

# 血红素亲和层析快速纯化香椿子抗氧化活性蛋白

王荣申, 孟超, 张守军, 卢燕, 李万忠\*

潍坊医学院药学院, 潍坊 261053

**摘要:**以蛋白质含量、总还原力和 DPPH 清除能力为指标, 对盐析法、碱提酸沉法、直接加热法进行评价, 选取蛋白含量高同时有较强还原力的碱提酸沉提取法。将环氧氯丙烷活化血红素偶联于 Sephadex G-25 制作亲和层析柱, 以水为平衡液、NaAc-HAc 缓冲液为洗脱液进行香椿子蛋白纯化, 考马斯亮蓝法测定所得蛋白纯度, 并对其初步抗氧化研究。结果表明: 目标产物蛋白具有较好的 DPPH 清除能力, 含量由 59.51% 提高至 96.23%, 纯化后蛋白纯度得到显著提高 ( $P < 0.05$ )。

**关键词:** 香椿子; 亲和层析; 蛋白纯化; 抗氧化

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.018

## Rapid Purification of Antioxidant Proteins from *Toona sinensis* Seeds Using Affinity Chromatography

WANG Rong-shen, MENG Chao, ZHANG Shou-jun, LU Yan, LI Wan-zhong\*

College of Pharmacy, Weifang Medical University, Weifang 261053, China

**Abstract:** *Toona sinensis* seeds protein (TSP) was extracted by salting out, alkali extraction and acid precipitation, direct heating methods. The total antioxidant and DPPH free radicals scavenge activity of the extract were then evaluated. TSP from alkali extraction and acid precipitation was selected as purification sample and was purified by affinity chromatography. Sephadex G-25 were activated using epichlorohydrin, hemin was bound with them to prepare an immobilized hemin affinity chromatography column, which was used to purify proteins from *T. sinensis* seeds equilibrated with water and eluted with NaAc-HAc buffer. Purification protein was tested by DPPH free radicals scavenge assay. The results showed that protein content was from 59.51% to 96.23% after affinity chromatography purification.

**Key words:** *Toona sinensis* seeds; affinity chromatography; protein purification; antioxidant activity

香椿 [*Toona sinensis* (A. Juss.) Roem] 系楝科落叶乔木, 在我国广泛分布, 为药食两用植物。香椿子为香椿的果实, 有抗氧化、降血糖、抗凝血和心脏保护等生物活性<sup>[1,2]</sup>。目前, 香椿子研究主要集中于挥发油、多酚、多糖等化学成分及活性研究<sup>[3-9]</sup>, 蛋白提取及体外抗氧化研究相对较少。

研究表明, 植物蛋白具有抗氧化性<sup>[10]</sup>、降血糖<sup>[11]</sup>、抗肿瘤<sup>[12]</sup>、免疫调节<sup>[13]</sup>等功能, 抗氧化性是蛋白多种功能性质之一。课题组前期研究发现 TSP 样品中含有 17 种氨基酸, 其中谷氨酸含量最高, 占总量的 35.37%; 其次为精氨酸, 占总量的 15.31%; 蛋氨酸含量最小, 占总量的 1.02%<sup>[14]</sup>。TSP 富含氨基酸全面, 种类丰富, 不失为一种较好的植物蛋白。

基于此, 以香椿子药渣为原料制备蛋白, 综合利用香椿子已有资源。以蛋白百分含量、总还原力、DPPH 清除能力为指标, 优选 TSP 提取方法, 血红素亲和层析纯化, 研究纯化蛋白体外抗氧化活性, 以期香椿子蛋白开发与应用提供借鉴。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

UV-800A 型紫外分光光度计: 上海元析仪器有限公司; EL204 电子分析天平: 梅特勒-托利多仪器有限公司; PS-30 超声波清洗仪: 深圳市深华泰超声洗净设备有限公司; RE-52 系列旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; HH600-2B 精密电热恒温三用水箱: 上海比朗仪器有限公司; KDM 型调温电热套: 山东鄞城创新仪器有限公司。

### 1.2 材料与试剂

香椿子, 济南圣科技术开发有限公司, 经潍坊医

收稿日期: 2016-06-07 接受日期: 2016-07-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81274049)

