文章编号：1009－038X(2003)04－0037－04

鸡蛋清中卵转铁蛋白的分离提取

杨严俊， 张亚辉
（江南大学 食品学院，江苏 无锡 214036）

摘 要：采用固定化金属螯合亲和色谱法(IMAC)，从蛋清中分离和提取卵转铁蛋白(OVT)．结果表明，采用均质处理蛋清液并结合硅藻土过滤澄清的预处理方法，去除了蛋清中的粘蛋白等一些影响柱分离的杂质蛋白，减轻了色谱柱的污染，延长了柱的使用寿命，从而降低了生产成本．SDS-PAGE 电泳分析显示，分离提取的 OVT 纯度达到 96%，远高于商品 OVT；电喷雾质谱分析显示，OVT 的相对分子质量为 76 500．

关键词：固定化金属螯合亲和色谱；转铁蛋白；分离
中图分类号：TS 253.4 **文献标识码**：A

Isolation of Ovotransferrin from Egg White

YANG Yan-jun， ZHANG Ya-hui
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: OVT was isolated from egg white by immobilized metal affitiny chromatography. The results showed the fouling of column was reduced and the life of column was increased after egg white was pretreated by homogenization and filtration, and the cost of isolation was reduced correspandingly. SDS-PAGE analysis showed the purity of OVT is 96%, which is much higher than that of commercial product. The relative molecular weight of OVT was determined as 76 500 by ESI Mass Spectrometry.

Key words: immobilized metal affitiny chromatography; Ovotransferrin; isolation

蛋白中主要含有卵粘蛋白、卵转铁蛋白、类卵粘蛋白、卵白蛋白、溶菌酶和卵球蛋白等蛋白质成分，其中的卵转铁蛋白(OVT)是一种易溶的非结晶白蛋白，又称为副卵白蛋白或卵伴白蛋白．这种蛋白质的相对分子质量约为 76 000，与血清转铁蛋白相似．OVT 与金属形成复合物后，其复合体分子的结构变得非常稳定．

Schade 和 Caroline 首次报道了 OVT 对大肠杆菌等的抑制作用与血清中的转铁蛋白相同[1,2]．Valenti 等人的实验证实卵转铁蛋白的抗菌性在数量和质量上与人类的乳铁蛋白(LF)相似[3]，而抗病毒的性能甚至优于乳铁蛋白和血清转铁蛋白[4]．在新生豚鼠由细菌诱发的感染实验中，也证实了这些蛋白质具有相似的保护作用，从而引出了营养性免疫力的概念．卵转铁蛋白对于提高机体免疫功能、增强抗病防病的能力、防治贫血等都具有非常重要的意义．母乳喂养的新生儿对肠道细菌的抵抗能力比用非母乳喂养的新生儿强，这是因为某种程度上

收稿日期：2002－12－05； 修回日期：2003－01－07．
作者简介：杨严俊(1965－)，男，江苏武进人，副教授，博士．
万方数据

母乳中含有较多的乳铁蛋白.而卵转铁蛋白与乳铁蛋白在结构和生物活性上相似,并且临床实验证明,婴儿服用后,并无异源蛋白常有的过敏等不良反应[4,5].因此 OVT 作为一种良好的免疫功能因子或生物医药产品,其应用前景十分广阔.

蛋清中虽含有大量的卵转铁蛋白,但 OVT 分离的研究进展却相对较慢,以往有关 OVT 的分离提取都是采用盐沉淀法或离子交换法[6,7],但这些方法都存在种种缺点.本实验采用 J. Porath[8] 发明的固定化金属螯合亲和色谱(IMAC)的新方法,分离纯化蛋清中的转铁蛋白,并对影响其分离的因素进行了研究.采用此方法并结合超滤技术可在分离 OVT 的同时得到溶菌酶、蛋白粉等副产品,可大大提高鸡蛋综合利用的广度和深度.

1 材料与方法

1.1 材 料

新鲜鸡蛋:购自于无锡市场;Chelating Sepharose Fast Flow:Pharmacia 公司生产;OVT 标样:Sigma 公司生产;均质机:上海东华高压匀浆泵厂制造;质谱仪:Waters 公司制造.

1.2 实验方法

1.2.1 蛋清预处理方法 新鲜的蛋清经 30 MPa 均质后,用生理盐水稀释 6 倍,均匀搅拌 30 min,以 3 000 r/min 离心 20 min,上清液经硅藻土过滤后备用.蛋清对照液采用 AL-Mashikhi 的方法制备[9].

