

秘鲁鱿鱼肌动蛋白的分离纯化及结构初探

牛付阁, 胡得妹, 张秀真, 杜艺轩, 张斌, 马爽, 潘伟春*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

摘要 目的:建立从秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白中分离纯化肌动蛋白的方法,实现肌动蛋白的批量制备。方法:使用磷酸盐缓冲液从秘鲁鱿鱼中提取肌原纤维混合蛋白,提取液首先经过阴离子交换层析分离出只有微小电荷差别的蛋白质,然后用凝胶过滤层析对混合组分中的小分子物质进行去除(如脱盐等操作),再使用大分子蛋白分离纯化系统纯化,得到纯度高的肌动蛋白(AC)。采用 SDS-PAGE、HPLC、MALDI-TOF-MS 3 种方法鉴定所分离的蛋白纯度和分子质量,采用光散射技术对肌动蛋白在溶液中的粒径分布进行表征。结果:本文从肌原纤维蛋白中提取出了纯度较高的肌动蛋白,且肌动蛋白的水力学半径(Rh)为 3.46 nm。结论:初步建立一种分离纯化肌原纤维蛋白中 AC 的新方法,为实现肌动蛋白的批量制备提供技术支持。

关键词 秘鲁鱿鱼;肌原纤维蛋白;肌动蛋白;提取分离;纯度鉴定

文章编号 1009-7848(2022)05-0035-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.005

秘鲁鱿鱼产量丰富,物美价廉,特别是营养价值高。含有 8 种人体必需氨基酸,且鱼肉中的微量元素具有高钾低钠的特点,这些特点足以让人们把目光聚焦在鱿鱼上,鱿鱼也因此成为销量逐年上升的海产品^[1]。目前,鱿鱼的主要加工方式是制作成鱼糜,对鱼糜原材料的要求主要是凝胶性能好,然而受到所含蛋白溶解度高、凝胶性能差、有特定的异味(酸、涩)等的限制^[2],鱿鱼在食品加工中的应用并不充分,利用价值低,导致资源的浪费。

蛋白质是一类复杂多变的生物大分子,其结构和性能密切相关。建立蛋白结构与蛋白凝胶特性间的联系,利用各种物理和化学手段调控蛋白的结构以优化其凝胶性能,是目前食品加工过程中常用的技术策略,如利用多糖与蛋白之间的互作形成多糖-蛋白凝胶^[3],加入凝胶强化剂^[4],改变其外界环境条件^[5]等。肌原纤维蛋白是秘鲁鱿鱼蛋白形成凝胶过程中的主要作用成分,它由肌动蛋白(AC)、原肌球蛋白(TM)及副肌球蛋白(PM)等单质蛋白组成^[6]。为生产出大众所接受和喜爱的产

品,需进一步研究肌原纤维蛋白的结构与性能^[7]。由于肌原纤维蛋白含多组分蛋白,且蛋白间存在强相互作用,这些作用力不仅会影响蛋白质整个失活过程,对调节不同分子间的交联过程也起到一定的作用^[8]。因为这些表征参数大多取决于肌原纤维蛋白的组成成分,所以整体表征肌原纤维蛋白几乎是不可能的。肌原纤维蛋白组成的细微变化,可能引起这些理化指标的巨大差异,导致食品实际生产过程中经验远比理论模型更常用。理论系:Bottom-up 方法是目前解决这类问题很常见的科研策略。获取高纯度的单个组分是这一策略能否实施的关键。然而,秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白溶液中的蛋白纳米颗粒(Nano protein particle)的存在^[9]揭示各组分间存在强相互作用,是分离纯化该体系的主要障碍。同时多组分的存在导致各组分在溶液中的浓度很低,进一步增大了体系分离纯化的难度;此外,分离纯化前目标蛋白质分子自身的折叠会影响分离纯化的 pH 值、温度和压力等条件。因此常用的条件为室温或低温、常压以及 pH 值接近等电点。这些制约条件使实验者不得不采用特殊的分离纯化仪器(蛋白纯化系统)和单元操作(色谱分离纯化技术)。同时,为达到分离纯化蛋白的目的,研究者需优化分离程序,包括色谱柱的选型,不同色谱柱的排序,色谱柱的操作条件。

目前,对肌原纤维蛋白的研究主要集中在外界环境条件,如 pH 值、压强和温度等对其凝胶性

收稿日期:2021-05-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31171713,31701650);
浙江省重中之重项目(JYTsp20142014,2017
SIAR220)

