

响应面法优化林蛙蛙皮中蛋白质的提取工艺

侯召华, 孙晓东, 宁浩然, 张宇, 金春爱, 崔松焕* (中国农业科学院特产研究所, 吉林长春 130112)

摘要 [目的] 利用响应面分析法优化林蛙皮中蛋白质的提取工艺。[方法] 通过单因素试验, 确定响应面试验因素与中心水平。根据 Box-Behnken 试验设计原理采用 4 因素 3 水平的响应面法, 依据回归分析, 以蛋白质提取率为响应值作响应面, 分析各因素的显著性和交互作用。[结果] 林蛙皮中蛋白质提取的最佳条件为: 液料比 30.35, 提取时间 3.28 h, 提取温度 11.13 °C, pH 为 6.01, 提取次数为 2 次。在最佳工艺条件下, 蛋白质的实际提取率为 6.11%。利用 SDS-PAGE 得到林蛙皮蛋白质分子量主要集中在 43~20 kD。

关键词 林蛙皮; 蛋白质; 响应面法; 提取

中图分类号 S966.3⁹ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)12-05362-04

Optimization of Extracting Conditions for Protein from Frog Skin (*Rana Chensinensis*) by Response Surface Methodology

HOU Zhao-hua et al (Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130112)

Abstract [Objective] The technology for extracting protein from frog skin was optimized by response surface methodology (RSM). [Method] The RSM experiment factors and levels were determined by single factor experiments. On the basis of Box-Behnken experiment design, a 4 factors and 3 levels' RSM was applied to get the RSM plot with the protein extraction rate as the response value after regression analysis. Then the significance and interaction of every factor were analyzed. [Result] The optimum extracting conditions of protein were as follows: the ratio of water to material of 30.35, extracting time of 3.28 h, extracting temperature of 11.13 °C, pH of 6.01, 2 times. The actual extraction rate is 6.11% under the optimum conditions. Using SDS-PAGE, the main range of molecular weight of protein is 43–20 kD.

Key words Frog skin; Protein; Response surface methodology (RSM); Extracting

中国林蛙 (*Rana Chensinensis*) 俗称田鸡, 隶属两栖纲、无尾目、蛙科, 是我国特有的经济价值很高的药用两栖动物, 主要分布在东北地区^[1], 其干燥的输卵管是我国特产的 1 种具有滋补强壮作用的珍贵动物性中药材——蛤蟆油。林蛙皮作为生产蛤蟆油的副产品, 营养价值极高, 以林蛙皮为原料的健康产品具有良好的市场前景, 因此深入开展林蛙皮资源研究和功能性食品具有重大开发意义^[2]。中国林蛙皮能分泌多种活性成分, 数百年来, 其作为中药用于治疗炎症^[1], 活性肽等蛋白质在蛙皮中的含量可达 10%。两栖类皮肤活性肽具有多种功效, 如抗菌性、抗肿瘤、刺激胰岛素分泌等, 对正常真核细胞几乎无影响, 而且不易产生耐药性, 这使其有望成为新一代治疗剂^[3]。

姜大成等比较了盐提、碱提对林蛙皮蛋白质的提取率, 并利用碱或盐溶液提取并调节 pH 对林蛙皮粗蛋白质进行提取, 结果表明 2 种方法均可行, 而盐提取方法的效果更显著^[2]。薛冰等研究林蛙皮抗氧化性, 冷冻干燥林蛙皮, 在用蒸馏水在 50 °C 下提取 30 min, 其 DPPH· 清除率达 79.12%, 而且 DPPH· 的清除能力随着浓度的增加而增强; 林蛙皮水提物也表现出较强的·OH 清除能力, 但对 O₂⁻ 的清除力不显著^[4]。刘红玉等从中国林蛙皮中提取出 1 种具有抗菌作用的蛙肽。在单因素试验的基础上, 通过正交试验筛选出提取蛙肽的最佳工艺条件, 即甲醇浓度 80%, 液固比为 6, 提取时间 24 h, 提取次数 3 次^[1]。金莉莉等以林蛙干皮为原料, 用甲醇、乙酸和磷酸盐 3 种浸提液提取有抑菌活性的多

