

大黄鱼小清蛋白提取工艺优化及免疫印迹分析

Optimization of the extraction process of parvalbumin from *Pseudosciaena crocea*

吕春霞 杨留明 陈世达 张慧恩 杨华

LU Chun-xia YANG Liu-ming CHEN Shi-da ZHANG Hui-en YANG Hua

(浙江万里学院, 浙江 宁波 315100)

(Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

摘要:通过测定小清蛋白得率,筛选出一种针对大黄鱼小清蛋白的提取液,并优化其提取工艺。结果表明:当提取时间为 42 h,提取液浓度为 72 mmol/L,提取液 pH 为 8.0、料液比($m_{\text{大黄鱼}}:V_{\text{提取液}}$)为 1:180 (g/mL)、提取温度为 50 °C 时,小清蛋白得率为 0.174 2%。通过阴离子凝胶柱层析进行分离纯化,采用免疫印迹分析确定小清蛋白分子量为 12 kDa。

关键词:大黄鱼;小清蛋白;分离纯化;免疫印迹

Abstract: By measuring the yield of parvalbumin, a kind of extraction solution of parvalbumin from *Pseudosciaena crocea* was screened out, and the relative extracting process was optimized. The results showed that when the extraction time was 42 h, the extract concentration was 72 mmol/L; the pH of the extract was 8, and the ratio of material to liquid was 1:180 (g/mL); the extraction temperature was 50 °C, and the extraction rate of parvalbumin reached 0.174 2%. Parvalbumin was then separated and purified by anion gel column chromatography, and its molecular weight was determined to be 12 kDa by Western blot analysis.

Keywords: *Pseudosciaena crocea*; parvalbumin; isolation and purification; Western blot

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*),硬骨鱼纲鲈形目石首鱼科黄鱼属^[1],俗称黄花鱼、桂花鱼等,是中国近海主要的经济鱼类^[2]。但是其含有致敏原小清蛋白,可对人体产生过敏反应。

水产食物的主要过敏原多属糖蛋白,其热稳定性较

高,分子量为 10~70 kD,如小清蛋白、原肌球蛋白、精氨酸激酶、肌钙结合蛋白等^[3]。小清蛋白(parvalbumin, PV)是多数鱼类中确定的主要过敏原^[4-6],其中大部分为硬骨鱼类。研究表明,鲑鱼过敏原中的 4 个抗原亚组分中, pI 4.75 的过敏原 M 即为 PV^[7-8],是鲑鱼的主要过敏原^[9]。Kobayashi 等^[10-11]在沙丁鱼、马鲛鱼、红绸鱼及太平洋鲑等鱼类的白色肌肉组织中发现了含量丰富的 PV,其深色肌肉组织中也有较低浓度的 PV。

小清蛋白是稳定性较高的蛋白,对酸碱度、温度和各种变性剂都有很强的耐受性,由于小清蛋白分子构象、折叠能力和抗原表位不同及特殊性,其在酶解和高温条件下均很稳定,并仍具有过敏性^[12-13]。蛋白质会受到游离基作用发生氧化,从而改变其蛋白功能特性^[14]⁶⁻⁷,而脂质过氧化反应产生的自由基迁移可诱导蛋白质聚集。目前国内外有关小清蛋白的研究^[15-16]较多,而关于大黄鱼小清蛋白的研究较少,吴玫静等^[17]以阿拉斯加狭鳕、蓝点马鲛、大黄鱼等 7 种鱼为原料,证明了鱼类过敏原主要为 48~57,33~41,28,17 kU 的蛋白,并通过间接 ELISA 和抑制性 ELISA 证实了不同鱼类蛋白之间存在强烈的交叉反应。目前由过敏原直接引起的过敏性疾病呈大幅增加趋势^[18]。试验拟先对大黄鱼小清蛋白的提取工艺进行优化,并对其进行免疫印迹试验,以期为后续大黄鱼小清蛋白的理化特性及致敏机理的确定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

大黄鱼:市售;

改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒:生工生物工程(上海)股份有限公司;

十二烷基磺酸钠(SDS)、10% SDS、1.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=8.8)、1.0 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=6.8)、30%丙烯酰胺(29:1)、5×SDS-PAGE 上样

基金项目:浙江省重中之重学科“生物工程”学生创新项目(编号: CX2017017);宁波市基金项目(编号:2019A610431)

作者简介:吕春霞,女,浙江万里学院在读硕士研究生。

通信作者:杨华(1978—),男,浙江万里学院教授,博士。

E-mail: yanghua@zww.edu.cn

收稿日期:2019-10-31

缓冲液、*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(AP)、甘氨酸(Gly)、羟甲基氨基甲烷(Tris)、二硫苏糖醇(DTT)、考马斯亮蓝 R-250、考马斯亮蓝 G-250;分析纯,北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司;

吐温 20:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体 PARV-19;美国 Sigma 公司;

鲑鱼小清蛋白标准品:江苏酶标生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:PL2002 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

pH 计:FE20 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

双室真空包装机:DZ-400 型,宁波江东明兴包装设备物资有限公司;

恒温水浴锅:DK-8D 型,上海维诚仪器有限公司;

垂直电泳仪:DYY-6C 型,北京六一生物科技有限公司;

酶标仪:Multiskan FC 型,美国 Thermo 公司;

漩涡混匀器:XW-80A 型,西宝生物科技有限公司;

冷冻干燥仪:ALPHA2-4 型,上海实维实验仪器技术有限公司;

高速冷冻离心机:Avanti J-26XP 型,美国贝克曼库尔特;

三清超微粉碎机:SQW-6DI 型,山东三清不锈钢设备有限公司;