作者简介:牛付阁(1983—),男,博士,副教授

通信作者:潘伟春 E-mail:wpan@zjsu.edu.cn

能的影响,如林伟伟等^[10]研究 pH 值和 KCl 对肌原纤维蛋白的影响;廖慧琦等^[11]研究 NaCl 不同添加量对大黄鱼肌原纤维蛋白凝胶性能的影响;韩柯颖等^[12]通过控制微波功率和时间,研究温度对鸡胸肉肌原纤维蛋白凝胶性能的影响;李钊等^[13]研究超高压对肌原纤维蛋白凝胶性能的影响。然而,目前尚未见从秘鲁鱿鱼中分离纯化出单体蛋白的报道。蛋白质结构复杂,为全面了解其结构和性能之间的关系,本研究通过阴离子交换层析和凝胶过滤层析联用的技术,从多组分且存在强相互作用的蛋白体系中分离纯化出较高纯度的单质蛋白,为食品蛋白构效关系的研究提供更精准的模式。

1 材料与方法

1.1 试验材料

秘鲁鱿鱼(4.5±1.5) kg,舟山第二海洋渔业公司;曲拉通-X10、Tris,美国 Amresco 公司;30%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺预混液(质量比 29:1)、十二烷基硫酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED),美国 BIO-RAD 公司;即用型蛋白质分子质量标准 Marker (6.5~200 ku),杭州宝诚生物技术有限公司;酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、氢氧化钠、乙醇等分析纯试剂均来自于杭州捷诚生物科技有限公司。

1.2 试剂制备

1.2.1 磷酸盐缓冲液 pH 7.5,10 mmol/L EDTA, 3.5 mmol/L KH_2PO_4 ,15.6 mmol/L Na_2HPO_4 。

1.2.2 上样缓冲液 2 mL 的 Tris-HCl 0.5 mol/L, (pH 6.8)+ 4 mL 10% SDS + 2 mL 甘油 + 0.05 mL 1% 溴酚蓝,超纯水定容至 10 mL,4 °C 保存。试验前加入 200 mmol/L DTT($v_{\text{上样缓冲液}}:m_{\text{DTT}}=1:0.03$)。

1.2.3 脱色液 40%无水乙醇+10%冰醋酸+50%去离子水。

1.2.4 缓冲液 缓冲液 A: 含 0.1 mol/L KCl 的磷酸盐缓冲溶液;缓冲液 B: 含 0.15 mol/L KCl 的磷酸盐缓冲溶液。

1.2.5 考马斯亮蓝染液 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 + 50 mL 90%的乙醇+100 mL 80%的磷酸,超纯水稀释至 1 L。

1.3 试验仪器与设备

变性梯度凝胶电泳仪、GS800 高分辨光密度

扫描仪,美国 BIO-RAD 公司;HPLC-1260KW-804 液相色谱仪,美国 Agilent 公司;Millipore-Q 超纯水仪,美国 MILLIPORE 有限公司;AKTA 蛋白纯化仪,美国 GE 公司;ALVCGS-3 广角光散射仪,德国 ALV 公司。

1.4 试验方法

1.4.1 肌原纤维蛋白的提取 参考 Hashimoto 等^[14]的方法,称取 25 g 秘鲁鱿鱼胴体肉(去除鱼皮、骨头、内脏、眼球、尾巴等),加入 200 mL 磷酸盐缓冲液和 50 mL 1%曲拉通(Triton),用 IKA 组织匀浆机匀浆(1 000 r/min),整个匀浆过程在冰浴上进行,每匀浆 30 s 停 30 s,重复 5 次,最后一次得到的匀浆液用 2 层纱布过滤得到滤液,离心(冷冻离心机,8 000×g,10 min,4 °C),沉淀用 10 倍体积的缓冲液 B 漂洗,离心,将以上过程重复进行 3 次,最后所得沉淀即为肌原纤维蛋白。

1.4.2 肌原纤维蛋白溶液的制备 磷酸盐缓冲液先抽滤(0.22 μm 滤膜)再超声 30 min。将上述肌原纤维蛋白沉淀在 4 °C 下按一定的质量比充分溶解在磷酸盐缓冲液中后离心,取上清液过 0.45 μm 滤膜即为目标溶液。

