

SDS - PAGE 电泳和高效凝胶过滤色谱法 研究人参蛋白热稳定性*

张巍, 姜先刚, 马晶, 李红艳, 赵雨, 赵大庆*

(长春中医药大学中医药与生物工程研发中心, 吉林 长春 130117)

[摘要] 目的: 研究人参蛋白在不同加热温度及时间下的热稳定性。方法: 采用中性缓冲液抽提和硫酸铵分级沉淀法提取人参蛋白, 在不同加热温度及时间条件下, 对人参蛋白进行 SDS - PAGE 电泳和高效凝胶过滤色谱分析。结果: 人参蛋白随着加热温度的升高而发生聚集和解聚; 在 50℃ 时, 人参蛋白会形成可溶性的大分子聚合物, 这一聚合物的浓度随加热时间的延长而不断升高。结论: 人参中各种蛋白亚基的热敏感性各不相同。

[关键词] 人参蛋白; 热稳定; SDS - PAGE 电泳; 高效凝胶过滤色谱

目前人参的炮制品主要包括红参、生晒参、保鲜参、活性参等。各种加工方法所采用的加工条件不同, 其中最为重要的区别是炮制温度的不同。由于人参中的许多成分均不够稳定, 容易受外界环境特别是温度的影响而起各种变化^[1], 因此在人参加工过程中温度的选择和控制是非常重要的。近 30 余年来, 人参成分的分离、纯化和结构鉴定得到了重大的进展, 迄今已知人参根中含有人参皂苷、多糖、挥发油、脂肪酸、甾醇、维生素、蛋白质、多肽等多种有效成分^[2]。但目前人们的研究主要集中于人参皂苷及挥发性成分, 蛋白质及多肽的研究相对较少。研究表明蛋白质和多肽在人参的生长、发育及生物功能表达等方面都起着重要的作用^[3-5]。本实验对不同加热温度 and 不同加热时间条件下人参蛋白的热稳定性进行了研究, 可为人参的炮制加工提供理论依据, 并对人参药用及商品价值的保持具有重要意义。

1 材料与仪器

1.1 材料

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、硫酸铵、丙烯酰胺、甘油、甘氨酸购自 Sigma 公司, 过硫酸铵 (Ammonium Persulfate)、TEMED (N, N, N', N' - 四甲基乙二胺)、 β - 巯基乙醇 (β - Mercaptoethanol)、考马斯亮兰 R - 250

(Coomassie Blue R - 250)、溴酚蓝购自 Amresaco 公司, 其他试剂均为国产分析纯。6 年生鲜参购于吉林省靖宇县, 经长春中医药大学姜大成教授鉴定为 6 年生鲜人参 *Panax ginseng* C. A. Mey。

1.2 仪器

LL3000 冻干机 (德国 Heto); 1100 型高效液相色谱仪 (Angilen 公司); Ohpak SB - 803 HQ (8mm $\times$ 300mm) 凝胶排阻液相色谱柱 (Showa Denko); Angilen1100 分离单元 (包括四元梯度泵, 柱温箱, 真空脱气装置), Angilen1100 二极管阵列监测器。

2 方法

2.1 人参蛋白的提取

取鲜参 500g, 匀浆, 加 1L 含 0.15mol $\cdot$ L⁻¹ NaCl、pH7.4 10mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris - HCl 缓冲液, 4℃ 浸提 24h, 5 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 30min, 上清液用 80% 硫酸铵沉淀, 4℃ 静置过夜, 沉淀加 3 倍体积 pH7.4 10mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris - HCl 缓冲液复性, 透析, -20℃ 预冻, 冻干, 得水溶性人参总蛋白 5g, 占鲜参重 1%。

2.2 不同加热温度样品的制备

取人参蛋白 0.32g, 用 pH7.4 10mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris - HCl 缓冲液 8mL 溶解, 分成 8 份, 各份浓度一致, 加热不同的温度: 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90℃,

* [基金项目] 科技部“十五”攻关资助项目 (2004BA907A17)

