

半夏总蛋白提取及其动态变化研究

冯瑞娟, 陈文铎, 董淼, 徐涛*

浙江理工大学 生物工程研究所, 浙江 杭州 310018

摘要: 目的 优选出半夏总蛋白提取的最适方法并研究不同生长时期总蛋白量及成分的变化, 为半夏药用成分的监控及合理采收提供科学依据。方法 采用丙酮沉淀法、95% (NH₄)₂SO₄ 盐析法、TCA-丙酮法和 Tris-饱和酚法提取半夏总蛋白, 筛选半夏总蛋白提取的最佳方法。分别于半夏出芽期、全苗期、珠芽期、佛焰苞期及倒苗期采集样品, 分为新鲜组和干燥处理组, 提取样品总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳检测及 Bradford 浓度测定。结果 丙酮沉淀法、95% (NH₄)₂SO₄ 盐析法、TCA-丙酮法和 Tris-饱和酚法提取的半夏总蛋白量分别为 0.369、0.678、1.082、0.493 mg/mL; 新鲜半夏 5 个不同生长时期总蛋白量占块茎的质量分数分别为出芽期 4.53 mg/g、全苗期 2.28 mg/g、珠芽期 2.79 mg/g、佛焰苞期 7.61 mg/g、倒苗期 10.21 mg/g; 干燥半夏 5 个不同生长时期总蛋白量占块茎的质量分数分别为出芽期 31.85 mg/g、全苗期 18.52 mg/g、珠芽期 42.08 mg/g、佛焰苞期 28.56 mg/g、倒苗期 56.84 mg/g; 新鲜半夏块茎中蛋白含有 15 条蛋白带, 干燥处理半夏块茎中蛋白含有 5 条蛋白带。结论 TCA-丙酮法是半夏总蛋白提取的最佳方法, 不同生长时期的半夏块茎中蛋白成分各异, 倒苗期总蛋白量最高。

关键词: 半夏; 总蛋白; 丙酮沉淀法; 盐析法; TCA-丙酮法; Tris-饱和酚法

中图分类号: R282.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1174-04

Extraction of total protein in tubers of *Pinellia ternata* and its dynamic change

FENG Rui-juan, CHEN Wen-duo, DONG Miao, XU Tao

Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

Abstract: Objective To select the best method for extracting total protein from the tubers of *Pinellia ternata*, study the dynamic change of total protein and components in different growing periods, and provide the information for medicinal ingredients monitoring and reasonable harvesting. **Methods** Four methods, acetone precipitation, 95% (NH₄)₂SO₄ salting, TCA-acetone, and Tris-saturated phenol methods, were used to extract the total protein from the tubers of *P. ternata* and optimize the extraction method. Samples were collected at different growing stages: bud stage, seedling stage, bulbil stage, spathe stage, and maturation stage, and divided into two groups, dry and fresh. Total protein was extracted, detected by SDS-PAGE electrophoresis, and determined by Bradford. **Results** The concentration of pinellia total protein extracted by acetone precipitation, 95% (NH₄)₂SO₄ salting, TCA-acetone, and Tris-saturated phenol methods was 0.369, 0.678, 1.082, and 0.493 mg/mL, respectively. The mass fractions of the total protein in fresh pinellia tuber were 4.53 mg/g at bud stage, 2.28 mg/g at seedling stage, 2.79 mg/g at bulbil stage, 7.61 mg/g at spathe stage, and 10.21 mg/g at maturation stage. However, the mass fractions of the total protein in dry pinellia tuber were 31.85, 42.08, 28.56, and 56.84 mg/g at the corresponding stages above. Fifteen protein bands were found in fresh pinellia tuber while five in dry pinellia tuber. **Conclusion** TCA-acetone precipitation is the most suitable method for total protein extraction from the tubers of *P. ternata*. Total protein components and content in pinellia tuber change in different growing periods.

