

• 药剂与工艺 •

中药牛骨髓中蛋白与多肽提取方法的比较研究

帕尔哈提·柔孜^{1,5}, 高彦华¹, 木合布力·阿布力孜³, 艾合米丁·外力^{1,5}, UCHKUN Ishimov J⁴, 阿衣吐逊·阿布都外力^{1,5}, 帕丽达·买买提^{2*}, 阿布力米提·伊力^{1*}

1. 中国科学院新疆理化技术研究所 新疆特有药用资源利用重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学护理学院, 新疆 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011
4. 乌兹别克斯坦科学院 生物有机化学研究所, 塔什干 100125
5. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 目的 研究中药牛骨髓中蛋白、多肽类成分的提取方法、结构信息及其抗菌活性, 提高药用价值。方法 采用 10 种提取和 3 种制备方法, 以蛋白含量、提取率、水解度、抗菌活性和相对分子量等为考察指标, 筛选牛骨髓蛋白与多肽的最佳提取和制备部位方法。结果 水、NaCl 溶液和 Tris-HCl 溶液提取法得到的蛋白综合指标较高, 其蛋白量分别为 (52.20±0.58)、(50.19±0.21)、(43.21±0.05) mg/mL, 抗菌活性的强弱与蛋白量高低有一定的关系; 电泳图谱显示, 牛骨髓蛋白样品具有 2 级谱带, 分别为蛋白谱带 (66 000) 与多肽谱带 (4 100~10 000); LC/MS 数据显示, 水提、0.5 mol/L NaCl 和 30% (NH₄)₂SO₄ 部位多肽相对分子量分别为 1 027.84~9 916.32、1 131.17~4 989.95、1 150.46~9 917.00, 与其电泳谱带基本吻合。结论 水提法操作较简单、快速、成本低, 适合于工业化生产; 采用 SDS-PAGE 和 LC/MS 对牛骨髓蛋白进行分析, 为构建其指纹图谱提供理论依据。

关键词: 牛骨髓; 蛋白; 多肽; 分离; 抗菌; 液质联用仪

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)15-3600-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.019

Comparative study of different extract methods for protein and peptides from Chinese medicine bovine bone marrow

PARHAT Rozi^{1, 5}, GAO Yan-hua¹, MOURBOUL Ablise³, AHMIDIN Wali^{1, 5}, UCHKUN Ishimov J³, AYITUXUN Abduwaili^{1, 5}, PALIDA Maimaiti², ABULIMITI Yili¹

1. State Key Laboratory Basis of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China
2. School of Nursing, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
4. A. S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent 100125, Uzbekistan
5. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Objective To study the extraction method, structure information, and antimicrobial activity of the protein and polypeptide components from Chinese medicine bovine bone marrow (BBM) for improvement of its medicinal value. **Methods** Ten kinds of

收稿日期: 2018-03-19

基金项目: 国家科技重大专项—重大新药创制—民族药新品种研发及其关键创新技术 (2017ZX09301045); 新疆医科大学与中国科学院新疆理化技术研究所技术服务项目 (20171010)

作者简介: 帕尔哈提·柔孜, 在读博士, 主要从事生物大分子化合物提取分离与活性筛选。E-mail: 2507444580@qq.com

*通信作者 阿布力米提·伊力, 研究员, 博士生导师, 主要从事天然药物生物大分子物质基础研究。E-mail: abu@ms.xjb.ac.cn
帕丽达·买买提, 副教授, 千人计划, 硕士生导师, 主要从事康复护理研究。E-mail: parida0331@126.com

extraction and three kinds of preparation methods were used to take the protein content, extraction rate, degree of hydrolysis, antimicrobial activity, and molecular weight as investigation index to screen optimal extraction ability and preparation parts of bovine bone marrow protein (BBMP) and polypeptide. **Results** The comprehensive evaluation index of protein extracted in water, NaCl, and Tris-HCl solutions was high, their contents were (52.20 ± 0.58) , (50.19 ± 0.21) , and (43.21 ± 0.05) mg/mL, respectively. The antimicrobial ability was related to protein content. The SDS-PAGE analysis showed that the proteins from BBM contained approximately secondary subunits which related to protein and peptide with molecular weight in the range of 66 000 and 4 100—10 000. The LC/MS data showed that the molecular weight of peptide extracted in water, 0.5 mol/L sodium chloride, and 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solutions were 1 027.84—9 916.32, 1 131.17—4 989.95, and 1 150.46—9 917.00, respectively, and the results were basically consistent with 1-DE electrophoresis bands. **Conclusion** Water extraction method is simple, and fast with relatively low cost, which is suitable for industrial production of BBMP. The SDS-PAGE and LC/MS method is adopted to analyze and provide a theoretical basis for construction of BBMP fingerprint.

Key words: bovine bone marrow; protein; polypeptide; isolation; antimicrobial; LC/MS

动物来源药材是中国传统药物中的重要组成部分^[1-2],除了虎、熊、犀牛、梅花鹿等珍稀野生动物的骨骼可作为名贵中药外,牦牛、骆驼、牛、羊、马等畜牧动物的骨质和骨髓在传统民族医药中也有广泛的药用记载^[3]。动物骨骼药效可能与所含有的骨胶原、磷脂质、软骨素等活性成分有关^[4]。骨髓中也含有丰富的蛋白质、矿物质(Ca、P、Fe、Zn、Cu等)及硫酸软骨素、卵磷脂等成分,药用价值高。牛骨髓在中医中主治精血亏损、虚劳羸瘦、消渴、吐衄、便血、崩漏带下等疾病^[5]。在民族药中骨科、皮肤科复方制剂制备中使用较多,起到消肿止痛、软肌松筋等作用^[6]。