肽, 结果表明甲醇法浸提产物的抑菌活性最佳, 粗提品经 G-25 层析后, 活力提高了 5 倍, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用^[5]。笔者以中国林蛙皮为原材料, 对其蛋白质的提取条件进行了研究, 旨在优化最佳提取工艺, 为后续研究及生产提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试验对象。 林蛙购于吉林省。

1.1.2 材料。 低分子量标准蛋白 (NEL 产品); 丙烯酰胺、亚甲基丙烯酰胺等为电泳级; 盐酸、乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等, 均为国产分析纯。

1.1.3 仪器。 TU-1810 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器 (480 W, 昆山市超声仪器有限公司); ALB-124 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); 雷磁 pHS-3C 型 pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); Allegra 64R Centrifuge 离心机 (德国 Beckman 仪器公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 林蛙皮的制备。 取林蛙数只, 断头, 在冰浴条件下迅速剥皮, 用生理盐水冲洗, 剪碎, 液氮速冻, 研磨粉碎, -80 °C 下冷冻贮藏, 备用。

1.2.2 浸提溶剂的选择。 分别取一定量的中国林蛙皮粉末置于玻璃匀浆器中, 添加 10 倍体积的提取液, 在 25 °C 下振荡浸提 2 h, 10 000 g 离心 15 min 后, 得到上清液; 离心后, 再重复浸提 1 次, 合并 2 次浸提液。提取液分别为 pH6.8 磷酸缓冲液、75% 乙醇、乙醇盐酸溶液 (3:1)。采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量, 选择较适宜的浸提溶剂。

1.2.3 单因素试验。 通过预试验得到提取温度、提取时间、料液比、提取液 pH、提取次数等因素对林蛙皮中蛋白质提取

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2012ZL090)。
作者简介 侯召华 (1982-), 男, 山东泰安人, 助理研究员, 博士, 从事特产经济动植物功能成分的研究。* 通讯作者, 副研究员, 硕士, 硕士生导师, 从事特种经济动植物研究, E-mail: tcsjgs@126.com。
收稿日期 2013-04-08

的影响效果,并初步确定各因素的最佳条件。

(1)提取液 pH 的选择。按照上述的提取方法,取磷酸缓冲液 pH 分别为 2、3、4、5、6、7、8、9,液固比为 20,提取时间 2 h,提取温度 25 ℃,提取 2 次。

(2)提取时间的选择。按照上述的提取方法,以 20 倍体积的 pH6.0 磷酸缓冲液于 25 ℃ 条件下分别浸提林蛙皮 1、2、3、4、5 h,提取次数 2 次。

(3)提取溶剂固液比的选择。按照上述的提取方法,分别以 10、20、30、40、50 倍体积的 pH6.0 磷酸缓冲液于 25 ℃ 条件下浸提林蛙皮 2 h,提取 2 次。

(4)提取温度的选择。按照上述的提取方法,分别以 20 倍体积的 pH6.0 磷酸缓冲液下提取 2 h,提取 2 次,提取温度分别为 4、12、20、35、50、65 ℃。

(5)浸提次数的选择。按照上述的提取方法,以 20 倍体积的 pH6.0 磷酸缓冲液 25 ℃ 条件下提取 2 h,分别浸提 1、2、3、4、5 次。

1.2.4 优化林蛙皮蛋白质提取的响应面试验设计。在单因素试验的基础上,确定液料比、pH、提取温度和提取时间的水平范围,使用 Design-Expert 8.0b 软件设计响应面试验。选用 Box-Behnken 试验设计(4 因素 3 水平),以蛋白质提取率为响应值(指标值),考察了 4 个因素对蛋白质提取工艺的影响,并对提取工艺进行优化。

1.2.5 蛋白含量的测定。配制 0~100 μg/ml 牛血清白蛋白溶液,绘制标准曲线。在 0.1 ml 蛋白质溶液中加入 5 ml 的考马斯亮蓝 G-250 试剂,振荡混合后放置 10 min,于波长 595 nm 处测定吸光度,并通过回归方程计算蛋白质浓度。