1.4.3 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白浓度 采用 Brodford 法对肌原纤维蛋白进行定量,以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白。配置浓度梯度的牛血清蛋白溶液 1 mL,加入考马斯亮蓝染色液 5 mL,充分混匀反应 5 min,用紫外分光光度计测定溶液在波长 595 nm 处的吸光值,绘制标准曲线。根据标准曲线计算出肌原纤维蛋白的浓度。

1.4.4 秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白分离纯化 将提取得到的肌原纤维蛋白溶液过 HiTrap Q FF 16 离子交换层析,用含 0.15~1 mol/L KCl 的磷酸盐缓冲溶液进行梯度洗脱,洗脱流速为 3 mL/min,收集各峰洗脱液超滤浓缩脱盐,然后过 SurperdexTM 200 10/300 凝胶层析,用 1 mol/L KCl 的磷酸盐缓冲溶液进行洗脱,洗脱流速为 0.5 mL/min,收集各峰洗脱液超滤浓缩脱盐,进行纯度鉴定^[7]。

1.4.5 蛋白的 SDS-PAGE 分析

1.4.5.1 梯度胶的制备 按配方配制 6%~18%的梯度胶,然后用 BioRad 梯度胶灌胶器进行灌胶,制成蛋白变性单向电泳所用的梯度胶。

1.4.5.2 制样 用提取液及盐溶液将蛋白溶液稀

释至适合的倍数(3~5 mg/mL),然后按体积比 1:1 加入上样缓冲液,于沸水中煮沸 3~5 min。

1.4.5.3 上样 将 10 μ L 蛋白 Marker 及煮沸过的样品依次加入胶孔。

1.4.5.4 电泳 凝胶板通电电泳,30 min 后将电压由 70 V 调到 110 V,当溴酚蓝移动到离胶板下沿约 1 cm 时,停止电泳。

1.4.5.5 染色 取出凝胶放在考马斯亮蓝 G-250 染色液中染色 2 h 以上,过程中保护胶面不被污染。

1.4.5.6 脱色 将染好的凝胶放入脱色液中脱色至蛋白条带清晰。

1.4.5.7 胶图像扫描和分析 用 GS-800 光密度扫描仪对染色后的凝胶进行扫描(光学分辨率为 300 DPx,像素标准为 8 bits)。为保证重复性,对每个样品的蛋白质电泳重复 3 次。

1.4.6 HiTrap Q FF 16 离子交换层析 在温度为 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中,将提取得到的肌原纤维蛋白按照质量比 1:3 溶解在缓冲液 A 中,充分溶解过夜后离心 10 min (5 000 \times g,4 $^{\circ}$ C),取上清液过 0.45 μ m 的微孔滤膜;上样量 5 mL,起始缓冲液为缓冲液 A,洗脱缓冲液为缓冲液 B,速度为 2 mL/min,洗脱梯度为 30%,50%和 100%。

1.4.7 SurperdexTM 200 10/300 凝胶层析柱分离纯化 将离子交换层析得到的蛋白组分峰用 Millipore 超滤管(微孔超滤管)浓缩脱盐,再用 SurperdexTM 200 10/300 凝胶层析柱分离纯化,上样量 500 μ L,洗脱液用缓冲液 A,洗脱流速为 0.5 mL/min,用分步收集器收集,每管 0.5 mL。

1.4.8 HPLC 测定蛋白的纯度 利用高效液相色谱仪自带的 KW-804 凝胶蛋白柱(排阻极限为 10⁶ Pa)分离纯化,所需的流动相为缓冲溶液 A,在室温下以 0.5 mL/min 的速度进行分离,在波长 280 nm 处检测蛋白含量。

1.4.9 MALDI-TOF 蛋白的鉴定 收集经凝胶电泳分离得到的单一条带,重新溶解提取蛋白质,然后利用 MALDI-TOF/MS 对分离得到的蛋白质进行鉴定,并将获得的信息与数据库进行比对。

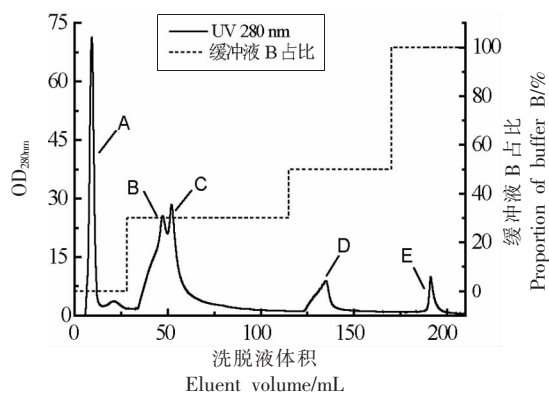
1.4.10 动态光散射粒径分析 利用激光光散射仪对纯化得到的蛋白质粒径进行表征,测量参数为(波长 628 nm,角度 90 $^{\circ}$,温度 25 $^{\circ}$ C),每次累积