Key words: tubers of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; total protein; acetone precipitation method; salting method; TCA-acetone precipitation method; Tris-saturated phenol method

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎, 是一种常用中药材, 入药首载于《神农本草经》, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效。半夏化学成分主要有半夏蛋

收稿日期: 2011-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772712)

作者简介: 冯瑞娟 (1986—), 女, 河南许昌人, 硕士, 研究方向为天然药物生物技术。Tel: 13588300460 E-mail: fruijuan05@yahoo.com.cn

*通讯作者 徐涛 Tel: 13957125871 E-mail: pkuxt@yahoo.com.cn

白、生物碱、甾醇类、多糖、氨基酸、挥发油、有机酸类、黄酮类、鞣质及微量元素等^[1-3]。研究表明半夏具有抗生育、抗肿瘤、抗心律失常、抗溃疡等作用^[4-5]。其中,半夏蛋白(pinellin)是一种植物凝集素,能与甘露糖专一性结合,其相对分子质量为 4.4×10^4 ,由4个约 1.1×10^4 的亚基组成,研究表明半夏蛋白常有单体、二聚体和四聚体共存的形式^[6],具有明显的生物活性,是半夏抗肿瘤和抗生育等药理作用的主要有效成分^[7]。传统提取半夏总蛋白的方法是硫酸铵分段盐析法,该法提取的蛋白电泳条带少,结果不理想,目前国内外对不同生长时期的半夏块茎总蛋白提取和成分动态变化的研究较少。本研究通过比较几种方法提取半夏总蛋白的效果,优选出最佳提取方法,并研究半夏在不同生长时期的总蛋白量和成分的动态变化,为半夏药用成分的监控及合理采收提供数据。

1 材料与试剂

1.1 材料

常规种植半夏块茎 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 采自山东菏泽,由本所徐涛副教授鉴定。于3月份种植于浙江理工大学苗圃。

1.2 试剂

丙酮、硫酸铵、KCl、NaCl、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、过硫酸铵(APS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、甲醇、二硫苏糖醇、甘油、四甲基乙二胺(TEMED)、乙酸铵、溴酚蓝、*N,N*-甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、甘氨酸购于生工生物工程(上海)有限公司;三氯醋酸(TCA)、CHAPS购于上海前尘生物科技有限公司;Tris-饱和酚购于上海沪宇生物科技有限公司;浓盐酸购于浙江理工大学;蛋白Marker购于Fermentas公司;脲素、冰乙酸、Bradford蛋白测定试剂盒、考马斯亮蓝R-250购于北京索莱宝科技有限公司;化学药品均为分析纯。

2 方法

2.1 半夏总蛋白提取方法

2.1.1 丙酮沉淀法^[8] 将样品研磨至粉末,加5倍体积PBS缓冲液,浸泡24h,然后4℃、12 000 r/min离心20min,取上清加入2倍体积4℃丙酮,沉淀用PBS溶解,溶液在4℃下对PBS透析48h,离心除去沉淀,上清液-20℃保存。

2.1.2 95% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析法^[9] 将样品研磨至粉末,加5倍体积PBS浸泡24h,然后4℃、12 000 r/min离心20min,取上清,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使饱和

度至95%,加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 过程中要匀速搅拌。4℃盐析过夜,4℃、12 000 r/min离心20min,将沉淀用PBS溶解,溶液在4℃下对PBS透析至透析液中检测不到 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,4℃、12 000 r/min离心20min,取上清,-20℃保存。

2.1.3 TCA-丙酮法^[9-11] 将样品研磨至粉末,加入样品体积5倍的提取液(含10%TCA和0.07%的 β -巯基乙醇的丙酮),-20℃静置过夜。然后4℃、12 000 r/min,离心35min,弃上清。5倍体积预冷的0.07% β -巯基乙醇的丙酮溶液清洗沉淀,摇匀后-20℃静置1h。然后4℃、12 000 r/min离心35min,弃上清。同法将沉淀清洗3次,于4℃挥干,即得到所需干粉。蛋白干粉加入4倍体积的裂解液(8 mol/L脲素、4%CHAPS和1%DTT)涡旋,静置30min。直至蛋白干粉充分溶解,4℃、12 000 r/min离心35min,取上清即可。临时保存在4℃备用。