1.2.6 林蛙皮的蛋白质分子量分析。利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对林蛙皮蛋白质分子量分布进行分析。胶浓度:分离胶 T=12%,浓缩胶 T=5%。在 200 V 恒压下电泳 3 h,电泳结束后,考马斯亮蓝 R-250 染色。脱色后,对凝胶条带进行分析。用 SDS-PAGE 分析蛋白质分子量,以低分子量标准蛋白(66.2、43、31、20.1、14.4 kD)为标准,对林蛙皮蛋白质分子量进行比较。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果 通过单因素试验,得到 pH 为 6.0、提取温度为 12 ℃、提取时间为 3 h、料液比为 30:1。提取次数达到 2 次后,提取率已经达到 96.41%,因此提取次数确定为 2 次。设定提取时间步长为 1;提取温度步长为 8;pH 步长为 1;料液比步长为 10。响应面因素和水平见表 1。

表 1 响应面因素与水平

水平	液固比 (X_1)	温度 //℃ (X_2)	提取时间 //h (X_3)	pH (X_4)
-1	20:1	4	2	5
0	30:1	12	3	6
1	40:1	20	4	7

2.2 回归模型的建立 选用了中心复合模型,做 4 因素 3 水平共 29 个试验点(5 个中心点)的响应面分析试验。由表 2 可知,这 29 个试验点可以分为 2 类:①析因点,自变量取值

在各因素所够成的三维顶点,共有 24 个析因点;②零点,为区域的中心点,零点重复 5 次,用于估计试验误差,以蛋白质提取率为响应值。

对固液比(X_1)、提取温度(X_2)、提取时间(X_3)、pH(X_4)作以下变换: $X_i = (Z_i - Z_0)/Z$ 。式中, X_i 为自变量的编码值, Z_i 为自变量的真实值, Z_0 为试验中心点处自变量的真实值, Z 为自变量的变化步长,蛋白质提取率为响应值(Y)。

表 2 蛋白质提取率的响应面试验结果

试验号	固液比(A)	温度(B) ℃	时间(C) min	pH(D)	蛋白质提取 率//%
1	-1	-1	0	0	4.74
2	1	-1	0	0	4.55
3	-1	1	0	0	4.75
4	1	1	0	0	4.28
5	0	0	-1	-1	4.38
6	0	0	1	-1	4.50
7	0	0	-1	1	4.28
8	0	0	1	1	4.43
9	-1	0	0	-1	4.03
10	1	0	0	-1	4.44
11	-1	0	0	1	4.62
12	1	0	0	1	4.31
13	0	-1	-1	0	5.20
14	0	1	-1	0	4.78
15	0	-1	1	0	5.48
16	0	1	1	0	5.37
17	-1	0	-1	0	5.41
18	1	0	-1	0	5.26
19	-1	0	1	0	5.36
20	1	0	1	0	5.93
21	0	-1	0	-1	4.38
22	0	1	0	-1	4.86
23	0	-1	0	1	5.58
24	0	1	0	1	5.37
25	0	0	0	0	6.08
26	0	0	0	0	6.08
27	0	0	0	0	6.08
28	0	0	0	0	6.08
29	0	0	0	0	6.08

应用 Design Expert 8.05b 软件进行多元回归拟合分析,得到蛋白质提取率与各因素变量的二次方程模型为 $Y = 6.08 - 0.012X_1 - 0.043X_2 + 0.15X_3 + 0.17X_4 - 0.070X_1X_2 + 0.18X_1X_3 - 0.18X_1X_4 + 0.077X_2X_3 - 0.17X_2X_4 - 0.0075X_3X_4 - 0.68X_1^2 - 0.47X_2^2 - 0.34X_3^2 - 0.99X_4^2$ 。

表 3 响应面二次模型的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
X_1	1	1.633×10^{-3}	1.633×10^{-3}	7.086×10^{-3}	0.934 1
X_2	1	0.023	0.023	0.098	0.759 1
X_3	1	0.260	0.260	1.120	0.307 9
X_4	1	0.330	0.330	1.450	0.249 1
X_1X_2	1	0.020	0.020	0.085	0.774 9
X_1X_3	1	0.130	0.130	0.560	0.465 8
X_1X_4	1	0.130	0.130	0.560	0.465 8
X_2X_3	1	0.024	0.024	0.100	0.751 6
X_2X_4	1	0.120	0.120	0.520	0.484 2
X_3X_4	1	2.250×10^{-4}	2.250×10^{-4}	9.762×10^{-4}	0.975 5
X_1^2	1	2.960	2.960	12.840	<0.003 0
X_2^2	1	1.420	1.420	6.160	<0.026 4
X_3^2	1	0.740	0.740	3.210	0.094 7
X_4^2	1	6.330	6.330	27.470	<0.000 1
二次项	14	0.160	0.012		
失拟项	10	0.160	0.016		
回归模型	14	9.270	0.660	2.870	<0.028 8
回归系数 R^2			0.734		

