

文章编号:1673-1689(2005)04-0073-03

pH 值对牛初乳中胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)分离纯化的影响

田晓艳

(辽宁石油化工大学 石化分院, 辽宁 抚顺 113001)

摘要: 通过搅拌式超滤器对牛初乳中的 IGF-1 超滤粗提, 制备 IGF-1 的粗提物. 对超滤条件的研究发现, 在 pH 值为 8.0 碱性条件下的 IGF-1 回收率在 pH 值为 4.2 酸性条件下高. 将超滤后的粗提物分别用 SDS-PAGE 电泳检测, 来验证每步骤的提纯效果. 再将浓缩后的 IGF-1 粗提物用葡聚糖 G-200 柱层析进一步分离纯化, 得到 IGF-1 纯品. 每一步骤的 IGF-1 质量浓度利用放射免疫测定法(RIA)测定.

关键词: 牛初乳; 胰岛素样生长因子-1; 提取和纯化; 超滤

中图分类号: Q 503

文献标识码: A

Influence of Different pH on the Purification of Insulin-Like Growth Factor-1(IGF-1) from Bovine Colostrums

TIAN Xiao-yan

(Petrochemical Engineering Institute, Liaoning Petrochemical Engineering University, Fushun 113001, China)

Abstract: The primitive IGF-1 from colostrums was obtained by ultrafiltration, and a higher yields could be obtained at pH 8.0 other than pH 4.2. The rude IGF-1 after ultrafiltration was tested by SDS-PAGE, and the pure IGF-1 was obtained Chromatography with a Sephadex G-200 column. IGF-1 density in each process was assayed through Radio Immuniton Assay(RIA).

Key words: colostrum; insulin-like growth factor-1; separation and purification; diafiltration

胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是一种由 70 个氨基酸残基组成的蛋白质, 相对分子质量为 7 649, 等电点 pI 约为 8.2, 其结构与胰岛素原(Proinsulin)相似, 具有类似于胰岛素样的生物合成代谢功能, 一方面提高组织摄取葡萄糖的能力, 另一方面抑制肝糖原的分解并促进肝糖原及肌糖原的合成. IGF-1 又是生长激素的介质, 具有促进生长的作用, 促进 DNA 的合成和表达, 促进细胞生长和分裂. 值得强调的是, IGF-1 是现在已经发现的仅有的几个能够刺激 DNA 和 RNA 的修复和生长的物质. 经研究发

现, IGF-1 可用于多种疾病的治疗, 如 1,2 型糖尿病, 生长激素受体缺乏病, 肾功能衰竭, 心脏病, 周围神经病变, 骨质疏松等. 另外, 口服 IGF-1 牛初乳浓缩液, 可以提高运动员的爆发力和耐受力, 增强运动员的体质. 近年来, 由于胰岛素样生长因子-1(IGF-1)应用在动物和医学研究的需求量极高, 但目前 IGF-1 价格昂贵且制备方法繁琐不一. 本实验目的在简化操作流程, 从牛初乳中快速抽取此生长因子, 以供进一步研究. 另外, 也是从牛初乳中提取免疫球蛋白等生物大分子活性物质后的剩余乳

收稿日期: 2004-09-30; 修回日期: 2004-11-10.

作者简介: 田晓艳(1971-)女, 辽宁沈阳人, 助教, 硕士.