30 s,平行测量 3 次。

2 结果与分析

2.1 离子交换层析分离蛋白的结果分析

如图 1 所示,经过离子交换层析分离后,肌原纤维蛋白溶液中总共分离出 5 个组分峰,峰 A 为没有被凝胶柱吸附的组分;峰 B 和 C 显示这两组分峰没有完全分开,但依然依次收集;峰 D 和 E 可单独收集,收集得到的各洗脱液取少量做 SDS-PAGE 检测,其余的用 Millipore 超滤管进行浓缩脱盐处理。



注:A. 流穿峰;B和C. 30%洗脱峰;D. 50%洗脱峰;E. 100%洗脱峰。

图 1 肌原纤维蛋白的分离洗脱曲线图

Fig.1 Isolation and elution diagram of myofibril protein

2.2 SDS-PAGE 凝胶电泳结果鉴定

由图 2 可知,电泳条带 A 中颜色较深的为肌动蛋白,较浅的条带为少量的副肌球蛋白和肌球蛋白重链;电泳条带 B 和 C 为 30%的洗脱液分离的组分峰,由于没有完全分离所以收集的时候界面不明确,导致电泳条带中两组分种类类似,都含有较多的副肌球蛋白、肌动蛋白和原肌球蛋白;电泳条带 D 中主要成分是肌动蛋白和原肌球蛋白;在电泳条带 E 中显示出单一条带,主要成分为肌动蛋白,分子质量为 44.3 ku。单纯选择离子交换层析技术分离肌原纤维蛋白,仅能从洗脱峰 E 中得到电泳纯的肌动蛋白,且纯化得到的蛋白量较少。而其它洗脱峰中肌动蛋白含量虽然高,但是不能得到较纯的单一蛋白质,因此还需要结合其它层析柱进一步分离纯化。

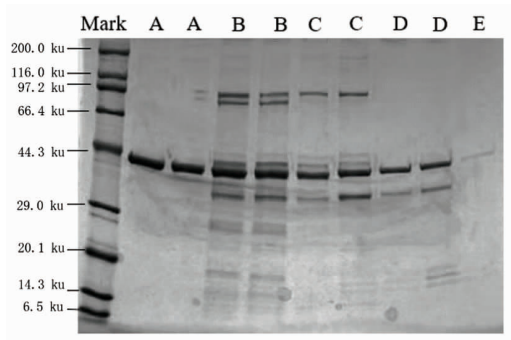


图2 离子柱分离得到的各洗脱液的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE electrophoretogram of each eluent obtained by ion column separation

