

肝蛋白提取纯化及应用研究进展

柳青海^{1,2}, 张唐伟^{1,2}, 李天才^{1*}

(1. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

[摘要] 介绍了肝蛋白的主要提取方法, 即水溶液提取法、碱提酸沉法、有机溶剂提取法、蔗糖密度梯度离心法、超声波萃取法等; 分离纯化方法, 即盐析法、低温有机溶剂沉淀法、透析与超滤、凝胶过滤法、亲和层析法、电泳法、离子交换层析法等。同时阐述了肝蛋白的应用及其应用前景。

[关键词] 肝蛋白; 提取分离; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R975. 5

[文献标识码] A

Review on Extraction, Purification and Application of Liver Protein

LIU Qinghai^{1,2}, ZHANG Tangwei^{1,2}, LI Tiancai^{1*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining, Qinghai 810008;
2. Graduate University, Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: The main extracting methods of liver protein which including aqueous extraction, acidic distillation, organic solvent extraction, sucrose density gradient centrifugation, ultrasonic extraction and so on, and the separation and purification method which including salting out, organic solvent precipitation, dialysis and ultrafiltration, gel filtration, affinity chromatography, electrophoresis, ion exchange and so on are introduced in this paper, and the application and prospects of liver protein are reviewed as well.

Key words: liver protein; extraction and separation; antitumor activity

动物肝脏是畜、禽宰杀后的主要副产品之一。肝脏是一种较好的动物蛋白源, 肝蛋白中含有多种畜禽必需的氨基酸, 而且比例适当, 为配合饲料开辟了新的蛋白质资源^[1]。我国动物肝脏资源丰富, 除传统食用外, 尚无其他利用, 利用率较低。近年来, 对动物肝蛋白研究较多, 主要集中于肝蛋白多肽的活性研究, 对开发蛋白类药物有着重要的意义。为肝蛋白的进一步开发利用提供参考, 笔者总结了肝蛋白的提取、分离方法及其活性研究进展。

1 肝蛋白的提取

蛋白提取首先要对组织或细胞经过一定的预处理, 使被提取物充分释放出来。影响蛋白提取率的因素主要是其在提取液中溶解度大小以及其由固相扩散到液相的难易程度。蛋白在溶剂中溶解度大小与该物质的分子结构及溶剂理化性质有关, 遵守“相似相溶”的原则。减小溶剂的黏度、搅拌和延长提取时间可以提高扩散速度, 增加提取率。提取的原则是“少量多次”, 对于等量的提取溶液, 分多次提取比一次提取效果好。大部分蛋白都溶于水、稀盐、稀酸或稀碱溶液, 少数与脂类结合的蛋白质可溶于乙醇、丙酮及丁醇等有机溶剂中, 因此, 在实际操作中可以根据具体情况选择不同溶剂提取蛋白。

1.1 水溶液提取法

水溶液和缓冲液系统对蛋白质稳定性好、溶解

度大, 是提取蛋白质最常用的溶剂, 通常用量是原材料的 1~ 5 倍, 提取时需搅拌, 以利于蛋白质的溶解。沈国强等^[2]用水溶液提取法从牛肝中提取分离过氧化氢酶(Catalase, CAT), 提取的最佳条件为浸提温度 30℃、浸提时间 10h、料水比 1: 5, 最高提取率可达 98.1%。SONG LiNa 等^[3]用水浸提从鲨鱼肝脏中提取多肽(sHSP)。Zhou Changlin 等^[4]用此方法从猪肝中分离蛋白。G. Sobha 等^[5]用水溶液浸提, 硫酸铵沉淀从骆驼肝中分离出铁蛋白。Dr. Douglis R 等^[6]用磷酸缓冲液在 90℃条件下提取 20min, 离心后保留上清液, 再用 40%乙醇沉淀从大鼠肝脏中分离纯化蛋白。岑亮等^[7]按 1: 5 的比例加入预冷的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5), 用高速组织捣碎机捣碎后, 在 2℃抽提 2h, 离心收集上清液, 再进一步分离纯化得到鸭肝蛋白酶。

1.2 碱提酸沉法

碱提酸沉是用碱性溶液浸泡原材料, 使其蛋白充分溶解出来, 然后用酸调节提取液的 pH 值, 达到蛋白的等电点而使其沉淀, 从而将蛋白和其他成分相互分离。张耀兮^[8]用该法提取牦牛肝蛋白, 最佳提取条件为: NaOH 浓度 1%, 料液比 1: 5, 浸提时间 60min, 提取温度 40℃, 酸沉条件为 pH 4.0, 蛋白质提取率可达 77.91%。