清的回收再利用,进而提高牛初乳的利用价值。

见图2、图3。

1 材料和方法

1.1 牛初乳

由阜新森氏乳业和沈阳市东陵区奶牛养殖户提供,产仔母牛第1 d到第7 d所产牛初乳。

1.2 实验方法

1.2.1 IGF-1 粗提物制备 利用搅拌式超滤器对脱脂牛初乳分别在酸碱条件下进行超滤粗提。

1.2.2 IGF-1 纯品制备 粗制品用葡聚糖 G-200 柱层析,分步收集,最后经超滤膜浓缩和冷冻干燥即得纯品。

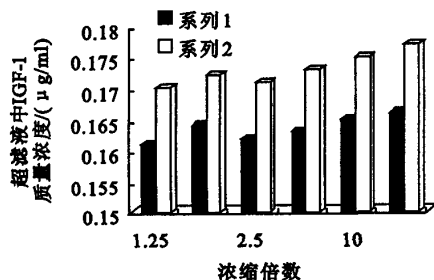
1.2.3 不同组分相对分子质量测定 SDS-PAGE 电泳法。

1.2.4 IGF-1 质量浓度及活性测定 放射免疫测定法(RIA)。

2 结果与讨论

2.1 不同 pH 值对 IGF-1 粗提物提取的影响

pH 值对 IGF-1 粗提物提取的影响见图 1。



系列1, pH4.2 时超滤液中 IGF-1 质量浓度($\mu\text{g/mL}$); 系列2, pH8.0 时超滤液中 IGF-1 浓度($\mu\text{g/mL}$)

图1 初乳乳清 1000 膜超滤过程中不同 pH 值不同浓缩倍数超滤液中 IGF-1 浓度

Fig. 1 IGF-1 concentration in colostrums ultrafiltration at different concentration fold and pH

从图1可见,在碱性条件下,IGF-1 的通透性加大,IGF-1 的质量浓度比在酸性条件下高。这可能是当 pH 值 >7 时,乳清蛋白质获得了净的负电荷,使分子间的静电斥力增加,蛋白质间的凝聚作用消失,透过率有较大的增加,Fane 和 Riml 等报道,BSA 等大分子蛋白质在此 PH 值时,于膜表面形成通透性较好的沉淀浓缩极化层,相对于 pH 值 <7 时,排斥力减弱,流速和透过率均相应增加。

2.2 不同 pH 值条件下超滤过程中各步骤乳清电泳

不同 pH 值条件下超滤过程中各步骤乳清电泳

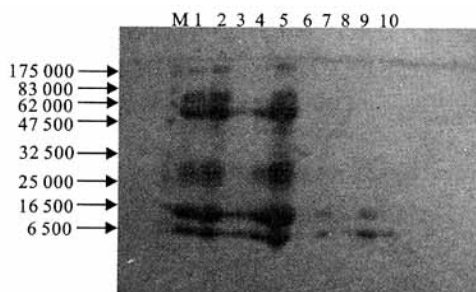


图2 pH4.2 时超滤过程中各步骤乳清电泳结果

Fig. 2 SDS-PAGE of colostrum during ultrafiltration at pH 4.2

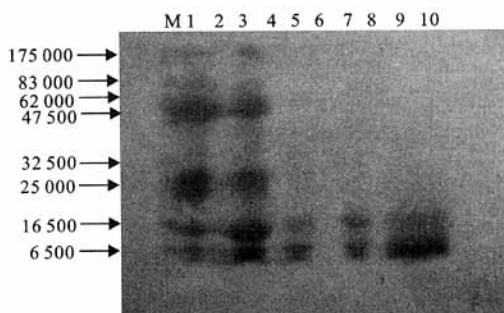


图3 pH 值 8.0 时超滤过程中各步骤乳清电泳结果

Fig. 3 SDS-PAGE of colostrum during ultrafiltration at pH 8.0

标准蛋白依次为:175 000; 83 000; 62 000;47 500; 32 500;25 000; 16 500; 6 500)

样品分别为 30 000 上液; 30 000 下液; 10 000 上液; 10 000 下液; 5 000 上液; 5 000 下液; 3 000 上液; 3 000 下液; 500 上液; 500 上液 (离心)

(其中:30 000 下液; 10 000 下液; 5 000 上液; 5 000 下液; 3 000 下液 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min, 浓缩