\* 通讯作者 Tel: 86-536-8462490; E-mail: lwzwmfmc@163.com

学院生药教研室许崇梅副教授鉴定为楝科植物香椿 [*Toonasinensis* (A. Juss.) Roem] 的果实;硫酸铵、石油醚、葡萄糖等试剂均为分析纯。

## 2 实验方法

### 2.1 香椿子蛋白提取

#### 2.1.1 盐析

取干燥香椿子适量,适当粉碎,与磷酸缓冲溶液混合,在室温下搅拌 30 min,静置,离心 3 次,收集上清液,除去黄色浮游块状物,加入饱和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 ℃ 静置过夜,离心,收集沉淀,用少量磷酸缓冲溶液溶解,透析除盐,离心,收集上清液,即得蛋白质粗提液<sup>[15]</sup>。

#### 2.1.2 碱提酸沉

取干燥香椿子适量,适当粉碎,石油醚脱脂,过滤晾干备用。取香椿子适量, pH = 10 碱液加热提取,加热完毕,离心,取上清,调节 pH 值至等电点,离心,弃去上清,用一定 pH 值缓冲溶液溶解,即得蛋白质粗提液<sup>[14]</sup>。

#### 2.1.3 直接加热法

取干燥香椿子适量,适当粉碎,石油醚脱脂,过滤晾干备用。取香椿子适量,加热回流提取,加热完毕,离心,取上清,即得蛋白质粗提液。

### 2.2 蛋白质含量测定方法<sup>[14]</sup>

#### 2.2.1 试剂配制

牛血清蛋白溶液:称取 10.0 mg 牛血清蛋白,加水溶解,100 mL 容量瓶定容,摇匀,即得,备用;考马斯亮蓝 G250 溶液:称取 10.0 mg 考马斯亮蓝 G250,加 5.0 mL 95 % 乙醇溶解,加 10.0 mL 85 % 磷酸,100 mL 容量瓶定容,备用。

#### 2.2.2 牛血清蛋白标准曲线建立

取牛血清蛋白溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 至试管中,蒸馏水补足至 1.0 mL,涡旋,加 5.0 mL 考马斯亮蓝 G250 溶液,涡旋,静置 5 min,595 nm 处测吸光度。以蛋白标准溶液浓度 (mg/mL) 为横坐标,吸光度 (A) 为纵坐标,建立标准曲线。在 0~0.09 mg/mL 浓度范围内,吸光度随牛血清蛋白溶液浓度增加而增加,呈良好线性关系,方程为:  $Y = 7.7931X + 0.0152$ ,  $R^2 = 0.9994$ 。

#### 2.2.3 蛋白质含量测定

取一定体积蛋白质粗提液,按 2.2.2 方法,样品代替蛋白标准溶液,测定吸光度,计算蛋白质含量。

### 2.3 糖含量测定方法<sup>[9]</sup>

#### 2.3.1 试剂配制

对照品溶液:称取葡萄糖 125.0 mg,容量瓶定容,使浓度为 0.5 mg/mL,备用;6 % 苯酚:称取苯酚 3.0 g,50 mL 容量瓶定容,摇匀,即得,4 ℃ 避光保存,备用。

#### 2.3.2 葡萄糖标准曲线建立

移取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 葡萄糖溶液,50 mL 容量瓶定容;分别移取 2 mL 至试管中,加 6 % 苯酚溶液 1.0 mL,涡旋,迅速滴加浓硫酸 5.0 mL,涡旋,静置 10 min,25 ℃ 水浴 15 min,冷至室温;2 mL 蒸馏水作空白,490 nm 处测样品吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,建立标准曲线。在 0.01~0.05 mg/mL 浓度范围内呈线性,所得方程为  $Y = 15.77X - 0.0598$ ,  $R^2 = 0.9990$ 。

#### 2.3.3 糖含量测定

取蛋白质粗提液适量,按 2.3.2 方法,样品代替葡萄糖溶液,测吸光度,计算糖含量。

### 2.4 抗氧化活性测定

#### 2.4.1 总还原力测定

在试管中依次加入 0.2 mol/L, pH = 6.6 磷酸缓冲液 2.5 mL,蛋白粗提液 1 mL,1 % 铁氰化钾 2.5 mL,涡旋,于 50 ℃ 水浴反应 20 min,取出,加入 10 % 三氯化铁终止反应;取上清 2.5 mL,加入 0.1 % 三氯化铁和蒸馏水,涡旋,静置 10 min。蒸馏水作空白,700 nm 处测吸光度,平行 3 次,取平均值<sup>[16]</sup>。