蛋白纯化系统:ÄKTA pure LI 型,GE Healthcare Uppsala Sweden。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 养殖大黄鱼去头后以背鳍线下刀,将鱼肉体与主骨、脂肪层和内脏分开,尖刀剔离鱼皮,拔出鱼刺,冰水洗净,超微粉碎机搅碎,真空包装,−40℃冻藏。

1.2.2 脱脂处理 参照夏珊珊等^[19-21]的方法并修改。以预处理鱼糜为原料,选取正丁醇、乙酸乙酯、氯仿+甲醇($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}}=1:1$)、异丙醇、乙醚+乙醇($V_{\text{乙醚}}:V_{\text{乙醇}}=1:1$)、40 g/L Na_2CO_3 溶液作脱脂剂,料液比($m_{\text{大黄鱼}}:V_{\text{提取液}}$)1:10 (g/mL),提取温度 20℃,提取时间 24 h,并以预处理鱼糜为对照组。测定其脂肪含量和总蛋白浓度,计算脱脂后各组脂肪质量分数及蛋白浓度,选择最佳脱脂溶剂。

1.2.3 脂肪含量测定 按 GB 5009.6—2016 执行。并按式(1)计算样品(干基)脂肪质量分数。

$$X = \frac{m_1 - m_0}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

X ——样品中脂肪质量分数,%;

m_1 ——恒重后接收瓶和脂肪的质量,g;

m_0 ——接收瓶质量,g;

m_2 ——样品干重质量,g。

1.2.4 蛋白浓度测定 采用 Bradford 法。

1.2.5 小清蛋白粗提取 根据陆宗超^{[14]27}的方法并略作修改。准确称取鱼糜(1.00±0.01) g,与 50 mmol/L、pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液以料液比($m_{\text{大黄鱼}}:V_{\text{提取液}}$)1:40 (g/mL)混匀,30℃下浸提 42 h,4℃、8 500 r/min 离心 15 min,取上清液即得大黄鱼肌浆蛋白溶液。肌浆蛋白于沸水中水浴 40 min,8 500 r/min 离心 15 min,上清即为小清蛋白粗提物。上清中加入 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 静置 2 h,待析出絮状物后,4℃、12 000 r/min 离心 15 min,取沉淀以 0.02 mol/L Tris-HCl 复溶,透析脱盐,得小清蛋白粗提物。

1.2.6 小清蛋白提取液选择 选用 50 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.5)、50 mmol/L Tris-HCl—50 mmol/L Gly—1 mmol/L DTT (pH 7.5) 和 50 mmol/L Tris-HCl—50 mmol/L Gly (pH 7.5) 溶液,以 1 mol/L KCl 溶液作为高浓度提取液的对比,提取方法参照 1.2.5。

1.2.7 单因素试验

(1) 提取液浓度:准确称取鱼糜 1.00 g,脱脂,固定提取液 pH 7.0、料液比($m_{\text{大黄鱼}}:V_{\text{提取液}}$)1:40 (g/mL)、提取温度 30℃、提取时间 42 h,考察提取液浓度(20,35,50,65,80,95 mmol/L)对大黄鱼小清蛋白得率的影响。

(2) 提取液 pH:准确称取鱼糜 1.00 g,脱脂,固定提取液浓度 50 mmol/L、料液比($m_{\text{大黄鱼}}:V_{\text{提取液}}$)1:40 (g/mL)、提取温度 30℃、提取时间 42 h,考察提取液 pH(3.0,3.5,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0)对大黄鱼小清蛋白得率的影响。

(3) 料液比:准确称取鱼糜 1.00 g,脱脂,固定提取液浓度 50 mmol/L、提取液 pH 7.0、提取温度 30℃、提取时间 42 h,考察料液比($m_{\text{大黄鱼}}:V_{\text{提取液}}$) $[1:40,1:60,1:80,1:100,1:120,1:140,1:160,1:180,1:200$ (g/mL)]对大黄鱼小清蛋白得率的影响。

(4) 提取温度:准确称取鱼糜 1.00 g,脱脂,固定提取液浓度 50 mmol/L、提取液 pH 7.0、料液比($m_{\text{大黄鱼}}:V_{\text{提取液}}$)1:40 (g/mL)、提取时间 42 h,考察提取温度(10,20,30,40,50,60℃)对大黄鱼小清蛋白得率的影响。

(5) 提取时间:准确称取鱼糜 1.00 g,脱脂,固定提取液浓度 50 mmol/L、提取液 pH 7.0、料液比($m_{\text{大黄鱼}}:V_{\text{提取液}}$)1:40 (g/mL)、提取温度 30℃,考察提取时间(10,18,26,34,42,50,58,66,74,84 h)对大黄鱼小清蛋白得率的影响。

1.2.8 小清蛋白得率测定 按式(2)计算小清蛋白得率。

$$X = \frac{m_0}{m} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

X——小清蛋白得率, %;

m_0 ——分离纯化后样品质量, g;

m ——鱼糜质量, g。

1.2.9 响应面试验 参照李晓等^[22-23]的方法, 在单因素试验基础上, 采用 Design Expert v8 中的 Box-Behnken 设计原理进行四因素三水平响应面试验设计, 考察提取液浓度、提取液 pH、料液比、提取温度 4 个因素对小清蛋白得率的影响。

1.2.10 阴离子柱层析纯化小清蛋白粗提物 参照刘光明等^[24]的方法并修改。采用 HiPrepTM(16/10)DEAE FF 阴离子柱 GE 层析系统进一步纯化小清蛋白粗提物。控制系统为 ÄKTA pure LI protein purification system (GE Healthcare Uppsala Sweden) 系统; 洗脱 A 液为 pH 7.5, 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液; 洗脱 B 液为 pH 7.5, 0.5 mol/L NaCl-0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液。每 2 mL 收集一次, 测定洗脱液在 220, 280 nm 处吸光值。收集的蛋白溶液用 HiPrepTM(26/10)Desalting 柱脱盐, 冷冻干燥, 冻干粉-40 °C 贮藏。