从图中可以看出,在碱性 pH 值 8.0 条件下得到的各超滤液电泳条带更清晰,分离效果更理想。特别是在 7 000 条带处,进一步分离出另一条电泳条带,分离层次更好。从图中还可以看出,50 000 膜下液,30 000,5 000 膜上液是一致的。说明在 50 000 膜这一步骤就达到了分离效果,但 50 000 超滤液中还含有大量的 IGF-1,为了提高回收率,进一步对 50 000 膜下液用 5 000 膜进行浓缩。另外,300 000 膜,100 000 膜上液也是一致的,理论上可以直接用 100 000 膜进行超滤,但实际操作过程中,由于 300 000 膜上液很粘稠,含有比较大的蛋白质分子,同时,100 000 膜孔小,乳清中蛋白质含量相对高,超滤速度很慢,也极易发生膜污染现象。从提高生产率角度来说,先用 300 000 膜,再用 100 000 膜,超滤速度快,膜的使用寿命也相应提高。

2.3 葡聚糖 G-200 柱层析对 IGF-1 的纯化

分别对图 4 中的第 33 洗脱峰到第 41 洗脱峰,图 5 中的第 30 洗脱峰到第 41 洗脱峰进行 IGF-1 的放射免疫活性检测,得到 IGF-1 的质量浓度值列表如下.

表 1 Sephadex G-200 分离的 pH 值 4.2 条件下 5 000 膜浓缩液各收集分液管 IGF-1 质量浓度

Tab.1 IGF-1 consistency of different collection fractions of liquid by Sephadex G-200

分液管数	浓度 (ng/mL)
33	4 500
34	5 200
35	6 600
36	8 000
37	7 200
38	4 000
39	1 800
40	100
41	5

图 4 可以看出,IGF-1 在酸性条件下超滤得到的 5 KD 膜浓缩液经过葡聚糖 G-200 分离后,分离不完全.从表 1 中可以看出,第 36 分液管的 IGF-1 达到最高值,为 8 000 ng/mL,处于第一个分离峰处.

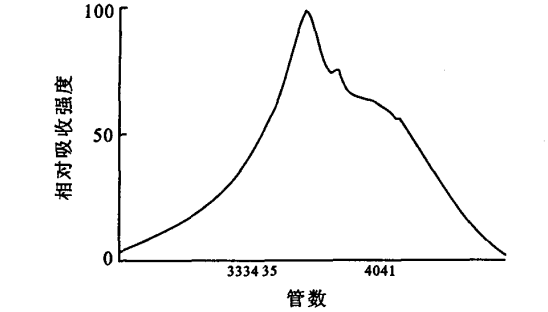


图 4 Sephadex G-200 分离的 pH 值 4.2 条件下的 5 000 膜浓缩液层析图

Fig. 4 Elution profiles of liquid by Sephadex G-200

由图 5 可以看出,IGF-1 在碱性条件下超滤得

到的 5 KD 膜浓缩液经过葡聚糖 G-200 分离后,分离完全.从表 2 中可以看出,第 36 分液管的 IGF-1 浓度达到最高值,为 9 800 ng/mL,处于第二个分离峰处.

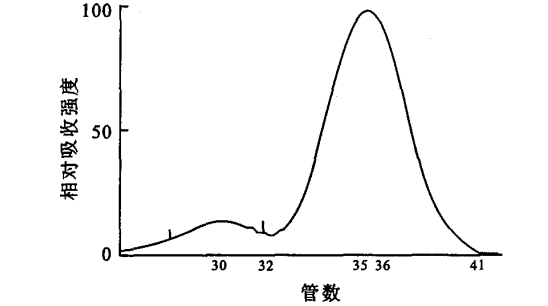


图 5 Sephadex G-200 分离的 pH 值 8.0 条件下的 5 000膜浓缩液层析图

Fig. 5 Elution profiles of liquid by Sephadex G-200

表 2 Sephadex G-200 分离的 pH 值 8.0 的 5 000 膜浓缩液各收集分液管 IGF-1 浓度

Tab.2 IGF-1 consistency of different collection fractions of liquid by Sephadex G-200

分液管数	浓度 (ng/mL)
30	510
31	750
32	825
35	7 050
36	9 800
37	9 000
38	5 550
39	2 100
41	10

3 结 论

脱脂牛初乳在 pH 值为 8.0 条件下超滤,经过 300 000,100 000,50 000,5 000 膜后,收集膜上液,再利用葡聚糖 G-200 柱层析纯化可得 IGF-1 纯品.在最高峰处可得 9 800 ng/mL 的 IGF-1.