[通讯作者] * 赵大庆, E-mail: cnzhaoyu@yahoo.com.cn。

加热时间均为1h,然后将样品以 $10\,000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,上清液用 $0.22\mu\text{m}$ 滤头过滤后即得。

2.3 不同加热时间样品的制备

取人参蛋白0.24g,用 $\text{pH}7.4\ 10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl缓冲液6mL溶解,加热不同的时间:30,60,90,120,150,240min,加热温度为 50°C ,各时间段分别取出1mL样品,将样品以 $10\,000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速离心10min,上清液用 $0.22\mu\text{m}$ 滤头过滤后即得。

2.4 蛋白浓度测定

使用PIERCE公司生产的BCA™蛋白试剂盒测定其蛋白浓度为90%。

2.5 SDS-PAGE电泳法

采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[6]。分离胶浓度为15%,浓缩胶浓度为5%。浓缩胶电压为70mV,分离胶电压140mV。电泳结束后用考马斯亮蓝R-250染色,最后用7.5%甲醇-水-5%冰醋酸(4.5:4.5:1)溶液脱色至背景清晰。

2.6 高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)

排阻极限:100kDa,流动相:Tris-HCl($10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}7.4$,含 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl),柱温: 25°C ,流速: $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长:280nm。

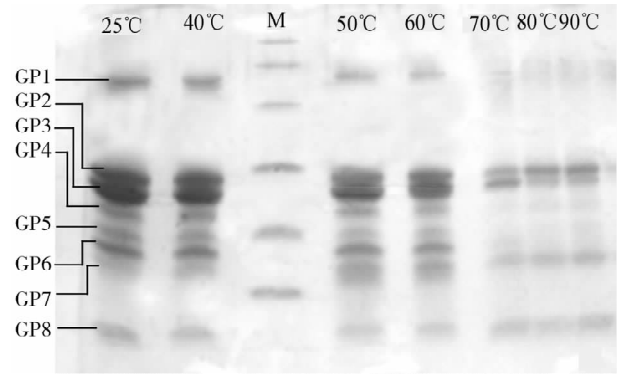
3 结果

3.1 加热温度对人参蛋白的影响

经SDS-PAGE电泳并应用TotalLab软件对凝胶进行分析,见图1~2。人参蛋白亚基的分子量主要分布在5~70kDa,主要包括分子量大约为64,29,27,24,19,18,15,8kDa的8种蛋白亚基(以下相应简称GP1-8),含量都大于3%。其中分子量为29kDa的GP2和27kDa的GP3为主要蛋白亚基,约占总蛋白亚基的50%。

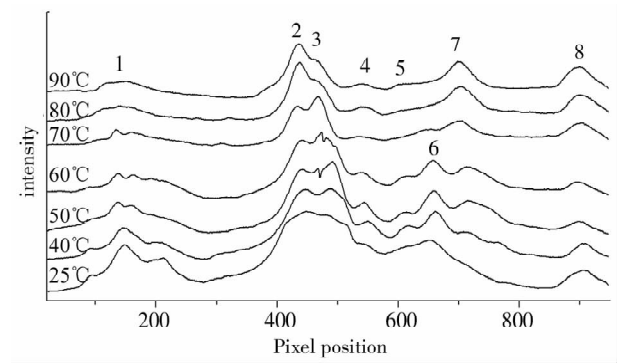
从SDS-PAGE电泳及扫描分析结果可以看到,对于GP1,加热温度大于 50°C 后,含量逐渐减少,当温度升到 70°C 时几乎消失;对于GP2和GP3,随着温度的升高,含量逐渐减少。当温度小于 40°C 时,GP2和GP3的含量基本相等,当温度在 $40\sim 60^{\circ}\text{C}$ 时,GP2含量小于GP3,当温度大于 60°C 时,GP2含量大于GP3;对于GP4,随着温度的升高,含量逐渐减少;对于GP5和GP6,随着温度的升高,含量逐渐减少,达到 70°C 后几乎消失;对于GP7和GP8,含量基本不随温度变化而变化。