1.3 有机溶剂提取法

一些和脂质结合比较牢固或分子中非极性侧链

[收稿日期] 2010-09-21; 2010-12-30 修回

[基金项目] 青海省科技厅支撑项目“牦牛肝活性蛋白提取与分离研究”(0733211D01)

[作者简介] 柳青海(1985-), 男, 在读硕士, 研究方向: 药用植物化学。E-mail: qhailiu@163.com

* 通讯作者: 李天才(1966-), 男, 副研究员, 硕士生导师, 从事青藏高原特色资源可持续利用与开发研究。E-mail: tldi@nwipb.ac.cn

较多的蛋白质和酶,不易溶于水、稀盐溶液、稀酸或稀碱中,可用乙醇、丙酮和丁醇等有机溶剂,但必须在低温下操作。丁醇对脂质结合紧密的蛋白质和酶提取效果较好,因为丁醇具有较强的亲脂性和亲水性,在溶解度范围内不会引起酶的变性失活。李志丹等^[9]用丙酮-TCA沉淀-裂解液浸泡提取海兔肝蛋白质,结果表明,该法提取蛋白效率较高。吴萍等^[10]用pH8.6的Tris-HCl缓冲溶液和乙醇-氯仿(1:1.03:0.08)溶液作为提取剂,80℃水浴变性6min,从家兔肝脏中分离锌金硫蛋白。Vijaya Lakshmi等^[11]用去污剂从小鼠肝脏中提取分离11 β -羟化类固醇脱氢酶(11 β -HSD),提取效果较好,得到的产物纯度高。

1.4 蔗糖密度梯度离心法

王璜等^[12]通过两次蔗糖密度梯度离心,从家兔肝脏中分离得到LRP(lung-resistance protein)蛋白粗提液。徐轶群等^[13]用1~4℃的0.25mol/L蔗糖溶液,液料比为1:10,匀浆后离心,取上清液提取鲫鱼肝过氧化氢酶,测定镉对其酶活性的影响。陆红法等^[14]取中华鳖肝脏,加含0.25mol/L蔗糖的缓冲液,匀浆,经离心(6000g,30min)和超速离心(100000g,10min),取上清液进一步分离中华鳖肝脏蛋白磷酸酶。HOLMES R S等^[15]用1:1蔗糖溶液浸泡,匀浆,通过高速离心得到小鼠肝脏过氧化氢酶。

1.5 超声波萃取法

超声波提取是基于超声波的特殊物理性质,通过压电换能器产生的快速机械振动波来减少目标萃取物与样品基体之间的作用力,从而实现固-液萃取分离。超声波提取(也称为萃取)以其提取温度低、提取率高、提取时间短等独特优势被应用于动、植物中各种目标成分提取,是替代传统剪切工艺方法,实现高效、节能、环保式提取的现代高新技术手段。吴萍等^[10]用超声波辅助有机溶剂从家兔肝脏中分离锌金硫蛋白,分离效果较好。

1.6 微波辅助提取法

微波辐射过程是高频电磁波穿透萃取介质,到达物料的内部。由于吸收微波能,细胞内部温度迅速上升,使其细胞内部压力升高,导致细胞破裂。细胞内有效成分自由流出,在较低的温度条件下提取介质捕获并溶解。通过进一步过滤和分离,便获得所要提取的物质。微波辅助萃取不仅效率高、选择性强、能耗小、操作费用少,且符合环境保护要求,广泛用于动植物中有效成分的提取分离。Walter Vetter等^[16]用微波辅助提取法提取海豹和鳕鱼肝蛋白。

2 肝蛋白的纯化

通过粗提后得到的蛋白混合物,有些蛋白含量十分丰富,而有的含量却很低。为了研究某个蛋白

质,必须首先将该蛋白质从其他蛋白质和非蛋白质分子中纯化出来。用于分离蛋白质的最重要特性是根据分子量大小、电荷、疏水性和对其他分子的亲和性的不同,通常采用多种方法组合来实现蛋白质的完全纯化。蛋白质分离纯化方法主要包括以下几种。

