保留时间之间的线性相关关系,用Excel软件绘制标准曲线为 $y = -0.0678x + 2.9999$, $R^2 = 0.9802$ 。

Sephadex G-100凝胶层析分离出部分蛋白组分的HPGPC图谱(图9~11),根据标准蛋白质的标准曲线,可计算出洗脱峰中蛋白组分的分子质量,最终确定蛋白组分分子质量大小及相对应牛乳乳清中蛋白质名称见表1。



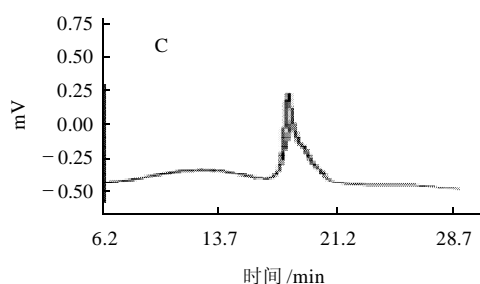
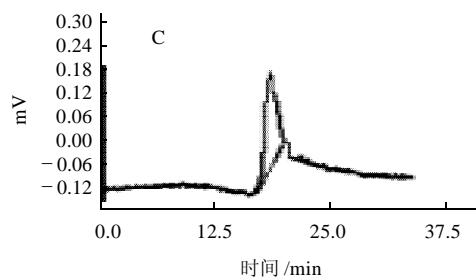
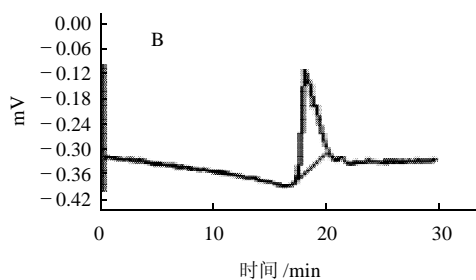
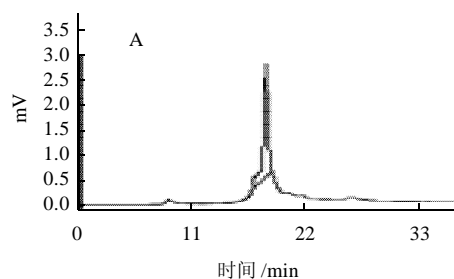
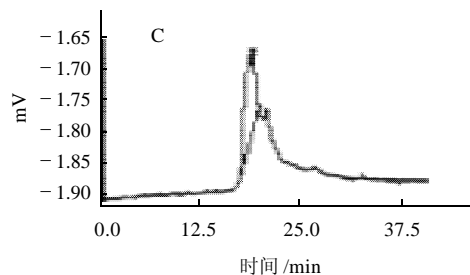
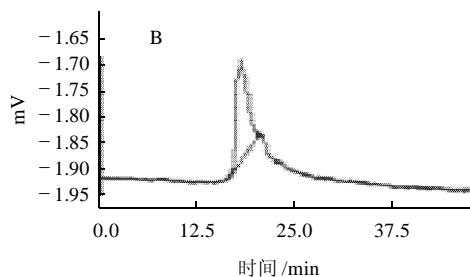
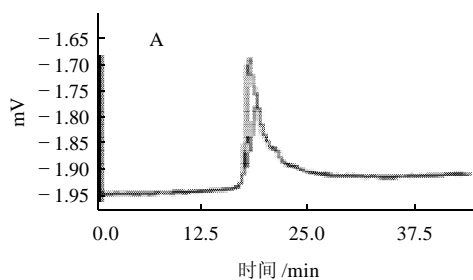
A. A₁; B. F₁; C. G₁。图9 峰A₁、F₁和G₁的HPGPC图谱Fig.9 HPGPC profiles of protein peaks A₁, F₁ and G₁A. H₁; B. I₁; C. K₁。图10 峰H₁、I₁和K₁的HPGPC图谱Fig.10 HPGPC profiles of protein peaks H₁, I₁ and K₁A. J₁; B. J₂; C. J₃。图11 峰J₁、J₂和J₃的HPGPC图谱Fig.11 HPGPC profiles of protein peaks J₁, J₂ and J₃

表1 驴乳乳清中蛋白质分子质量及相对应牛乳乳清中蛋白质
Table 1 Identification of separated protein fractions of donkey's milk whey based on molecular mass alignment with cow's milk whey

驴乳乳清的 层析峰	蛋白质分子 质量/kD	牛乳乳清中所含 蛋白质(分子质量/kD)
A ₁	14	溶菌酶(14)
F ₁	64.2	牛血清白蛋白(67)
G ₁	32	未知蛋白质
H ₁	19	β -乳球蛋白
I ₁	70.1	未知蛋白质
J ₁	72.2	未知蛋白质
J ₂	68.1	牛血清白蛋白(67)
J ₃	18.5	β -乳球蛋白(18)
K ₁	14.2	α -乳白蛋白(14)