#### 2.4.2 DPPH·清除率测定

DPPH 溶液:精密称取 DPPH 0.0040 g,乙醇溶解,50 mL 容量瓶定容,摇匀,使得浓度为 80 mg/L,置冰箱中冷藏备用。

取 2 mL 糖蛋白溶液,加 2 mL DPPH 溶液,混匀,室温避光放置 45 min,517 nm 处测吸光度,为  $A_i$  值;取 2 mL DPPH 溶液,加 2 mL 乙醇,混匀,517 nm 处测吸光度,为  $A_0$  值;取 2 mL 样品液,加 2 mL 乙醇,517 nm 处测吸光度,为  $A_j$  值<sup>[17]</sup>。

自由基清除率公式:  $K\% = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$

### 2.5 血红素亲和层析纯化香椿子蛋白<sup>[18]</sup>

#### 2.5.1 Sephadex G-25 惰性载体活化

将 25 g G-25 于烧结漏斗中抽干,用 100 mL 1 mol/L NaCl 和 100 mL 蒸馏水洗涤,抽干,将其转移至锥形瓶,加 15 mL 2 mol/L NaOH、4 mL 环氧氯丙烷和 20 mL 56 % 1,4-二氧六环,40 ℃ 恒温摇床,振荡活化 2 h,将活化后的载体用去离子水和 0.2 mol/L pH = 9.5 饱和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液洗涤,抽干后立

即偶联。

### 2.5.2 血红素标准曲线建立

取一定量氯化血红素用少量 15% 氨水溶解,依次加入一定体积蒸馏水使浓度为 1、1.5、2、2.5、3 mmol/L,稀释一定倍数,测吸光度,以血红素浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,建立标准曲线。

### 2.5.3 血红素偶联率测定

取 5 g 活化好 G-25,分成 5 份,每份 1 g,分别与不同浓度血红素偶联,过滤,用一定体积蒸馏水淋洗未反应试剂,收集滤液,测吸光度。

### 2.5.4 氯化血红素与 Sephadex G-25 载体偶联

氯化血红素先用少量 15% 氨水溶解,然后加入蒸馏水至终浓度为 1.5 mmol/L,再取此氯化血红素溶液 25 mL 与已活化的载体混合,40 °C 恒温摇床,振荡偶联 24h 左右,用蒸馏水淋洗掉未反应试剂,而后把已偶联上氯化血红素的 G-25 进行装柱。

### 2.5.5 亲和层析操作

0.1 mol/L, pH 9.5 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液洗涤血红素层析柱,最后用去离子水平衡。上样蛋白质粗提液 15 mL,上样完毕,用蒸馏水洗脱,每支试管收集 10 mL,分别在 280 nm 处测 OD 值,出现峰值洗脱液即未被柱子吸附的蛋白质,待 OD 值降至基线;换 0.2 mol/L, pH 3.6 NaAc-HAc 缓冲液洗脱,收集,出现峰值洗脱液即被柱子吸附而后洗脱的蛋白质。

## 2.6 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件,采用配对小样本 *t* 检验,蛋白质纯化前后数据均以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果与分析

### 3.1 蛋白质与糖百分含量

将盐析法、碱提酸沉法、直接加热法制备蛋白质

粗提液分别代替牛血清蛋白和葡萄糖溶液测定吸光度,根据线性方程计算蛋白质和糖含量,所占百分含量见图 1。由图可知,蛋白质含量顺序:碱提酸沉 > 盐析 > 直接加热法;糖含量顺序:直接加热法 > 盐析 > 碱提酸沉。