2.1 根据溶解度不同的纯化方法

2.1.1 盐析法 中性盐对蛋白质的溶解度有显著影响,一般在低盐浓度下随着盐浓度升高,蛋白质的溶解度增加,此称盐溶;当盐浓度继续升高时,蛋白质的溶解度不同程度下降并先后析出,这种现象称盐析,将大量盐加到蛋白质溶液中,高浓度的盐离子(如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 SO_4^{2-} 和 NH_4^+)有很强水化力,可夺取蛋白质分子的水化层,使之“失水”,于是蛋白质胶粒凝结并沉淀析出。蛋白质盐析常用中性盐,主要有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、 Na_2SO_4 、 NaCl 、 Na_3PO_4 等,应用最多的是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,其温度系数小而溶解度大、分段盐析效果好且不易引起蛋白质变性。邱慧等^[17]先用饱和度为40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 离心后,上清液中再加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至60%饱和度,离心收集沉淀,得到鸭肝过氧化氢酶。G. Sobha等^[5]使用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀,从骆驼肝脏中分离出铁蛋白。岑亮等^[7]将鸭肝匀浆后,上清液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至45%饱和度,离心收集沉淀,使蛋白和其他杂质分离。

2.1.2 低温有机溶剂沉淀法 用与水可混溶的有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮、三氯乙酸等),可使大多数蛋白质溶解度降低并析出,此法分辨率比盐析高,但蛋白质较易变性,应在低温下进行。李春娟等^[18]将动物肝脏匀浆离心后,上清液中加入丙酮,4℃放置过夜,离心的沉淀即为过氧化氢酶。

蛋白质沉淀分离后,需要将蛋白质中的盐或有机溶剂除去,主要使用透析方法,该方法简单易行、成本低,但耗时较长。可用葡萄糖凝胶G-25或G-50过柱的方法除杂,所用时间较短。陈旭等^[19]采用Sephadex G-25层析(1.7cm×32cm),用0.025mol/L Tris-HCl缓冲液(pH7.25)除去从鲨鱼和鳊鱼肝中提取铁蛋白样品中的盐类物质,脱盐后的铁蛋白经截流分子量为100kU的透析袋透析,冷冻干燥得到纯品。

2.2 根据分子量大小的纯化方法

2.2.1 透析与超滤 透析法是利用半透膜将分子大小不同的蛋白质分开。超滤法是利用高压或离心力,使水和其他小的溶质分子通过半透膜,而蛋白质留在膜上,可选择不同孔径的滤膜截留不同分子量的蛋白。蔡震峰等^[20]用离子交换层析和超滤法结合从家兔肝脏中提取金属硫(MT)蛋白,分离效果较好。

2.2.2 凝胶过滤法 原理是根据分子大小分离,分离时分子量大的物质先流出柱,而分子量小的后

流出,从而达到分离目的。常用的填充材料有聚丙烯酰胺凝胶(Bio-Gelp)、葡聚糖凝胶(Sephadex)、琼脂糖凝胶(agarose gel)和聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶(sephacryl)。吴萍等^[10]对提取液用 Sephadex G-50 凝胶柱色谱法分离纯化家兔肝脏锌金属硫(Zn MT)蛋白,纯化得到 Zn MT 粗品产率约为 2.5 mg/g 肝,表明该分离方法可用于 Zn MT 的纯化,其操作简单,设备要求低,可在常规实验室完成,是一种简便可靠的方法。王璜等^[12]用 sephacryl 1000 分子筛层析纯化家兔肝脏中 LRP(lung resistance protein)蛋白,SDS-PAGE 银染结果显示最终得到了单一电泳条带的家兔 LRP 蛋白。

2.3 根据配体特异性的纯化方法——亲和层析法
亲和层析法(affinity chromatography)是分离蛋白质的一种极为有效的方法,经常只需一步处理即可使某种待提纯的蛋白质从复杂的蛋白质混合物中分离出来,而且纯度很高。孙建新等^[21]用溴化氰活化的琼脂糖凝胶 4B(CNBr-activated sepharose 4B)和 Blue dextran 偶联,从大鼠肝脏中分离出乳酸脱氢酶。

2.4 根据带电性质的纯化方法

2.4.1 电泳法 由于蛋白质的分子量和电荷数量不同而在电场中的迁移率不同而分开。应用最多的是等电聚焦电泳,其利用一种两性电解质作为载体,电泳时两性电解质形成一个由正极到负极逐渐增加的 pH 梯度,当蛋白质样品泳动到凝胶的某一部位,pH 值正好等于该蛋白质的等电点时,蛋白质的净电荷为零而不再移动,则聚集形成一条蛋白质区带。该方法可用于分析和制备各种蛋白质。李志丹等^[9]用等电聚焦各种电泳和 SDS-PAGE 电泳法得到分子量大小不同的海兔肝蛋白。

