

葵瓜子仁蛋白实验室提取条件探讨

高芳\*

(白城医学高等专科学校,吉林 白城 137000)

[摘要] 目的:探讨葵瓜子仁蛋白的实验室提取条件。方法:选取 8 种不同条件(P1,P2,P3,P4,P5,P6,P7,P8)提取葵瓜子仁蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白质纯度,应用双向电泳对提取条件进行分析,通过二维电泳图谱确定最佳提取条件。结果:8 种条件下提取的葵瓜子仁蛋白干粉质量 57.43 ~ 63.59 mg,差异无统计学意义,但 P3,P4,P7,P8 提取的蛋白质纯度显著高于其他 4 种条件,双向电泳结果显示 P4,P8 条件下蛋白点最多,分别为(196 ± 11),(194 ± 20)个,但 P4 条件下得到的蛋白点更清晰。最佳提取条件为提取温度 50 ℃,提取溶剂为去离子水,超声提取时间 20 min。结论:P4 条件下得到的蛋白质总量和种类最多,为植物蛋白的蛋白组学研究提供参考。

[关键词] 葵瓜子仁蛋白; 实验室提取条件; 双向电泳; 缓冲液; 裂解定量

[中图分类号] R283.6;R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0042-03

[doi] 10.11653/syfy2014050042

Investigation of Laboratory Extraction Conditions for Proteins  
from Sunflower Seed Kernels

GAO Fang\*

(Baicheng Medical College, Baicheng 137000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate laboratory extraction conditions of proteins from sunflower seed kernels. **Method:** Eight different conditions (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8) were adopted to extract proteins from sunflower seed kernels, purity of proteins was determined by Bradford, extraction conditions were analyzed by two-dimensional electrophoresis method. **Result:** After extracted by eight conditions, content of protein powder in sunflower seed kernels was 57.43-63.59 mg without significant differences; But protein purity of P3, P4, P7 and P8 was significantly higher than the other four conditions; 2-D PAGE electrophoresis results showed that P4 and P8 had the most protein spots which were (196 ± 11) and (194 ± 20), respectively; However, protein spots was more clear by comparing with P8. Optimum technology conditions were as follows: extraction temperature 50 ℃, ultrasonic time 20 min, with deionized water as extraction solvent. **Conclusion:** The amount and kind of most proteins obtained under condition of P4, and it could a reference for proteomics of plant proteins.

[Key words] protein from sunflower seed kernels; laboratory extraction conditions; dimensional electrophoresis; buffer solution; quantitative cleavage

葵瓜子仁具有保护心脏、预防高血压、防止衰老、预防心血管疾病及提高机体免疫力等保健功能,

主要保健成分为葵瓜子仁蛋白<sup>[1]</sup>。目前对葵瓜子仁蛋白的研究在国内外鲜有报道,因为从葵瓜子仁中提取蛋白的最佳条件尚无定论,蛋白提取率普遍较低,导致了原材料的严重浪费,很大程度上阻碍了葵瓜子仁蛋白的开发利用<sup>[2]</sup>。本实验旨在探索杏仁组织蛋白的最佳实验室提取条件,为其蛋白质组学研究提供参考。

[收稿日期] 20130417(011)

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目(2011153C86)

[通讯作者] \*高芳,本科,副教授,从事天然产物提取工艺研究,Tel:1384350846,E-mail:admini@126.com

1 材料

2510 MTH 2.8L 型超声提取仪(美国 Branson 公司),Mars-X 型微波辅助提取系统(美国培安公司),PacBasic101 型电泳仪(日本三洋公司),GT-3F-1 型低温高速离心机(Eppendorf 公司)。

葵瓜子(兰州新区向日葵产业园),等电聚焦前的矿物油(Amersham Biosciences 公司),丙烯酰胺、双丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、尿素、十二烷基苯磺酸钠(SDS)、硫脲、3-[3-(胆酰氨丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS)、两性电解质均购自北京红星化工厂,水为电阻 >18 MΩ 去离子水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 葵瓜子仁蛋白的提取 将葵瓜子仁剥出,粉碎,分别称取研磨好的葵瓜子仁粉 1 g,加石油醚 6 mL 溶解,搅拌 15 min,以除去葵瓜子仁中油分,比较溶剂种类、提取方法、提取时间及温度对蛋白提取工艺的影响,见表 1。Buffer(pH 8.8)包括 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,1.5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl,10 mmol·L<sup>-1</sup> DTT,1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 苯甲基磺酰氟和 0.1% 十二烷基硫酸钠。将不同提取液放入离心机中于 10 000 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃ 条件下离心 5 min,收集上清液,于 -18 ℃ 冷冻保存。