利用 Design-Expert 8.0b 软件对试验数据进行方差分析。由表 3 可知,通过软件分析和回归方程模拟寻优结果及方差分析可知模型的 P 值为 0.028 8,此时回归方程模型是显著的,说明该试验方法是可靠的。对回归方程的相关系数 (R^2) 为 0.733 9,说明模型响应值的变化 73.39% 来自所选考察变量。因此,回归方程可以较好地描述考察因子与响应值之间的关系。失拟(lack-of-fit)检验可以用来检验模型对观察数据描述的准确性。失拟值为 0.016,表明该模型的拟合结果较好,进一步说明各因素值和响应值之间的关系可以用此模型来函数化,可用该回归方程代替试验真实点对试验结

果进行分析。方程的二次项系数均为负,表明方程有最大值。各项系数的 P 值越小,说明该二次项越显著。对于该模型而言,液料比的二次项(A^2)和 pH 的二次项(D^2)的 P 值均小于 0.01,对蛋白质提取率的影响极为显著。由表 3 可知,4 个因素对蛋白质提取率的影响排序为:pH > 液料比 > 提取温度 > 提取时间;其中 pH 的影响最为显著($P < 0.000 1$)。

2.3 两因素间的交互作用分析 将 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 因素中的任意 2 个因素固定在零水平,可得到其他 2 个因素之间的交互效应对蛋白质提取效果的影响,根据回归方程做出响应面图(图 1),考察所拟合的响应曲面的形状,分析 pH、液料比、