同时应用高效凝胶过滤色谱对人参蛋白进行分析,见图3。



M: 分子量标准蛋白,自上而下分子量依次为97,66,43,31,20,14KD

图1 人参蛋白不同温度加热1h的凝胶电泳图谱



1~8: 分别为人参蛋白亚基 GP1-8

图2 人参蛋白不同温度加热1h的凝胶扫描图谱

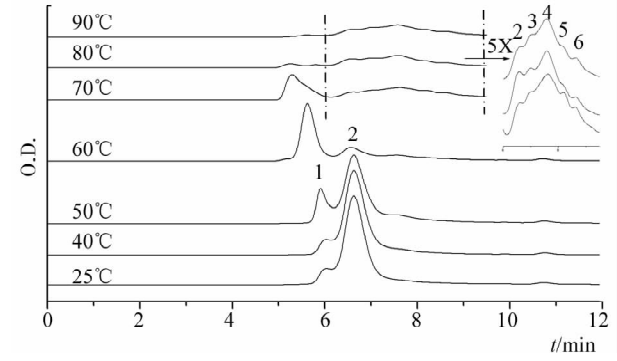


图3 人参蛋白不同温度加热1h的高效凝胶过滤色谱

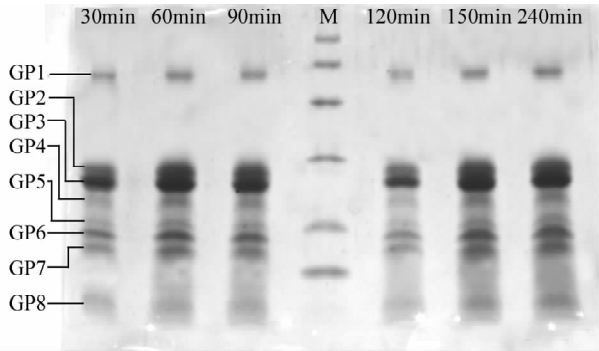
结果显示,在保留时间5.876min处有一个弱吸收峰(峰1),根据标准蛋白与保留时间的关系,可推算出该峰所对应的蛋白质分子量大于100kDa;另外,在保留时间6.576min处有一个强吸收峰(峰2),该峰面积约占总峰面积80%以上,对应的分子量约为64kDa。

随着温度的升高,峰1的保留时间逐渐减少。温度小于 60°C 时,峰1的强度随温度升高而逐渐增加,但当温度大于 60°C 时,强度逐渐减弱,在

90℃时几乎消失。峰2的强度随温度的升高而逐渐减弱,在90℃时几乎消失。此时,峰3、峰4、峰5、峰6成为主要吸收峰,其相应的分子量经计算分别为40,29,15,8kDa。