表 1 葵瓜子仁蛋白提取条件

| No. | 溶剂           | 提取温度<br>/℃ | 提取时间<br>/min | 提取方法 |
|-----|--------------|------------|--------------|------|
| P1  | 去离子水         | 25         | 10           | 超声   |
| P2  | 去离子水         | 25         | 20           | 超声   |
| P3  | 去离子水         | 50         | 10           | 超声   |
| P4  | 去离子水         | 50         | 20           | 超声   |
| P5  | Tris-HCl 缓冲液 | 25         | 10           | 微波辅助 |
| P6  | Tris-HCl 缓冲液 | 25         | 20           | 微波辅助 |
| P7  | Tris-HCl 缓冲液 | 50         | 10           | 微波辅助 |
| P8  | Tris-HCl 缓冲液 | 50         | 20           | 微波辅助 |

2.2 蛋白质的裂解定量和纯度测定

2.2.1 蛋白质的裂解定量<sup>[3]</sup> 配置裂解液(4 mmol·L<sup>-1</sup> 硫脲,10 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素,6% CHAPS,45 mmol·L<sup>-1</sup> DTT,4% 两性电解质),称取 2.1 项下提取的蛋白质粉末各 10 mg 放入离心管中,各加入配好的裂解液 250 μL,混合均匀,于室温条件下间断振荡裂解 5 h,在 18 000 r·min<sup>-1</sup>,21 ℃ 条件下离心 30 min,收集上清液并进行蛋白质定量<sup>[4]</sup>。

2.2.2 蛋白质纯度的测定 采用 BRADFORD 法测

定蛋白质纯度。取 6 支试管,编号 0~5,分别加入不同体积的 1 g·L<sup>-1</sup> 标准蛋白(0~0.5 mL)、0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaCl(0.5~1 mL),各加入考马斯亮蓝试剂 5 mL,摇匀,在 1 h 内以 0 号试管为空白对照,应用紫外-可见光分光光度法于 595 nm 处进行比色,以标准蛋白为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线。称取等量 2.1 项下各葵瓜子仁蛋白质粉末,按 2.2.1 项下方法进行裂解,得上清液;另取 8 支试管,加入合适质量浓度的上清液,使 A 测定值在标准曲线范围内,计算蛋白质纯度。

蛋白质纯度 = 纯蛋白质质量 / 干粉质量 × 100%

试验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,本试验均为计量资料,方差齐用 t 检验,方差不齐则用 t 检验,P<0.05 时表明差异具有统计学意义,结果见图 1。表明 P1~P8 条件下提取的蛋白质干粉质量 57.43~63.59 mg,差异无统计学意义;对不同提取工艺得到的蛋白质纯度进行方差分析,结果显示 P3,P4,P7,P8 间差异无统计学意义,但与另外 4 种条件间具有极显著的统计学差异(P<0.01)。

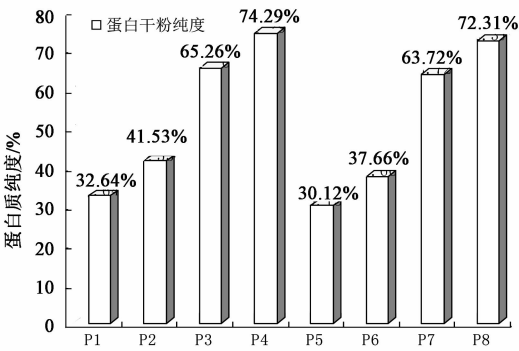


图 1 不同提取条件下葵瓜子仁蛋白质纯度的比较

2.3 双向电泳 在 Protean IEF Cell 上进行第一向 SDS-PAGE,将 pH 4~7 的 IPG(7 cm)胶条放置于含有 150 U 蛋白质的水化液(4 mmol·L<sup>-1</sup> 硫脲,10 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素,6% CHAPS,45 mmol·L<sup>-1</sup> DTT,4% 两性电解质)150 μL 中 12 h(24 ℃),进行第一向等电聚焦电泳,设置参数为分别在 500,1 000,4 500 V 的电压下快速升压 2,1.5,4 h,并在 4 500 V 电压下聚焦 24 h,最终 13 000 h,500 V 持续 24 h,聚焦完成后分别在平衡液 I(7 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素,0.412 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液,3% SDS,3% DTT,15% 甘油,pH 9.0)和平衡液 II(7 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素,0.412 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液,3% SDS,3% 碘乙酰胺,15% 甘油,pH 9.0)中放置 20 min。在 MINI-Protean Tetra SYSTEM 上进行第二向等电聚焦电泳,应用 10% 浓度的分离胶系统,用 0.8% 琼脂糖密封液固

定胶条,溴酚蓝指示线胶条前和分离胶后分别为 90,180 V,当达到向上距分离胶下边 0.6 cm 时停止,电压 50 V 持续 60 min,恒定电压 160 V,电流限定 35 mA。