(下转第 80 页)

3 结 论

食醋在体外抗氧化体系——DPPH 自由基体系、还原力、酚质量分数、羟自由基和超氧阴离子自由基体系中的抗氧化性研究表明:食醋(酿造醋)提取物在这些体系中均具有抗氧化性。食醋 DPPH 自由基清除活性、还原力与酚质量分数相关,羟自由

基清除活性和超氧阴离子自由基清除活性与酚质量分数相关性较小。将食醋提取物(醇沉上清液)用 Sephadex G25 分离成 4 个不同相对分子质量组分,除低相对分子质量组分 HF4 外,各分离组分在所选定的抗氧化体系中均具有抗氧化活性。HF4 对超氧阴离子自由基有促进作用,推测其中含有不适用于该方法检测的化合物,具体原因尚待研究。

参考文献:

- [1] 徐清萍,敖宗华,陶文沂. 食醋功能研究进展(上)[J]. 中国调味品,2003,298(12):11—12,42.
- [2] 徐清萍,敖宗华,陶文沂. 食醋功能研究进展(下)[J]. 中国调味品,2004,299(1):19—23.
- [3] 徐清萍,敖宗华,陶文沂. 恒顺香醋 DPPH 自由基清除活性[J]. 中国调味品,2004,305(7):19—23.
- [4] Ock-sook Yi, Anne S. Neyer, *et al.* Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system[J]. *JAACS*, 1997, 74(10):1301—1307.
- [5] Francisco J. Morales, Salvio Jiménez-Pérez. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence[J]. *Food Chemistry*, 2001, 72(1):119—125.
- [6] Yokozawa T, Dong E, Natagawa T, *et al.* In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(6):2143—2150.
- [7] Shelley M Klein, Gerald Cohen, Arthur I Cederbaum. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(21):6006—6012.
- [8] Singh R P, Chidambara K N Murthy, Jayaprakasha G K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(1):81—86.
- [9] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *Eur J Biochem*, 1974, 47(1):469—474.
- [10] 廖展如, 陈文学, 艾常春, 等. 邻苯三酚自氧化法适于测定 SOD 活性吗? [J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2003, 37(1):59—64.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 75 页)

参考文献:

- [1] 白秀英,李平风. 甲状旁腺素, IGF-1 可加速成骨样细胞 ROS17/2.8 增殖周期的进程[J]. 细胞生物学杂志. 1999, 21(2):75—78.
- [2] 许光武,俞茂华,叶红英. 小剂量牛初乳短链胰岛素样生长因子-1 可改善糖尿病大鼠周围神经病变[J]. 中华内分泌代谢杂志. 2000, 16(4):231—234.
- [3] B A M, Shooter G K. Insulin-like growth factor 1 and its binding proteins: a study of the binding interface using b-domain analogues[J]. *Biochemistry*, 1999, 38, 15863—15870.
- [4] Pfeifle B, Maier V, Ditschuneit H. Insulin-like growth factor 1/somatomedin-C: a rapid isolation procedure with FPLC [J]. *Preparative Biochemistry*, 1985, 15(5), 291—307.
- [5] Bang P, Ahlsen M, Berg U, *et al.* Carlsson-Skwirut C. Free insulin-like growth factor-1: Are we hunting a ghost[J]. *Horm Res*, 2001, 55:84—93.

(责任编辑:杨萌)