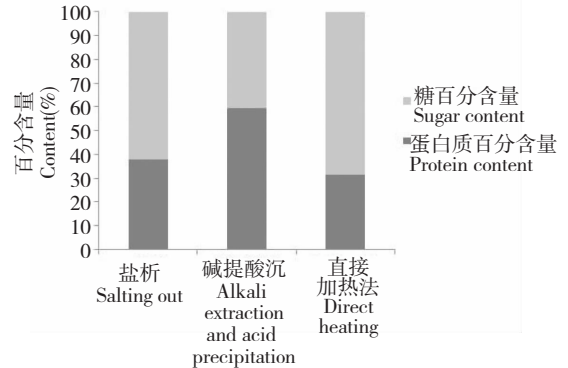


图 1 粗提液蛋白质与糖百分含量

Fig. 1 Content of protein and sugar of crude extracts

### 3.2 不同方法制备蛋白抗氧化活性比较

取一定体积不同提取方法制备蛋白粗提液进行总还原力和 DPPH 清除率测定,结果见图 2、图 3。由图 2 可知,不同提取方法制备蛋白均具有一定抗氧化能力,随着样品浓度增加,总还原力也增加,且均有良好线性关系,结果见表 1。总还原力顺序为:直接加热法 > 碱提酸沉法 > 盐析法。

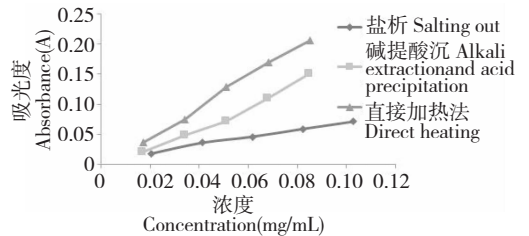


图 2 不同方法提取蛋白质总还原力比较

Fig. 2 Total antioxidant activity of different TSP extract

表 1 不同方法提取蛋白质总还原力线性相关比较

Table 1 Linear correlation of total antioxidant activity of different TSP extract

提取方法 Extraction method	线性方程 Linear equation	相关系数 $R^2$ Correlation coefficient	线性范围 Linear range (mg/mL)
盐析法 Salting out	$y = 2.56x - 0.0082$	0.9962	0.02 ~ 0.10
碱提酸沉法 Alkali extraction and acid precipitation	$y = 1.9027x - 0.0171$	0.9855	0.01 ~ 0.08
直接加热法 Direct heating	$y = 0.6303x + 0.0068$	0.9921	0.01 ~ 0.08

由图 3 可知,不同提取方法制备蛋白均具有一定 DPPH 清除能力,随着样品浓度增加,DPPH 清除

率也增加,呈浓度依赖关系,拟合线性方程见表 2,盐析法、碱提酸沉法、直接加热法  $IC_{50}$  分别为 0.15、

0.07、0.03 mg/mL, DPPH 清除能力顺序为:直接加热法 > 碱提酸沉法 > 盐析法。

综合蛋白质百分含量、总还原力和 DPPH 清除能力,实验选取蛋白质含量最高且具较高还原能力的碱提酸沉蛋白作纯化上样样品。

### 3.3 血红素标准曲线

血红素在 0.005 ~ 0.015 mmol/mL 浓度范围内,呈良好线性关系,线性方程为  $y = 73.093x - 0.0751$ ,  $R^2 = 0.9908$ 。

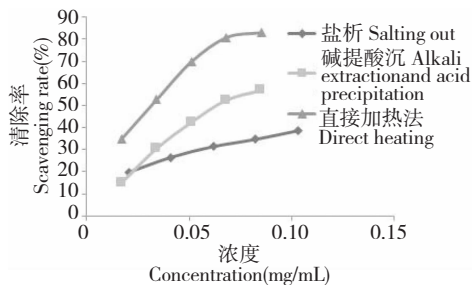


图3 不同方法提取蛋白质 DPPH 清除率比较

Fig. 3 DPPH free radicals scavenging activity of different TSP extract

表2 不同方法制备蛋白质 DPPH 清除率线性相关比较

Table 2 Linear correlation of DPPH free radicals scavenging activity of different TSP extract

提取方法 Extraction method	线性方程 Linear equation	相关系数 $R^2$ Correlation coefficient	线性范围 Linear range (mg/mL)
盐析法 Salting out	$y = 222.1x + 16.53$	0.9791	0.02 ~ 0.10
碱提酸沉法 Alkali extraction and acid precipitation	$y = 621.29x + 7.7975$	0.9644	0.01 ~ 0.08
直接加热法 Direct heating	$y = 729.7x + 26.962$	0.9352	0.01 ~ 0.08

