

罗非鱼肠系脂滴及相关蛋白提取过程分析

李 劼^{1,2}, 黄 卉², 相 欢², 岑剑伟², 魏 涯², 赵永强², 郝淑贤², 李来好²

1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部水产品加工重点实验室/国家水产品加工技术研发中心, 广东广州 510300

摘要: 动植物中的脂质以脂滴 (Lipid droplet, LD) 的形式存在。掌握脂滴及脂滴相关蛋白 (Lipid droplet related protein, LDRP) 的提纯方法, 对解析鱼类脂质变化及影响机制, 寻求适宜的调控途径至关重要。以罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的肠系脂肪组织为原料, 利用离心、重悬及增溶等处理手段分离纯化脂滴及LDRP, 并结合SDS-PAGE和质量浓度变化分析提纯效果。结果表明, 肠系脂肪组织经3次离心和3次重悬可有效去除杂质, 获得较为纯净的脂滴。虽然溶解剂增溶提取的LDRP蛋白浓度较高, 但电泳条带存在明显拖尾现象, 说明脂质脱除效果不佳, 影响了LDRP提取纯度。脱脂增溶需经4组有机溶剂联合处理才可获得纯度高、复溶效果好的LDRP提取样品。离心、干燥方式及脂滴冷冻对LDRP增溶影响差异不显著。

关键词: 罗非鱼; 脂滴; 脂滴相关蛋白; 提取

中图分类号: S 985.1⁺9

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Extraction process of intestinal lipid droplets and lipid droplet-related proteins from tilapia

LI Jie^{1,2}, HUANG Hui², XIANG Huan², CEN Jianwei², WEI Ya², ZHAO Yongqiang², HAO Shuxian², LI Laihao²

1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/National R&D Center for Aquatic Product Processing, Guangzhou 510300, China

Abstract: Lipids in animals and plants exist in the form of lipid droplet (LD). It is very important to master the purification methods of lipid droplet and lipid droplet related protein (LDRP) for understanding the lipid changes and influence mechanisms of fish, and seeking appropriate regulatory approaches. In this paper, the lipid droplet and LDRP were separated and purified through centrifugation, resuspension and solubilization by using *Oreochromis niloticus* intestinal tissues as raw material. The results show that the intestinal adipose tissues were effectively removed by three times of centrifugation and three times of resuspension to obtain the pure lipid droplet. Although the concentration of LDRP protein extracted by solubilization was higher, the electrophoretic bands showed an obvious trailing phenomenon, indicating that the effect of lipid removal was poor, which affected the purity of LDRP extraction. Delipidation and solubilization need to be combined with four groups of organic solvents to obtain the LDRP extracted samples with high purity and good re-solubilization effects. The effects of centrifugation drying

收稿日期: 2022-11-01; 修回日期: 2022-12-18

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-46); 广东省重点领域研发计划项目 (2019B020225001); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金 (2020TD69); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2020CY03, 2021SD06)

作者简介: 李 劼 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与质量安全。E-mail: 839430748@qq.com

通信作者: 郝淑贤 (1972—), 女, 研究员, 博士, 研究方向为水产品加工与质量安全。E-mail: susanhao2001@163.com

李来好 (1963—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为水产品加工与质量安全。E-mail: laihaoli@163.com

method and lipid droplet freezing on LDRP solubilization were not significantly different.

Keywords: *Oreochromis niloticus*; Lipid droplet; Lipid droplet-related protein; Extraction

水产品加工和贮藏过程中,其脂质变化显著。脂质通过水解、氧化等反应,一般会生成风味物质,但也会产生大量不良物质,而这些物质可作为评价水产品营养和安全的指标^[1-2]。以往对于水产品脂质的研究多基于整体脂质和脂肪酸的组成和含量^[3-4]。近期大量研究发现脂质以脂滴(Lipid droplet, LD)的形式存在。脂滴不再是人们传统认知的惰性细胞器,而是一种高度复杂、进化稳定,几乎存在于所有动植物当中的动态细胞器。脂滴在细胞内有维持细胞能量稳定、保护细胞不受脂毒性物质侵害等作用^[5]。同时,脂滴与其他细胞器也有密切的相互作用^[6-7],如脂滴和线粒体的紧密接触便于疏水性脂肪酸从脂滴转运到线粒体^[8],内质网合成模型显示脂滴在内质网小叶上合成^[9-10]。

脂滴是细胞中常见的重要细胞器,脂滴包被的单层磷脂膜上镶嵌着多种蛋白,如“PAT”家族蛋白^[5,11],脂滴的中性脂质核心也存在许多蛋白^[12]。在脂滴表面和内部的蛋白被统称为脂滴相关蛋白(Lipid droplet-related protein, LDRP)。不同LDRP之间的差异会影响脂滴在细胞中的功能^[13],脂滴的完整性对脂质代谢具有重要意义^[14]。脂滴出现聚集或者是数量变化,与脂质的合成或吸收有密切关系^[15];脂质成分在降解之前,LDRP发生降解^[16-17]。

目前关于脂滴的研究主要集中在微生物、植物及畜禽类动物^[6,18-20]。密度梯度离心法是脂滴提取的常用方法,其原理是先通过低速离心去除颗粒较大的杂质,使脂滴聚集;再利用不同密度缓冲液进行高速离心,使脂滴和杂质彻底分离。通常依据离心次数分为两步离心法^[21-22]和三步离心法^[23-24],二者均在最后一次离心中加入不同密度的缓冲液,利用高速离心使脂滴和杂质彻底分离。不同物种提取脂滴的条件不同,需要针对样品种类和特性进行调整^[25]。目前,关于水产动物脂滴的研究较少,分析脂滴提取过程和影响因素的研究尚未见报道。罗非鱼是我国主要的经济鱼类,其脂质在加工及贮藏过程中的变化一直是加工企业及科研工作者关注的焦点。掌握鱼类脂滴及LDRP提纯方法,对解析鱼类脂质变化及影响机制,寻求适宜的调控途径至关重要。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活罗非鱼(400~600 g)购自广州超市。三甲基甘氨酸(Tricine)、4% (体积分数)多聚甲醛通用型固定液购自兰杰柯科技有限公司;Bradford蛋白浓度测定试剂、Bradford蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)、考马斯亮蓝染色液、BeyoColor™彩色预染蛋白(10~170 kD)购于上海碧云天生物技术有限公司;NUPAGE 12% (体积分数) Bis-Tris蛋白预制梯度胶板(厚1.0 mm、15孔)、NUPAGE MES SDS缓冲液(20×)购于英潍捷基(上海)贸易有限公司;二甲基亚砜、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、苯甲磺酰氟(PMSF)、十二烷基磺酸钠(SDS)购于北京索莱宝科技有限公司。二甲苯、中性树胶购于国药集团化学试剂有限公司;环保脱蜡液、HE染液、油红染液、苏木素染液分化液、返蓝液、甘油明胶封片剂购于武汉赛维尔生物科技有限公司。其他均为实验室常用试剂。