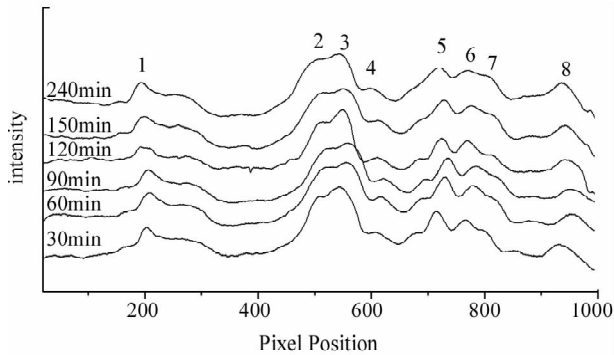
3.2 加热时间对人参蛋白的影响

不同加热时间条件下人参蛋白的SDS-PAGE电泳及扫描分析结果见图4,图5。不同加热时间条件下人参蛋白的高效凝胶过滤色谱分析结果见图6。



M: 分子量标准蛋白, 自上而下分子量依次为
97, 66, 43, 31, 20, 14kD

图4 人参蛋白50℃加热不同时间的凝胶电泳图谱



1~8: 人参蛋白亚基 GP1-8

图5 人参蛋白50℃加热不同时间的凝胶扫描图谱

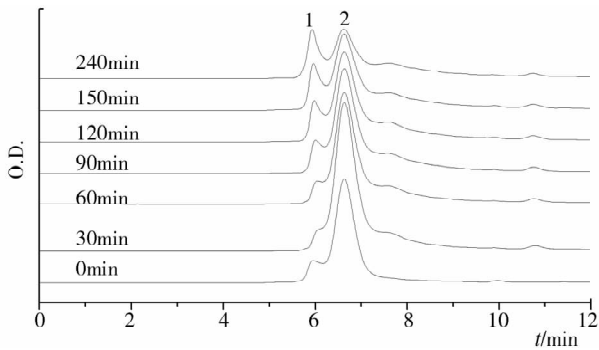


图6 人参蛋白50℃加热不同时间的高效凝胶过滤色谱图

由图4~5可以看到,8种蛋白亚基的含量基本不随温度变化而变化。由图6可以看到,峰1的强

度随温度升高而逐渐增加,在加热240min时,强度已大于峰2,由相对弱峰变为相对强峰。峰2的强度随温度的升高而逐渐减弱,在240min时,强度已小于峰2,由相对强峰变为相对弱峰;峰1和峰2的保留时间都不随温度变化而变化。

4 讨论

对人参蛋白的研究开始于20世纪80年代末90年代初,进入90年代中期,由于现代生物技术在中草药领域的广泛应用,人参蛋白的研究才日益增多。应用二维电泳技术现已表明人参中共有人参蛋白300多种,其中已被报道的仅有40多种^[2-4]。本实验对采用缓冲液抽提及硫酸铵分级沉淀法制备的人参蛋白,应用SDS-PAGE电泳和高效凝胶过滤色谱技术进行了分析。从SDS-PAGE电泳结果看到,我们制备的人参蛋白主要包含8种蛋白亚基。我们对这些蛋白亚基进行了进一步的分离纯化,结果显示,在天然条件下,除GP2和GP3外,其它亚基都是以单亚基形式存在的(结果另文讨论)。GP2和GP3是组成人参核糖核酸酶的两个亚基。GP2和GP3分子量相加为56kDa左右,而人参核糖核酸酶的分子量约为64kDa^[2],两者之差约为8kDa。Ji Y. Yoon等对这一蛋白进行了详细研究,认为其分子量的差别是由于非共价结合糖的存在,即认为该核糖核酸酶是糖蛋白^[7]。从高效凝胶过滤色谱分析结果看到,我们制备的人参蛋白有两个洗脱峰。峰1分子量大于100kDa,含量较少,主要成分应为大的蛋白多聚体;峰2分子量为64kDa,主要成分应为人参核糖核酸酶。除这两个洗脱峰外,并未检测到其他的蛋白峰。我们认为,这可能是由于人参核糖核酸酶含量非常高,而凝胶过滤色谱分辨率较低,洗脱峰峰形较宽,造成其他蛋白的吸收峰被遮蔽。

在不同加热温度条件下,人参蛋白的SDS-PAGE电泳结果表明,除GP7和GP8的含量基本不随温度变化而变化外,其他蛋白亚基含量都随温度升高而减少。很明显这是由于蛋白质在加热条件下发生变性聚集,进而产生不溶性沉淀造成的。其中GP1、GP5和GP6在温度大于70℃时,几乎消失,说明其对温度最敏感。而GP2和GP3虽然为同一个蛋白两个亚基,但浓度变化情况不尽相同。这意味着人参核糖核酸酶在加热情况下,除直接发生变性聚集产生沉淀外,还应存在另外一种情况,即蛋白首先解聚生成两个亚基,然后每个亚基再分别变性