瑞典、美国、丹麦、英国、日本等技术发达国家早已开始对畜禽骨和海洋鱼类骨骼产品的开发,主要的加工方法有将骨骼加工成骨泥、从骨骼中提取胶原蛋白、从动物软骨组织中提取硫酸软骨素等生物活性成分^[7-8]。国内也有以畜禽骨骼为原料制备的多肽或制成的促进骨折愈合的骨肽注射液,以及预防骨质疏松、治疗腰椎间盘突出症、关节炎、风湿、骨折等疾病的复方骨肽、骨肽片等药物陆续上市^[9-10],但骨髓相关的基础研究依然集中在骨髓移植和相关疾病的治疗方面^[10-12]。

我国拥有丰富的畜禽骨资源,但长期以来,因其食药功能成分和活性研究不足,除少数加热熬汤和制作骨胶外,一般加工成骨糊、骨粉等作为饲料添加剂,而在资源向“动物生化药物”转化利用方面研究较少。这些方法和应用忽视了骨骼的综合营养价值,造成了骨营养成分和资源的大量浪费,而且带来了环境污染。食药加工业通常使用全骨,未能将骨质和骨髓有效地分离,并且动物骨髓有效成分的针对性研究鲜见。

有研究报道^[13-14]显示牛骨胶原蛋白不同类型酶解液或膜分离后的部位分别对金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌及大肠杆菌等具有抑制活性。这些方法同样适用全骨,本课题组前期预试验采用4种试菌来筛选牛骨髓蛋白抗菌活性,结果对其中的2种试菌抑制活性较好。因此,对牛骨髓蛋白、多肽等生物大分子活性成分的研究对骨髓资源的开发利用具有重要意义。

牛骨髓长期在新疆地区民间许多秘方中使用,具有很好的疗效,但基础研究薄弱,有关牛骨髓蛋白系统有效地提取分离研究报道鲜见。因此,本实验以蛋白含量、提取率、抗菌活性和相对分子质量等为评价指标,采用水、NaCl、Tris-HCl、乙醇、醋酸、磷酸盐缓冲溶液等10种提取溶剂,并筛选的最佳方法基础上分离不同部位,进一步分离纯化,用2种试菌(大肠杆菌和白色念球菌)进行活性筛选,以SDS-PAGE和LC/MS测定相对分子质量。从而提高牛骨髓类产品附加值、开发新型骨蛋白产品资源,同时为民族药中生物大分子类化合物的物质基础和质量标准研究提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DF-10IS 集热式恒温加热磁力搅拌器,郑州长城工贸有限公司;165-8001 小型电泳仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;RE252A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;ME204 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Allegra TM25R Centrifuge 离心机,美国 Beckman Coulter 公司;FDU-2100 型冷冻干燥仪,北京泰亚赛福科技发展有限公司;酶标仪,美国 Bio-Tec 公司。

1.2 药材与试剂

牛骨髓购于新疆乌鲁木齐华凌牛羊屠宰场, 经中国科学院新疆生态与地理研究所阿布力米提·阿布都卡迪尔研究员鉴定为新疆褐牛 (Xinjiang brown cattle) 的骨髓。骨髓样品用冷水和温水冲洗 3~5 次, 剔除骨头碎片和肉后存于 -20 °C 使其硬化, 加 1:5 比例液氮粉碎成粉末, 存于 -40 °C, 备用。低范围蛋白质相对分子质量对照品 (protein marker), 批号 20171219, 相对分子质量标准 (66 000~4 100), 重庆科润生物医药研发有限公司; 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8、8.8)、10% SDS, 北京白鲨易生物科技有限公司; 大肠杆菌 (批号 ATCC10231)、白色念珠菌 (批号 ATCC11229), 中国医学细菌保藏管理中心; 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 牛骨髓蛋白的提取

分别称取 10 份牛骨髓粉末, 每份 100 g, 按以下 10 种方法进行提取 (步骤 1, 图 1)。

(A) 水提^[15-16]: 蒸馏水, 料液比 1:7, 提取温度 40 °C, 时间 3 h, 提取次数 3 次。

(B) 10% NaCl 提取^[17]: 料液比 1:5, 提取温度 45 °C, 时间 2 h, 提取次数 2 次。

(C) 75% 乙醇提取^[18-19]: 料液比 1:3, 提取温度 45 °C, 时间 2 h, 提取次数 3 次。

(D) 2% NaOH 提取^[20-21]: 料液比 1:3, 提取温度 50 °C, 时间 2 h, 提取次数 2 次。

(E) 2% KOH: 料液比 1:4, 提取温度 50 °C, 时间 2 h, 提取次数 2 次。

(F) 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 提取: 加 500 mL PBS 溶液 (50 mmol/L, pH 7.4), 震荡 (150 r/min, 1 h), 离心 (5 000 r/min, 10 min), 取上清液, pH 调至 4.6, 离心 (8 000 r/min, 15 min), 取上清液, 浓缩, 透析, 冷冻干燥。

(G) 生理盐水提取^[22]: 料液比 1:6, 提取温度 40 °C, 时间 3 h, 提取次数 3 次。

(H) 5% 醋酸提取^[23-24]: 料液比 1:8, 提取温度 50 °C, 时间 3 h, 提取次数 3 次, 合并滤液, 适当浓缩, 加丙酮 (1:3), 于低温下静置 8 h, 离心取沉淀层, 自然干燥。