1.2.2 固定化金属螯合亲和色谱柱的制备 取 Chelating Sepharose Fast Flow 约 20 mL,装入色谱柱中(20 cm×1.6 cm),采用 0.05 mol/L $CuCl_2$ 溶液上柱,使 1/2 至 2/3 体积的柱床为载 Cu^{2+} 树脂,然后先用 5 倍柱床体积的超纯水去除未吸附的 Cu^{2+},再用至少 2 倍柱床体积的起始缓冲液(0.05 mol/L HAc-Tris/0.5 mol/L NaCl pH 8.2)洗柱,待用.

1.2.3 卵转铁蛋白的分离 蛋清经预处理后上柱,用起始缓冲液洗脱,体积流速为 1 mL/min,收集洗脱液(5 mL/管),于 280 nm 测定每管的吸光度值.当洗脱液的吸光度值小于 0.1 时,开始梯度洗脱.再洗脱至吸光度值小于 0.1 时,换用 0.1 mol/L 的咪唑溶液洗脱,直至吸光度值小于 0.1.最后洗脱完毕后分别用体积分数为 20% 乙醇、EDTA、H_2O 清洗,并用起始缓冲液平衡,再重复上样.

1.2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳 将分离得到的洗脱液透析除盐并浓缩后,采用 SDS-PAGE 电泳法分析浓缩样品,电泳分离胶质量分数为 10%,采用考马斯亮蓝 R250 染色.

1.2.5 OVT 的定性鉴定 采用电喷雾(ESI)质谱法对 OVT 进行相对分子质量测定,其测定参数为:毛细管电压 3.66 V,一级椎孔电压 60 V,离子源温度 120 ℃,脱溶剂气体温度 250 ℃,光电倍增器 650 V,检测质量范围 200~2 500.

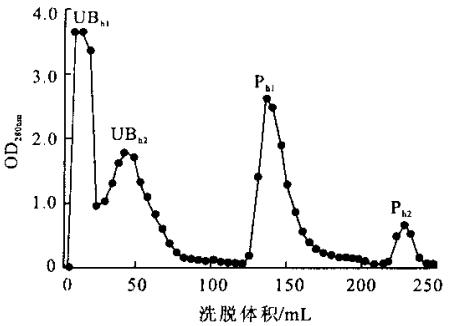
2 结果与讨论

2.1 蛋清预处理方法的影响

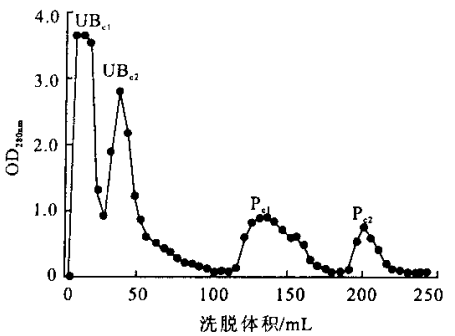
蛋清中含有大量的浓厚蛋白,而它又主要是由卵粘蛋白和类粘蛋白构成的一种呈纤维状的胶状物质,粘度很大.其中卵粘蛋白因为不溶于水且粘度较大,因此在柱分离时会造成堵塞及污染.所以,必须首先对蛋清进行必要的预处理以消除卵粘蛋白对 OVT 分离提取造成的影响.考虑到蛋清本身很粘,所以降低粘度是首要的步骤.一般可采用高速分散、均质、超声波等,本实验采用最适合工业化的技术——均质法,这样既降低了料液粘度,又可解决 OVT 与其他蛋白相互作用结合的问题.实验结果显示,蛋清先均质后离心,只有极少量蛋白质发生沉淀被离心下来.均质处理后的蛋清液,在与蛋清对照液的蛋白含量相同的情况下上柱,均质蛋清液中的梯度洗脱组分 P_{h1}(即 OVT 组分峰)的峰面积高于蛋清对照液中的 P_{c1} 梯度洗脱组分(分别见图 1a,b),说明前者分离得到的 OVT 的量较高.比较两者的洗脱峰的形状可看出,由前者分离得到的组分峰形窄且较为对称,说明分离较好且组分的纯度也较高.SDS-PAGE 电泳分析结果也显示,前者的 OVT 纯度要高于后者,分别为 96% 和 81%(见图 2).另外两者的 UB 峰的成分也不尽相同.

