



从猪心中提取纯化细胞色素 C 工艺研究

肖云

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430074)

摘要:以猪心为原料提取细胞色素 C,研究了不同的料液比、提取温度、pH、提取时间对提取效果的影响,结果表明:棕色素最佳提取条件为:料液比为 1:2,温度为 30℃,pH 为 4.0 条件下,提取 2h,,在此条件下提取率可达 2.98%。

关键词:细胞色素 C;猪心提纯;工艺研究

中图分类号: Q81

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2015) 01-0088-03

细胞色素 C 是呼吸链的一个重要组成成份。是一种含铁卟啉基团的蛋白质,在线粒体呼吸链上位于细胞色素 b 和细胞色素 aa₃ 之间,细胞色素 C 的作用是在生物氧化过程中传递电子的作用。细胞色素 C 溶液用于各种组织缺氧急救的辅助治疗,如一氧化碳中毒、催眠药中毒、氰化物中毒、新生儿窒息、严重休克期缺氧、脑血管意外、脑震荡后遗症、麻醉及肺部疾病引起的呼吸困难和各种心脏疾患引起的心肌缺氧的治疗^[1]。

一般来说,组织的细胞色素 C 含量与它们的呼吸活性大致成平行关系,在心肌与其他剧烈运动的肌肉中含量最为丰富,猪心便宜易得,故选用猪心为原料提取纯化细胞色素 C^[2,3]。

一、材料与方法

(一)材料

1.材料与试剂

新鲜猪心购自屠宰场, H₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, NaCl, 三氯醋酸溶液, 联二亚硫酸钠 (Na₂S₂O₄·2H₂O)均为分析纯;人造沸石(60~80 目)。

2.主要仪器

匀浆机;电动搅拌器;离心机;UV-3000 紫外可见分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司);层析柱(2.5×30cm);DFY 恒温水浴锅。

(二)试验方法

1.提取工艺^[4]

猪心 → 肌肉糜 → 提取液 → 吸附层析洗脱液 → 粗提液 → 沉淀细胞色素 C

2.最佳提取条件的选择

取新鲜或冰冻的猪心,除去脂肪和结缔组织,匀浆机绞为肌肉糜。取绞碎后的猪心肌肉糜,用蒸馏水浸提,料液比分别为 1:1、1:2、1:3、1:4,浸提温度分别为 25℃、30℃、35℃、和 40℃、浸提 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、浸提时间分别为 1h、2h、3h 和 4h,通过测定不同提取条件时对细胞色素 C 含量的影响,从而得到最佳提取条件。

3.细胞色素 C 含量测定

所得制品是还原型细胞色素 C 水溶液,在波长 520nm 处有最大吸收值,根据这一特性,用 722 型分光光度计,先作出一条标准细胞色素 C 浓度和对应的光密度值的标准曲线,然后根据测得的待测样品

收稿日期:2014-12-05

作者简介:肖云(1980-),女,湖北黄冈人,武汉职业技术学院生物工程学院讲师,研究方向:生物技术。

溶液的光密度值就可以由标准曲线的斜率求出待测样品的含量。

二、结果与分析

(一)最佳提取条件试验结果

1.料液比对提取效果的影响

分别称取 50g 取绞碎后的猪心肌肉糜,用蒸馏水浸提,分别加入蒸馏水为 50mL、100mL、150mL、200mL,在 pH 为 4.0 条件下,30℃浸提 2h,提取液采用人造沸石吸附,(NH₄)₂SO₄ 洗脱,三氯乙酸沉淀法纯化得到细胞色素 C 粗品。5mL 蒸馏水溶解细胞色素 C 粗品后,520nm 处测吸光值,考察料液比对提取效果的影响。试验结果如图 1 所示:

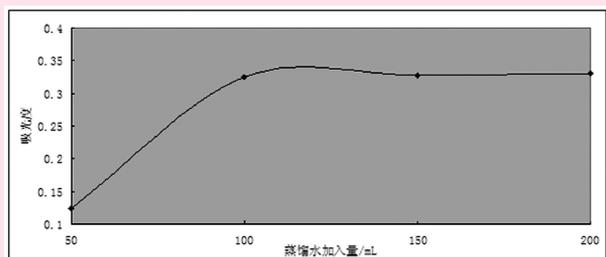


图 1 蒸馏水加入量对提取效果的影响

由图 1 结果可知,在料液比小于 2:1(100mL)时,随着加水量增大,吸光值增大;料液比大于 2:1(100mL)加水量的增大对吸光值无明显影响。而加水量增大会导致提取液体积增大,故选择料液比 2:1 为最佳提取条件。

2.浸提温度对提取效果的影响

分别称取 50g 取绞碎后的猪心肌肉糜,加入 100mL 蒸馏水,分别在 25℃、30℃、35℃、和 40℃条件下,pH 为 4.0,浸提 2h,提取液采用人造沸石吸附,(NH₄)₂SO₄ 洗脱,三氯乙酸沉淀法纯化得到细胞色素 C 粗品。5mL 蒸馏水溶解细胞色素 C 粗品后,520nm 处测吸光值,考察浸提温度对提取效果的影响。试验结果如图 2 所示:

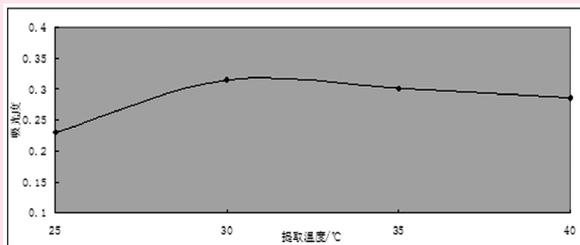


图 2 提取温度对提取效果的影响

由图 2 结果可知,在提取温度为 30℃时,吸光值最大;提取温度超过 30℃时吸光值反而减小。可能是提取温度高意向细胞色素 C 的生物活性,导致得率下降。故最佳提取温度为 30℃。

3.浸提 pH 对提取效果的影响

分别称取 50g 取绞碎后的猪心肌肉糜,加入 100mL 蒸馏水,温度为 30℃,由于细胞色素 C 在碱性条件下不温度,故选择提取 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0,浸提 2h,提取液采用人造沸石吸附,(NH₄)₂SO₄ 洗脱,三氯乙酸沉淀法纯化得到细胞色素 C 粗品。5mL 蒸馏水溶解细胞色素 C 粗品后,520nm 处测吸光值,考察 pH 对提取效果的影响。试验结果如图 3 所示:

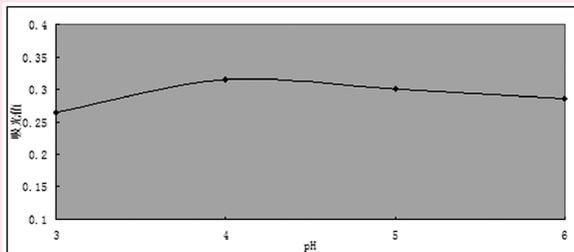


图 3 提取 pH 对提取效果的影响

由图 3 结果可知,在提取 pH 为 4.0 时,吸光值最大;提取 pH 超过 4.0 时吸光值反而减小。可能是提取 pH 升高后不利于细胞色素 C 的溶出,导致得率下降。故最佳提取 pH 为 4.0。

4.浸提时间对提取效果的影响

分别称取 50g 取绞碎后的猪心肌肉糜,加入 100mL 蒸馏水,温度为 30℃,pH 为 4.0,分别浸提 1h、2h、3h 和 4h,提取液采用人造沸石吸附,(NH₄)₂SO₄ 洗脱,三氯乙酸沉淀法纯化得到细胞色素 C 粗品。5mL 蒸馏水溶解细胞色素 C 粗品后,520nm 处测吸光值,考察浸提时间对提取效果的影响。试验结果如图 4 所示:

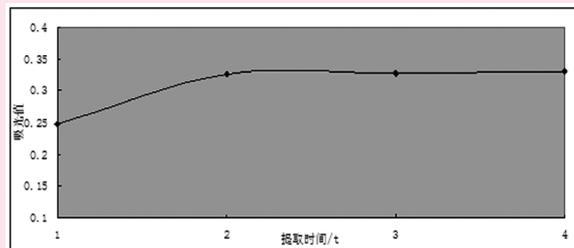


图 4 提取时间对提取效果的影响

由图 4 结果可知,在提取时间为 2h 以内时,随提取时间延长,吸光值增大;但当提取时间超过 2h 后,随提取时间增长,吸光值没有显著提高。故最佳时间为 2h。

(二)细胞色素 C 含量测定结果

1.细胞色素 C 标准曲线的制备

取 1 毫升标准品(80mg/ml),稀释至 25ml,从中分别取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml,分别置于五支试管中,每管补加蒸馏水至 4ml,并加少许联二亚硫酸钠作还原剂,然后在 520nm 处测得各管的光密度,分

别为 0.179, 0.330, 0.520, 0.700, 0.870。以浓度为横坐标, 光密度值为纵坐标, 作出标准曲线图。

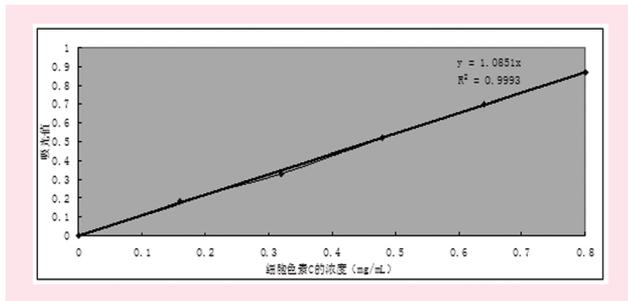


图5 细胞色素C标准曲线

2. 细胞色素C得率的测定

称取 50g 取绞碎后的猪心肌糜, 用 100mL 蒸馏水, 在 pH 为 4.0 条件下, 30℃ 浸提 2h, 提取液采用人造沸石吸附, (NH₄)₂SO₄ 洗脱, 三氯乙酸沉淀法纯化得到细胞色素 C 粗品。5mL 蒸馏水溶解细胞色素 C 粗品后, 520nm 处测吸光值为 0.325。故最终得率为: 2.98%。

三、结论

取除去脂肪和结缔组织的猪心, 匀浆后分别选取料液比分别为 1:1、1:2、1:3、1:4, 提取温度分别为

25℃、30℃、35℃、40℃、提取 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0, 提取时间分别为 1h、2h、3h 和 4h, 通过测定不同提取条件时对吸光度的影响, 研究表明细胞色素 C 的最佳提取条件为: 在 30℃, 料液比为 1:2 时, pH 为 4.0 时, 用蒸馏水提取 2h, 此条件下, 棕色素提取率达 2.98%。

细胞色素 C 是产值较高的生化药物, 可以猪心为原料进行提取分离, 可以达到提高经济效益的目的。

参考文献:

- [1] Kalbfuss B, Wolff M, Morenweiser R, et al. Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion exchange chromatography [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(5): 932-944.
- [2] 李宝珠, 赵丽哲, 宁晓玲. 猪心中细胞色素 C 分离提纯的研究 [J]. *中国生化药物杂志*, 1995, 16(5): 221-223.
- [3] 张坤镛. 细胞色素 C 生产工艺的改进 [J]. *中国生化药物杂志*, 1994, 15(1): 48-49.
- [4] 安帮涛, 徐英权, 卢元成, 等. 提取细胞色素 C 的研究 [J]. *生物技术*, 1991, 4(6): 16-19.

[责任编辑: 郭 群]

Study on the Extraction of Cytochrome C from Pig's Heart

XIAO Yun

(School of Biological Engineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract: In this research, we use a pig's heart as raw material to extract cytochrome C. The effects of solvents with different material and liquid ratio, extraction temperature, pH, extraction time on the extraction are studied. The results show the best extraction conditions are that the ratio of material to liquid is 1:2, temperature is 30℃, pH is 4.0, extraction time is 2h, under which the extraction rate can reach 2.98%.

Key words: Cytochrome C; extraction of pig's heart; study on the technique