1.2 试剂配制

配制磷酸盐缓冲液(PBS)、蔗糖溶液(2.5 mol·L⁻¹)。

苯甲磺酰氟(PMSF)(0.2 mol·L⁻¹):将0.35 g PMSF溶解于10 mL二甲基亚砜,-20℃下避光保存。

缓冲液A(Buff A):1.79 g Tricine用400 mL去离子水溶解,用氢氧化钾(KOH)调pH至7.8;加入50 mL蔗糖溶液(2.5 mol·L⁻¹),定容至500 mL。

缓冲液B(Buff B):0.95 g HEPES、1.49 g氯化钾(KCl)和0.038 g氯化镁(MgCl₂),用180 mL去离子水溶解,用KOH调pH至7.4,定容至200 mL。

1.3 仪器与设备

H1850R冷冻离心机(湖南湘仪公司);IKA-T25均质机(德国IKA公司);D1008E掌上离心机[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司];SYNERGY/H1酶标仪(美国伯腾公司);Alpha1-4冷冻干燥机(德国Christ公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Mini Gel Tank PAGE电泳系统、CRYOSTAR NX50冰冻切片机(美国赛默飞科技公司);J-12J脱水机、JB-P5包埋机、JB-L5冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016

病理切片机、LEICA 819 切片刀 (上海徕卡仪器有限公司); KD-P 组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); Nikon Eclipse E100 正置光学显微镜、NIKON DS-U3 成像系统 (日本尼康); 其他均为实验室常用设备。

1.4 方法

1.4.1 肠系脂肪样品处理

参考 Tian 等^[23] 的方法并稍加改动。取罗非鱼肠系脂肪, 用 PBS 洗涤 3 次, 沥干水分, 备用。

1.4.2 肠系脂肪 H&E 染色与观察

参考 Tian 等^[23] 和崔留娟^[26] 的方法并进行调整。取肠系脂肪用 4% (质量分数) 多聚甲醛固定 48 h, 用 75%~95% (体积分数) 乙醇进行梯度脱水, 二甲苯进行透明处理, 石蜡固定、切片。切片样品经二甲苯脱蜡、无水乙醇脱水后, 进行苏木素染色、分化液分化、返蓝液返蓝、伊红染色, 再进

行脱水和透明处理, 用中性树胶封片。显微镜进行观察与分析。

1.4.3 肠系脂肪提取

参考 Tian 等^[23]、Ding 等^[25] 和 Mirza 等^[27] 的方法, 提取过程见图 1。取 3 g 脂肪样品置于离心管中, 加入 10 mL Buff A 和 0.2 mL PMSF 均质, 冰浴放置 20 min, 匀浆液为全细胞裂解液 (Whole cell lysate, WCL)。将匀浆液于 4 °C 条件下进行二次离心, 首次离心 (1 000×g) 后取上层液 (Supernatant, S) 进行再次离心 (3 000×g), 2 次离心时间均为 10 min, 经 2 次离心后获得的上清液为去核上清液 1 (Post-nuclear supernatant 1, PNS1)。将 PNS1 与 Buff B (5 mL) 混合, 离心 (45 min, 4 °C, 10 200×g), 收集粗脂滴。将粗脂滴用 5 mL Buff B 混合充分后进行重悬处理 (10 min, 4 °C, 10 200×g), 脂滴重悬步骤重复 3 次。