由表1可以看出,峰A₁中蛋白组分的分子质量接近于溶菌酶,峰F₁和峰J₂中蛋白组分的分子质量接近于牛血清白蛋白,峰H₁和峰J₃中蛋白组分的分子质量接近于 β -乳球蛋白,峰K₁中蛋白组分的分子质量接近于 α -乳白蛋白。与牛乳乳清中蛋白组分相对比,发现驴乳乳清中存在3种未知蛋白质,分子质量分别为32、70.1、72.2kD。

3 结论

驴乳作为一个新的研究领域,国内外研究主要集中在理化指标和营养特性等方面。Piccione等^[11]发现驴乳中营养成分的日变化存在一定规律,脂肪和乳糖含量在夜晚达到高峰,而蛋白质含量在白天达到高峰。Vincenzetti等^[12]对驴乳中蛋白质成分进行研究,发现驴

乳与其他乳类相比有低酪蛋白含量和高溶菌酶含量的营养特性。张岩春等^[13]通过对驴乳与牛乳中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量进行比较,发现驴乳中 α -乳白蛋白含量较高。张晓莹等^[14]对50头新疆疆岳驴乳的化学成分以及微生物指标进行分析,结果表明,与牛乳相比驴乳各项指标更接近人乳。Criscione等^[15]研究发现西西里岛的驴乳中缺乏 α_{s1} -酪蛋白。Mao等^[16]研究发现驴乳乳清蛋白中一些活性蛋白质组分对人肺癌细胞A549具有抗增生和抗肿瘤的作用,其分子量大于10 kD,这些活性蛋白质组分能促进细胞分泌白细胞介素-2、干扰素- γ 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素- β 。驴乳中活性蛋白质组分不仅能直接抑制肿瘤增生,还可通过激活淋巴细胞和巨噬细胞间接杀死肿瘤细胞。

本研究针对新疆驴乳经脱脂,等电点沉淀,分离得到乳清蛋白,采用DEAE-52纤维素层析和SephadexG-100凝胶层析分离出蛋白组分,并利用SDS-PAGE凝胶电泳和高效凝胶过滤色谱对所纯化蛋白质进行鉴定。通过与牛乳乳清中蛋白质相对比,发现新疆驴乳中存在3种未知蛋白质,分子量分别为32、70.1kD和72.2 kD。这说明驴乳中除了含有与牛乳相似的营养成分外,还具有其他生物活性成分,它们可能是一些保护性蛋白,在机体的抗病机制方面起着重要作用。对于本实验结果可以为深入系统地研究驴乳中的生物活性成分,并确定其药用机理,以及开发驴乳产品,提高驴乳的利用价值等提供科学依据。也为阐明驴乳保护性蛋白含量及其生物学活性的独特性,为驴乳保护性蛋白的新资源奠定基础。

参考文献:

- [1] 陆东林,李雪红,叶尔太·沙比尔哈孜,等. 疆岳驴乳成分测定[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(11): 26-28.
- [2] CONTE F, PASSANTINO A. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from ass milk in Sicily: Case report, safety and legal issues[J]. Travel Medicine and Infectious Disease, 2008, 6: 250-252.
- [3] ZHANG Xiaoying, ZHAO Liang, JIANG Lu, et al. The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage[J]. Food Control, 2008, 19: 1191-1195.
- [4] GUO Huiyuan, PANG Kun, ZHANG, Xiaohui, et al. Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(1): 1635-1643.
- [5] BLASI F, MONTESANO D, de ANGELIS M, et al. Results of stereospecific analysis of triacylglycerol fraction from donkey, cow, ewe, goat and buffalo milk[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21: 1-7.
- [6] VINCENZETTI S, POLIDORI P, SALIMEI E, et al. Purification and identification of α_{s1} - and β -caseins from asses milk[J]. Veterinary Research Communications, 2005, 29(2): 211-213.
- [7] 张岩春, 尤娟, 罗永康. 驴乳的主要成分及与其他乳的分析比较[J]. 中国食物与营养, 2008(10): 54-55.
- [8] CHIANESE L, CALABRESE M G, FERRANTI P, et al. Proteomic characterization of donkey milk "caseome" [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(29): 483-484.
- [9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 189-229.
- [10] TORRE G L, SAITTA M, POTORT A G, et al. High performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for sensitive determination of bioactive amines in donkey milk[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217: 5215-5224.
- [11] PICCIONE G, FAZIO F, CAOLA G, et al. Daily rhythmicity in nutrient content of asinine milk[J]. Livestock Science, 2008, 116: 323-327.
- [12] VINCENZETTI S, POLIDORI P, MARIANI P. Donkey's milk protein fractions characterization[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 640-649.
- [13] 张岩春, 郑酷, 尤娟, 等. 驴乳中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定[J]. 农产品食品科技, 2008, 2(4): 13-14.
- [14] 张晓莹, 赵亮, 郑倩, 等. 新疆疆岳驴乳理化及微生物指标分析[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 303-305.
- [15] CRISCIONE A, CUNSOLO V, BORDONARO S, et al. Donkeys' milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis[J]. International Dairy Journal, 2009, 19: 190-197.
- [16] MAO Xueying, GU Junnan, SUN Yan, et al. Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells[J]. International Dairy Journal, 2009, 19: 703-708.