1.2.11 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用 Ulrich^[25]的方法制备 1.5 mm 不连续 SDS-PAGE 凝胶, 根据小清蛋白的分子量选择配制 15% 分离胶, 5% 浓缩胶, 采用 60 V 恒压进行浓缩胶的电泳, 90 V 恒压进行分离胶的电泳。结束后取出凝胶, 考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h, 脱色至胶片背景清晰, 凝胶成像。

1.2.12 免疫印迹分析 参照 Kanna 等^[26-27]的方法, 采用免疫印迹检测大黄鱼小清蛋白过敏原的免疫活性。SDS-PAGE 凝胶电泳后, 进行免疫印迹试验。

1.3 数据处理

除阴离子柱层析曲线外, 所有试验均重复 3 次, 结果以 Mean±SD 表示。采用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行数据分析, 组间差异比较采用 One-way ANOVA 分析, 两两比较采用 Tukey 法分析均值的差异显著性, $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著。数据统计均采用 GraphPad prism 7.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 脱脂条件优化

由图 1、2 可知, 与对照组相比, 正丁醇、乙酸乙酯、氯仿+甲醇、异丙醇、乙醚+乙醇、 Na_2CO_3 组脱脂效果显著 ($P < 0.05$); 正丁醇、氯仿+甲醇、异丙醇组的蛋白浓度较接近 ($P < 0.05$), 表明这 3 种脱脂方法蛋白损失率较低, 且脱脂后 10 kDa 的小清蛋白灰度接近于对照组, 故选择正丁醇进行脱脂处理。

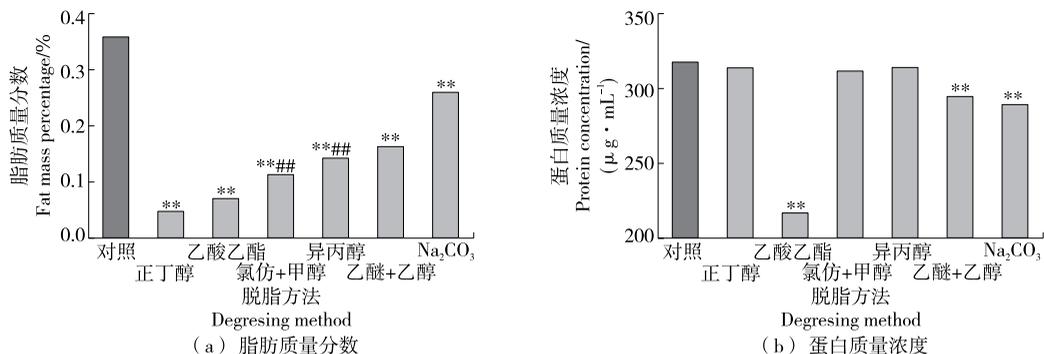
2.2 大黄鱼小清蛋白粗提取

由图 3 可知, Tris-HCl-Gly-DTT、Tris-HCl-Gly、PBS、KCl 组的蛋白质量浓度分别为 433.59, 402.20, 391.78, 374.03 $\mu\text{g/mL}$, 且差异显著 ($P < 0.05$)。

由图 4 可知, 高浓度溶液对 10 kDa 蛋白浓度的提取效果较差, 反而会增加杂蛋白浓度, 由于加入还原剂 DTT 可以减少小清蛋白的氧化, 提高抽提蛋白的含量和免疫活性^{[14]13-15}, 使加入 DDT 的提取液杂蛋白条带较少, 所以选用 Tris-HCl-Gly-DTT 作为提取液。

2.3 单因素试验

由图 5 可知, 提取液浓度对小清蛋白得率影响较为明显, 当 Tris-HCl 缓冲液浓度为 20~95 mmol/L 时, 小清蛋白得率随其浓度升高呈先升高后降低的趋势, 当 Tris-HCl 缓冲液浓度为 65 mmol/L 时, 小清蛋白得率最高。提取液 pH 对小清蛋白得率影响较为明显, 当 Tris-HCl 缓冲液 pH 为 3.5~10.0 时, 小清蛋白得率先上升后下降, 当 pH 为 6.0 时, 小清蛋白得率达最高; 当 pH 为 3.5 时, 小清蛋白得率接近于 0, 推测小清蛋白的 pI 为 3.5, 而 Elsayed 等^[7-8]研究发现鳕鱼过敏原 M(PV) 的 pI 为 4.75, 略高于试验测定值。当料液比 ($m_{\text{大黄鱼}} : V_{\text{提取液}}$) 为 1 : 40~1 : 140 (g/mL) 时, 小清蛋白得率先升高后降低, 当料液比 ($m_{\text{大黄鱼}} : V_{\text{提取液}}$) 为 1 : 120 (g/mL) 时, 小清蛋白得率达最高。当提取温度为 10~60 °C 时, 随着提取温度的升高, 小清蛋白得率先升高后降低, 当提取温度为 20 °C 时, 小清蛋白得率达最高。由于提取温度升高, 分子



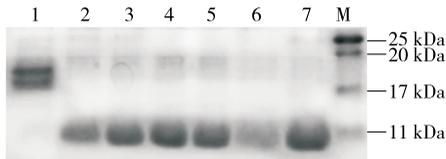
与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与正丁醇组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 1 脱脂方法对大黄鱼脂肪质量分数和蛋白质量浓度的影响

Figure 1 Effects of different degreasing methods on fat content and protein concentration of *Pseudosciaena crocea*