2.4.2 离子交换层析法 当蛋白质溶液流经离子交换层析柱时,带有与离子交换剂相反电荷的蛋白质被吸附在离子交换剂上,随后用改变 pH 或离子强度办法将吸附的蛋白质洗脱下来。岑亮等^[7]从鸭肝中提取蛋白酶粗提液,用 DEAE-Sephacryl S-200 凝胶柱层析,最后得到蛋白酶电泳纯品,纯化倍数为 650.16 倍,回收率为 19.23%。孙建新等^[21]用 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析,从大鼠肝脏分离的乳酸脱氢酶中进一步分离乳酸脱氢酶 M₄,得到电泳纯,整个分离纯化过程快速、经济,可在 8 h 内完成,可见其为一种较好的纯化方法。赵赣等^[22]用 DEAE-纤维素离子交换层析柱,以 NaCl 洗脱,收集洗脱液,检测酶活性,进一步通过凝胶过滤分离鸡肝碱性磷酸酶,但并未得到单一的纯酶。

3 肝蛋白的应用

3.1 抗氧化

范秋颂等^[23]研究表明,鲨鱼肝蛋白粗提物能部

分修复受损的肝脏线粒体的呼吸功能,增强肝脏线粒体和肝脏抗氧化的能力,从而保护肝脏免受硫代乙酰胺(TAA)造成的急性肝损伤,对肝脏有保护作用。

3.2 治疗糖尿病

有研究表明,鲨鱼肝活性肽 S-8300 能显著降低链佐霉素(STZ)诱导的胰岛素细胞凋亡,对 STZ 损伤的小鼠胰岛素瘤 B 细胞具有明显的修复和保护作用;鲨鱼肝活性肽 S-8300 对四氧嘧啶(ALX)所致的血糖升高有显著的抑制作用,表明鲨鱼肝活性肽 S-8300 可能具有减弱四氧嘧啶(ALX)对胰岛 β 细胞的杀伤作用,或改善损伤的胰岛 β 细胞的功能;显著降低糖尿病小鼠的肾重/体重值,说明其对糖尿病小鼠的肾脏也有一定的保护作用^[24-26]。

3.3 抗肿瘤作用

邹清雁等^[27]分别用 4 个月和 7 个月的胎肝提取物(蛋白),观察其对 BEL-7042 肝癌细胞的影响,结果表明:从 4 个月大小的胎肝中提取出含有较多的促肝分化因子,能抑制肝癌细胞的生长和促进分化。王鸿鹤等^[28]从河豚肝脏中提取分离多肽 A,其在体内、体外试验有一定的抗癌活性,但其抗癌作用与剂量无相关性,对人癌细胞和人体正常细胞无明显的选择性。李茹冰等^[29]从肝脏提取活性物质 S₄,其能抑制 BEL-7402 肝癌细胞增殖,并对肝细胞源的肿瘤细胞具有一定特异性,已具备天然提取物抑癌药物的基本标准,具有重要的研究与开发价值。

4 前景与展望

蛋白质制剂已成为制药工业不可缺少的一部分,蛋白类药物发展迅速。据美国 Frost & Sullivan 咨询公司预测,如按蛋白质类药物市场年增长率 12% 计算,到 2011 年,全球蛋白质类药物市场总销售额将达 1180 亿美元,而市场上蛋白类药物主要以抗肿瘤药物为主。蛋白类药物研究的热点是对已有的蛋白进行结构改造和引进计算机图像技术研究蛋白与受体之间的相互作用,从而设计出简单的小分子化合物。因此,寻找新的活性蛋白或小分子多肽,对蛋白类药物研究和开发具有重要意义。

动物肝脏是畜、禽宰杀后的主要副产品之一。动物肝脏资源丰富,以猪肝为例,猪肝约占整猪体重的 1.4%,全国每年可得猪肝 0.6~0.8 亿 kg。目前,对动物肝脏的利用较少,除少量食用外,相当一部分被废弃,如果把这部分资源进行新产品开发转化为产品,特别是肝脏中丰富的蛋白质,其经济效益相当可观。

[参 考 文 献]

- [1] 卞克明,孙守信,王玉华,等. 肝粉可以替代部分鱼粉喂产蛋鸡[J]. 饲料研究, 1987(4): 40-41.
- [2] 沈国强,张 栋,杨春霞. 牛肝过氧化氢酶提取工艺的

研究[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(1): 37-39.

[3] Song Li Na, Huang Xia Dong, LEI Hong, et al. Hepatocyte Proliferation and Damage β -Cell Protective Effect of a New Hepatocyte Stimulate Peptide (Shsp) from Shark Liver[J]. Chin J Nat Med, 2007, 5(4): 306-310.

[4] Zhou Changlin, Zhou Feiguo, Gao Chunfang, et al. Biological effects of extract from new born porcine liver on hepatocytes, hepatic stellate cells, and hepatoma cell line[J]. Journal of Medical Colleges of PLA, 2008, 23: 336-345.