2.1.4 Tris-饱和酚法^[12] 将样品研磨至粉末,加入5倍体积的PBS,摇匀,静置1h,4℃、12 000 r/min离心30min,取上清。加入等体积的Tris-饱和酚,涡旋10min,静置1h,13℃、12 000 r/min离心5min,收集酚相。加入3倍体积0.1% mol/L乙酸铵-甲醇溶液,混匀,-20℃过夜,4℃、12 000 r/min离心30min,收集沉淀,加3倍体积乙酸铵-甲醇溶液混匀,静置30min,4℃、12 000 r/min离心30min,收集沉淀。预冷丙酮洗3次,每次静置30min,沉淀于4℃挥干。干粉加入4倍体积的裂解液(8 mol/L脲素、4%CHAPS和1%DTT),涡旋,静置30min,直至干粉完全溶解,4℃、12 000 r/min离心35min,取上清。

取12等份半夏粉末,采用4种方法提取半夏总蛋白,总蛋白溶液定容至同一体积。试验重复3次。

2.2 半夏总蛋白浓度的测定

采用Bradford蛋白质量浓度测定法^[13]。

2.3 半夏不同生长时期总蛋白动态变化研究

3月下旬播种半夏,分别于半夏生长出芽期、全苗期、珠芽期、佛焰苞期及倒苗期采集样品,样品分为2组,其中一组为新鲜样品,一组干燥处理。各个时期新鲜样品各取1.1g;各个时期干燥处理组样品各取0.2g。采用TCA-丙酮法提取各时期半夏样品总蛋白(新鲜样品加液氮后充分研磨),新鲜样品组蛋白溶液定容至2mL,干燥处理组样品定容至3mL。

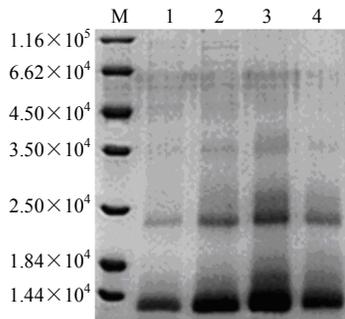
采用15%SDS-PAGE凝胶检测^[14]及Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定样品浓度。

3 结果与分析

3.1 半夏总蛋白提取方法优选

4 种不同方法提取半夏总蛋白的 15% SDS-PAGE 电泳结果见图 1。4 种方法提取半夏总蛋白 15% SDS-PAGE 电泳行为, 蛋白条带主要出现在 1.2×10^4 、 2.4×10^4 、 3.5×10^4 处, 蛋白电泳行为没有很大差别。

采用 Bradford 蛋白测定试剂盒对 4 种方法提取的半夏总蛋白样品进行测定, 4 种方法提取的半夏总蛋白量为 TCA-丙酮法 (1.082 mg/mL) > 95% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析法 (0.678 mg/mL) > Tris-饱和酚法 (0.493 mg/mL) > 丙酮法 (0.369 mg/mL)。从蛋白电泳行为和蛋白质质量浓度两方面可知 TCA-丙酮法是最佳半夏总蛋白提取方法, 故半夏总蛋白的提取采用 TCA-丙酮法。



M-Marker 1-丙酮沉淀法 2-95% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析法 3-TCA-丙酮法 4-Tris-饱和酚法
M-Marker 1-acetone precipitation method 2-95% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ salting method 3-TCA-acetone method 4-Tris-saturated phenol method

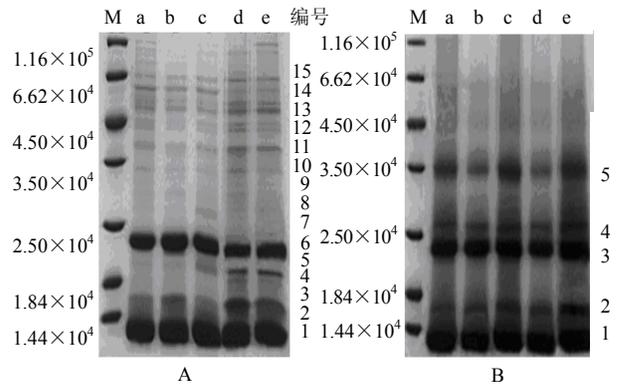
图 1 半夏总蛋白的 SDS-PAGE (15%) 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE (15%) electrophoresis of total protein in tubers of *P. ternata*

