

凝胶电泳法(SDS-PAGE)测定饲料添加剂溶菌酶二聚体的含量

张文刚¹ 张 妍¹ 孙冰清¹ 姜 芹¹ 顾 欣¹ 黄士新^{1*} 达列亚·阿合买提²

1.上海市兽药饲料检测所,上海 201103;2.新疆兽药饲料监察所,乌鲁木齐 830063

摘要 溶菌酶二聚体标准溶液在 0.1~1.0 mg/mL 范围内具有良好的线性,线性方程: $Y=1.99 \times 10^{-5}X-0.0708$, $R>0.99$ 。精密度试验结果显示,采用凝胶电泳法对饲料添加剂中溶菌酶二聚体的含量进行测定,其含量为 32.19%~34.91%,日内相对标准偏差为 1.35%~1.73%,日间相对标准偏差为 1.82%,结果表明 SDS-PAGE 方法测定溶菌酶二聚体具有试验操作简单、结果稳定可靠的特点,适用于饲料添加剂溶菌酶二聚体含量的测定。

关键词 饲料添加剂;溶菌酶二聚体;凝胶电泳法

溶菌酶二聚体是以鸡蛋清溶菌酶单体为原料,将单体溶菌酶聚合为溶菌酶二聚体,分子质量约为 28.8 ku。溶菌酶二聚体分子中 2 个相邻分子之间的结合方式为共价键结构,其不但保留了单体溶菌酶的酶活性,而且还产生了新的免疫活性。溶菌酶二聚体通过显著增强腹腔巨噬细胞的吞噬率及其吞噬指数,提高血液中中性细胞的吞噬率,从而提高断奶仔猪的非特异性免疫功能。这种特性可用于改善仔猪肠道发育,促进营养物质吸收,提高断奶仔猪增重。溶菌酶二聚体作为新型的饲料添加剂产品,其二聚体比例控制在大于总含量的 30%。目前,溶菌酶二聚体常用的检测方法有高效液相色谱法和电泳法,与液相方法相比,电泳法具有成本低、操作简单、重复性高等特点^[1-2]。

1 材料与方法

1.1 试剂

柠檬酸、柠檬酸三钠,均购自上海凌峰化学试剂有限公司;三氯乙酸,购自上海凌峰化学试剂有限公司;EDTA、氢氧化钠、丙酮,均购自上海凌峰化

学试剂有限公司;溶菌酶二聚体对照品,纯度 99.2%,溶菌酶二聚体饲料添加剂(批号为 0880、0881、0882、0883),由上海艾魁英生物科技有限公司提供;4-15%Resolving Gel 小型预制胶、10×Tris/Glycine/SDS 电泳缓冲液、Dual Color Marker,均购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;上样缓冲液(自制,4×Laemmli Sample Buffer,购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司); β -巯基乙醇,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液,购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器

离心机,德国 Eppendorf 公司;涡旋振荡仪,美国 Talboys 公司;BIO-RAD 电泳仪、BIO-RAD 成像系统,美国 BIO-RAD 公司;Mettler Toledo AL104 型电子天平,瑞士梅特勒公司。

1.3 试验方法

1)标准溶液及样品的制备。①标准溶液制备。精密称取溶菌酶二聚体标准品 10 mg,移取纯化水 1 mL 溶解制备成浓度为 10 mg/mL 的标准溶液,稀释至 2 mg/mL,备用。②样品制备。取 180 mg 样品

收稿日期:2021-02-23

基金项目:上海市科技兴农项目(2019-02-08-00-03-F01131)

* 通讯作者

张文刚,男,1979 年生,硕士,高级畜牧师。

溶于 30 mL 0.1 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.6), 加 3 mL 0.5 mol/L EDTA, 磁力搅拌至完全溶解, 然后加入 15 mL 3 mol/L 氯化钠溶液, 继续搅拌 30 min, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 11.8。离心, 弃上清, 向沉淀中加入 1 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.6), 充分震荡 30 min 至沉淀复溶。转移至 2 mL 离心管, 加 1 mL 30% 三氯乙酸溶液, 充分震荡离心 10 min, 弃上清, 加 1 mL 丙酮洗涤, 离心弃上清, 丙酮重复洗涤 1 次, 置于通风橱内吹干。取 25 μ L 上样缓冲液, 加入 75 μ L 纯水, 充分吹洗溶解, 备用。

2) 标准曲线。分别取标准溶液 1、2、4、6、10 μ L, 加入 5 μ L 上样缓冲液, 纯水补足至 20 μ L, 终浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、1.0 mg/mL, 充分混匀, 沸水煮 1 min, 5 000 r/min 离心 1 min。

3) 上样。将预制胶放入电泳槽中, 并灌入新配置的电泳缓冲液。用微量进样器分别加入 Marker、溶菌酶二聚体标准溶液和试样各 10 μ L, 电泳条件为 15 mA 恒电流。

4) 染色与脱色。将 2 块玻璃板取出, 用刀片轻轻插入凹槽玻璃的顶部与另一玻璃板之间的缝隙, 轻轻向上撬, 上层玻璃轻轻撬开。使用马斯亮蓝蛋白胶快速染色液进行染色, 纯水脱色至背景无色后将凝胶平整放置于紫外/白光转换板上, 拍照扫描条带, 分析二聚体。