运动速度加快,在不破坏蛋白结构的前提下提高了蛋白溶出率,但当提取温度>20℃时,继续升高提取温度,蛋

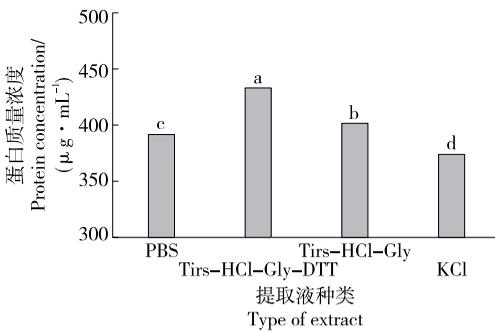
白质的空间构象发生变化且在一定程度上发生变性沉淀,蛋白质溶出量减少,得率下降^[28]。当提取时间为42h时,小清蛋白得率较大后趋于平稳,故固定提取时间为42h。



1. Na₂CO₃组 2. 乙醚+乙醇组 3. 氯仿+甲醇组 4. 正丁醇组 5. 异丙醇组 6. 乙酸乙酯组 7. 对照组 M. Marker

图2 大黄鱼脱脂后 SDS-PAGE 电泳图

Figure 2 SDS-PAGE electrophoresis of the large yellow croaker protein extracts after degreasing



字母不同表示差异显著(P<0.05)

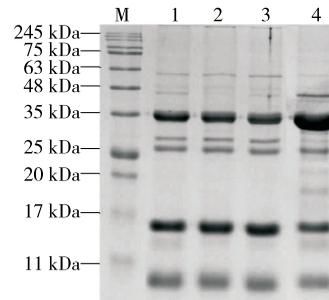
图3 提取液种类对大黄鱼小清蛋白浓度的影响

Figure 3 The effect of the type of extract on the concentration of parvalbumin from *Pseudosciaena crocea*

2.4 响应面试验

2.4.1 模型及显著性分析 在单因素试验基础上,以提取液浓度、提取液 pH、料液比和提取温度为试验因素,以小清蛋白得率为评价指标,根据 Box-Behnken 设计原理进行四因素三水平响应面试验设计。响应面试验因素与水平见表 1,试验设计与结果见表 2。

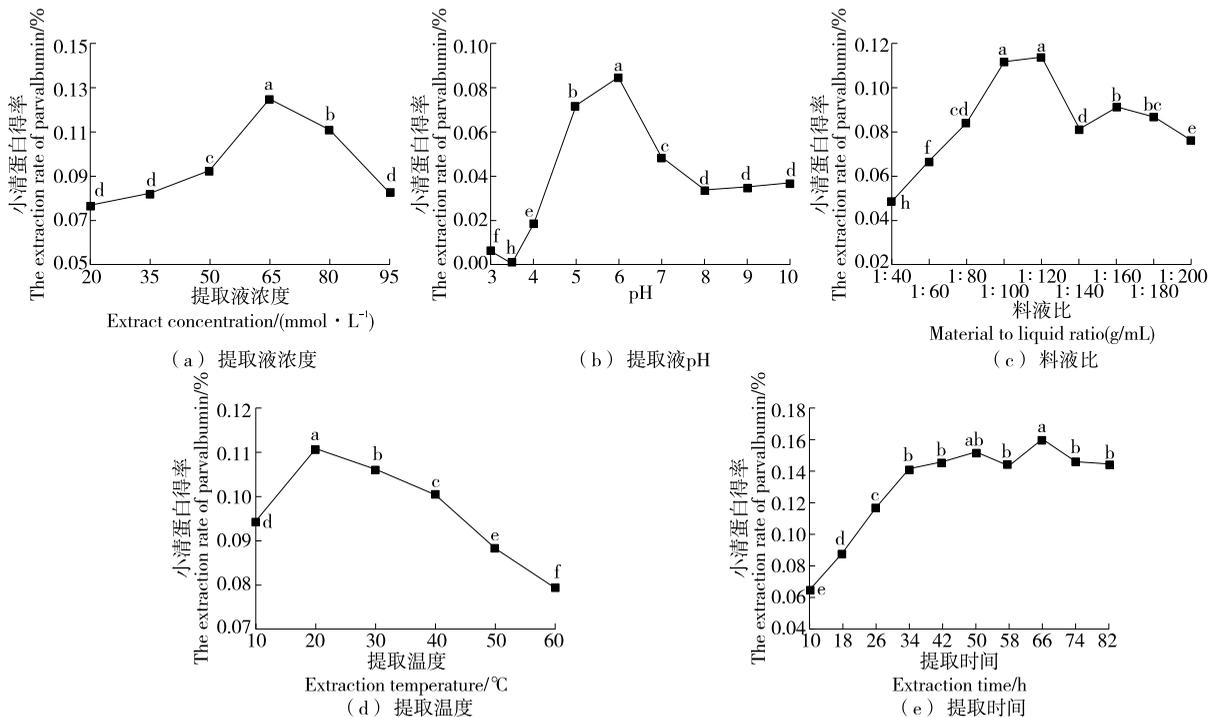
采用 Design Expert v8 软件对响应面试验结果进行



M. Marke 1. PBS 2. Tris-HCl-Gly-DTT 3. Tris-HCl-Gly 4. KCl

图4 大黄鱼小清蛋白粗提物 SDS-PAGE 电泳图

Figure 4 SDS-PAGE electrophoresis of crude extract of parvalbumin from *Pseudosciaena crocea*



字母不同表示差异显著(P<0.05)

图5 各因素对大黄鱼小清蛋白提取率的影响

Figure 5 Effects of different extraction factors on the extraction rate of parvalbumin from *Pseudosciaena crocea*