(I) 牛骨髓脱脂粉 (石油醚脱脂) 加 50% 乙醇, 料液比 1:5, 提取温度 50 °C, 时间 3 h, 提取次数 3 次。

(J) Tris-HCl (1 mol/L, pH 8.4) 提取^[25]: 料液比 1:10, 提取温度 45 °C, 时间 4 h, 提取次数 3 次。

除了上述方法 F 和 H 以外, 其他实验均以加热回流提取, 过滤、合并滤液、脱脂、滤过、适当浓缩、透析后冷冻干燥制备。

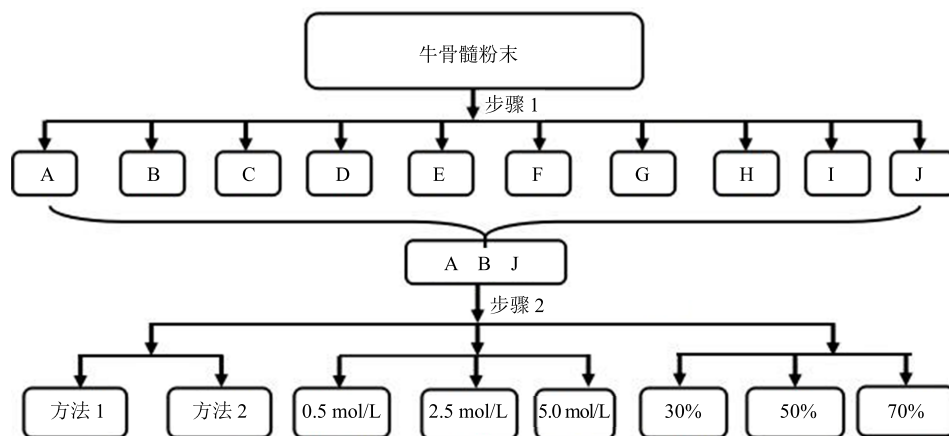


图 1 牛骨髓蛋白的提取方法

Fig. 1 Flow sheet for extract method of BBMP

2.2 牛骨髓不同蛋白部位的制备

从上述 10 种提取方法中, 以蛋白含量、提取率、抗菌活性、相对分子质量及水解度等为考察指标, 选出最佳 3 种方法, 即水提取、NaCl 提取、Tris-HCl 缓冲液提取, 并对其进行分离优化制备不同提取物 (步骤 2, 图 1), 制备方法如下: (a) 水提取: 分别

对牛骨髓原料经液氮粉碎 (方法 1) 和非液氮粉碎部分 (方法 2) 进行提取。 (b) NaCl 提取: 采用不同浓度 (0.5、2.5、5.0 mol/L) 的 NaCl 溶液对牛骨髓原料 (液氮粉碎) 进行提取。 (c) Tris-HCl 缓冲液提取: Tris-HCl 提取液用不同质量分数硫酸铵 (依次用 30%、50%、70%) 进行分级沉淀 (牛骨髓原

料使用液氮粉碎)。

2.3 蛋白的纯化

将牛骨髓水提蛋白用阴、阳离子交换柱色谱法进行分离纯化。牛骨髓水提蛋白经过透析脱盐后,取 150 mg 样品加水溶解,滤过(0.45 μm 微孔滤膜),清液过 DEAE-52 阴离子交换树脂,用 0.4 mol/L NaCl 溶液洗脱,体积流量为 0.5 mL/min,根据洗脱峰保留时间来收集组分(酸性多肽)。未出峰的部位(碱性多肽)^[26]适当浓缩、透析脱盐,同法制备,过 CM-650 阳离子交换树脂,体积流量为 0.5 mL/min,紫外检测波长为 280 nm,根据洗脱峰保留时间,合并收集组分、适当浓缩、透析、冷冻干燥制备粉末。

2.4 蛋白水解活力的测定

取牛骨髓水提蛋白样品 10 mg,用少量蒸馏水溶解、离心,取上清液用蒸馏水定容于 10 mL 量瓶中,加 1 mL 酶解液,蒸馏水为空白,采用 Folin-酚法测定牛骨髓蛋白水解活力^[27]。于 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中显色 20 min、pH 7.0,用紫外分光光度计于 660 nm 处测定吸光度。1 个酶活力单位以 1 g 固体酶粉每分钟水解酪素产生 1 μg 酪氨酸所需酶的量来表示。

2.5 蛋白含量测定

利用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定,根据 BCA 蛋白测定试剂盒说明书操作配制工作液,精确称取各蛋白样品 2.5 mg,加入 1 mL 蒸馏水溶解,用酶标仪于 562 nm 处测定吸光度,每个样品进行 3 组平行实验。

2.6 蛋白电泳操作

牛骨髓蛋白种类和相对分子质量分析按照参考文献方法并稍加修改后进行^[28]。浓缩胶质量分数为 15%,分离胶质量分数为 12%,胶厚 1.0 mm。称取骨髓蛋白样品 10 mg,加 1 mL 水溶解,离心,取上清液。蛋白样品按 $V(4\times\text{蛋白质上样缓冲液})-V(\text{蛋白质样品})4:1$,在沸水中煮沸 5 min,取 10 μL 上样。初始电压为 75 V 电泳,分离 0.5 h 后电压调到 150 V。电泳完毕后,固定(1~2 h),用考马斯亮蓝染色 G-250 进行染色(1.5~2 h),脱色(反复更换脱色液直到背景清晰为止),拍照。

2.7 抗菌活性检测

配制质量浓度为 50 mg/mL 的骨髓蛋白样品,利用孔穴法检测其抗菌活性,每孔加样品溶液 20 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱 30~60 min,使溶液完全被吸收,倒置培养皿 16~18 h,测量抑菌环的直径并

记录。菌种分别为 CA: 白色念球菌 ATCC10231, EC: 大肠杆菌 ATCC11229。抑菌圈直径 ≤ 7 mm,则认为样品无抑菌活性。

2.8 牛骨髓多肽相对分子质量测定

液质联用仪(安捷伦 6520B CHIP-Q-TOF),按照参考文献方法稍加修改后进行^[29-30]。正离子质谱(ESI/MS^+)条件:毛细管电压 65 V,干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$ 。锥孔电压 175 V,液质模式质量范围 m/z 300~3 000。色谱柱为 Agilent Zorbax 300 SB- C_{18} 柱(150 mm $\times$ 7.5 mm, 5 μm),流动相 A 为 0.1%甲酸+5%乙腈,流动相 B 为 90%甲酸+0.1%乙腈,梯度程序:0~3 min, 0~5% A; 3~13 min, 5%~80% A; 13~15 min, 80% A; 15~17 min, 80%~5% A。