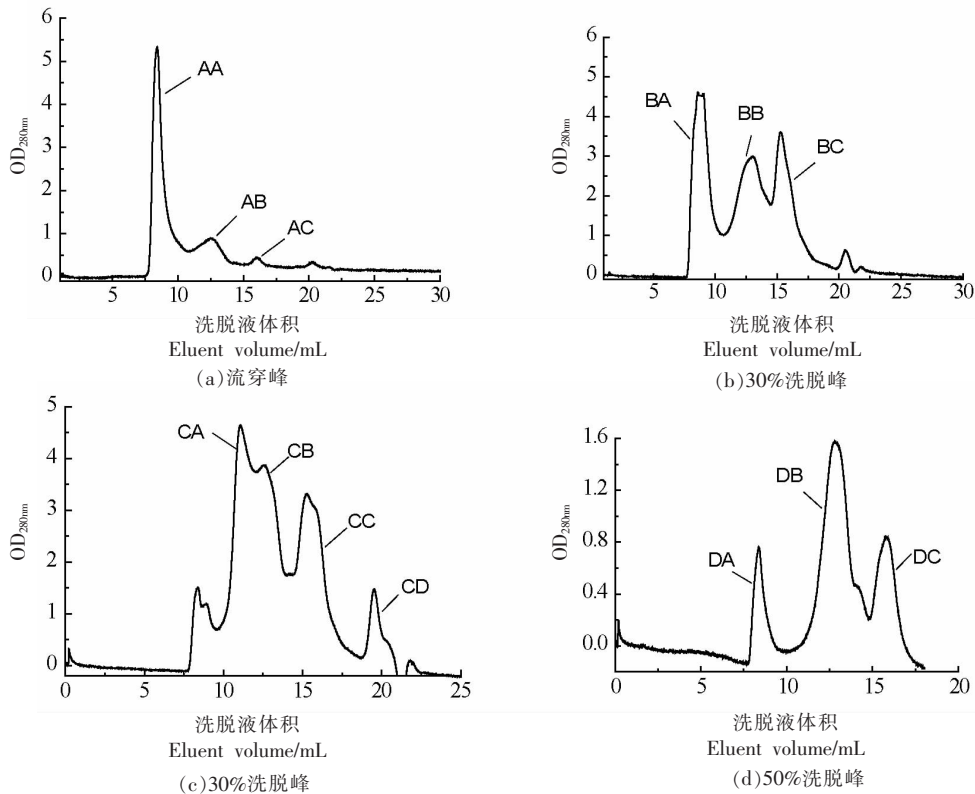


图3 凝胶柱分离肌原纤维蛋白的洗脱峰

Fig.3 Separation of elution peak from myofibrillar protein by gel column

2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

用 Millipore 超滤管 (截留分子质量为 10 ku) 浓缩经凝胶层析得到的所有洗脱峰用于 SDS-PAGE 进行纯度鉴定, 鉴定结果如图 4 所示。

如图 4 所示, 泳道 AA、AB、DA 和 DC 均显示出分子质量约 44.3 ku 的均匀单一条带。根据文献

2.3 凝胶层析柱分离纯化的结果分析

如图 3a 所示, 收集液 A 用凝胶柱分离后得到 3 个洗脱峰, 分别标记为 AA、AB 和 AC; 收集液 B 进一步分离得到 3~4 个洗脱峰, 由图 3b 可看出几个峰依然没有完全分离开; 而 50% 洗脱峰被进一步分离出 3 个峰, 分别被命名为 DA、DB、DC, 由图 3c (30% 洗脱峰) 可看出分离度良好。对比图 3a 和 3d 可以看出, 峰 AA 和 DA 被分离出时所需的洗脱液的体积和出峰位置相似, 初步猜测这两个峰可能含有相同的蛋白组分。收集每个洗脱峰溶液, 经浓缩脱盐后用于 SDS-PAGE 电泳鉴定。

可知, 这些条带均为电泳纯肌动蛋白。而 BA 泳道中不仅含有肌动蛋白还有较多的复肌球; 从 BC 泳道中分离得到了肌动蛋白、原肌球蛋白以及少量的副肌球蛋白; DB 峰只能得到肌动蛋白和原肌球蛋白的复合物; C 峰 (即 CA、CB、CC、CD 峰) 的副肌球蛋白、肌动蛋白和原肌球蛋白没有分离;

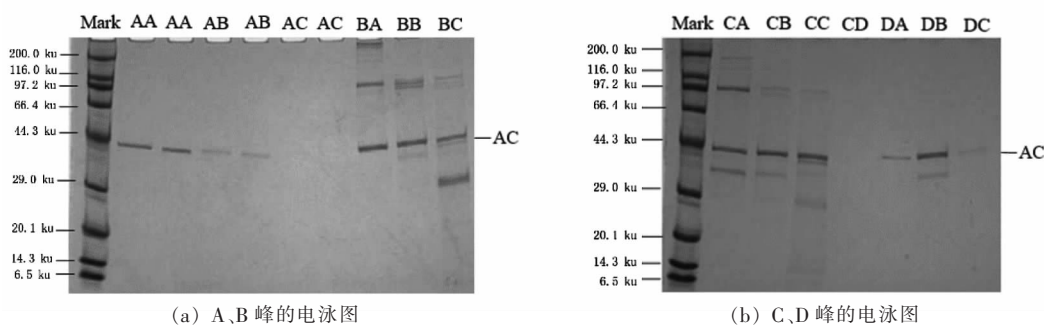


图 4 凝胶柱分离得到的各洗脱液的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE electrophoretogram of each eluent obtained by gel column separation

AC 峰未检测到蛋白质。

综上所述, 秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白经离子交换柱和凝胶色谱法柱联合处理后, 可从 AA、AB、DA 和 DC 洗脱液中得到较纯的肌动蛋白(电泳纯级)。