多元回归拟合分析,得二次多项式回归方程:

$$Y = 9.3883 \times 10^{-2} + 1.2829 \times 10^{-3} A - 4.8501 \times 10^{-2} B + 7.51898 \times 10^{-5} C - 3.33715 \times 10^{-4} D - 6.25977 \times 10^{-5} AB + 5.5566 \times 10^{-7} AC + 1.16284 \times 10^{-5} AD + 3.00613 \times 10^{-5} BC + 1.86981 \times 10^{-4} BD + 2.44838 \times 10^{-6} CD - 9.96215 \times 10^{-6} A^2 + 3.46613 \times 10^{-7} B^2 - 3.46613 \times 10^{-7} C^2 - 2.21972 \times 10^{-5} D^2 \quad (3)$$

表 1 响应面试验因素与水平表
Table 1 Codes and levels of RSM

水平	A 提取液浓度/ (mmol · L ⁻¹)	B 提取液 pH	C 料液比 (g/mL)	D 提取 温度/℃
1	35	4	1 : 60	10
0	65	6	1 : 120	30
-1	95	8	1 : 180	50

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果
Table 2 Box-Behnken design and result

序号	A	B	C	D	小清蛋白得率/%
1	-1	-1	0	0	0.049 2
2	1	-1	0	0	0.052 1
3	-1	1	0	0	0.134 1
4	1	1	0	0	0.122 0
5	0	0	-1	-1	0.043 1
6	0	0	1	-1	0.079 3
7	0	0	-1	1	0.047 3
8	0	0	1	1	0.095 3
9	-1	0	0	-1	0.059 7
10	1	0	0	-1	0.050 0
11	-1	0	0	1	0.075 4
12	1	0	0	1	0.093 7
13	0	-1	-1	0	0.032 2
14	0	1	-1	0	0.137 8
15	0	-1	1	0	0.071 5
16	0	1	1	0	0.191 5
17	-1	0	-1	0	0.065 3
18	1	0	-1	0	0.068 6
19	-1	0	1	0	0.076 2
20	1	0	1	0	0.083 5
21	0	-1	0	-1	0.053 8
22	0	1	0	-1	0.118 7
23	0	-1	0	1	0.059 7
24	0	1	0	1	0.154 6
25	0	0	0	0	0.092 4
26	0	0	0	0	0.079 6
27	0	0	0	0	0.069 7
28	0	0	0	0	0.098 6
29	0	0	0	0	0.072 3

由表 3 可知,失拟项 P=0.399 1,不显著,表明该回归模型的预测值与实际值拟合较好。模型 P<0.01,表明该模型极显著,试验方法准确可行。R²=92.41%,说明各因素存在线性相关,拟合程度良好,试验误差小。因此,可以采用该模型分析和预测不同条件下的提取率。各因素对小清蛋白得率的影响顺序为提取液浓度>提取温度>料液比>提取液 pH。一次项 B 和 C 与二次项 B²对小清蛋白得率影响极显著(P<0.01),一次项 D 对小清蛋白得率影响显著(P<0.05)。

2.4.2 因素间的交互影响 各因素变量之间的交互作用对响应值——小清蛋白得率的响应面三维图如图 6 所示,其中提取液浓度和提取液 pH、提取液浓度和提取温度、料液比与提取液 pH、提取温度和提取液 pH 的交互作用响应面曲面坡度陡峭,说明其对大黄鱼小清蛋白得率影响显著。

2.4.3 最优工艺条件的确定及模型验证 通过响应面法得到大黄鱼小清蛋白的最优提取工艺为提取液浓度 72 mmol/L、提取液 pH 8.0、料液比(*m*_{大黄鱼} : *V*_{提取液})1 : 180 (g/mL)、提取温度 50 ℃,此条件下的小清蛋白得率为 0.174 2%(*n*=3),与理论预测值 0.181 1%基本相符,说明该回归方程能真实反映各因素对小清蛋白得率的影

表 3 提取工艺回归模型方差分析表[†]

Table 3 Variance analysis for the regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P	显著性
模型	0.04	14	2.48×10 ⁻³	12.18	<0.000 1	
A	8.33×10 ⁻⁶	1	8.33×10 ⁻⁶	0.04	0.842 6	
B	0.02	1	0.02	119.52	<0.000 1	* *
C	3.43×10 ⁻³	1	3.43×10 ⁻³	16.88	0.001 1	* *
D	1.23×10 ⁻³	1	1.23×10 ⁻³	6.04	0.027 6	*
AB	5.64×10 ⁻⁵	1	5.64×10 ⁻⁵	0.28	0.606 7	
AC	4.00×10 ⁻⁶	1	4.00×10 ⁻⁶	0.02	0.890 5	
AD	1.95×10 ⁻⁴	1	1.95×10 ⁻⁴	0.96	0.344 5	
BC	5.21×10 ⁻⁵	1	5.21×10 ⁻⁵	0.26	0.620 8	
BD	2.24×10 ⁻⁴	1	2.24×10 ⁻⁴	1.10	0.312 0	
CD	3.45×10 ⁻⁵	1	3.45×10 ⁻⁵	0.17	0.686 6	
A ²	5.21×10 ⁻⁴	1	5.21×10 ⁻⁴	2.56	0.131 7	
B ²	3.13×10 ⁻³	1	3.13×10 ⁻³	15.37	0.001 5	* *
C ²	1.01×10 ⁻⁵	1	1.01×10 ⁻⁵	0.05	0.826 9	
D ²	5.11×10 ⁻⁴	1	5.11×10 ⁻⁴	2.51	0.135 2	
残差	2.85×10 ⁻³	14	2.03×10 ⁻⁴			
失拟项	2.22×10 ⁻³	10	2.22×10 ⁻⁴	1.40	0.399 1	
纯误差	6.33×10 ⁻⁴	4	1.58×10 ⁻⁴			
总差	0.04	28				