2.9 统计分析

以上数据均进行 3 次平行测定,蛋白含量,提取率和抑菌圈等以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Excel 2007 和 Statistical 6.0 软件对所得数据进行统计分析。

3 结果与分析

3.1 牛骨髓蛋白提取效果比较分析

所选用的 10 种方法提取量和蛋白含量上差异较大,蛋白含量大小顺序为 $A>J>G>B$; 提取率大小顺序为 $H>J>A>B$; 对白色念球菌和大肠杆菌表现出较好抑制作用的提取方法分别是 J、G、B、A; 蛋白含量测定采用的 BCA 法主要以水溶性蛋白为主,溶解度越好蛋白含量越高。方法 H 所获取的蛋白虽然提取量高,但此法获取的蛋白溶解性不好,蛋白含量低,电泳分析未出现条带,因此,不宜采用和进一步分析。凯氏滴定法测定骨髓粗蛋白含量,每 100 克牛骨髓中有 2.5 g 粗蛋白,表 1 所列的提取率是各种方法所得的蛋白质量除以总蛋白质量而得。抗菌活性与蛋白含量高低有一定的关系。综上,较好的方法分别是 J、A、B,结果见表 1。

3.2 牛骨髓蛋白不同制备部位结果比较分析

按第 1 阶段选出的 3 种方法,配制不同质量浓度提取液筛选最佳制备部位骨髓液氮粉碎提取效果明显高于非液氮粉碎提取,是因为骨髓经液氮粉碎后组织破碎比较均匀,易于与水混合,蛋白质能够大量溶出,故蛋白含量较高,该法操作方便,适合于大量生产要求。NaCl 提取中,溶液中 NaCl 浓度越高蛋白含量越低;高浓度下提取后,需要脱盐透析处理,较麻烦,加大了实验成本^[31],其中 0.5 mol/L NaCl 溶液提取效果较好。硫酸铵沉淀中综合考虑试验条件、50%沉淀部位提取量、蛋白含量和抗菌活

性较好。蛋白含量高则抗菌活性强,这进一步表明抗菌活性与蛋白含量高低有一定的关系。综上,制备牛骨髓蛋白最适合的方法分别是水提(液氮粉碎)、氯化钠(0.5 mol/L)、硫酸铵沉淀(50%),结

果见表 2。

3.3 水解活力测定比较分析

从上述不同制备部位中选出的水、NaCl 和 Tris-HCl 提取等 3 种方法所得的蛋白进行水解活力测

表 1 10 种提取方法效果比较

Table 1 Comparison on 10 kinds of extraction methods

项目	方法	提取量/(mg·g ⁻¹)	蛋白量/(mg·mL ⁻¹)	提取率/%	抑菌圈直径/mm	
					CA	EC
A	水	17.1±0.2	52.20±0.58	68.43±0.06	8.07±0.06	9.11±0.11
B	10% NaCl	12.4±0.1	28.44±0.01	46.27±0.06	8.17±0.15	8.99±0.01
C	75%乙醇	3.3±0.1	13.64±0.01	13.17±0.15	—	—
D	2% NaOH	2.2±0.2	18.38±0.24	8.13±0.59	—	—
E	2% KOH	4.7±0.1	19.15±0.01	18.70±0.10	—	—
F	PBS	4.5±0.1	16.35±0.12	18.03±0.06	8.12±0.16	—
G	生理盐水	9.7±0.2	39.27±0.25	38.73±0.12	9.10±0.01	9.04±0.05
H	5%冰乙酸	22.0±0.1	1.81±0.02	88.19±0.10	—	—
I	50%乙醇	8.2±0.3	19.54±0.02	32.73±0.01	—	8.10±0.10
J	Tris-HCl	20.1±0.1	43.21±0.05	80.37±0.06	9.12±0.11	9.06±0.05

—未检出

—not detected

表 2 不同制备部位效果比较

Table 2 Comparison on preparation effect on different extract parts

项目	部位	提取量/(mg·g ⁻¹)	蛋白量/(mg·mL ⁻¹)	提取率/%	抑菌圈直径/mm	
					CA	EC
a	液氮粉碎	17.1±0.2	52.20±0.58	68.43±0.06	8.07±0.06	9.11±0.11
	原料	14.4±0.1	28.52±0.03	57.61±0.02	8.07±0.08	—
b	0.5 mol·L ⁻¹	10.4±0.2	50.19±0.21	41.57±0.11	9.12±0.03	9.13±0.05
	2.5 mol·L ⁻¹	6.9±0.2	46.26±0.08	27.56±0.06	8.05±0.15	—
	5.0 mol·L ⁻¹	12.3±0.1	26.41±0.03	49.32±0.10	8.11±0.10	9.15±0.03
c	30%	11.0±0.1	35.11±0.01	44.14±0.16	9.13±0.03	9.16±0.19
	50%	13.1±0.5	52.35±0.08	52.41±0.05	10.07±0.04	9.09±0.04
	70%	6.2±0.1	41.71±0.01	24.80±0.02	8.10±0.12	10.13±0.08

—未显示抑菌活性

—no antimicrobial activity

定,其中水提(液氮粉碎)、0.5 mol/L NaCl 和 Tris-HCl 提取+50%硫酸铵沉淀部位水解度好。NaCl 提取过程中随着盐浓度的增高水解度降低,一般随着水解度的增加,蛋白水解产物的溶解性增大、肽链变短、相对分子质量变小、蛋白含量明显提高,这需要下一步电泳和 LC/MS 数据来综合分析确定。

与吕雪鹏等^[32]采用木瓜、中性、风味蛋白酶加高压制备牛骨多肽,最佳条件(中性蛋白酶)下,水解度 14.29%和胡君景等^[33]采用中性蛋白酶+风味蛋白酶后水解度达到 63.6%相比,本实验上述 3