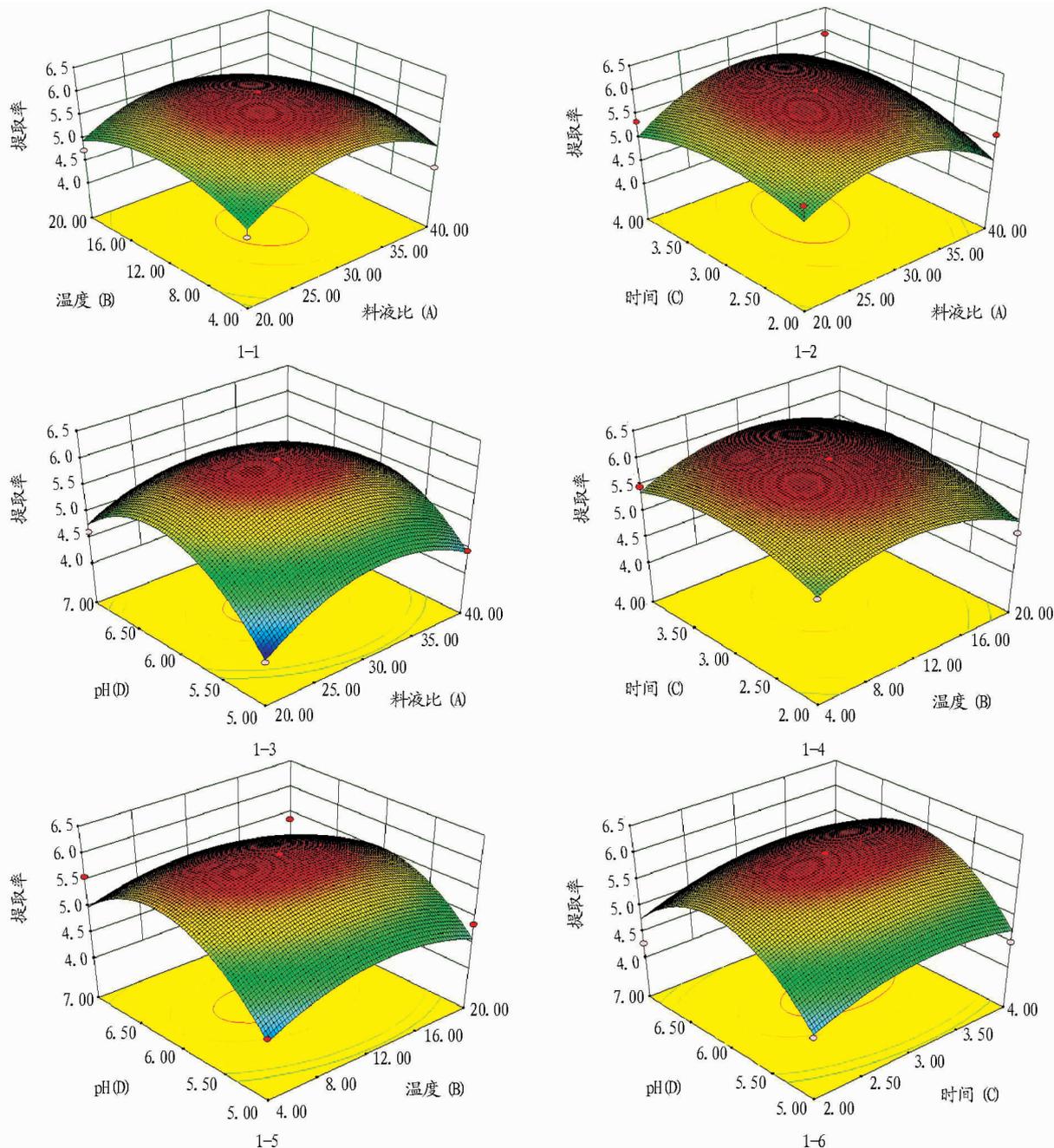


图1 响应曲面图

提取时间、提取温度对蛋白质得率的影响。从图 1 可以看出,提取料液比和 pH 表现的曲面较为陡峭,存在极值的条件

应该在圆心处。

2.4 回归模型的验证 通过 3 次验证试验,得到蛋白质提

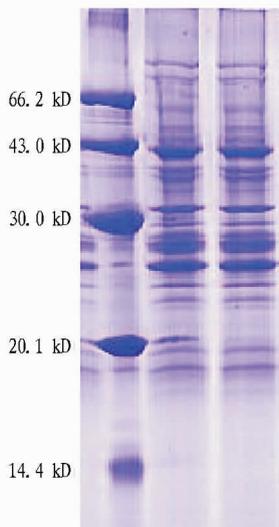


图2 林蛙皮蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

取率的平均值为 6.11%。验证提取率与模型预测值仅相差 0.016%，表明此模型是合适有效的。

2.5 林蛙皮蛋白质分子量的分布 SDS-聚丙烯酰胺凝胶对林蛙皮蛋白质进行电泳。胶浓度:分离胶 T = 12%，浓缩胶 T = 5%；200 V 恒压下电泳结束后,利用 R-250 染色,脱色后得

(上接第 5361 页)

性都较好,且不需要特殊的试验设备,只需要 1 台普通的水浴锅即可^[11]。由于 LAMP 方法的扩增效率非常高,在只存在少量 cDNA 的情况下也能对核酸进行大量扩增,因此 LAMP 法可以在逆转录酶存在的情况下采用直接一步法扩增 RNA,相较于普通 PCR 的先逆转录再进行 PCR 要方便很多,而且防止了由于多次操作带来的各种可能存在的污染。

该研究建立的 JEV RT-LAMP 检测方法能特异性地检测猪 JEV,并且表现出较高的灵敏度,RNA 的最小检测极限为 0.5 pg,与 RT-Nested-PCR 的灵敏度相当。二者检出率的符合率为 90.9%,说明建立的 RT-LAMP 具有较好的可靠性。整个反应只需要在水浴锅中 65℃,反应 1 h 即可完成。该研究对 RT-LAMP 反应体系进行了优化,扩增效率极高,理论上说在反应过程中会产生大量的焦磷酸镁,反应结束后可以通过对比反应液的浑浊度来判断样品的阴阳性。但是,反应结束后阴、阳性样品的反应液的浊度并没有明显的区别,并不能根据反应液的浊度就能判断出样品的阴、阳性,这与彭宜等^[12]的试验结果不同,反应结束后必须通过添加 100 × SYBR Green I 染料才能达到反应结果的可视化观察。