5) 精密度试验。取批号为 0880 的溶菌酶二聚

体样品, 按本文材料与方法 1.3 中②的方法处理后进行电泳分析, 连续测定 6 次, 连续检测 3 d, 计算方法的日内精密度和日间精密度。

6) 实样检测。分别取上海艾魁英生物科技有限公司生产的批号为 0881、0882、0883 3 批次样品, 按本文材料与方法 1.3 中②的方法处理后进行电泳分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线和线性方程结果

试验结果表明, 溶菌酶二聚体标准溶液 0.1~1.0 mg/mL 范围内具有良好的线性, 其线性方程为 $Y=1.99 \times 10^{-5} X - 0.0708$, $R^2=0.9945$, 结果见图 1。

2.2 精密度实验结果

试验结果显示, 样品中溶菌酶二聚体的含量为 32.19%~34.91%; 日内相对标准偏差为 1.35%~1.73%, 日间相对标准偏差为 1.82%, 具体试验结果见表 1。

2.3 实样检测结果

试验结果显示, 批号 0881、0882、0883 样品中溶菌酶二聚体的含量为 31.19%~32.89%; 相对偏差均低于 3%, 具体试验结果见表 2。

3 结论

本试验分别对 SDS-PAGE 法测定溶菌酶二聚体的电泳条件、染色液选择、标准曲线以及精密度

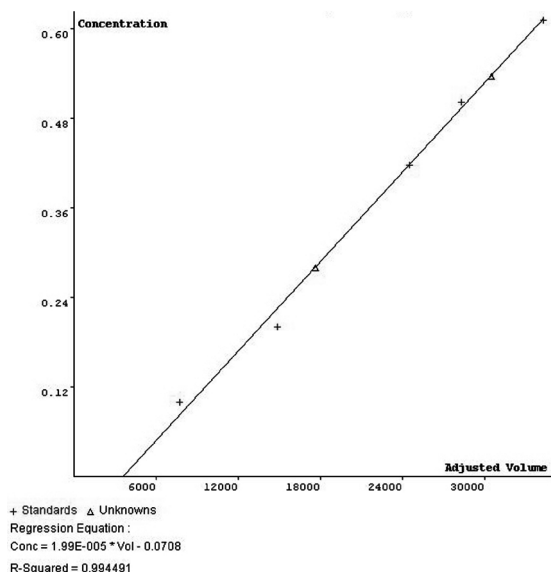


图 1 溶菌酶二聚体标准曲线及线性方程结果

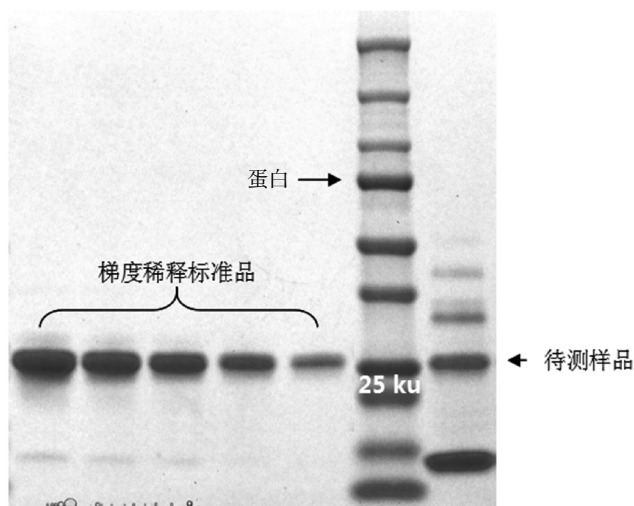


图 2 溶菌酶二聚体线性试验电泳图

表 1 溶菌酶二聚体含量测定精密度试验结果

%

项目	第 1 天	第 2 天	第 3 天
含量	33.43	33.96	34.89
	33.47	34.28	34.25
	33.65	33.84	34.91
	32.19	33.16	33.86
	33.81	33.92	33.69
	33.29	33.17	33.63
日内 RSD	1.73	1.35	1.70
日间 RSD		1.82	

表 2 实际样品中溶菌酶二聚体含量测定结果

%

批号	溶菌酶二聚体含量		相对偏差
	测定值	平均值	
0881	30.52	31.19	2.13
	31.85		
0882	33.72	32.89	2.56
	32.05		
0883	33.15	32.41	2.28
	31.67		

等因素进行了研究,结果发现采用 15 mA 恒电流进行蛋白的浓缩分离、快速考马斯亮蓝进行蛋白胶染色, 试验时间较短且溶菌酶二聚体条带较为清晰。线性试验数据表明,溶菌酶二聚体标准溶液在 1.0 mg/mL 以下具有较好的线性关系。精密度实验以及实样检测均表明, SDS-PAGE 方法测定饲料添加剂溶菌酶二聚体含量具有操作简单、准确可靠等特点, 适用于饲料添加剂溶菌酶二聚体质量分析。

参 考 文 献

- [1] 史瑾, 杨小琳, 赵金礼, 等. Tricine-SDS-PAGE 电泳定量检测人体泪液中溶菌酶含量[J]. 临床医学研究与实践, 2018, 36(2): 4-6.
- [2] 韩奕奕, 黄菲菲, 王建军. 凝胶电泳法(SDS-PAGE)测定乳与乳制品中溶菌酶二聚体的含量[J]. 乳业科学与技术, 2009, 135(2): 74-77.

【责任编辑: 胡 敏】