种最佳制备部位在不添加任何酶及不采用高级加工工艺优化条件下水解度均 40%以上,这表明骨髓原生蛋白溶解度良好,值得进一步开发利用。结果见表 3。

3.4 纯化效果比较分析

牛骨髓水提蛋白(液氮粉碎)用 DEAE-52 阴离子柱色谱法进行纯化,经 0.4 mol/L NaCl 溶液洗脱,收集了被树脂吸附的酸性多肽,其富集率与蛋白含量较高,对白色念球菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用;未被树脂所吸附的部分进一步用 CM-650 阳

表 3 水解度比较结果

Table 3 Comparison on hydrolysis degree

项目	部位	水解度/(U·mL ⁻¹)
a (水)	液氮粉碎	40.12±0.03
	未粉碎	21.73±0.02
b (氯化钠)	0.5 mol·L ⁻¹	44.84±0.04
	2.5 mol·L ⁻¹	34.66±0.05
	5.0 mol·L ⁻¹	23.51±0.01
c (Tris-HCl)	30%	27.33±0.02
	50%	40.22±0.03
	70%	31.50±0.06

表 4 阴阳离子纯化效果比较

Table 4 Comparison on purification effects

纯化步骤	富集率/%	蛋白量/(mg·mL ⁻¹)	抑菌圈直径/mm	
			CA	EC
DEAE-52	47.50±0.01	83.50±0.08	10.20±0.09	11.10±0.11
CM-650	29.80±0.02	69.90±0.10	9.10±0.12	8.30±0.03

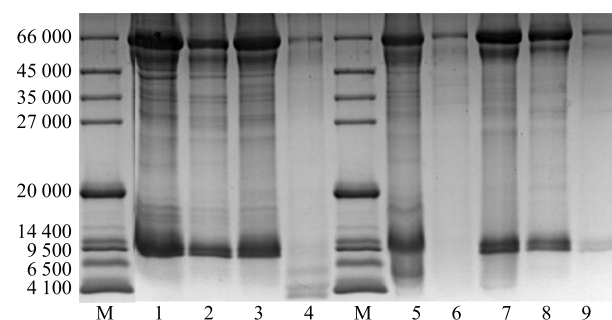
有机或缓冲溶液也能提取原生多肽。硫酸铵 50%和 70%部位蛋白谱带出现相同位置，可以合并使用。水提部位在 9 500~14 400、66 000 处出现谱带，条带较粗，显示蛋白含量高。0.5 mol/L NaCl 制备部位在 4 100~6 500 处出现的多肽谱带较清晰，又在 9 500~14 400 处、66 000 处出现多肽与蛋白谱带，说明该部位是制备多肽的有效方法之一。2.5 mol/L NaCl 部位只在 66 000 处出现蛋白谱带。5 mol/L NaCl 部位谱带显示在 9 500~14 400 处、66 000 处。50%乙醇提取部位谱带显示在 9 500 和 66 000 处；75%乙醇部位谱带与 50%乙醇部位相似，但谱带强度比较弱。综上，蛋白谱带数目和谱带强度与蛋白种类与含量有关系，用各种提取方法所得的蛋白均在 66 000 处有谱带，与牛血清白蛋白（相对分子质量为 66 000）谱带相近；多肽谱带显示在 4 100~10 000 处，需要进一步分离纯化测定其相对分子质量，结果见图 2。

对骨髓蛋白 2 种水提取蛋白及其酸碱分离部位与其余几种方法所得的蛋白进行 SDS-PAGE 分析，得出各样品蛋白相对分子质量同样分布在 4 100~66 000。水提（液氮粉碎）中，同时出现蛋白和多肽段谱带，水提（非液氮）中多肽谱带不太明显。DEAE-52 结合的酸性部位在 4 100~6 500 处出现多肽谱带。CM-650 结合的碱性多肽谱带在 6 500~14 400 处。另外，为了综合比较，NaOH 提取分为

离子交换柱色谱法纯化，收集碱性多肽，该多肽含量、提取率、抗菌作用等均低于酸性多肽。从蛋白含量和抗菌作用来比较，纯化后的含量与活性明显高于粗蛋白，这表明纯化能提高蛋白含量、强化抗菌活性，结果见表 4。

3.5 SDS-PAGE 分析

对不同提取方法所制备的蛋白进行了 SDS-PAGE 分析，各部位蛋白相对分子质量主要分布在 4 100~66 000，样品谱图位置按提取方法进行合理安排。Tris-HCl 提取+(NH₄)₂SO₄ 沉淀中，30%部位在 4 100 左右和 66 000 处出现多肽与蛋白谱带，显示一般用



M-低范围蛋白相对分子质量对照品 1-水提取部位 2-70%硫酸沉淀部位 3-50%硫酸铵沉淀部位 4-30%硫酸铵沉淀部位 5-0.5 mol·L⁻¹ NaCl 提取部位 6-2.5 mol·L⁻¹ NaCl 提取部位 7-5.0 mol·L⁻¹ NaCl 提取部位 8-50%乙醇提取部位 9-75%乙醇提取部位
M-protein marker, low range 66 000—4 100 1—water extract part 2—4 were 70%, 50%, 30% (NH₄)₂SO₄ precipitation parts 5—7 were 0.5, 2.5, 5.0 mol·L⁻¹ NaCl extract parts 8, 9 were 50%, 75% ethanol extract parts

