

鱿鱼鱼精蛋白的提取、纯化及其生化特性

EXTRACTION, PURIFICATION AND ITS BIOCHEMICAL CHARACTER OF SQUID PROTAMINE

钟立人 毋瑾超 张燕平 赵 艳 王南舟

(杭州商学院食品科学与工程系, 310035)

ZHONG Li-Ren, WU Jin-Chao, ZHANG Yang-Ping, ZHAO Yao, WANG Nan-Zhou

(Department of Food Science and Engineering, Hangzhou Institute of Commerce, 310035)

关键词 鱿鱼, 鱼精蛋白, 提取, 纯化, 生化特性

KEYWORDS Squid, Protamine, Extraction, Purification, Biochemical character

鱼精蛋白(Protamine)是一种常与 DNA 结合,存在于鱼类成熟精巢中的碱性蛋白。由于其生化组成的特点,鱼精蛋白不仅具有促使细胞发育繁殖的作用,而且一旦将其分离出来,能有效抑制多种食品腐败菌的生长和繁殖[Miller 1942]。同时,这种鱼精蛋白还有降血压、助呼吸、促消化、抗菌消毒、抑制肿瘤的生长等多种作用[Sharifa 等 1993]。

目前,已有从鲑、乌鱼、鲤等鱼种中分离到鱼精蛋白的报导[Uyttendaele 和 Devere 1994, 张文重 1992, 高桂庭 1995],其中鲑鱼鱼精蛋白在日本等国已成功用于食品贮藏保鲜[Nakamura 和 Kato 1994, Yajima 等 1996]。鉴于我国沿海水产资源的特点,本研究以鱿鱼(Squid)作为提取原料。鱿鱼,学名枪乌贼,属头足纲,枪乌贼科,我国南北沿海均有分布,且产量相当丰富,但目前国内外尚未见到有关鱿鱼鱼精蛋白的研究报导。采用已报导的鲑、乌鱼、鲤等鱼精蛋白提取方法对提取鱿鱼鱼精蛋白经实验证实并不适用。经反复试验,找到了一种提取鱿鱼鱼精蛋白的较好方法。该方法的特点是:手续较简便,提取得率较高。用经过纯化的样品进行了等电点和相对分子质量的测定等鱿鱼鱼精蛋白的研究,以期为鱿鱼精巢组织的综合利用,开拓一条新途径。

1 材料和方法

1.1 实验材料和主要仪器

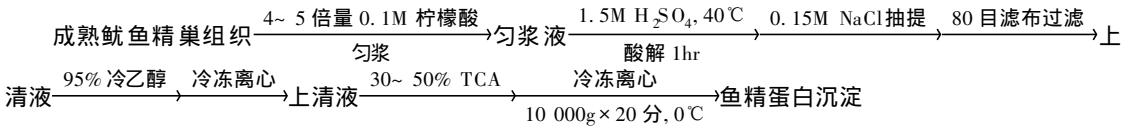
鱿鱼精巢组织(中外合资舟山兴业有限公司鱿鱼加工厂提供); 鲑鱼鱼精蛋白硫酸盐(Sigma 试剂); 组织捣碎机(DS-1, 上海标本模型厂); 高速冷冻离心机(GL-21, 湖南仪器仪表总厂离心机厂); 凝胶电泳槽(北京六一仪器厂), 核酸蛋白检测仪(MP-92, 中科院上海生化所); 自动部份收集器(BS-100A, 上海沪西分析仪器厂); 稳流稳压电泳仪 ECP-3000(北京六一仪器厂); Sephadex G-25, 两性电解质, 低分子量标准蛋白样品(上海生物化学试剂公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 鱿鱼鱼精蛋白提取方法

浙江省科技计划项目资助, 编号: 971101049。

收稿日期: 1998-11-04



1.2.2 鲑鱼鱼精蛋白的纯化

在鱼精蛋白的提取过程中,可能会混入杂蛋白,核酸等其它物质,因此必须对提取物进一步纯化。本试验采用葡聚糖凝胶柱层析法分离纯化蛋白质[张龙翔 1997]。

层析条件: Sephadex G-25 (上海化学试剂厂), Pharmacia (进口分装)。样品液: 鲑鱼鱼精蛋白硫酸盐 (Sigma 试剂) 5mg/mL, 提取的鲑鱼鱼精蛋白硫酸盐 5mg/mL。层析柱: 1.8cm \times 16cm。洗脱液: 0.05M Tris-HCL, pH 6.7, 0.1M KCl 液。洗脱速度: 40mL/h。检测波长: 280nm。