选择提取蛋白质纯度较高的 P3,P4,P7,P8 进行双向电泳,利用 BRADFORD 方法对该 4 种条件下提取得到的蛋白进行定量,相同质量蛋白质上样,利用 PDQUESTC 8.0 软件分析蛋白点分别为(131 ± 14),(196 ± 11),(140 ± 17),(196 ± 20)个,表明 P4 和 P8 条件下提取出的蛋白质点要明显多于 P3 和 P7,具有极显著的统计学差异( $P < 0.01$ )。

**2.4 二维电泳图谱分析** 应用 Image Master 2D Elite 软件对 P4 和 P8 进行分析,尽管这两个提取条件得到的蛋白质点基本相同,但蛋白质组的电泳面存在一定差异,见图 2,结果显示 P4 条件下得到的蛋白点更加明显,原因可能是由于两种条件选用的提取溶剂不同,在去离子水中蛋白质的溶解效率较高,故融入的蛋白质量较大。

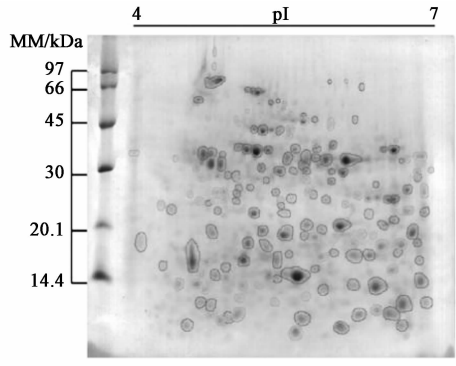


图 2 不同提取条件得到的葵瓜子仁蛋白二维电泳叠加分析

### 3 讨论

目前国内外对葵瓜子蛋白的提取条件尚无定论<sup>[5-6]</sup>,通过对 8 种实验室常用的蛋白质提取条件进行分析,结果表明溶剂和提取方法对葵瓜子仁蛋白提取率的影响最大。相同提取温度和时间情况下,以去离子水为溶剂并采取超声提取法所得蛋白质的纯度要高于选择 Tris-HCl 缓冲液为溶剂并采用微波辅助提取法,表明葵瓜子仁蛋白应用去离子水为提取溶剂的效果较 Tris-HCl 缓冲液好,提取方法选择超声提取法最好,但研究人员应用微波辅助法提取栗子组织蛋白质的效果不佳,提示微波辅助提取法不适合蛋白质结构的提取,另一方面由于微波具有较高能量,当传递到蛋白质中可能会使蛋白质

结构发生变化而导致活性丧失<sup>[7-10]</sup>。  
由二维电泳图谱可知,在提取溶剂和方法相同的条件下,随提取温度的升高和时间的延长,得到的蛋白质种类增多;当提取温度和时间相同时,采用去离子水和超声提取法得到的蛋白质种类略多于 Tris-HCl 缓冲液和微波辅助提取法,但差异无统计学意义,说明影响葵瓜子仁蛋白提取种类的主要因素为提取温度和时间。

### [参考文献]

[ 1 ] Kennedy J F, White C A. Bioactive carbohydrates Chichester [ M ]. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1983:36.  
[ 2 ] 贾梦醒,朱涛,罗朝志,等. 不同剂量鱼精蛋白对肝移植新肝期凝血功能的影响 [ J ]. 北华大学学报:自然科学版,2012,13(6):640.  
[ 3 ] Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [ J ]. Proteomics, 2004,4(9):2522.  
[ 4 ] Nandakumar M P, Marten M R, Raman B, et al. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional gel electrophoresis [ J ]. J Proteome Res,2003,2(1):89.  
[ 5 ] Franz G. Polysaccharides in pharmacy: current application and future concepts [ J ]. Planta Med,1989,55(6):493.  
[ 6 ] 赵国华,韩笑. 虫草素对  $\beta$ -淀粉样蛋白诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 [ J ]. 北华大学学报:自然科学版,2012,13(4):413.  
[ 7 ] 陈艳军,高旭珍,关大勇,等. 玉米须醇提物对肝纤维化大鼠药效学研究 [ J ]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):195.  
[ 8 ] Imberty A, Pérez S, Shah R N, et al. Flexibility in a tetrasaccharide fragment from the high mannose type of N-linked oligosaccharides [ J ]. Int J Biol Macromol, 1993,15(1):17.  
[ 9 ] 舒静,张小鹿,徐震宇,等. 黄芪抗腹膜纤维化模型大鼠间皮细胞紧密连接损伤的研究 [ J ]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):196.  
[ 10 ] He C N, Wang C L, Guo S X, et al. Study on chemical constituents in herbs of *Anoectochilus roxburghii* [ J ]. Chin J Chin Mater Med,2005,30(10):761.

[责任编辑 全燕]