笔者从样品处理到得出诊断报告,JEV RT-LAMP 耗时仅约 3 h,而 RT-Nested-PCR 方法耗时约 7 h,普通常规 PCR 耗时约为 5 h,RT-LAMP 的检测时间至少缩短了 2 h。运用 RT-LAMP 对临床样品进行检测,并与 RT-Nested-PCR 进行比较,结果表明所建立的方法具有较好的可靠性。另外,建立的猪流行性乙型脑炎 RT-LAMP 方法不需要特殊的试验设备,还具有快速、特异性好、灵敏度高、操作简易的特点,十分

到林蛙皮蛋白质电泳图。利用 SDS-PAGE 分析获得的蛋白多肽,以低分子量标准蛋白(66.2、43、31、20.1、14.4 kD)为对照,可以看出林蛙皮蛋白质分布较为广泛,其中主要集中在 20.1 ~ 43 kD。

3 小结

应用 Box-Behnken 响应面设计优化了林蛙皮中蛋白质的提取工艺。该试验结果表明,桔梗总皂苷的最佳提取条件为:液料比 30.35,提取温度为 11.13℃,提取时间 3.28 h, pH6.01,蛋白质实际提取率为 6.11%,提取次数为 2 次。林蛙皮蛋白质分布较广泛,其中主要集中在 20.1 ~ 43 kD。此试验结果对林蛙皮蛋白质的工业化生产具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 刘红玉,崔洪斌,许岩.中国林蛙蛙皮提取工艺的研究[J].食品工业科技,2009,30(1):201-203.
- [2] 姜大成,祝洪艳,肖井雷.林蛙皮蛋白粉提取工艺研究[J].吉林中医药,2010,30(7):619-620.
- [3] 王战勇,井静,苏婷婷.中国林蛙皮抗菌肽的提取及其抗菌活性的研究[J].食品科技,2010,35(6):235-238.
- [4] 薛冰,金在久,施溯漪.林蛙皮的抗氧化性研究[J].华西药理学杂志,2012,25(4):431-433.
- [5] 金莉莉,丁忠福,王秋雨.中国林蛙皮抗菌肽提取条件的优化研究[J].食品科学,2008,29(10):223-227.

适合应用在基层和现场,对猪群和人类 JE 的有效防控均具有重要意义。

参考文献

- [1] 李晓宇,宋宏,付士红,等.中国流行性乙型脑炎病毒分子生物学特性研究[J].病毒学报,2004,20(3):200-208.
- [2] 秦毅斌,何颖,何萍萍,等.广西猪乙型脑炎血清流行病学调查分析[J].南方农业学报,2011,42(6):668-671.
- [3] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):63.
- [4] DUKES J P, KING D P, ALEXANDERSEN S. Novel reverse transcription loop-mediated amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus[J]. Archives of Virology, 2006, 151(6):1093-1106.
- [5] IWAMOTO T, SONOBE T, HAYASHI K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, *M. avium* and *M. intracellulare* in sputum samples[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(6):2616-2622.
- [6] HARAKUDO Y, YOSHINO M, KOJIMA T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Salmonella[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 253(1):155-161.
- [7] SEKI M, YAMASHITA Y, TORIGOE H, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *lytA* gene for detection of Streptococcus pneumoniae [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(4):1581-1586.
- [8] 李茂宁,赵武,陈云霞,等.日本脑炎病毒套式 RTPCR 方法的建立与初步应用[J].动物医学进展,2009,30(12):5-8.
- [9] 陈继明.重大动物疫病监测指南[M].北京:中国农业科学技术出版社,2008:207-210.
- [10] 秦毅斌,赵武,梁家幸,等.一起乙型脑炎致猪繁殖障碍病例的确诊[J].广西畜牧兽医,2011,27(6):326-328.
- [11] ASIM K, MEENA H, RONALD M. Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Other Methods and their Applications [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1991, 26(3/4):301-334.
- [12] 彭宜,谢芝勤,刘加波,等.H9N2 型禽流感病毒 RT-LAMP 可视化检测方法建立[J].中国人兽共患病学报,2011,27(1):19-28.