1.2.3 鲑鱼鱼精蛋白纯度鉴定

经柱层析后的样品,采用聚丙烯酰胺等电聚焦电泳法对其进行纯度鉴定。

电泳条件: 凝胶浓度 7.5%, pH 梯度范围 (pH 3.5~10)。样品: 鲑鱼鱼精蛋白 (Sigma 试剂, 2.5mg/mL), 提取的鲑鱼鱼精蛋白 (2.5mg/mL)。

粗品经柱层析纯化后的第二峰 (2.5mg/mL)。

上样量: 均为 10 μ L。

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定相对分子质量

电泳条件: 凝胶浓度 10%, 采用垂直平板电泳槽。

低分子量标准蛋白样品: 磷酸化酶 B (94 000), 牛血清白蛋白 (67 000), 肌动蛋白 (43 000), 碳酸酐酶 (30 000), 烟草花叶病毒 (17 500), (上海生物化学试剂公司)。

鲑鱼鱼精蛋白 (Sigma 试剂) 20 μ L。

纯化的鲑鱼鱼精蛋白 20 μ L。

电泳方法: 样品上样进行电泳, 结束后, 测定染料迁移距离及各样品迁移距离。由公式相对迁移率 = 样品迁移距离 / 染料迁移 / 距离, 求得各相对迁移率, 并制得标准曲线, 然后依据标准曲线求得鲑鱼鱼精蛋白的相对分子质量, 标准曲线见图 3。

2 结果与分析

2.1 柱层析结果

葡聚糖凝胶 G-25 柱层析对鱼精蛋白的纯化结果见图 1。

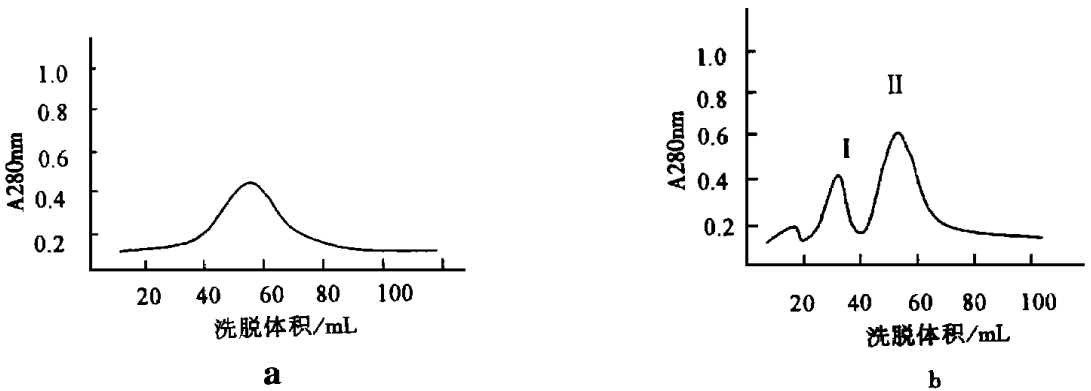


图 1 葡聚糖凝胶 G-25 柱层析对鱼精蛋白的纯化结果

Fig.1 Sephadex G-25 column chromatography of protamine preparation

a. 鲑鱼鱼精蛋白 (Sigma) b. 鲑鱼鱼精蛋白 (提取)

2.2 鱼精蛋白纯度鉴定

在鱿鱼鱼精蛋白制取过程中,沉淀鱼精蛋白时,采用先冷乙醇,后三氯乙酸的分级沉淀。若氯化钠抽提后,直接采用三氯乙酸沉淀,则会同时沉淀大批杂蛋白,如图 2a。先用冷乙醇沉淀,则可使大批杂蛋白沉淀,同时鱼精蛋白几乎不沉淀,再用三氯乙酸处理,则可得较纯净的鱼精蛋白样品,如图 2b。

在图 1b 中,收集 II 号尖峰部分,其与标准鲑鱼鱼精蛋白出峰体积接近,对其进行电泳,如图 2c 中,其等电点靠近碱性端,且条带单一,纯化效果较好,与鲑鱼鱼精蛋白标准样品完全一致。

在鱿鱼鱼精蛋白等电聚焦测定中,经三次测定,求得鱿鱼鱼精蛋白的等电点分别为 8.90、9.0、9.16,数值接近取平均值 $PI=9.02$ 。

2.3 鱿鱼鱼精蛋白的相对分子质量

鱿鱼鱼精蛋白相对分子质量测定,由 SDS-PAGE 图示(图 3)及计算可知,提取的鱿鱼鱼精蛋白由两部分组成,其在电泳图上非常相似,不能分开,这两部分分子量分别为 11000 和 9300。