### 3.4 血红素偶联率测定

取不同浓度血红素偶联 1 g G-25, 浓度不同, 偶联率也不同, 结果见图 4。由图可知: 当血红素浓度为 1.5 mmol/L 时, 偶联率最高, 故选择血红素浓度为 1.5 mmol/L 进行偶联, 装柱。

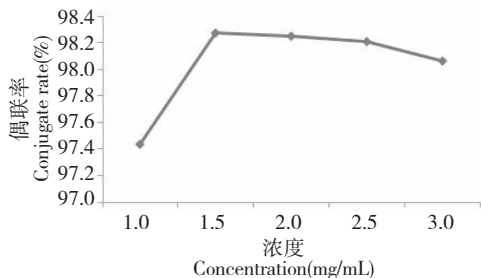


图4 血红素偶联率曲线

Fig. 4 The coupling efficiency curve of hemin

### 3.5 亲和层析纯化

亲和层析纯化, 上样完毕, 先用水洗脱, 收集, 测吸光度, 共收集 45 支试管, 此时其 OD 值降至基线, 合并旋蒸, 即得未吸附蛋白; 换 pH = 3.6 NaAc-HAc 缓冲溶液洗脱, 收集, 测吸光度, 共收集 43 支试管, 此时 OD 值降至基线, 合并旋蒸, 即得吸附蛋白。洗脱试管吸光度值见图 5。

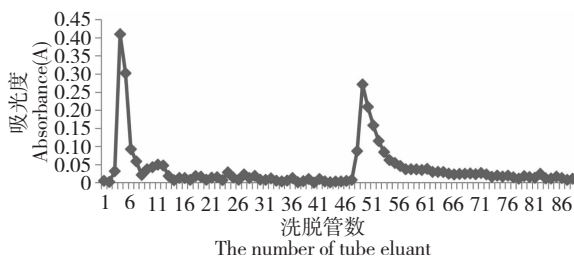


图5 亲和层析水洗脱和酸洗脱样品吸光度

Fig. 5 The absorbance of sample eluted with water and acid solution by affinity chromatography

脱样品糖含量较高, 酸洗脱样品蛋白质含量高, 可见碱提酸沉提取蛋白得到纯化, 蛋白含量得到显著提高 ( $P < 0.05$ ), 经统计分析, 蛋白纯化前后百分含量有统计学意义。

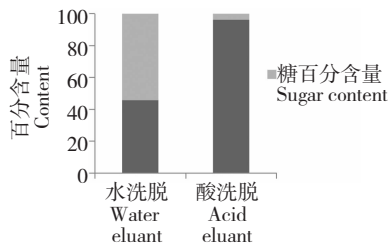


图6 纯化后蛋白质与糖百分含量

Fig. 6 The content of protein and sugar after purification

### 3.6 纯化后蛋白质与糖百分含量

对亲和层析水洗脱和酸洗脱合并溶液分别进行蛋白质和糖含量测定, 结果见图 6。由图可知: 水洗

### 3.7 纯化后蛋白抗氧化活性

对纯化后蛋白进行 DPPH 自由基清除能力测

定,评价纯化后蛋白抗氧化活性,结果见图7。样品清除 DPPH 能力随其浓度增加呈上升趋势,呈浓度依赖关系。拟合线性方程为  $y = 195.09x + 4.9693$ ,  $R^2 = 0.9425$ ,浓度范围 0.02 ~ 0.10 mg/mL。

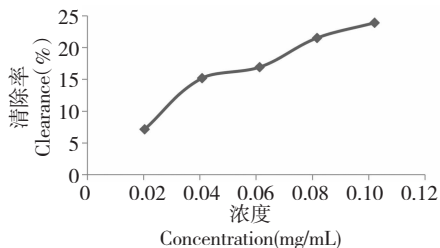


图7 纯化后蛋白质 DPPH 清除率

Fig. 7 The DPPH free radical scavenging rate of proteins after purification

## 4 讨论与结论

盐析法、碱提酸沉法、直接加热法提取蛋白含量、总还原力和 DPPH 清除能力存在不同程度差异,不同提取方法原理不一样,提取白结构、性质可能存在差异,蛋白提取方法多样,各有优劣,应根据所需进行选择。