从 SDS-PAGE 图谱中可以看出,均质蛋清液的 UB_h 峰中,只含有极少量的转铁蛋白,在蛋清对照液的 UB_c 峰中,还有相当多的 OVT 存在(见图 2);而蛋清对照液的咪唑洗脱峰(见图 1b 中的 P_{c2})中也含有较多的 OVT.这与 AL-Mashikhi 的实验结果完全吻合[9],说明对照蛋清液中存在较多结合状态的转铁蛋白.均质蛋清液在咪唑洗脱时得到的组分峰(图 1a 中的 P_{h2})中 OVT 含量则很少,这是因为蛋清经过均质后,破坏了其复合结构,从而提高了转铁蛋白的得率及纯度.另外由于均质处理还降低了蛋清液的粘度,从而使 IMAC 柱的洗脱更为流畅,每阶段的洗脱都较易进行,清洗也较为彻底,大大降低了柱的污染程度,延长了柱的使用寿命.这些都充分说明了,均质预处理方法可有效地提高转铁蛋白的分离效率.

万方数据



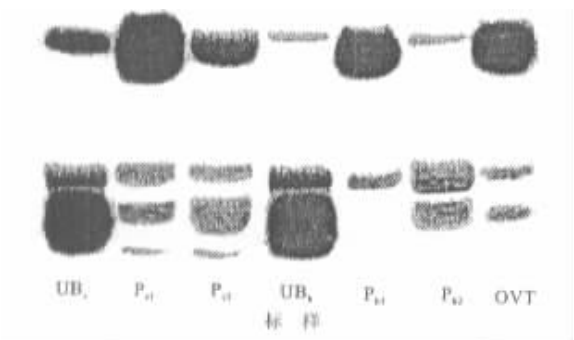
a. 均质蛋清液



b. 对照液

图 1　蛋清液的 OVT 洗脱图谱

Fig. 1　Chromatogram of untreated egg white



UB_c 组分为 Ub_{c1} 和 Ub_{c2} 的合并组分

图 2　蛋清 IMAC 色谱分离各组分的电泳图谱

Fig. 2　SDS-PAGE pattern of the fractions in egg white isolated by IMAC

2.2　洗脱方式的影响

固定化金属螯合亲和色谱通常采用 pH 连续梯度洗脱方法，但 AL-Mashikhi 是分步洗脱法，即先用 pH 8.2 的缓冲液洗脱 ，再用 pH 4.0 的缓冲液洗脱，最后用 0.1 mol/L 咪唑洗脱. 本实验针对均质处理的蛋清液的特点，先用 pH 8.2～4.0 的缓冲液梯度洗脱，最后再用 0.1 mol/L 咪唑洗脱. 梯度洗脱法的优点是分离效率高，适宜于复杂组分的分离，而且可减少分离峰的拖尾现象，避免由于 pH 值的突变而造成对柱的损坏.

比较图 1a，b 可以看出，由于对蛋清进行了预处理，在采用梯度洗脱后，就可把绝大部分的 OVT 洗脱下来，而且含量较高. 所以分离时只需收集此部分组分即可，操作也更为简单，避免了采用 AL-Mashikhi 方法中需收集咪唑分离组分的麻烦[9]. 另外，在实验中还可观察到，蛋清参照液的转铁蛋白分离组分为无色，而与此对照的是均质蛋清液的转铁蛋白分离组分带有明显的铁锈红色，说明蛋清经均质处理后分离得到的 OVT 的含量更高，这与 SDS-PAGE 电泳分析结果相吻合(见图 2).

2.3　柱容量的测定

从图 3 看出，当均质处理的蛋清液上样量为 60 mL 时，$UB_{60\text{-}1}$、$UB_{60\text{-}2}$ 组分中都已经含有较多的 OVT，即此上样量已超过了 IMAC 柱的柱容量，使得部分的 OVT 不能与 Cu^{2+} 螯合而直接被洗脱下来. 上样量为 30 mL 时，从 SDS-PAGE 中看出，$UB_{30\text{-}1}$ 中 OVT 含量极少，只有在梯度洗脱时才有部分被洗脱下来($UB_{30\text{-}2}$). 这也说明，当采用均质处理的蛋清液时，IMAC 柱(共有 20 mL 凝胶)的最大容量约为 30 mL，若以蛋清中含质量分数为 1% 的 OVT 计，则相当于每毫升 15 mg OVT 凝胶，此值低于用纯 OVT 样品测得的柱含量[9]. 同时注意到，不管上样量是否超过柱容量，梯度洗脱时都能得到高纯度的 OVT. 由此可得出结论：上样量的多少对 OVT 的洗脱纯度影响不大，但对其回收率的影响较大；上样量过大，可造成不必要的浪费.