图 2 各种方法提取的蛋白 SDS-PAGE 分析图谱

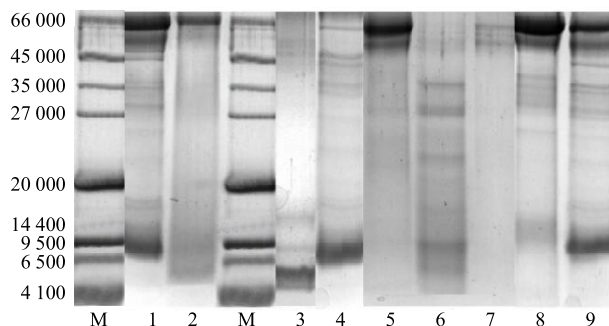
Fig. 2 SDS-PAGE analysis for BBMP from various extraction methods

2 个部位，其中 2.5% NaOH 提取部位谱带只在 66 000 处出现，未出现多肽谱带。5% NaOH 提取部位由于蛋白含量低，蛋白与多肽谱带均不清晰。5%醋酸提取中，因样品水溶性较差，谱带不清晰，此 2 种方法弃用。生理盐水提取方法所提的蛋白谱带较明显，且单一；PBS 提取部位中蛋白与多肽谱带同时出现，表明 PBS 缓冲溶液是多肽分离较好的溶剂之一，但

生理盐水和 PBS 提取后续实验需要透析等操作来脱盐处理,不宜使用。总之,水提(液氮粉碎)法获取的结果较为理想,DEAE-52 和 CM-650 能够有效地分离水提蛋白酸性多肽部位,可作为有效的分离纯化方法之一,结果见图 3。

3.6 3 种制备部位多肽的 LC/MS 图谱分析

多肽类成分在色谱柱上保留时间较短,出峰快,峰值低。水提部位(液氮)中主峰约含有 25 种多肽段,相对分子质量在 1 027.84~9 916.32^[34],电荷数最大为+9,对应相对分子质量为 4 947.51,电荷数最小为+3,对应相对分子质量为 2 757.38。0.5 mol/L NaCl 制备部位主峰约含有 33 种多肽段,其带电荷的数量较多,约占 87%,相对分子质量在 1 131.17~4 989.95,与电泳图所显示的谱带基本吻合,其中电荷数最大为+7,对应相对分子质量为 4 989.95,电荷数最小为+2,对应相对分子质量为 2 270.62。30%硫酸铵沉淀部位主峰约含有 30 种多肽段,相对分子质量在 1 150.46~9 917.00,与电泳谱带基本吻合。其中电荷数最大为+7,对应相对分子质量为 7 444.87,电荷数最小为 4,对应相对分子质量为 3 345.23。综上,水提部位电荷数最高(+9),0.5 mol/L NaCl 部位带电荷多肽段数量最多(87%),30%硫酸铵沉淀部位多肽相对分子质量范围较广(1 150.46~9 917.00),结果见图 4 及表 5。



M-低范围蛋白相对分子量对照品 1-水提蛋白(液氮) 2-水提蛋白(非液氮) 3-DEAE-52 结合部位 4-CM-650 结合部位 5-2.5% NaOH 提取部位 6-5.0% NaOH 提取部位 7-5.0%醋酸+丙酮沉淀部位 8-生理盐水提取部位 9-PBS 提取部位

M-protein marker, low range 66 000—4 100 1-water extract protein (Liquid nitrogen powder) 2-water extract protein (Non liquid nitrogen) 3-DEAE-52 binding part 4-CM-650 binding part 5, 6 were 2.5%, and 5.0% NaOH extract parts 7-precipitation part of 5.0% acetic acid + acetone 8-extract part of physiological saline 9-extract part of phosphate buffer saline

图 3 各制备部位的蛋白 SDS-PAGE 分析图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis for BBMP from various preparation parts

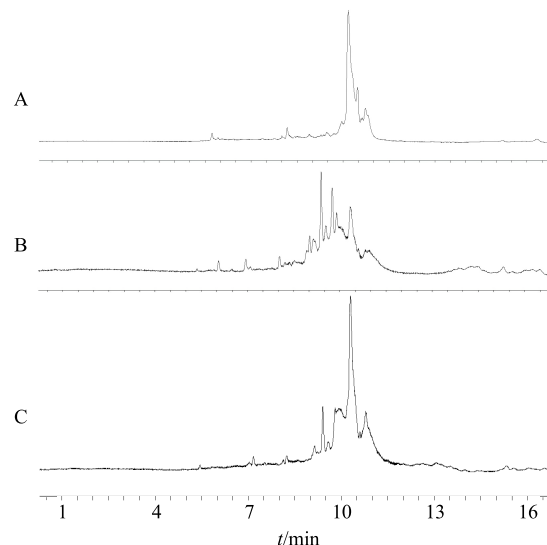


图 4 牛骨髓水提部位 (A)、牛骨髓 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 溶液提取部位 (B) 牛骨髓 30%硫酸铵沉淀部位 (C) 多肽 LC/MS 图谱

Fig. 4 LC-MS chart of peptides from BBM water extract (A), BBM extract by 0.5 mol·L⁻¹ NaCl (B), and BBM precipitation by 30% (NH₄)₂SO₄ (C)

4 讨论

一般动物的骨骼质量占动物体质量的 20%~30%,牛骨的质量约占体质量的 20.5%~25%,其中骨髓占鲜骨的 4%~7%,拥有丰富的鲜骨和骨髓资源。吕雪鹏等^[32]对牛骨多肽制备工艺进行探讨,选用 4 种不同酶提取多肽,多肽得率 69.76%,水解度 14.29%。邹兴建等^[35]通过正交试验优化猪骨天然提取物的高压蒸煮工艺,温度 130 °C,蛋白质和骨油提取率分别为 68.2%、83.3%。但以上方法均未将骨质和骨髓分开研究,也未对分离的蛋白与多肽进行电泳和相对分子质量分析,同时高温条件可能会破坏蛋白质和某些必需氨基酸结构特点,使其失去生物活性。本实验在未采用高温或酶解条件下,得到的蛋白与多肽提取率与上述文献报道结果相近(骨髓蛋白提取率为 68.34%),因此,可以初步推断出骨髓可能是一种富含优质蛋白的食品资源。