由于血红素特殊结构,抗氧化活性蛋白能够通过氧化还原反应与之结合,将血红素偶联于 Sephadex G-25,利用铁原子高活性的第五、第六配位键,捕获抗氧化蛋白。基于此,实验选用血红素作为配基,做成亲和层析柱用于纯化抗氧化蛋白<sup>[15]</sup>。

血红素亲和层析柱能选择性从香椿子蛋白粗提液中吸附具有抗氧化活性的蛋白,经过一步就可达到快速纯化的目的。实验表明,血红素亲和层析纯化香椿子中抗氧化蛋白具有成本低,快速的特点,适合放大、应用。

抗氧化肽抗氧化活性的大小受肽链长短的影响,一般小于 20 个氨基酸残基,如果肽段过长,含有抗氧化性的 Val、Leu 未能呈现在肽段的 N-端和 C-端,则抗氧化性就表现不出来,香椿子蛋白具有抗氧化能力,推断其为短肽链蛋白,为新结构蛋白的发现与研究提供思路。

### 参考文献

1 Wang RS (王荣申), Zhang SJ (张守军), Tao HM (陶慧敏), *et al.* Study on identification of chemical constituents of the seeds of *ToonaSinensis*. *Guangzhou ChemInd* (广州化工), 2016, 44(2): 93-95.

2 Li WZ (李万忠), Ding JX (丁嘉信), Zhang XP (张晓平), *et al.* Research progress on chemical composition, extraction methods and biological actives of *Toona*. *Qilu Pharm Affairs* (齐鲁药事), 2012, 1: 37-39.

3 Liu ZL (刘忠良), Ma TB (马天波), Sun LP (孙立明). Analysis of the essential oil from the seeds of *Toonasinensis* by GC-MS. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37(2): 94-95.

4 Li WZ (李万忠), Wang XH (王晓红), Han WN (韩玮娜), *et al.* Protective effect of petroleum ether fraction of *Toonasinensis* Roem seeds extracts on kidney of diabetic nephropathy rats. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 2035-2039.

5 Wang XH (王晓红), Li WZ (李万忠). Protective effect of *Toonasinensis* seed extracts on diabetic peripheral neuropathy. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 120-124.

6 Liu JC (刘金城), Zhuang WX (庄文欣), Li FJ (李锋杰), *et al.* Protective effect of polyphenols extracts from the seeds of *Toonasinensis* on 6-hydroxydopamine-induced injury of PC12 cells. *Chin J Neuroanatomy* (神经解剖学杂志), 2016, 32(1): 31-36.

7 Wang XH, Li WZ, Kong D. *Cyclocaryapaliurus* extract alleviates diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and aldose reductase. *Ren Fail*, 2016, 8: 1-8.

8 Li WZ, Wang XH, Zhang HX, *et al.* Protective effect of the n-butanol *Toonasinensis* seed extract on diabetic nephropathy rat kidneys. *Genetics Molecul Res*, 2016, Accepted.

9 Ding SH (丁世洪), Liu B (刘兵), Zhao SW (赵淑伟), *et al.* Study of extraction process of polysaccharide from seeds of *Toonasinensis* and antioxidant activity *in vitro*. *Chin J Infor TCM* (中国中医药信息杂志), 2016, 23(3): 91-94.

10 Han CH, Lin YF, Lin YS, *et al.* Effects of yam tuber protein, dioscorin, on attenuating oxidative status and learning dysfunction in d-galactose-induced BALB/c mice. *Food Chem-Toxicol*, 2014, 65: 356-363.

11 Pan D, Zhang D, Wu J, *et al.* Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of a novel proteoglycan from *GanodermaLucidum* fruiting bodies on db/db Mice and the possible mechanism. *PLoS One*, 2013, 8(7): 68332.

12 Chuethong J, Oda K, Sakurai H, *et al.* Cochinin B, anovel ribosome-inactivating protein from the seeds of *Momordica-chinchinensis*. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30: 428-432.

13 Chu KT, Ng TB. Smilaxin, anovel protein with immunostimulatory, antiproliferative, and HIV-1-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes. *BiochemBiophys Res Commun*, 2006, 340: 118-124.