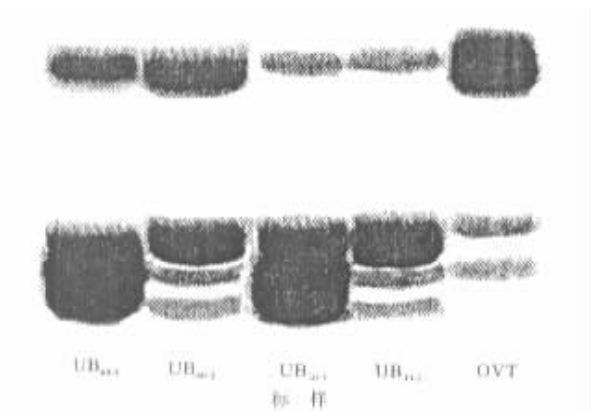


图 3　不同上样量各分离组分的电泳图谱

Fig. 3　SDS-PAGE pattern of the fractions with different loading

2.4　OVT 的电喷雾质谱定性分析

色谱分离得到的 OVT 的相对分子质量采用电喷雾质谱法测定. 从质谱图中可看出，OVT 的纯度非常高，基本上只有一个质谱峰(见图 4)，其相对分子质量为 76 500，与文献中报道的相对分子质量

万方数据

70 000～80 000 或 76 000 完全吻合[9].

3 结 论

采用均质处理蛋清液结合硅藻土过滤澄清的预处理方法,直接用固定化金属螯合亲和色谱柱从蛋清液中分离提取卵转铁蛋白,实验结果表明,经预处理后,可以去除粘蛋白等一些影响柱分离的不溶性杂质,避免柱堵塞和柱污染,延长色谱柱的使用寿命,降低了生产成本,使得卵转铁蛋白的分离向实用化迈进了一大步.

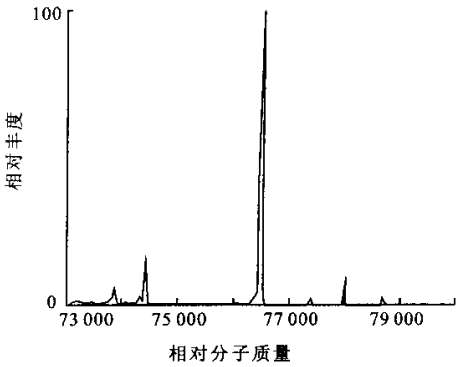


图 4 OVT 组分的质谱图

Fig. 4 ESI^+ MS spectrum of OVT fraction

参考文献:

[1] Schade A L, Caroline L. Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of Shigella dysenteriae, Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae[J]. **Science**, 1944, 100:14－16.

[2] Schade A L, Caroline L. An iron-binding component in human blood plasma[J]. **Science**, 1946, 104 :340－342.

[3] Valenti P, Antonin G, Von Hunolstein C, *et al*. Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin[J]. **Int J Tiss Reac**, 1983, 5(1):97－105.

[4] Giansanti F, Rossi P, Massucci M T, *et al*. Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin[J]. **Biochem Cell Biol**, 2002, 80(1):125－130.

[5] Del Giacco G S, Leone A L, Ferlazzo A. Total IgE in newborns treated prophylactically with conalbumin[J]. **Int J Tiss Reac**, 1985, 7 (6):535－537.

[6] Phillips J L, Azari P. On the structure of ovotransferrin, isolation and characterization of the cynogen bromide fragment and evidence for a duplicate structure[J]. **Biochemistry**, 1971, 10 (7) :1160－1165.

[7] Antonini E. **美国专利**:4029711,1977.

[8] Porath J, Carlsson J, Olesson I. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation[J]. **Nature**, 1975, 258 (5536):598－599.

[9] Al-Mashikhi S A, Nakai S. Seperation of ovotransferrin from egg white by immobilized metal affinity chromatography[J]. **Agric Biol Chem**, 1987, 51(11):2881－2887.

(责任编辑 杨 勇)

万方数据