在骨髓蛋白生物活性研究中抗氧化、抗菌、降血压、提高机体免疫力等方面报道较多^[36-37]。陈阳述等^[38]研究胎牛骨髓多肽对小鼠和人 T 细胞功能的影响发现胎牛骨髓多肽在工作浓度 5.0~10 mg/mL 时,对人淋巴细胞表达的 mIL-2R 有促进作用。刘芳等^[39]报道采用中西医结合治疗再生障碍性贫血临床观察中发现以牛骨髓为主原料的复方药物对其具有显著的疗效。骨髓既是造血器官,也是重要的免

表 5 牛骨髓 3 种制备部位多肽段信息比较

Table 5 Comparison on polypeptide segment information from BBM 3 extract parts

样品名称	出峰时间/min	相对分子质量 (+电荷)
水提部位	5.471	1 138.72 (+5), 1 215.60 (+3), 4 947.51 (+9), 4 974.02 (+7), 4 972.02 (+5), 2 073.27
	5.930	4 598.11 (+8), 4 593.42 (+7), 4 596.64 (+6), 2 757.38 (+3)
	5.187~5.634	6 589.66, 7 487.97, 7 787.89, 9 916.32
	8.916	1 044.76, 1 145.22, 1 272.05, 1 422.01
	9.491	1 138.83, 1 035.77, 1 139.23
	10.476	7 599.06
	10.742	1 027.84, 1 116.46, 1 152.27
0.5 mol·L ⁻¹	5.343	4 989.95 (+7), 4 988.97 (+6)
NaCl 提	6.049	1 863.78 (+4), 1 533.28 (+3), 1 862.76 (+3), 1 977.13 (+4), 2 848.04 (+5), 2 846.99 (4)
取部位	6.941	2 815.02 (+6), 2 814.00 (+5), 2 813.00 (+4)
	7.101	3 266.62 (+6), 3 265.58 (+5), 3 263.55 (+4)
	8.037	3 412.81 (+6), 3 412.80 (+5), 3 411.761 (+4)
	9.006	1 130.17
	9.540	3 481.97 (+6), 3 481.95 (+5), 1 153.61, 2 460.71 (+2), 1 677.39
	9.754	3 796.45 (+6), 3 795.44 (+5), 3 794.41 (+4), 4 098.32 (+4)
	9.889	1 989.41 (+4), 3 976.76 (+7), 3 975.75 (+6), 3 974.74 (+5), 2 270.62 (+2), 2 867.24
30%硫酸铵	6.875	2 185.55 (+5), 2 034.32, 2 162.39
沉淀部位	9.676	3 795.90 (+6), 3 794.85 (+5), 1 222.837 6, 1 348.682 8
	10.090	3 628.58 (+5), 3 345.23 (+4), 7 447.87 (+7), 1 150.46, 1 222.72, 1 274.89, 6 798.28 (+5), 1 455.18,
	10.131~10.246	1 938.04, 2 391.84, 2 537.61, 2 700.01, 2 908.63
		5 319.18, 5 739.15, 6 250.25, 6 810.94, 7 331.92, 8 125.69, 8 559.38, 9 365.41, 9 629.16, 9 917.00

疫器官，一般骨髓分 2 种^[40]：红骨髓和黄骨髓。红骨髓能制造红细胞、血小板和各种白细胞，其中血小板有止血作用，白细胞能杀灭与抑制各种病原体，包括细菌、病毒等，某些淋巴细胞能产生抗体。因此，本实验以抗菌活性为考察指标，对各提取部位获取的蛋白进行抑菌活性筛选，蛋白含量较高部位均有抑菌作用，这表明抗菌作用与蛋白含量高低有一定的关系。后续实验需要增加活性评价指标，从而提高资源有效开发利用价值。

综上所述，对所选用的 10 种提取方法经综合评价得出，较为理想的提取溶剂分别是水、NaCl 和 Tris-HCl 缓冲溶液。各制备部位中水提（液氮），0.5 mol/L NaCl，50%硫酸铵沉淀部位蛋白含量、水解度和抗菌活性较好。SDS-PAGE 分析发现牛骨髓蛋白样品具有 2 级谱带，分别为蛋白谱带（66 000）与多肽谱带（4 100~10 000），这对建立牛骨髓蛋白与多肽指纹图谱模型提供依据。通过阴阳离子交换柱色谱法纯化能够提高牛骨髓水提蛋白的纯度、增强抗菌活性。LC/MS 分析的 3 种制备部位多肽相对

分子质量在 1 027.84~9 917.00，与 SDS-PAGE 谱带基本吻合。从提取条件、耗材等因素考虑，水提法最适合于工业化生产，具有一定的推广应用潜力。牛骨髓多肽部位仍需进一步分离纯化和筛选功能性短肽，鉴定并合成活性多肽单体对其应用开发具有重要现实意义。

志谢：本课题研究期间受到中国科学院中亚药物研发中心资助和支持。

参考文献

- [1] 徐莹, 陈晨, 沈玉萍, 等. 动物药鉴定的研究现状与对策探讨 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 578-581.
- [2] 李国华. 动物药鉴别研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 241-243.
- [3] 艾力阿吉·库尔班尼亚孜. 维吾尔医成药宝库 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民卫生出版社, 2009.
- [4] 安丽萍, 任广凯, 石力强, 等. 鹿骨多肽对地塞米松诱导的骨质疏松大鼠骨微结构的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4030-4034.
- [5] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.