3.2 不同生长时期的半夏总蛋白动态分析

采集不同生长时期的半夏样品, 分别对新鲜和干燥处理样品提取总蛋白进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 结果见图 2 和表 1。

新鲜样品蛋白电泳结果如图 2-A 所示, 半夏总蛋白中有 15 条蛋白条带, 而不同时期不同蛋白成分的量有差异, 1 号条带表观相对分子质量为 1.2×10^4 , 4 号条带表观相对分子质量为 2.4×10^4 , 其量在半夏不同生长时期占总蛋白的比例均较高, 是半夏的主要蛋白成分; 2、3、6~9、10、12、14、15 号条带在佛焰苞期和倒苗期量相对其他时期占总蛋白比例较高, 这些蛋白在半夏佛焰苞期和倒苗期积



M-Marker 1-出芽期 2-全苗期 3-珠芽期 4-佛焰苞期 5-倒苗期
M-Marker 1-bud stage 2-seedling stage 3-bulbil stage
4-spathe stage 5-maturation stage

图 2 不同生长时期新鲜 (A) 与干燥 (B) 处理样品总蛋白 15% SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE (15%) electrophoresis of total protein in fresh (A) and dry (B) tubers of *P. ternata* at different growing stages

表 1 不同生长时期半夏总蛋白测定结果

Table 1 Determination of total protein in tubers of *P. ternata* at different growing stages

生长时期	总蛋白 / $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$		总蛋白质量分数 / $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	
	新鲜半夏	干燥半夏	新鲜半夏	干燥半夏
出芽期	1.766	2.230	4.53	31.85
全苗期	1.504	1.852	2.28	18.52
珠芽期	1.633	2.805	2.79	42.08
佛焰苞期	2.916	1.904	7.61	28.56
倒苗期	4.762	3.979	10.21	56.84

累相对较高, 7 号蛋白条带表观相对分子质量为 4.4×10^4 , 但推测和表观相对分子质量为 2.4×10^4 的 4 号条带一样, 原因可能是在变性胶 SDS-PAGE 凝胶上样处理过程中, 凝集素二聚体和四聚体解聚, 电泳应只能检测到凝集素单体; 13 号蛋白条带在出芽期、全苗期及珠芽期量在总蛋白中的比例相对其他时期高; 15 号蛋白条带存在于出芽期和倒苗期, 且倒苗期时较出芽期时高。新鲜半夏不同生长时期中, 块茎中总蛋白量变化表现为倒苗期 > 佛焰苞期 > 出芽期 > 珠芽期 > 全苗期。

干燥处理样品蛋白结果如图 2-B 所示, 干燥处理后相对分子质量大的蛋白成分消失, 总蛋白中只有 5 条蛋白条带, 其中表观相对分子质量为 1.2×10^4 的 1 号条带和 2.4×10^4 的 3 号条带在总蛋白中所占的比例仍是最高, 干燥处理后的样品中出现表观相对分子质量在 2.5×10^4 附近的 4 号条带和 $3.5 \times$

10^4 的5号条带,相对于新鲜样品减少了10条蛋白条带。

干燥处理半夏不同生长时期中,块茎中总蛋白量变化表现为倒苗期>珠芽期>出芽期>佛焰苞期>全苗期。

4 讨论

本实验采用丙酮沉淀法、95% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析法、TCA-丙酮法和 Tris-饱和酚法研究筛选半夏总蛋白提取的最佳方法。SDS-PAGE 凝胶结果显示,4种方法提取的蛋白条带基本一样,且可知相对分子质量 1.2×10^4 和 2.4×10^4 的蛋白是块茎中的主要蛋白;但因半夏是真核生物,总蛋白条带却很少,推测是在干燥处理过程中量少、相对分子质量大的蛋白发生降解,对热不稳定,在变性胶电泳处理过程中蛋白质也因发生变性而降解,而 1.2×10^4 、 2.4×10^4 、 3.5×10^4 对热稳定,变性处理时也相对稳定。