2.5 肌动蛋白的高效液相色谱洗脱峰分布

由以上结果可知, 肌动蛋白可从峰 AA、AB、DA 及 DC 中获得, 对于该蛋白纯度的检测, 以从 DA 峰中收集到的蛋白液为代表, 检测结果显示为单一、对称性良好的峰, 说明肌动蛋白在层析介质上是均一的(除去盐离子所引起的吸收峰)。

2.6 肌动蛋白的 MALDI-TOF-MS 鉴定及纯度分析

利用基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱分析分离纯化得到的肌动蛋白, 然后根据数据库比对, 获得肌动蛋白的信息(图 6)。

由表 1 可知, Mascot 峰值为 829, 而当 Mascot 峰值 ≥ 95 时即为鉴定成功, 说明经过离子交换色谱和凝胶色谱联合从肌原纤维蛋白中分离得到了电泳纯和色谱纯的肌动蛋白。

2.7 肌动蛋白粒径分布

由图 7 可知, 在 0.15 mol/L KCl 盐溶液条件下, 肌动蛋白光强度自相关衰减速度较快, 在弛豫时间为 1.64 ms 时达到最低点, 说明该溶液肌动蛋白溶解性良好。由图 8 可知, 肌动蛋白溶液的粒径分布呈单峰状态, 对称性好, 说明溶液体系比较均匀, 进一步间接说明本试验纯化的肌动蛋白相对纯净。肌动蛋白在 0.15 mol/L KCl 中的平均水力半径(Rh)为 3.46 nm, 这与 Kanzaki 等^[15]的测定结

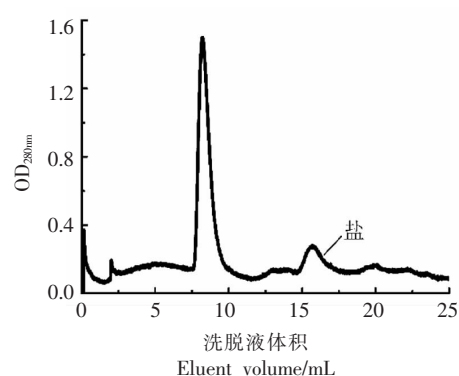


图 5 肌动蛋白的高效液相色谱分析

Fig.5 HPLC analysis of actin

果一致, 说明该方法获得的肌动蛋白保持了其天然的结构, 未发生变性聚集。

3 结论

整个分离纯化肌动蛋白流程中均没有加入蛋白酶抑制剂 EDTA, 提取液用磷酸盐缓冲液分步洗脱, 梯度 30%, 50%, 100%, 洗脱流速 2 mL/min, 肌原纤维蛋白过离子柱后, 获得 5 个洗脱峰, 100%洗脱峰 E 中获得电泳纯肌动蛋白, 其余的洗脱峰再进一步利用凝胶柱分离纯化, 在 A 峰和 D 峰中获得较高纯度的肌动蛋白; SDS-PAGE 和 HPLC 分析结果显示肌动蛋白为电泳纯级和色谱纯级蛋白, 经 MALDI-TOF-MS 进一步验证确定所得到的蛋白质为肌动蛋白。利用动态光散射多所获得的肌动蛋白进行了表征, 0.15 mol/L KCl 中光强自相关衰减速率较快, 弛豫时间 1.64 ms 处达到最小值, 肌动蛋白水力学半径(Rh)为 3.46 nm, 说