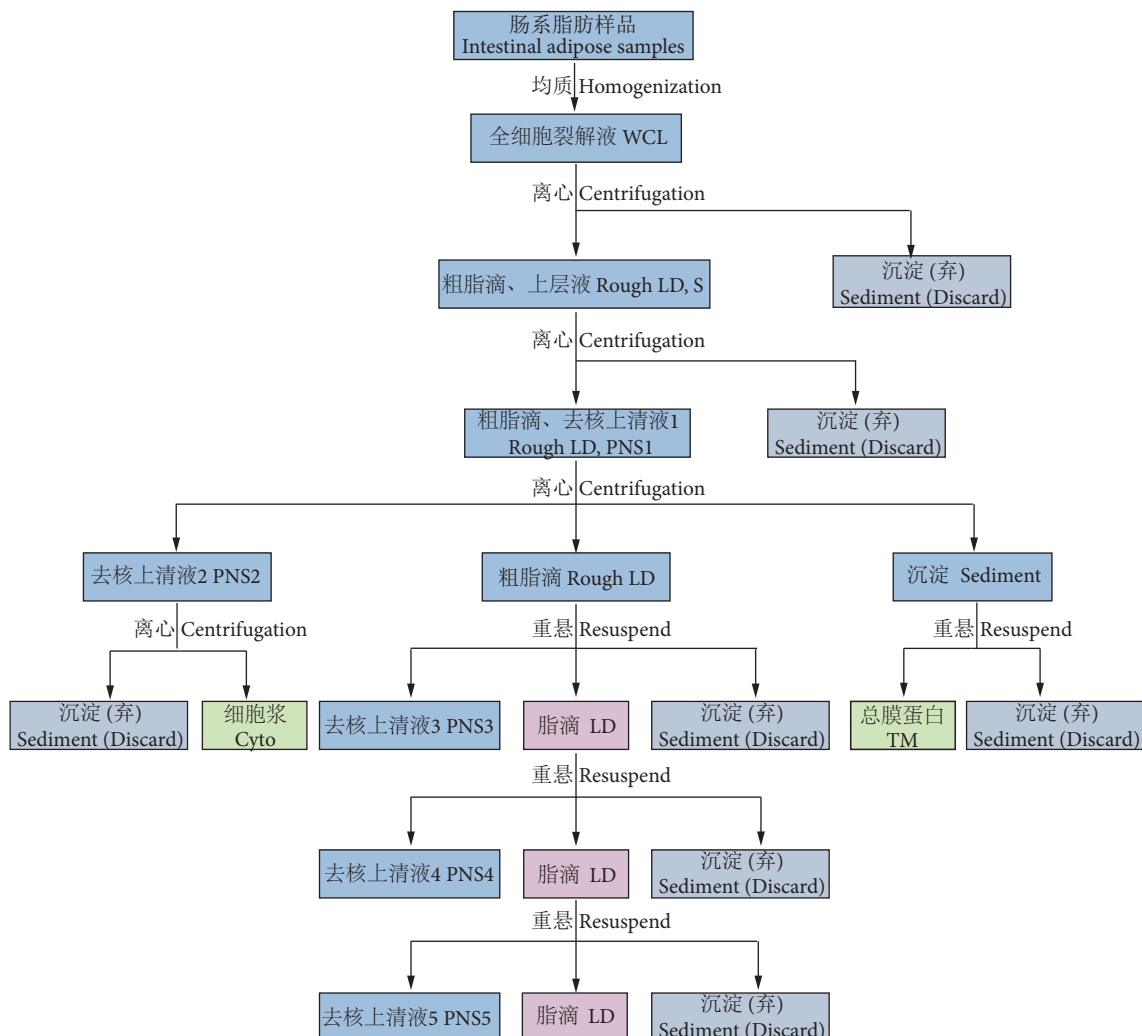


图1 肠系脂肪组织脂滴提取过程

Fig. 1 Extraction process of lipid droplet in intestinal adipose tissue

1.4.4 脂滴相关蛋白(LDRP)增溶

1) 溶解剂增溶。参考 Brasaemle 和 Wolins^[28] 的方法并进行调整。取 0.1 g 脂滴, 加入 1 mL 10% (质量分数) SDS 超声水浴孵化 1 h, 期间每隔 10 min 将样品用涡流搅拌器搅拌 5 s。孵化结束后常温离心 10 min (10 200×g), 收集下层清液。

2) 脱脂增溶。参考闫峻等^[24]、Brasaemle 和 Wolins^[28] 及郭玉^[29] 的方法并调整。取 0.1 g 脂滴, 加入 -80 °C 预冷的丙酮 1 mL, -20 °C 孵育过夜后, 4 °C 离心 (10 200×g) 60 min 去上清。沉淀先后经 1 mL 丙酮、丙酮-乙醚混合溶剂 (V:V=1:1) 及乙醚溶解后进行离心处理, 3 次离心温度均为 4 °C, 低速长时离心参数为 4 300×g, 30 min, 高速短时离心参数为 10 200×g, 10 min。干燥后的样品加 100 μL 去离子水复溶进行分析。

1.4.5 蛋白质含量测定

一般样品用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定。溶解增溶后的蛋白质溶液稀释 10 倍后, 用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (去垢兼容型) 测定浓度。

1.4.6 SDS-PAGE 凝胶电泳

参考郭玉^[29]、闫峻等^[24] 和 Huang 等^[30] 的方法并调整, 用 12% (质量分数) 的预制凝胶进行 SDS-PAGE 分析。取 20 μL 蛋白样品溶液与 5 μL 的上样缓冲液 (5×) 混合, 98 °C 变性 5 min, 上样量为 10 μg 或 10 μL。120 V 恒压 90 min, 电泳结束用考马斯亮蓝染液进行染色和脱染色。条带的相对分子量与标准蛋白 Maker (10~170 kD) 进行比较确定。

1.5 数据分析

实验重复 3 次, 使用 SPSS 22.0 软件对数据进行单因素方差分析和差异显著性 ($P<0.05$) 分析, 采用 Origin 2021b 软件绘图。

2 结果

2.1 肠系脂肪细胞特点

由图 2 可见, 肠系脂肪细胞排列紧密, 形状呈圆形或椭圆形。大量的脂质空泡说明肠系脂肪细胞含量丰富, 其他细胞器含量低。王雅文^[31] 和林婉玲等^[32] 认为鱼类肠系脂肪在代谢方面表现比较不活跃, 主要的功能是储能, 所以脂质沉积更多。

2.2 脂滴的提取过程

如图 3-a 所示, 经过细胞裂解步骤, 最初的混合溶液 (I) 浑浊呈橘粉色, 粗脂滴分布不均, 部分

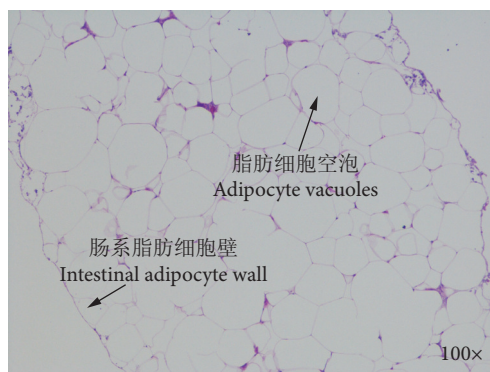


图2 肠系脂肪组织学观察

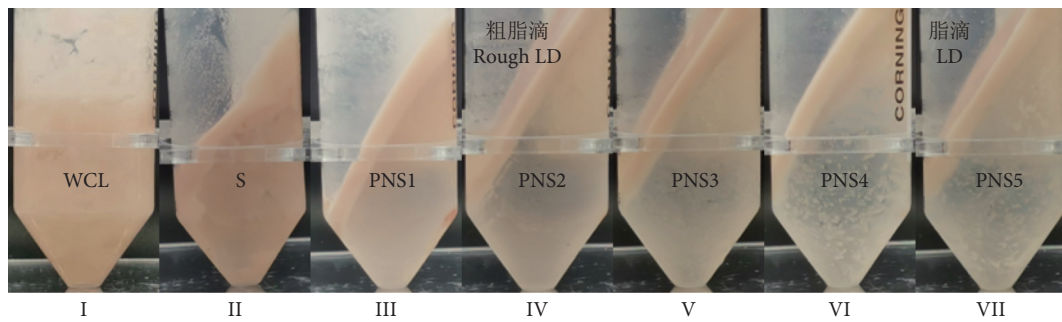
Fig. 2 Histological observation of tilapia's mesenteric adipose tissue