3 讨论与结语

(1) 采用本研究提供的鱿鱼鱼精蛋白提取方法,即先抽提、水解,再分级沉淀的方法,经电泳结果分析,可制得纯度较高的鱿鱼鱼精蛋白,得率约为 2.1%。

(2) 在鱼精蛋白纯化过程中,经葡聚糖凝胶柱层析时,由于葡聚糖中的羧基团呈酸性,它与呈碱性的鱼精蛋白会发生吸附作用,影响洗脱效果,经添加盐类,使盐离子强度在 0.05M 以上,就会减弱吸附作用[王重庆 1994],本实验选用 0.1M KCl 液,效果较好。

(3) 在聚丙烯酰胺等电聚焦中发现鲑鱼鱼精蛋白电泳结果处于电极端,且 PI 比报导数值偏低这是由于实验采用的两性电解质载体为 PH3.5~10 之缘故,而鱿鱼鱼精蛋白在 PH 梯度胶上扩散较充分,其 PI 较低,推测与其分子结构有关。

(4) 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时,发现鱿鱼鱼精蛋白有两部分,其在等电聚焦上形为一致,推测其由两部分组成。而且所得鱿鱼鱼精蛋白相对分子质量有差异,这是由于它们在精氨酸含量或蛋白质肽键排列顺序以至空间结构不同所致,有关问题仍需进一步探讨。

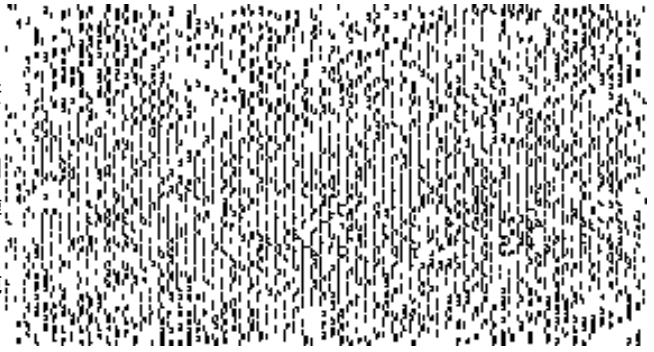


图 2 鱼精蛋白聚丙烯酰胺等电聚焦电泳结果

Fig. 2 PAGE-Isoelectric focusing pattern of protamine sample

a. NaCl 抽提后,直接三氯乙酸沉淀; b. NaCl 抽提后,先用乙醇后用 TCA 沉淀; c. 沉淀 b 经凝胶柱层析收集 II 峰; d. 鲑鱼鱼精蛋白

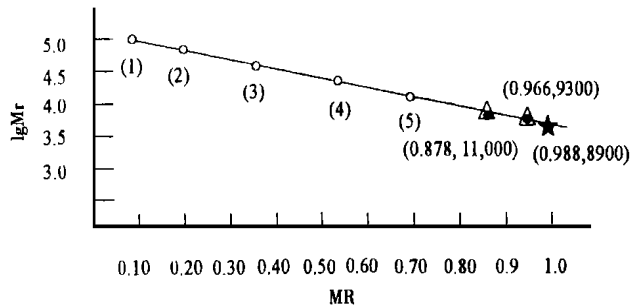


图 3 鱼精蛋白 SDS-PAGE 电泳图示

Fig. 3 SDS-PAGE pattern of protamine

(1) 磷酸化酶 B (0.073, 4.973); (2) 牛血清白蛋白 (0.183, 4.862); (3) 肌动蛋白 (0.322, 4.633); (4) 碳酸酐酶 (0.512, 4.477); (5) 烟草花叶病毒 (0.688, 4.243)

△ 鱿鱼鱼精蛋白 ★ 鲑鱼鱼精蛋白

参 考 文 献

- 王重庆. 1994. 高级生物化学实验教程. 北京: 北京大学出版社. 54~ 64
- 张文重. 1992. 乌鱼精蛋白之萃取利用. 养鱼世界(台湾), (2): 31~ 34
- 张龙翔. 1997. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社. 100~ 106
- 高桂庭. 1995. 鱼精蛋白的提取工艺与防腐特性. 水产科技情报, 22(3), 119~ 120
- Miller B F. 1942. Antibacterial properties of protamine and histone, *Science*, 96, 428~ 430
- Nakamura S, Kato A. 1994. New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J Agric. Food, Chem*, 40: 735~ 739
- Sharifa K, Flushing N Y, John K, et al. 1993. Process for the preparation of a high purity protamine-DNA complex and process for use of same. United States Patent. (5): 187, 260
- Uyttendaele M, Devere J. 1994. Evaluation of antimicrobial activity of protamine, *Food Microbiology*, 11: 417~ 427
- Yajima, Mizuo, Nazaki. 1996. Protamine and pepper extracts as food preservatives. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho. Jp.* 8, 289, 770