聚集形成沉淀。很明显,两个亚基的热敏感性是不同的。在40~60℃时,GP2更易受热产生沉淀,当温度大于60℃时,GP3更易受热产生沉淀。

在不同加热温度条件下,人参蛋白的高效凝胶过滤色谱结果表明,随着温度的升高,峰1的保留时间逐渐减少,这意味着组成聚合物亚基的数量越来越多,聚合物的分子量越来越大;温度小于60℃时,峰1的强度随温度升高而逐渐增加,这意味着大分子聚合物的浓度越来越高;当温度大于60℃时,峰1强度逐渐减弱,在90℃时几乎消失,这意味着由于分子量越来越大、浓度越来越高,聚合物最终产生沉淀。峰2的强度随温度的升高而逐渐减弱,意味着人参核糖核酸酶发生了聚集或解聚。在90℃时,由于峰2强度的急剧减弱,被其所遮蔽的其他蛋白峰得以被发现,峰3、峰4、峰5、峰6成为主要吸收峰,相应的分子量分别为40,29,15,8kDa。结合SDS-PAGE电泳结果,强度最高的峰4应为GP2,峰5和6应为GP7和GP8。在峰4和峰5之间应该还存在一个GP3的吸收峰,但结果并未观察到。我们认为这是由于人参核糖核酸酶是一糖蛋白,如果糖分子与GP3结合,并比较稳定,当人参核糖核酸酶受热解聚时,糖和GP3的复合物则在峰3处被洗脱。

在50℃加热不同时间条件下,人参蛋白的SDS-PAGE电泳结果表明,8种蛋白亚基的含量基本不随加热时间变化而变化,也证明了人参蛋白亚基在此温度下比较稳定。高效凝胶过滤色谱结果表明,峰1的保留时间不随温度变化而变化。这意味着在此温度下,大分子聚合物有着较为固定的亚基组成,不随加热时间的延长而进一步聚集。峰2的强度随温度的升高而逐渐减弱。这意味着人参核糖

核酸酶随加热时间的延长而不断发生聚集或解聚。

由以上分析我们得出如下结论:人参蛋白随着加热温度的升高而发生聚集和解聚,各种蛋白亚基的热敏感性各不相同。GP1、GP5和GP6对温度最敏感,GP7和GP8最为稳定;在50℃时,人参蛋白会形成可溶性的大分子聚合物,这一聚合物的浓度随加热时间的延长而不断升高。**TCM**

参考文献

- [1] 李震,刘冰,李文艳.改进工艺提高红参加工质量[J].人参研究,2001,13(3):37.
- [2] 曲婷婷.人参有效成分抗肿瘤的研究进展[J].中医药学刊,2005,23(12):2275-2277.
- [3] Lam S. K., Ng T. B.. Isolation of a novel thermolabile heterodimeric ribonuclease with antifungal and antiproliferative activities from roots of the sanchi ginseng[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 285:419-423.
- [4] Lam S. K., Ng T. B.. Isolation of a small chitinase-like antifungal protein from *Panax notoginseng* root[J]. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2001, 33:287-297.
- [5] Lam S. K., Ng T. B.. A xylanase from root of sanchi ginseng with inhibitory effects on human immunodeficiency virus-I reverse transcriptase[J]. *Life Sciences*, 2002, 70:3049-3058.
- [6] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京:科学出版社,2002. 880-887.
- [7] Yoon J. Y., Ha B. H., Woo J. S., et al. Purification and characterization of a 28-kDa major protein from ginseng root[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2002, 132: 551-557.

(收稿日期 2006-12-27)

Study on the Thermal Stability of Ginseng Protein by SDS-PAGE and Gel Filtration Chromatography

Zhang Wei, Jiang Xiangang, Ma Jing, Li Hongyan, Zhao Yu, Zhao Daqing

(Center for New Medicine Research of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun Jilin 130117, China)

[Abstract] **Objective:** Study the thermal stability of ginseng protein by SDS-PAGE and Gel Filtration Chromatography. **Methods:** Ginseng protein was been extracted by ammonium sulfate fractionation. The sample was heated at different temperature for different time, and then studied by SDS-PAGE and Gel Filtration Chromatography. **Results:** With increasing heating temperature, the soluble ginseng proteins were associated to form insoluble aggregates and (or) dissociated to form subunits. Upon heating at 50℃, proteins associated to form big and soluble aggregates. **Conclusion:** The thermal suseptibility of ginseng protein subunits are different.

[Key words] Ginseng protein; Thermal stability; SDS-PAGE; Gel filtration chromatography