脂质黏附在试管壁上。经过初步离心分离后 (II), 裂解液分层, 脂滴上浮, 下层溶液浑浊, 底部有未破碎的肠脂组织薄膜^[33]。经过二次离心 (III), 脂滴上浮, 溶液明显分层, 说明细胞核、细胞碎片和未破碎的细胞除去较为彻底^[23,25]。经过 10 200×g 离心分离后 (IV), 分为 4 个部分, 由上至下依次为黄色油状物、微黄色脂滴、透明溶液和沉淀物。取脂滴层进行 3 次重悬之后 (V—VII), 脂滴从微黄色变成乳白色, 下层溶液基本无沉淀。初步判断经过以上步骤可以获得较为纯净的脂滴。

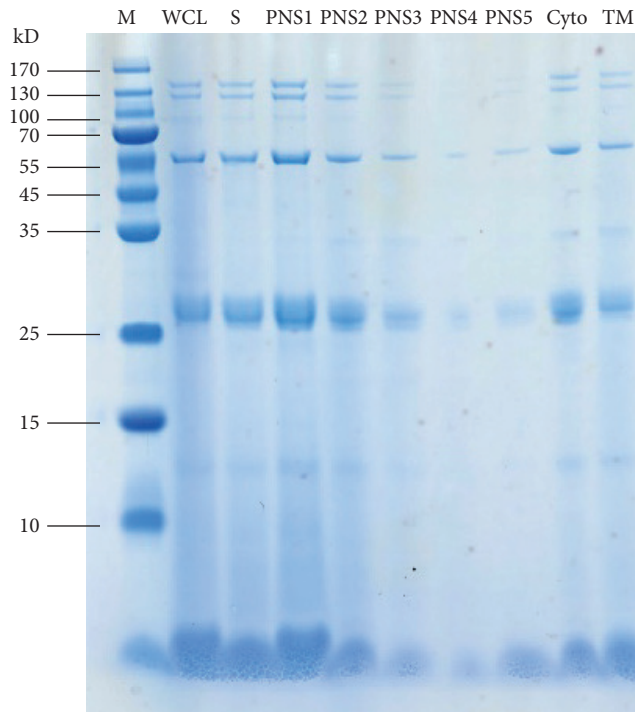
为进一步判断肠系脂肪组织脂滴提取过程中杂质的去除情况, 收集脂滴提取过程中各步骤的样品, 分别为 WCL、S、PNS1-5、Cyto 和 TM, 用 SDS-PAGE 进行分析, 结果如图 3-b 所示。WCL 和 S 条带相似, 说明 WCL 经 1 000×g 离心仅去除了少量质量较大的未破碎的肠系脂肪组织外膜, 其上层液 S 与 WCL 蛋白组成未发生明显变化。PNS1 的蛋白质条带颜色变深, 因为 3 000 ×g 离心将更多的杂质沉淀分离出来, 所以条带丰度明显增加^[34-35]; PNS1 在 100 kD 附近的条带比 WCL 和 S 要明显, PNS2 与 PNS1 相比 100 kD 附近的条带减弱, 说明脂滴得到进一步纯化。Cyto 和 TM 的条带组成类似, 35 kD 附近出现了 WCL 和 S 没有的蛋白质条带, 说明通过 3 次离心能将破碎细胞膜等杂质充分沉淀。经过重悬处理后 PNS3—PNS5 的电泳条带几乎消失, 表明脂滴纯化基本完成。闫峻等^[24]、Jolivet 等^[36] 和 Ding 等^[37] 均认为离心和重悬操作有利于脂滴提纯。肠系脂肪经过提取纯化后, 脂滴的提取率约为 55%。

2.3 脂滴蛋白的增溶

脂滴由疏水核心和磷脂单分子层组成, 疏水核



(a) 脂滴提取过程 LD extraction process



(b) 提取效果鉴定 Identification of extraction effect

WCL. 全细胞裂解液; S. 上层液; PNS1—PNS5. 去核上清液1—5; Cyto. 细胞浆; TM. 总膜蛋白; M. Marker; I. 混合溶液; II. 1 000×g 分离; III. 3 000×g 分离; IV. 10 200×g 分离; V. 1 次重悬; VI. 2 次重悬; VII. 3 次重悬。
 WCL. Whole cell lysate; S. Supernatant; PNS1—PNS5. Postnuclear supernatant 1—5; Cyto. Cytosol; TM. Total membrane; M. Marker; I. Mixed solution; II. 1 000×g separation; III. 3 000×g separation; IV. 10 200×g separation; V. 1 time resuspension; VI. 2 times resuspension; VII. 3 times resuspension.

图3 脂滴提取过程

Fig. 3 Extraction process of lipid droplet

心中最主要的物质是三酰基甘油^[38]。有研究表明, LDRP 可能通过两亲性螺旋的疏水侧与磷脂单分子层紧密结合^[39], 通过一般的离心步骤无法将 LDRP 与脂质部分很好地分开。因此, 需要将 LDRP 增溶, 使 LDRP 与脂质分离。增溶方式主要分为溶解剂增溶和脱脂增溶 2 种。

2.3.1 溶解剂增溶

本实验在 SDS 与超声的共同作用下, 将 LDRP 从脂滴上洗脱下来, 经过离心后得到含 LDRP 清液。离心后上层不溶于水的白色物质为脂质层, 下层微浑浊的溶液为 LDRP。王丽娜等^[40] 研究认为脂

质被表面活性剂完全溶解后下层溶液呈澄清透明状, 而本实验的下层溶液微浑浊, 推测脂滴未能完全增溶。

取 LDRP 清液进行 SDS-PAGE 分析。图 4-b 结果显示 LDRP 清液蛋白质条带少、颜色浅且有拖尾的现象, 说明溶解剂增溶的效果不理想。这可能是由于 LDRP 堆积在电泳孔道中, 不能充分迁移到凝胶中^[28]; 也可能是高浓度 SDS 溶液使 LDRP 构象改变^[40-41]。