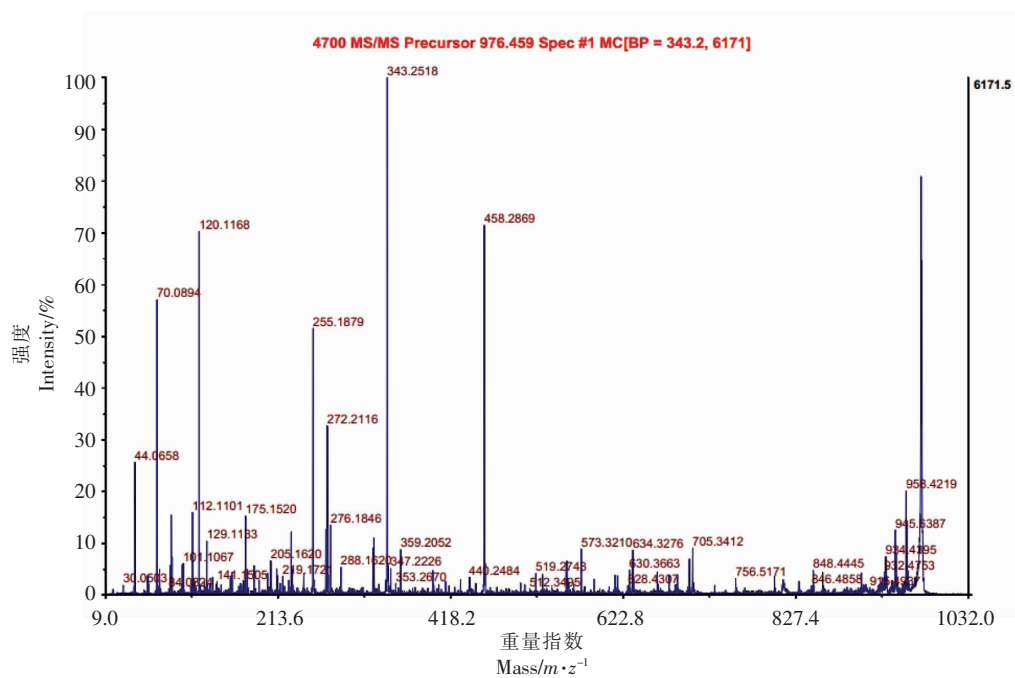


图6 肌动蛋白的 MS/MS 质谱图

Fig.6 MS/MS mass spectra of actin

表1 肌动蛋白的鉴定

Table 1 Identification of actin

蛋白点	登录号	蛋白名称	等电点(PI)	分子量/ku	肽段匹配数	Mascot 峰值
C2	AFQ22728.1	肌动蛋白	5.29	42 158	38	829

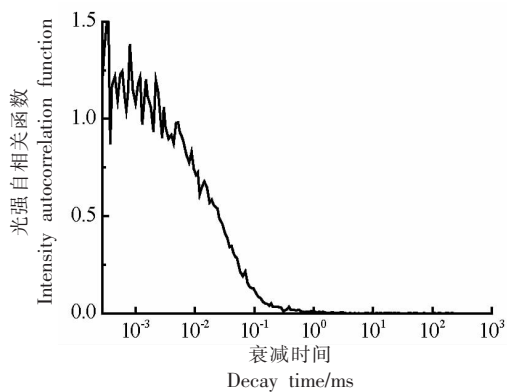
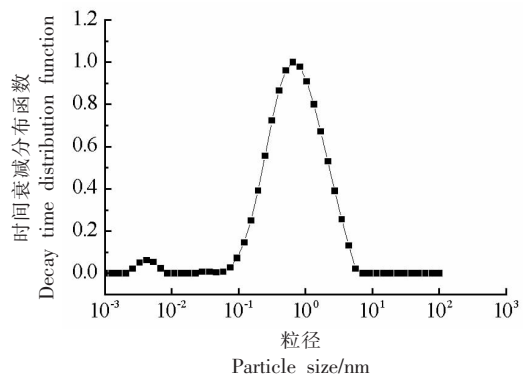