[5] G. Sobha, S. Suryakala, C. Geetha, et al. Camel Kidney Ferritin: Isolation and Partial Characterization [J]. Veterinary Research Communications, 2000, 24: 287-297.

[6] Dr. Dougl's R, Labrecque M, D. directo, et al. Purification and physical chemical characterization of hepatic stimulator substance [J]. Haplology, 1987, 7(1): 100-106.

[7] 岑亮, 张丽丽, 邱慧, 等. 鸭肝蛋白酶的分离纯化及其部分性质研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(2): 97-101.

[8] 张耀兮. 牦牛肝蛋白提取分离及其活性研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2009: 23-25.

[9] 李志丹, 包晓东, 黄慧英, 等. 优化海兔肝蛋白质组提取与分离技术[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(增刊): 194-197.

[10] 吴萍, 彭新君, 何斌, 等. 家兔肝脏中锌金硫蛋白提取工艺的研究[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(3): 47-51.

[11] Vijaya Lakshmi, Carl Monder. Extraction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase from rat live microsomes by detergents [J]. Journal of Steroid Biochemistry, 1985, 22(3): 331-340.

[12] 王璜, 赵晓军. 家兔肝脏 LRP 蛋白的分离纯化与鉴定[J]. 四川动物, 2009, 28(2): 256-258.

[13] 徐轶群, 熊慧欣, 王子波. 铜对鲫鱼肝过氧化氢酶活性的影响[J]. 扬州大学学报: 自然科学版, 2006, 9(3): 76-78.

[14] 陆红法, 诸丽萍. 中华鳖肝脏蛋白磷酸酶的酶学特性分析[J]. 丽水学院学报, 2008, 30(5): 30-33.

[15] HOLMES R S, MASTERS C J. Epigenetic interconversion of the multiple forms of mouse liver catalase [J]. FEBS LETTERS, 1970, 11(1): 45-48.

[16] Walter Vetter, Marion Weichbrodt, Kerstin Hummert, et al. Combined microwave assisted extraction and gel permeation chromatography for the determination of chlorinated hydrocarbons in seal blubber and cod livers [J]. Chemosphere, 1998, 37(9): 2439-2449.

[17] 邱慧, 郭小路, 易焱波, 等. 鸭肝过氧化氢酶的分离纯化及部分性质研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(4): 163-168.

[18] 李春娟, 李妍, 李东刚, 等. 动物肝脏中超氧化物歧化酶活性的测定[J]. 化学工程师, 2006(7): 14-18.

[19] 陈旭, 黄河清, 孔波, 等. 鲨鱼和鲑鱼肝铁蛋白电泳纯的制备技术[J]. 海洋科学, 2004, 28(1): 15-18.

[20] 蔡震峰, 任凤莲, 曹醴承, 等. 金属硫蛋白的分离纯化[J]. 分析科学学报, 2008, 24(5): 527-530.

[21] 孙建新, 陈志, 扬雨善. 大鼠肝乳酸脱氢酶 M₄ 的分离纯化[J]. 第二军医大学学报, 1994, 15(1): 74-77.

[22] 赵赣, 钱芳, 孙永学, 等. 鸡肝碱性磷酸酶的分离纯化及其部分性质的研究[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2003, 21(3): 194-198.

[23] 范秋颂, 黄才国, 金艳, 等. 鲨鱼肝蛋白粗提物对大鼠肝线粒体抗氧化功能的影响[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2005, 31(5): 598-601.

[24] 黄凤杰, 吴梧桐. 鲨鱼肝活性肽 S-8300 抗糖尿病与细胞保护作用[J]. 中华临床药理学与治疗学, 2007, 12(7): 1283-1287.

[25] Huang F J, Wu W T. Antidiabetic effect of a new peptide from squalus mitsukurii liver (S-8300) in Alloxan induced diabetes [J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2005, 32: 521-525.

[26] Huang F J, Wu W T. Antidiabetic effect of a new peptide from squalus mitsukurii liver (S-8300) in Streptozotocin induced diabetes [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2005, 57: 1575-1580.

[27] 邹清雁, 孔祥平, 李茹冰. 胎肝提取物对 BEL 7402 肝癌细胞的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 1997, 13(4): 225-226.

[28] 王鸿鹤, 李瑜, 冯公侃, 等. 河豚肝脏提取物多肽 A 的抗癌活性实验[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(3): 278-280.

[29] 李茹冰, 孔祥, 邹清雁, 等. 肝细胞提取物组分 S₄ 对肿瘤细胞体外增殖的影响[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(7): 591-593.

(责任编辑: 冯卫)