2.3.2 脱脂增溶

脱脂增溶结果如图 5 所示, 增溶后蛋白质条

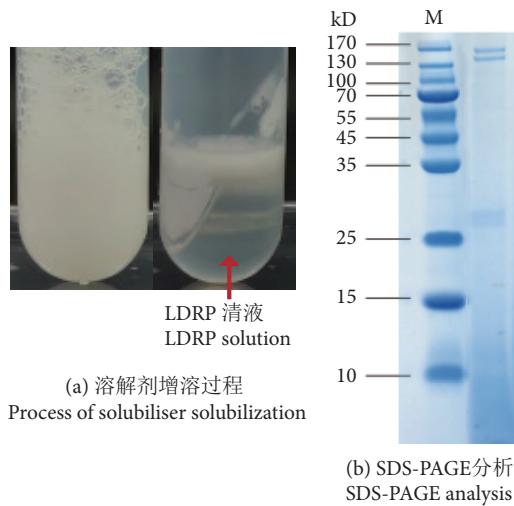


图4 溶解剂增溶

Fig. 4 Solubilization by solubiliser

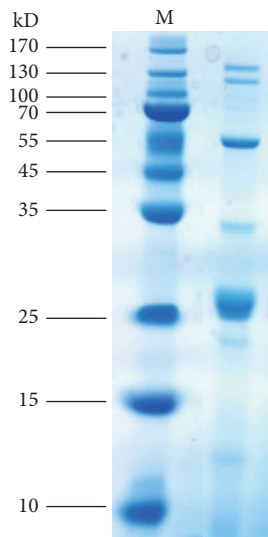


图5 脱脂增溶的SDS-PAGE分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of delipidation and solubilization

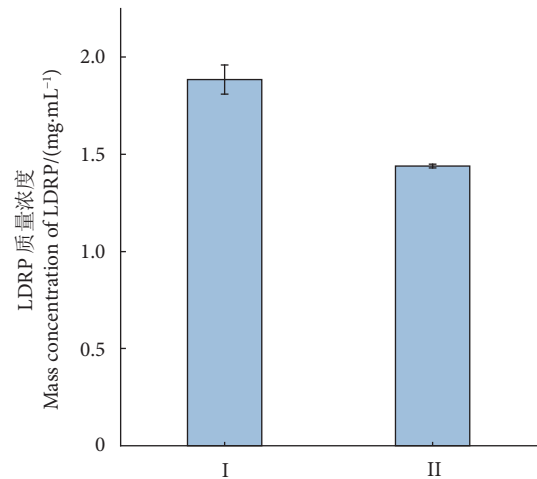
带多且清晰、丰度高，说明脱脂增溶的效果较理想。

2.3.3 溶解剂增溶与脱脂增溶的比较

图 6 为两种增溶处理后样品蛋白含量分析结果。由图可知溶解剂增溶提取的 LDRP 蛋白浓度高，但电泳时蛋白质条带少、拖尾明显，说明溶解剂增溶对脂质的脱除效果不理想。

2.3.4 影响脱脂增溶的因素

1) 增溶步骤对增溶效果的影响。脂滴样品先后经低温丙酮、常温丙酮、丙酮-乙醚混合溶剂 ($V:V=1:1$) 及乙醚处理，分析各步骤处理对 LDRP 的增溶效果，结果见图 7-a。经过冷冻丙酮增溶后，复溶时试管壁上有大量附着物，复溶溶液呈浑浊状，说明单一丙酮增溶脂质去除效果差；经



I. 溶解剂增溶; II. 脱脂增溶。

I. Solubilization by solubiliser; II. Delipidation and solubilization.

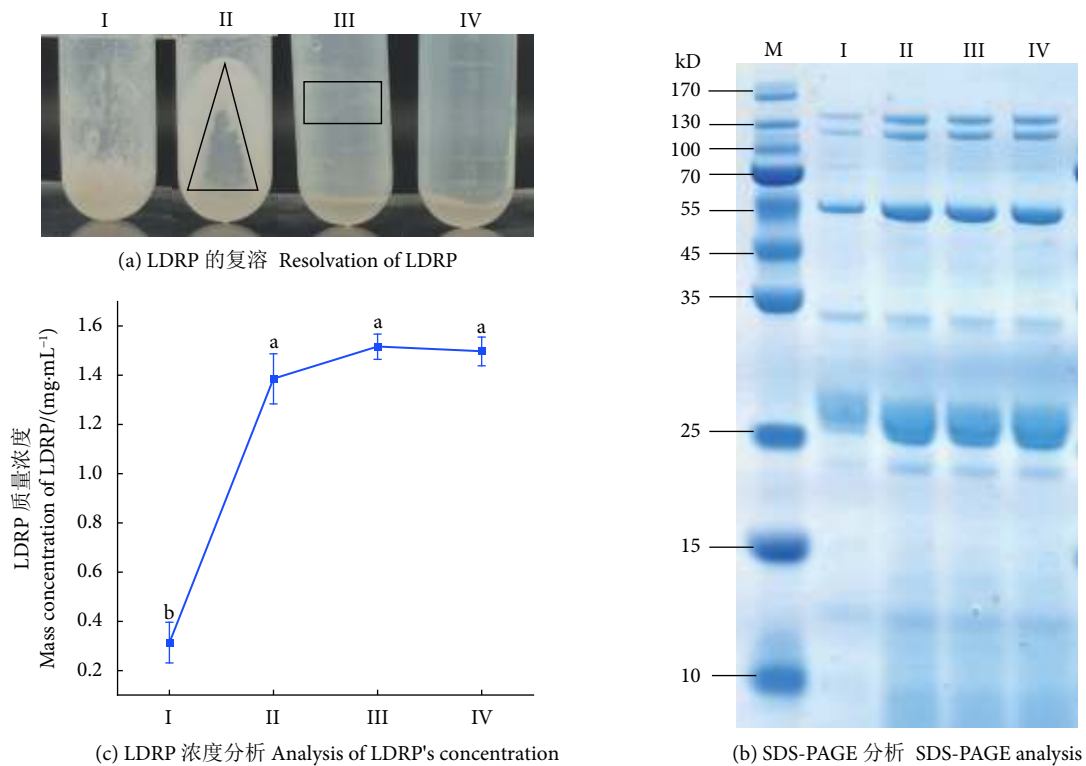
图6 溶解剂增溶和脱脂增溶的LDRP质量浓度

Fig. 6 LDRP's mass concentration of solubilization by solubiliser and delipidation and solubilization