[†] * 表示差异显著(P<0.05), * * 表示差异极显著(P<0.01);R²=0.924 1,R_{adj}²=0.848 2,CV=17.04%。

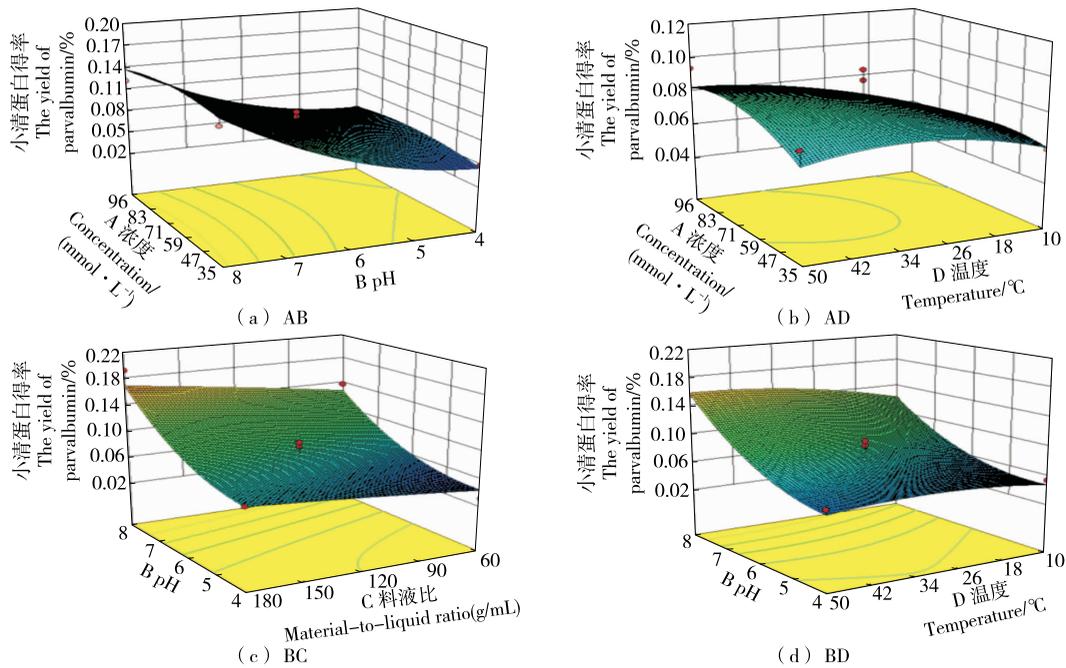


图6 各因素对小清蛋白得率的交互作用

Figure 6 Response surface optimization map

响。孙妙^[29]研究表明,大菱鲆鱼肉中的过敏原小清蛋白得率为0.286%,可能是因为鱼种不同。

2.5 大黄鱼小清蛋白粗提物阴离子柱层析纯化

试验表明,大黄鱼小清蛋白提取液在220 nm处的吸收峰远高于其他波长,这可能与小清蛋白缺少在280 nm处有吸光值的色氨酸有关^[30]。故在220 nm下测定小清蛋白的洗脱曲线,共分离得到4个明显的洗脱组分(见图7)。

由图8可知,洗脱峰1、2的蛋白含量较高且成分单一,分子量约为10 kDa,与陆超超^[14]^[38]报道的小清蛋白分子量相符。结合图7和图8可知,大黄鱼小清蛋白的最高盐浓度为0.5 mol/L,当盐浓度为0.16 mol/L时停止目的样品的收集。

2.6 小清蛋白的免疫印迹确认

小鼠抗蛙单克隆小清蛋白抗体PARV-19,是目前商

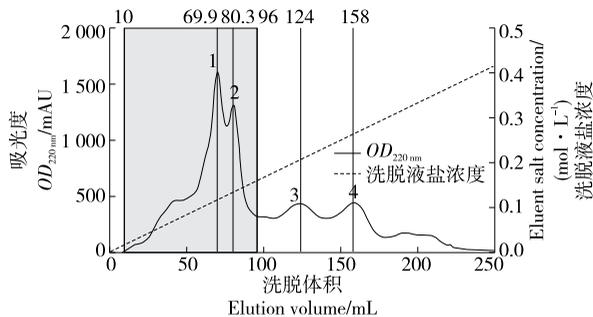


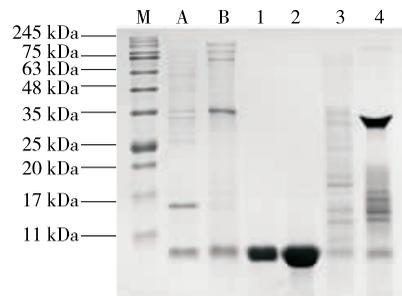
图7 大黄鱼小清蛋白阴离子柱层析洗脱图

Figure 7 Parvalbumin of *Pseudosciaena crocea* anion column chromatography elution map

用化的已被证实并被使用的单克隆抗体,已被用于确认鲤鱼、鲈鱼、鳕鱼和罗非鱼中的小清蛋白。由图9可知,纯化后的大黄鱼小清蛋白可在分子量10~12 kDa处与小鼠抗蛙单克隆抗体出现明显的特异杂交显色条带,据此判定纯化的蛋白样品即为小清蛋白。