采集半夏不同生长时期的样品,提取半夏总蛋白,因不同生长时期新鲜样品的含水量不同,故比较新鲜样品中总蛋白量差异不足以说明半夏不同生长时期总蛋白的动态变化规律,可作为半夏总蛋白动态变化研究的参考。故实验设置了干燥处理组,以排除水分对块茎中总蛋白所占比例的影响。

SDS-PAGE 凝胶检测和质量浓度测定结果显示,新鲜块茎总蛋白成分和量都发生了变化。不同蛋白成分在不同生长时期的量不同,不同时期采收的半夏其半夏蛋白成分的量也有一定差异,需要在炮制时加以注意。干燥处理后在 3.5×10^4 和 2.5×10^4 附近出现了2条新鲜样品中没有的蛋白条带。在新鲜和干燥处理的样品中相对分子质量为 1.2×10^4 和 2.4×10^4 的量最高,说明这2种蛋白相对较稳定,是半夏的主要蛋白,干燥处理样品中的 3.5×10^4 和 2.5×10^4 附近出现的蛋白也相对较稳定。新鲜和干燥处理后总蛋白成分的差异可能是干燥导致半夏块茎中相对分子质量大蛋白分解产生的。

不同采收期半夏块茎干燥至恒定质量后进行测定,结果显示块茎中总蛋白量变化为倒苗期>珠芽期>出芽期>佛焰苞期>全苗期。倒苗期是蛋白积累最多的时期,无论新鲜和干燥样品中,倒苗期块

茎中总蛋白量都是最高的。结果表明,半夏不同生长时期总蛋白成分发生了一定变化,同一蛋白成分在不同的生长时期其量有差异,新鲜和干燥处理样品中蛋白量和种类也有一定差异。

参考文献

- [1] Ge X Y, Wu H. Phytochemical properties and quality evaluation methods of *Pinellia ternata* [J]. *China Pharm*, 2009, 18(9): 3-5.
- [2] 申浩, 吴卫, 侯凯, 等. 川半夏种茎大小对产量和质量的影响 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 788-792.
- [3] 丁伟, 张立红, 潘晟昊, 等. 水半夏组培快繁体系的建立 [J]. *中草药*, 2011, 42(3): 585-588.
- [4] 李斌, 程秀民, 周永妍, 等. 半夏的研究进展 [J]. *中国民族民间医药*, 2010, 19(1): 47-48.
- [5] 王志强, 李炳超. 半夏药理作用研究进展 [J]. *山西医药杂志*, 2009, 38(1): 65-67.
- [6] 徐陶, 杜娟, 谢丽霞, 等. 半夏蛋白及其基因研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(10): 2557-2559.
- [7] You S B, Han Z X, Zhou X R. Progresses of the research on *Pinellia* protein [J]. *Sci-Tech Inform Develop Econom*, 2006, 16(16): 165-167.
- [8] Sun G X, Ding S S, Qian Y J. The extraction and chemical analysis of proteins from *Pinellia pedatisecta* and their inhibitory effects on the mouse sarcoma-180 [J]. *Acta Acad Med Shanghai*, 1992, 19(2): 17-20.
- [9] Damerval C, de Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seeding proteins [J]. *Electrophoresis*, 1986, 7(1): 52-54.
- [10] 毕胜男, 严铭铭, 邵帅, 等. 飞蓬植物蛋白质的提取与分析 [J]. *中国新药杂志*, 2009, 18(12): 1168-1170.
- [11] Wang M J, Ji K S. The study of protein extraction from *Buxus sinica* var. *parvifolia* leaves [J]. *Genomics Appl Biol*, 2009, 28(1): 105-108.
- [12] Wang W, Scali M, Vignani R, et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds [J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(14): 2369-2375.
- [13] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [14] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970(227): 680-685.