常温丙酮二次增溶处理后，增溶样品复溶效果略好于单一冷冻丙酮处理，虽然仍存在脂滴附壁现象，但部分溶解液澄清透明（见黑框透明三角形区域）；经过丙酮-乙醚混合溶剂脱脂后，试管壁有少量点状附着物存在（见黑框方形区域）；经过乙醚再次增溶后，试管壁几乎无附着物残留，增溶样品能完全溶于水中。对脱脂增溶得到的 LDRP 进行 SDS-PAGE 和蛋白浓度分析，见图 7-b 和图 7-c。由结果可知冷冻丙酮脱脂增溶后得到的 LDRP 质量浓度最低，且蛋白条带丰度低，25 kD 以下的小分子量蛋白质缺失；随着脱脂步骤的增加，LDRP 蛋白质质量浓度变化差异不明显 ($P < 0.05$)，结合复溶效果选择 4 组溶解剂协同处理。

2) 离心和干燥的方式对增溶效果的影响。离心和干燥是增溶过程中必不可少的步骤。根据现有研究报道，离心方式分为低速长时离心 ($4\ 300\times g$, 30 min) 和高速短时离心 ($10\ 200\times g$, 10 min)。干燥可采用氮吹、冻干、自然风干。离心和干燥方式对 LDRP 增溶的影响结果见图 8。SDS-PAGE 电泳图表明不同离心和干燥方式的 LDRP 蛋白条带基本一致 (图 8-a)，蛋白丰度也无显著变化；蛋白浓度分析也表明离心和干燥方式对增溶的 LDRP 含量影响差异不显著 ($P < 0.05$, 图 8-b)。说明离心方式和干燥方式不会影响 LDRP 提取增溶效果，研究中可根据条件进行选择。

3) 冷冻对于脱脂增溶的影响。为分析提取后脂滴存放是否会影响后续 LDRP 增溶，以新鲜脂滴



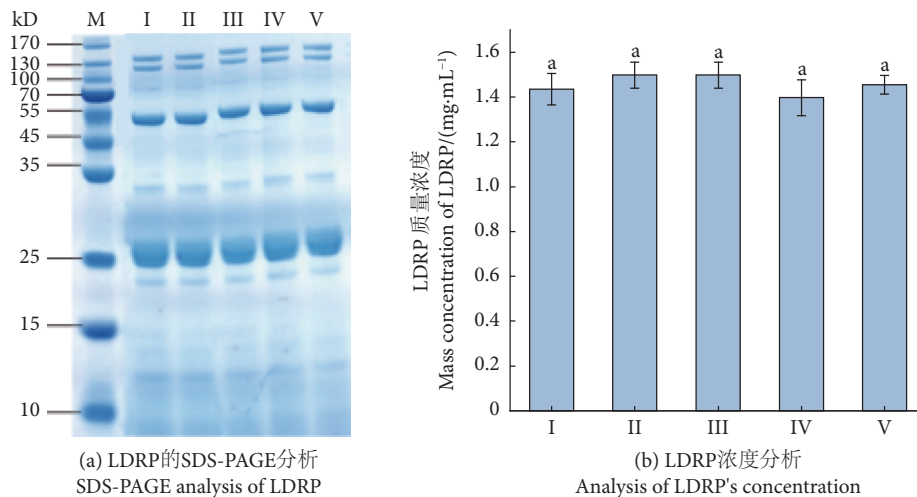
I. 低温丙酮; II. 常温丙酮; III. 丙酮-乙醚混合溶剂; IV. 乙醚。
 I. Low-temperature acetone; II. Room-temperature acetone; III. Acetone/ether solvent mix; IV. Ether.

图 7 脱脂增溶过程分析

Fig. 7 Analysis of process of delipidation and solubilization

样品和冷冻脂滴样品 (-20 °C, 7 d) 为原料, 经上述增溶处理提取 LDRP。由结果可知新鲜脂滴样品和冷冻脂滴样品的 LDRP 条带无显著性差异 (图 9-a), 样品间 LDRP 浓度无显著性差异 (图 9-b), 说明脂滴在 -20 °C 冷冻储藏 7 d 不会影响后续 LDRP

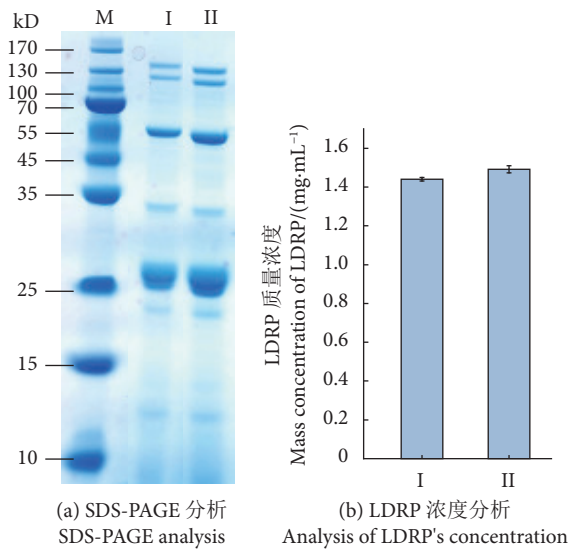
的增溶。有报道称冷冻脂滴进行增溶处理后, 得到的 LDRP 回收率低^[23,28], 与本实验结果略有差异, 这可能与实验冷冻时间有关。本实验发现冷冻脂滴样品试管底部出现少量水分, 这可能是由于冷冻贮藏过程中, 脂滴之间发生聚集所致^[42-44]。



I. 低速长时; II. 高速长时; III. 氮吹; IV. 冻干; V. 自然干。
 I. Low speed and long time; II. High speed and long time; III. Nitrogen blowing; IV. Freeze-drying; V. Natural drying.