3 结论

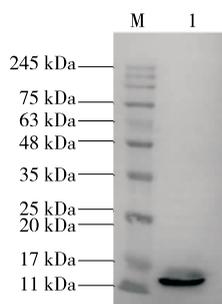
采用热肌浆蛋白热提取和阴离子柱层析的方法研究了养殖大黄鱼小清蛋白的提取工艺,此时的洗脱液盐浓度为0.16 mol/L。提取前进行脱脂处理,大大减少了其他杂质,提高了小清蛋白的纯度,而还原剂二硫苏糖醇的添加,减少了小清蛋白的氧化,提高了其提取得率。响应



M. Marker A. 大黄鱼肌浆蛋白 B. 大黄鱼小清蛋白热提取物 1. 第1洗脱峰 2. 第2洗脱峰 3. 第3洗脱峰 4. 第4洗脱峰

图8 大黄鱼小清蛋白阴离子柱层析 SDS-PAGE 电泳图

Figure 8 SDS-PAGE electrophoresis of parvalbumin from *Pseudosciaena crocea* eluted by anion column chromatography



M. Marker 1. 纯化的血清蛋白

图 9 血清蛋白的免疫印迹分析

Figure 9 Western-blot of parvalbumin

面优化确定的养殖大黄鱼血清蛋白最佳提取工艺条件为提取浓度 72 mmol/L, 提取液 pH 8.0, 料液比 ($m_{\text{大黄鱼}} : V_{\text{提取液}}$) 1 : 180 (g/mL), 提取温度 50 °C, 提取时间 42 h, 此条件下血清蛋白得率为 0.174 2%; 采用免疫印迹法分析血清蛋白的分子量约为 12 kDa。由于血清蛋白的分离纯化技术较为复杂, 其致敏及脱敏机理有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 李婷婷. 大黄鱼生物保鲜技术及新鲜度指示蛋白研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013: 1.
- [2] 刘家富, 韩坤煌. 我国大黄鱼产业的发展现状与对策[J]. 福建水产, 2011, 33(5): 4-8.
- [3] 张永霞, 杨阳, 蔡秋凤, 等. 水产食物过敏原及其抗原表位的研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2015, 5(5): 1-8.
- [4] SHRUTI R S, MICHAEL F S, SANDIP D K, et al. Antibody reactivity to the major fish allergen parvalbumin is determined by isoforms and impact of thermal processing[J]. Food Chemistry, 2014, 148: 321-328.
- [5] SYED Hasan Arif. A Ca^{2+} -binding protein with numerous roles and uses; Parvalbumin in molecular biology and physiology[J]. Bioessays, 2009, 31(4): 410-421.
- [6] ANNETTE Kuehn, LNES Swoboda, KARTHIK Arumugam, et al. Fish allergens at a glance: Variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens[J]. Frontiers in Immunology, 2014, 5: 179.
- [7] ELSAYED S, AAS K, SLETTEN K, et al. Tryptic cleavage of a homogeneous cod fish allergen and isolation of two active polypeptide fragments [J]. Immunochemistry, 1972, 9(6): 647.
- [8] AUKRUST L, APOLD J, ELSAYED S, et al. Crossed immunoelectrophoretic and crossed radioimmunoelectrophoretic studies employing a model allergen from codfish[J]. International Archives of Allergy & Immunology, 1978, 57(3): 253-262.
- [9] ELSAYED S, AAS K. Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 1971, 40(3): 428-438.
- [10] KOBAYASHI A, TANAKA H, HAMADA Y, et al. Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles[J]. Allergy, 2006, 61(3): 357-363.
- [11] JENNIFER L W, NISREEN M M, DAVID J. Coughlin Parvalbumin correlates with relaxation rate in the swimming muscle of sheepshead and kingfish[J]. Journal of Experimental Biology, 2006, 209(2): 227-237.
- [12] SWOBODA L, BUGAJSKASCHRETTTER A, LINHART B, et al. A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy[J]. Journal of Immunology, 2007, 178(10): 6 290-6 296.
- [13] 郭岩. 鱼类主要过敏原血清蛋白的单克隆抗体制备及其金属酶联免疫体系的构建[D]. 上海: 上海师范大学, 2017: 4.
- [14] 陆宗超. 大菱鲆过敏原血清蛋白的制备及氧化对其 IgE 结合能力的影响[D]. 北京: 中国海洋大学, 2013.
- [15] 蔡秋凤, 刘光明, 王瑞芳. 鱼类主要过敏原血清蛋白的检测[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(8): 716-720, 723.
- [16] 肖有明, 刘红, 陈红兵, 等. 鲤鱼血清蛋白过敏原的分离纯化[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 385-388.
- [17] 吴玫静, 李振兴, 金科, 等. 青岛地区常见鱼类过敏原的鉴定及其交叉反应研究[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1 532-1 539.
- [18] MOHAMED F J, THOMAS G R, MARY E M, et al. Occupational allergy and asthma among salt water fish processing workers [J]. American Journal of Industrial Medicine, 2008, 51(12): 899-910.
- [19] 夏珊珊, 曹少谦, 刘亮, 等. 响应面法优化马面鱼皮胶原蛋白提取工艺及胶原组成分析[J]. 核农学报, 2014, 28(5): 869-875.
- [20] 田家亮, 周宗科, 廉永云, 等. 三种不同脱脂方法对猪骨脱脂的效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(16): 3 133-3 136.
- [21] 吴靖娜, 许永安, 刘智禹, 等. 养殖大黄鱼鱼片脱脂工艺研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2013, 34(6): 27-31.
- [22] 李晓, 李红艳, 王颖, 等. 响应面法优化狭鳕鱼鱼皮酸性胶原蛋白的提取工艺[J]. 广西科学院学报, 2016, 32(4): 250-257.
- [23] 李莉, 顾赛麒, 王锡昌, 等. 响应面法优化酶法提取大鲵皮胶原蛋白工艺[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 876-883.
- [24] 刘光明, 梁银龙, 苏文金, 等. 鲤鱼血清蛋白的纯化及其过敏原性鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 188-191.
- [25] ULRICH K Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. nature, 1970, 227(5 259): 680.