- 术出版社, 2006.
- [6] 提力瓦地·吾麦尔, 阿里木江·吾斯曼, 古力巴尔·卡生木. 维吾尔医治疗 45 例膝关节骨性关节炎临床观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(4): 34.
- [7] Miller E J, Rhodes R K. Preparation and characterization of the different types of collagen [J]. *Meth Enzym*, 1982, 82: 33-64.
- [8] Maccari F, Galeotti F, Volpi N. Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 129: 143-147.
- [9] 黄咏红. 复方骨肽临床应用综述 [J]. 中医临床研究, 2012, 4(23): 119-120.
- [10] 磨红. 骨肽片治疗类风湿性关节炎的临床研究 [J]. 内科, 2012, 7(2): 122-123.
- [11] 李熙灿, 谢学明, 黄春花, 等. 龟板醇提物对大鼠骨髓间充质干细胞氧化损伤的修复及其抗脂质过氧化作用 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1043-1046.
- [12] Zakharova L A, Belevskaya R G, Mikhailova A A. Effect of bone marrow opioid peptides on antibody formation in the productive phase of the immune response [J]. *Bull Exper Biol Med*, 1986, 105(1): 63-66.
- [13] 张顺亮, 成晓瑜, 潘晓倩, 等. 牛骨胶原蛋白抗菌肽的制备及其抑菌活性 [J]. 肉类研究, 2012, 26(10): 5-8.
- [14] 张顺亮, 潘晓倩, 成晓瑜, 等. 牛骨胶原蛋白源抑菌肽的分离纯化及成分分析 [J]. 肉类研究, 2013, 27(11): 33-36.
- [15] 刘立新. 猪骨蛋白水提工艺的优化 [J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 220-222.
- [16] 董乐, 林变, 王力. 水提法提取鱼鳞胶原蛋白的研究 [J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2010, 25(5): 525-529.
- [17] 易建华, 朱振宝, 赵天殊. 盐提与膜分离偶联制备双低油菜籽蛋白 [J]. 食品科技, 2011, 36(5): 168-172.
- [18] 姜恒, 韩威, 刘彦华, 等. 热乙醇法提取猪血白蛋白工艺改良的探讨 [J]. 西南国防医药, 2011, 21(11): 1167-1169.
- [19] 赵华, 王虹, 任晶, 等. 响应面法提取玉米醇溶蛋白的工艺优化 [J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 38-40.
- [20] 胡云虎, 涂俊芳, 郝培应, 等. 氢氧化钠法提取虾壳蛋白最佳条件的研究 [J]. 生物学杂志, 2008, 25(5): 58-60.
- [21] 邱英华, 孙卫东, 王玉海, 等. 蚕蛹蛋白提取与脱臭工艺研究 [J]. 中国食品添加剂, 2012(3): 133-136.
- [22] 杜立群, 苗君, 郭继强, 等. 生理盐水提取柞蚕蛹蛋白及 SDS-PAGE 分析 [J]. 中国酿造, 2008 (20): 68-70.
- [23] 欧阳小艳, 孙武, 马超, 等. 冰乙酸提取玉米醇溶蛋白的工艺研究 [J]. 食品科技, 2015, 40(1): 263-267.
- [24] 刘克海, 董玲, 顾佳妮, 等. 胶原蛋白凝胶的制备及其中药物体外扩散性考察 [J]. 中国药房, 2011, 22(13): 1189-1191.
- [25] 李莹莹, 吴彩娥, 杨剑婷, 等. 白果蛋白质提取及 SDS-PAGE 分析 [J]. 食品科学, 2010, 31(22): 36-40.
- [26] Yili A, Aisa H A, Imamu X, et al. Isolation of biocidal peptides from anethum graveolens seeds [J]. *Chem Nat Comp*, 2006, 42(5): 588-591.
- [27] 袁耕瑾. 蛋白酶活力测定中福林试剂的配制及其测定原理 [J]. 上海调味品, 1986 (3): 16-18.
- [28] 梁梓强, 梁士可, 张梅, 等. 褐飞虱可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2015, 54(6): 27-30.
- [29] Gobbaa C D, Tompa G, Otte J. Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *arsuki bacterium ikkense* [J]. *Food Chem*, 2014, 165(15): 205-215.
- [30] van den Broek I, Niessen W M A, van Dongen W D. Bioanalytical LC-MS/MS of protein-based biopharmaceuticals [J]. *J Chromat B*, 2013, 929(7): 161-179.
- [31] 赵春颖, 王燕, 李云峰, 等. 正交试验法优选蚕茧中丝胶蛋白的提取工艺 [J]. 中药材, 2015, 38(5): 915-918.
- [32] 吕雪鹏, 张华江, 牟钰德, 等. 响应面法优化牛骨制备骨多肽工艺的研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 265-270.
- [33] 胡君景, 刘景圣, 张大力, 等. 复合酶分步酶解法提取牛骨胶原蛋白工艺的研究 [J]. 肉类研究, 2010(1): 34-36.
- [34] Rozi P, Muhammad P, Ishimov, U Z, et al. Isolation and characterization of antimicrobial peptides from *bos taurus* bone marrow [J]. *Chem Nat Compd*, 2018, 54: 527-531.
- [35] 郇兴建, 胡序建, 冯立斌, 等. 制备猪骨天然提取物的高压蒸煮工艺优化 [J]. 食品科学, 2012, 33(8): 15-17.
- [36] 付刚, 李诚, 马长中, 等. 猪骨抗氧化肽的酶解制备研究 [J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 136-138.
- [37] 魏庭浩. 猪骨胶原多肽的制备及其血管紧张素转换酶抑制活性的研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2010.
- [38] 陈阳述, 余宙耀, 张海松, 等. 胎牛骨髓多肽对小鼠和人 T 细胞功能的影响 [J]. 上海免疫学杂志, 1998, 18(2): 119-120.
- [39] 刘芳, 董昌虎, 周智辉. 中西医结合治疗再生障碍性贫血不同骨髓免疫分型的临床观察 [J]. 现代中医药, 2011, 31(2): 30-31.
- [40] Shafat M S, Gnaneswaran B, Rushworth S A. The bone marrow microenvironment-home of the leukemic blasts [J]. *Blood Rev*, 2017, 31(5): 277-286.