图 8 离心和干燥方式对脱脂增溶的影响

Fig. 8 Effects of centrifuge and drying method on delipidation and solubilization



I. 新鲜样品; II. 冷冻样品。
I. Fresh samples; II. Frozen samples.

图9 冷冻对脱脂增溶的影响

Fig. 9 Effect of freezing on delipidation and solubilization

3 讨论

3.1 脂滴提取

脂滴几乎存在于所有动植物中,但不同物种、部位所含脂滴量不同^[32],提取方法也有差异。鱼类脂滴存储位点主要有肠系脂肪组织、肝胰脏、腹部两侧脂肪块^[45]。故本文选择脂滴丰富的肠系脂肪组织作为研究对象。

提取脂滴是利用脂滴中性酯密度小的特征^[46],通过离心和重悬等操作,使脂滴能够浮于水溶液顶部。为保护细胞器,提取中会使用含有蔗糖的 Buff A 进行均质;为保护脂滴和 LDRP 不被酶解,加入 PMSF 防止蛋白酶进行分解^[47-48];通过梯度离心后,脂滴得以悬浮在液面顶部,这时得到的脂滴仍然有杂质的存在。向脂滴中加入 Buff B 进行洗涤,3 次重悬后,脂滴中的杂质多数被去除。离心过程保留了绝大部分脂滴,但有部分尺寸特小和特大的脂滴丢失^[25]。

3.2 LDRP 的增溶

SDS 溶液是常用的蛋白质提取增溶剂,其增溶原理是利用 SDS 的表面活性剂特征^[49],溶解磷脂,使生物膜的通透性增大,实现蛋白增溶的目的^[50]。有研究表明 SDS 可抑制内源蛋白酶对蛋白质的酶解,从而在蛋白质提取过程中起到保护作用^[51]。本研究在溶解增溶过程中,经孵化后的样品溶液浑浊,有大量泡沫产生(图 3-a)。这是由于

SDS 作为两亲性化合物本身就具有起泡性^[52],在孵化过程中经超声及涡旋处理产生大量泡沫。

脱脂增溶的原理是利用有机溶剂溶解脂质,使蛋白质沉淀析出^[53]。LDRP 与脂质结合比较牢固,不易溶于水、稀盐溶液、稀酸或稀碱中,可用丙酮和乙醚等有机溶剂进行增溶^[54]。脱脂增溶是目前研究较为常用的方法^[26,30],脂滴经过脱脂增溶后,得到白色 LDRP 粉末。与溶解剂增溶的方式相比,脱脂增溶得到的 LDRP 含量虽然较低,但条带多且清晰,适宜用作 LDRP 的提取分析。

有研究指出 LDRP 的提取受离心方式的影响^[28,30]。本研究发现离心方式不会影响 LDRP 的提取效果,说明低速长时和高速短时的离心条件下,LDRP 均能实现沉降,与有机溶剂很好地分离。同时,干燥方式也不会影响 LDRP,这可能是由于有机溶剂易挥发、干燥时间短,所以 LDRP 不易发生变性。

虽然冷冻过后 LDRP 回收率低,但蛋白质条带无显著差异,说明脂滴性质仍然稳定,短时间内(7 d)可将脂滴置于-20 °C 冰箱中储藏,而长时间储藏则需置于-80 °C 冰箱中。

4 结论

肠系脂肪细胞脂质丰富,适合作为研究脂滴提取方法的模板。经过 3 次离心、3 次重悬后能得到较为纯净的脂滴。对 LDRP 进行分析的重要手段是 SDS-PAGE 凝胶电泳,不同的增溶方式对于 LDRP 的增溶有截然不同的效果,溶解剂增溶后的 LDRP 蛋白质浓度高,有脂质残留;脱脂增溶后的 LDRP 条带多但蛋白质浓度低。离心方式、干燥方式和冷冻贮藏对于 LDRP 提取无显著性差异。

参考文献:

- [1] 林剑军,赵文红,刘巧瑜,等. 脂质水解氧化对干腌鱼制品风味影响的研究进展 [J]. 食品工业, 2021, 42(9): 206-210.
- [2] OKPALA C O R, BONO G. Lipid autoxidation in fishery products postharvest: is cold to freezing oxygen-free packaged storage the better remedy?[J]. Lipid Technol, 2016, 28(7): 122-125.
- [3] 韩迎雪,林婉玲,杨少玲,等. 15 种淡水鱼肌肉脂肪含量及脂肪酸组成分析 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 217-222.
- [4] 柯欢,李慧,熊伟,等. 白乌鱼与罗非鱼的营养物质比较分析 [J]. 农产品加工, 2020(1): 47-49.
- [5] 庞永佳,翟桂影,李瑞,等. 脂滴包被蛋白的结构、功能及其与脂类疾病关联的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(6): 59-67.