(下转第 179 页)

3 结论

通过对不同干燥方法加工的茯苓产品进行显微性状、有效成分含量、抗氧化活性 3 个方面进行比较,结果显示,真空冷冻干燥、日晒、空气能仿生变温干燥的茯苓产品的显微性状优于恒温干燥;空气能仿生变温干燥的茯苓产品的水提液的抗氧化活性最高;空气能仿生变温干燥的茯苓产品的水溶性多糖、醇溶性蛋白含量降低,水溶性蛋白含量极显著提高;空气能仿生变温干燥方法还解决了高温干燥方法导致茯苓产品开裂的问题,比日晒、阴干时间缩短,比真空冷冻干燥能耗低,并避免了茯苓加工过程中需熏硫磺的问题。综上,空气能仿生变温干燥为最佳的茯苓干燥方法。但干燥方法对茯苓成分影响的具体机制尚不明确,还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 251.
- [2] 郭毓菲, 张诗泉, 王汉迪, 等. 超声波法提取水溶性茯苓多糖工艺优化及其抗氧化活性探究[J]. 中国酿造, 2018, 37(12): 160-164.
- [3] 崔鹤蓉, 王睿林, 郭文博, 等. 茯苓的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(5): 694-700.
- [4] JIANG Yu, FAN Liu-ping. Evaluation of anticancer activities of *Poria cocos* ethanol extract in breast cancer: In vivo and in vitro, identification and mechanism[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 257: 112851.
- [5] 张叶苗, 杨岳峰, 杨野全, 等. 茯苓复合提取物对 2 型糖尿病大鼠血糖和血脂水平的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(5): 937-941.
- [6] 李洪波, 杨瑞雪, 陈静, 等. 茯苓免疫调节蛋白-1 抗体的制备及分析[J]. 中草药, 2014, 45(20): 2 912-2 916.
- [7] 张年, 李兆星, 李娟, 等. 茯苓的化学成分与生物活性研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(2): 220-233.
- [8] 王丽丽. 真空冷冻干燥食品加工工艺的研究[J]. 现代食品, 2020(13): 47-49.
- [9] 龚志华. 茯苓辐照降解及其产物生物活性研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2010: 14-16.
- [10] 张晓婷, 王满生, 邱浩楠, 等. 青叶苎麻叶多酚超声辅助提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(12): 152-158.
- [11] 杨岚, 尹火青, 唐娟, 等. 三个茯苓品种氨基酸与蛋白质的含量比较[J]. 中国食物与营养, 2018, 24(6): 44-46.
- [12] 黄骞樟, 林晓蓉, 陈忠正, 等. 烘焙工艺对饮料加工用绿茶品质的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(11): 165-171.
- [13] 刘艳红, 熊张平, 季春艳, 等. 干燥方式对太和香椿芽品质的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(9): 201-206.
- [14] 陈婷婷. 真空冷冻干燥技术在生物制药方面的运用分析[J]. 科技创新与应用, 2020(35): 154-155.
- [15] LOZANO-MONTAÑA P A, SARMIENTO F, MEJÍA-SEQUERA L M, et al. Physiological, biochemical and transcriptional responses of *Passiflora edulis Sims* F. edulis under progressive drought stress [J]. Scientia Horticulturae, 2021, 275: 2 275-2 280.
- [16] LIPIEC J, DOUSSAN C, NOSALEWICZ A, et al. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: A review[J]. Int Agrophys, 2013, 27: 463-477.
- [17] 宫瑞泽. 美拉德反应对中药品质的影响及调控研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(1): 243-251.
- [18] 胡云峰, 王晓彬, 陈君然, 等. 基于美拉德反应制备的熟制黑枸杞加工工艺及活性成分变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(7): 155-160.
- [19] 邓桃妹, 彭代银, 俞年军, 等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2 703-2 717.
- [20] 刘欢, 邹吉祥, 金华. 干旱胁迫对文冠果脯氨酸和可溶性蛋白质含量的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2019(2): 17-18.
- [21] 王纪辉, 侯娜, 梁美. 水分胁迫下竹叶花椒的生理响应[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(3): 676-681.
- [22] FURLAN A L, BIANUCCI E, GIORDANO W, et al. Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 151: 566-578.
- [23] 赵益梅. 调亏灌溉对‘赤霞珠’葡萄和葡萄酒中花色苷与缩合单宁特性的影响[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2019: 5-9.
- [24] 肖扬波, 王满生, 邱浩楠, 等. 空气能仿生变温干燥对茯苓产品显微性状、营养成分及抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(12): 152-158.
- [25] 肖扬波, 王满生, 邱浩楠, 等. 空气能仿生变温干燥对茯苓产品水溶性多糖、醇溶性蛋白含量的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(11): 165-171.
- [26] KANNA Motoyama, YOTA Suma, SHOICHIRO Ishizaki, et al. Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans[J]. J Agric Food Chem, 2012, 55(3): 985-991.
- [27] CHEN Ling-yun, SUE L Hefle, STEVE L Taylor, et al. Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(15): 5 577-5 582.
- [28] 洪晶, 陈涛涛, 唐梦茹, 等. 响应面法优化韭菜籽蛋白质提取工艺[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 89-96.
- [29] 孙妙. 鱼过敏原的肠道可控释放及诱发免疫耐受的机制[D]. 北京:中国海洋大学, 2013: 16-18.
- [30] 李铮. 草鱼主要过敏原小清蛋白亚型纯化鉴定及加工对过敏原影响的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2014: 17-18.

(上接第 156 页)