图7 肌动蛋白溶液的自相关函数分布

Fig.7 Autocorrelation function distribution of actin solution



注:肌动蛋白质量在 0.15 mol/L KCl 溶液中的平均水力半径(Rh)。

图8 肌动蛋白溶液的粒径分布图

Fig.8 Particle size distribution of actin solution

明获得的肌动蛋白保持了其天然结构,未发生变性聚集。本研究详细探讨了秘鲁鱿鱼肌动蛋白的

分离纯化,对进一步分析秘鲁鱿鱼蛋白之间的构效关系和产品开发具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 岳冬冬, 王鲁民, 郑汉丰, 等. 中国远洋鱿钓渔业发展现状与技术展望[J]. 资源科学, 2014, 36(8): 1686-1694.
YUE D D, WANG L M, ZHENG H F, et al. The status and technological expectations of distant-water squid jigging fisheries in China[J]. Resources Science, 2014, 36(8): 1686-1694.
- [2] ZHANG R, ZHOU R, PAN W C, et al. Salting-in effect on muscle protein extracted from giant squid (*Dosidicus gigas*) [J]. Food Chemistry, 2017, 215: 256-262.
- [3] 贾丽娜. 魔芋葡甘聚糖和脂肪影响罗非鱼肌原纤维蛋白凝胶性能的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
JIA L N. Effects of konjac glucomannan and fat on gel properties of tilapia myofibrillar protein [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [4] 金晶. 淡水鱼鱼糜制品脱腥技术及凝胶特性改良的研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2008.
JING J. Study on deodorization technology and gel properties improvement of freshwater fish surimi products[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2008.
- [5] 周逸, 金森, 徐亦及, 等. 秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白提取和加热条件对其凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 126-130.
ZHOU Y, JIN M, XU Y J, et al. Effects of extraction and heating conditions on gel characteristics of *Dosidicus gigas* myofibrillar protein[J]. Food Science, 2013, 34(14): 126-130.
- [6] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance[J]. Physiological Reviews, 1996, 76(2): 371-423.
- [7] 张秀真. 秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白分离纯化及相互作用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2017.
ZHANG X Z. Isolation, purification and interaction of myofibrillin from squid of Peru [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2017.
- [8] EISENBERG DAVID D C. Physical chemistry with applications to life sciences [M]. Menlo Park: The Benjamin/Cummins, 1979: 868.
- [9] NIU F G, YU J, ZHANG R, et al. Properties of nano protein particle in solutions of myofibrillar protein extracted from giant squid (*Dosidicus gigas*) [J]. Food Chemistry, 2020, 330: 127254.
- [10] 林伟伟, 励建荣, 潘伟春, 等. 秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白凝胶的构效关系研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(1): 39-46.
LIN W W, LI J R, PAN W C, et al. The study of the relationship between the structure and properties of *Dosidicus gigas* myofibrillar protein gel[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(1): 39-46.
- [11] 廖慧琦, 吕春霞, 陆益钡, 等. 食盐添加量对养殖大黄鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(20): 67-71.
LIAO H Q, LÜ C X, LU Y B, et al. Effects of salt concentration on gel properties of cultured large yellow croaker surimi[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(20): 67-71.
- [12] 韩柯颖, 魏苏萌, 杨玉玲, 等. 响应面法优化微波加热制备肌原纤维蛋白凝胶工艺[J]. 肉类研究, 2020, 34(9): 31-38.
HAN K Y, WEI S M, YANG Y L, et al. Optimization of microwave-assisted preparation of heat-induced myofibrillar protein gel by response surface methodology[J]. Meat Research, 2020, 34(9): 31-38.
- [13] 李钊, 李宁宁, 刘玉, 等. 超高压对肌原纤维蛋白结构及其凝胶特性影响的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(21): 304-309.
LI Z, LI N N, LIU Y, et al. Advances on the effects of ultra-high pressure on myofibrillar protein structure and its gel properties[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(21): 304-309.
- [14] HASHIMOTO K, WATABE S, KONO M, et al. Muscle protein composition of sardine and mackerel [J]. Nihon Suisan Gakkaishi, 1979, 45(11): 1435-1441.
- [15] KANZAKI N, UYEDA T Q, ONUMA K. Inter-molecular interaction of actin revealed by a dynamic light scattering technique [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110(6): 2881-2887.

Isolation, Purification and Structural Exploration of Actin from *Dosidicus gigas*

Niu Fuge, Hu Demei, Zhang Xiuzhen, Du Yixuan, Zhang Bin, Ma Shuang, Pan Weichun*
(School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

Abstract Objective: To establish a method for isolating and purifying actin from *Dosidicus gigas* myofibrillary protein and realize the batch preparation of actin. Method: The mixed protein of myofibrillar was extracted from *Dosidicus gigas* by phosphate buffer. The protein extracted from the squid was separated by anion exchange chromatography with only a small charge difference. Then the gel filtration chromatography was used to remove the small molecules in the mixture, such as desalination, and then purified by macromolecular protein purification. The purified protein was obtained with high purity (AC). SDS-PAGE, HPLC and MALDI-TOF-MS were used to identify the purity and molecular weight of the isolated protein. The particle size distribution of actin in the solution was characterized by light scattering technique. Results: In this paper, actin with high purity was extracted from myofibrillar protein, and the hydraulic radius (Rh) of actin was 3.46 nm. Conclusion: A new method for isolation and purification of actin in myofibrillar protein was preliminarily established, which provided support for the batch preparation of actin.

Keywords *Dosidicus gigas*; myofibrillar protein; actin; extraction and isolation; purity identification