- [6] 彭玥晗, 徐磊, 许金蔓, 等. 脂滴包被蛋白基因对猪肌肉发育的影响[J]. 畜牧兽医杂志, 2019, 38(3): 28-30.
- [7] SHIVAI AH K K, SUSANTO F A, DEVADASU E, et al. Plastoglobule lipid droplet isolation from plant leaf tissue and cyanobacteria[J]. J Vis Exp, 2022: 188.
- [8] 罗玉珍, 韩海军, 陈敏, 等. 脂滴包被蛋白 Plin5 参与调节脂代谢和线粒体功能[J]. 生命的化学, 2020, 40(8): 1279-1288.
- [9] SINGH A, SEN P. Lipid droplet: a functionally active organelle in monocyte to macrophage differentiation and its inflammatory properties[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2021, 1866(10): 158981.
- [10] WILFLING F, WANG H J, HAAS J T, et al. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets[J]. Dev Cell, 2013, 24(4): 384-399.
- [11] DEJGAARD S Y, PRESLEY J F. New method for quantitation of lipid droplet volume from light microscopic images with an application to determination of pat protein density on the droplet surface[J]. J. Histochem Cytochem, 2018, 66(6): 447-465.
- [12] 徐冲, 何金汗, 徐国恒. 脂滴包被蛋白 (perilipin) 调控脂肪分解[J]. 生理科学进展, 2006(3): 221-224.
- [13] 刘梅芳, 徐国恒. PAT 家族蛋白在细胞内脂滴代谢过程中的作用[J]. 生理科学进展, 2006(2): 103-107.
- [14] YAN Z H, ZHAO L P, KONG X Z, et al. Behaviors of particle size and bound proteins of oil bodies in soymilk processing[J]. Food Chem, 2016, 1866(10): 881-890.
- [15] 钟艳花, 林重, 钟映芹, 等. 厚朴酚对脂肪酸诱导 HepG2 细胞脂质积蓄的作用及机制研究[J]. 山西中医药大学学报, 2021, 22(3): 171-177.
- [16] MURPHY D. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms[J]. Prog Lipid Res, 2001, 40(5): 325-438.
- [17] BHATLA S C, VANDANA S, KAUSHIK V. Recent developments in the localization of oil body-associated signaling molecules during lipolysis in oilseeds[J]. Plant Signal Behav, 2009, 4(3): 176-182.
- [18] 刘芳, 邢颖, 相金柱, 等. 猪早期孤雌胚胎脂滴含量和脂肪酸代谢相关基因表达的初步研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2019, 50(4): 387-396.
- [19] ABDULSAMIE H, MOUHNAD S, MURPHY D J. Functional involvement of caleosin/peroxygenase PdPXG4 in the accumulation of date palm leaf lipid droplets after exposure to dioxins[J]. Environ Pollut, 2021, 281: 116966.
- [20] MARTA B, ALBERT P. Eukaryotic lipid droplets: metabolic hubs, and immune first responders[J]. Trends Endocrinol, 2022, 33(3): 218-229.
- [21] CHITRAJU C, FISCHER A W, FARESE R V, et al. Lipid droplets in brown adipose tissue are dispensable for cold-induced thermogenesis[J]. Cell Rep, 2020, 33(5): 108348.
- [22] YOVANNY I, RUBÉN F S, TOMÁS C, et al. Lipid droplet isolation from arabidopsis thaliana leaves[J]. Bio Protoc, 2020, 10(24): e3867.
- [23] TIAN J J, ZHANG J M, YU E M, et al. Identification and analysis of lipid droplet-related proteome in the adipose tissue of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) under fed and starved conditions[J]. Comp Biochem Physiol D, 2020, 36: 100710.
- [24] 闫峻, 马衍旋, 穆淑琴, 等. 猪骨骼肌内脂滴分离和纯化方法的探究[J]. 动物营养学报, 2019, 31(1): 266-273.
- [25] DING Y F, ZHANG S Y, YANG L, et al. Isolating lipid droplets from multiple species[J]. Nat Protoc, 2013, 8(1): 43-51.
- [26] 崔留娟. 棕色脂肪组织脂滴和线粒体相互作用的研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2019: 31.
- [27] MIRZA A H, CUI L J, ZHANG S Y, et al. Comparative proteomics reveals that lipid droplet-anchored mitochondria are more sensitive to cold in brown adipocytes[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2021, 1866(10): 158992.
- [28] BRASAEMLE D L, WOLINS N E. Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation[J]. Curr Protoc Cell Biol, 2016, 72: 3.15.1-3.15.13.
- [29] 郭玉. 骨骼肌与脂肪组织细胞中脂滴表面蛋白的差异分析与鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019: 19-21.
- [30] HUANG T, BAMIGBABA A T, XU S M, et al. Identification of noncoding RNA-encoded proteins on lipid droplets[J]. Sci Bull, 2021, 66(4): 314-318.
- [31] 王雅文. 罗非鱼脂肪组织和脂肪细胞的代谢生理特性研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2017: 27.
- [32] 林婉玲, 关榕, 曾庆孝, 等. 彩鲷和普通罗非鱼不同部位营养及质构特性的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(1): 16-21, 49.
- [33] 王来亮, 周芳芳, 黄璐璐, 等. 应用 iTRAQ 技术联合 PRM 验证技术筛选肝硬化患者急性肾损伤的早期预测生物标志物[J]. 现代实用医学, 2021, 33(4): 440-442.
- [34] 李科, 魏义勇, 刘云, 等. Nycodenz 密度梯度离心法提取及纯化大鼠心肌线粒体[J]. 遵义医学院学报, 2016, 39(5): 525-528.
- [35] 黄靖娴. 超速离心机技术原理与操作维护注意事项[J]. 科技创新与应用, 2018, 36: 130-132.
- [36] JOLIVET P, BOULARD C, BELLAMY A, et al. Oil body proteins sequentially accumulate throughout seed development in *Brassica napus*[J]. J Plant Physiol, 2011, 168(17): 2015-2020.
- [37] DING Y F, LI Y, ZHANG S Y, et al. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets[J]. J Lipid Res, 2012, 53(3): 399-411.
- [38] 蔡立鹏, 康娜, 谭金玲, 等. 脂滴与胞内细胞器互作研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(5): 964-972.
- [39] 张来福, 尹云厚. 脂滴的生物物理学和细胞生物学研究[J]. 现代农业科技, 2019, 11: 90-93.
- [40] 王丽娜, 权春善, 许永斌, 等. 利用表面活性剂介导的方法制备 AgrC 蛋白脂质体[J]. 化学学报, 2014, 72(2): 233-240.
- [41] 林爱华, 孙小梅, 李步海. 表面活性剂对蛋白质变性作用的研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版) 2002, 21(1): 21-24.
- [42] 杨小刚. 原油乳状液冻融稳定性的研究[D]. 天津: 天津大学, 2009: 15-18.
- [43] 王亚娟, 范亚苇, 李静, 等. 不同辅助法对冻融破乳提取油茶籽

- 油的影响 [J/OL]. 中国油脂, 2022. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1099.ts.20220407.0911.001.html>.
- [44] 卢浩, 刘懿谦, 代品一, 等. 油水强化分离技术 [J]. 化工进展, 2020, 39(12): 4954-4962.
- [45] 叶元土. 提升淡水养殖鱼类食用质量的技术集成与创新 [J]. 饲料工业, 2022, 43(10): 1-11.
- [46] 罗强, 闫峻, 李宁, 等. 动物脂滴结构及功能研究进展 [J]. 家畜生态学报, 2022, 43(2): 1-7.
- [47] 黎渊弘, 罗艳萍, 廖共山. 短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白的酶学性质研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(11): 1639-1641.
- [48] 田鑫, 汪之和, 施文正, 等. 南极磷虾体内胰蛋白酶的纯化及性质研究 [J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(5): 741-747.
- [49] PERBELLINI F, LIU A K L, WATSON S A, et al. Free-of-Acrylamide SDS-based Tissue Clearing (FASTClear) for three dimensional visualization of myocardial tissue[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5188.
- [50] LAI M J, LI X W, LI J, et al. Improved clearing of lipid droplet-rich tissues for three-dimensional structural elucidation[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(5): 465-467.
- [51] 岳红卫, 韩富亮. 酿酒酵母蛋白提取工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2015, 16: 304-306.
- [52] 罗志刚, 杨欢, 齐亮. 生物表面活性剂鼠李糖脂性质的研究 [J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2022, 50(1): 30-37.
- [53] 柳青海, 张唐伟, 李天才. 肝蛋白提取纯化及应用研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2011, 39(2): 161-164.
- [54] 王世宽, 于海光, 许艳丽. 叶蛋白提取方法的比较及发酵酸法的应用前景 [J]. 生物技术, 2010, 20(1): 94-96.