

三相法分离番薯过氧化物酶

蔡燕, 姜路云, 陈华旺, 韩丽玮*, 吴锦明
(南通大学化学化工学院, 江苏南通 226019)

摘要:采用三相法(TPP)分离纯化番薯过氧化物酶(SPP),以番薯过氧化物酶的酶活回收率和纯化倍数为优化目标,分别利用单因素法和响应面分析法对其影响因素进行考察。建立了最佳提取条件:以叔丁醇作溶剂、硫酸铵饱和度为 66%、粗提物与叔丁醇体积比为 1.0:1.13、温度为 26℃、pH=5.0,在最优提取条件下,其酶活回收率和纯化倍数分别达 133.5%和 3.5。SDS-PAGE 电泳分析结果显示 SPP 酶蛋白主要为一条带,其分子质量约为 40 kDa 左右。三相法操作简便、耗时短、成本低,此外分离过程增强了 SPP 酶与底物的亲和力,提高了酶活回收率,有利于工业化应用。

关键词:三相分离;番薯过氧化物酶;酶活回收率;纯化倍数;响应面分析

中图分类号:Q554

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2019)07-0127-06

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2019.07.027

Separation of peroxidase from sweet potato by three-phase partitioning method

CAI Yan, JIANG Lu-yun, CHEN Hua-wang, HAN Li-wei*, WU Jin-ming

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong 226019, China)

Abstract: Sweet potato peroxidase (SPP) is separated and purified by three-phase partitioning (TPP) method. The recovery rate and purification ratio of sweet potato peroxidase are optimized by single factor method and response surface analysis. The optimal extraction conditions are established as follows: *t*-butyl alcohol is used as solvent, the saturation of ammonium sulfate is 66%, the volumetric ratio of crude solution to *t*-butyl alcohol is 1.0:1.13, the temperature is set at 26°C and pH is 5.0. Under these optimal conditions, the purification efficiency of sweet potato peroxidase can reach 3.5 times and the activity recovery can be 133.5%. It is shown by SDS-PAGE that SPP enzyme protein is a single band with a molecular weight of around 40 kDa. TPP is a simple, quick, low cost and very attractive process for primary purification of SPP and has a big potential use for industrial applications.

Key words: three-phase partitioning; sweet potato peroxidase; activity recovery; purification factor; response surface analysis

过氧化物酶(Peroxidase, POD, EC1.11.1.7)是广泛存在于自然界的一类氧化还原酶,催化有过氧化氢参与的多种氧化反应,属含血红素的氧化酶。2007年,Alpeeva等发现番薯过氧化物酶(sweet potato peroxidase, SPP)较辣根过氧化物酶在分析检测反应中具有更高的灵敏度,且发光时间长、稳定性高^[1]。目前番薯过氧化物酶在环保行业、食品工业、医疗诊断、生物传感器等行业应用普遍^[2]。通常利用丙酮分级分离、双水相萃取方法将过氧化物酶初步分离,再利用硫酸铵分级沉淀法进一步纯化。但这些分离提纯方法存在操作过程复杂、耗时长、失酶量大、提取率低等缺点。近年来,三相法逐步取代盐析法应用于酶的分离纯化,是指在粗酶液中加入盐和有机溶剂并将其混匀,离心静置后分层形成三相,上层有机相是有机溶剂,中间沉淀相是酶蛋白沉

淀,下层水相主要包含极性化合物。三相法操作简便、耗时短,真正做到了一步分离,酶活回收率和纯化倍数也较其他多步分离方法高,有利于工业化应用^[3-7]。目前尚未见关于利用三相法分离纯化番薯过氧化物酶的研究报道。

笔者采用三相法分离纯化番薯过氧化物酶,以 SPP 的酶活回收率和纯化倍数为优化目标,利用单因素法和响应面分析法对三相分离的影响因素进行考察和优化。通过扫描电镜(SEM)观察分析了酶蛋白沉淀的微观结构,并利用 SDS-PAGE 电泳测得了 SPP 的分子质量。

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料与试剂

番薯(本地超市购买)。无水乙醇、叔丁醇、正

收稿日期:2018-10-28;修回日期:2019-05-15

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20150401);南通大学大型仪器开放基金(KFJN1806)

作者简介:蔡燕(1983-),女,博士,副教授,研究方向为生物技术,yancai2010@ntu.edu.cn;韩丽玮(1986-),女,博士,讲师,研究方向为金属有机配合物,通讯联系人,lwhan@ntu.edu.cn。

丁醇、乙腈、异丙醇、1,4-丁二醇、硫酸铵、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、愈创木酚、氢氧化钠、盐酸、乙二胺四乙酸二钠、碳酸氢钠、氯化钠, AR, 国药集团化学试剂有限公司生产;考马斯亮蓝(G250)、牛血清蛋白, 索莱宝生物生产。

1.2 仪器

80-1 型医用离心机, 江苏新康医疗器械有限公司生产; XK96-A 型快速混匀器, 上海磊固仪器有限公司生产; TU-1901 型紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司生产; PH-100A/100B 笔式 pH 计, 邦西仪器科技上海有限公司生产; EVO18 扫描电子显微镜, 德国蔡司公司生产。

2 实验方法

2.1 番薯过氧化物酶粗提液的制备

将新鲜番薯皮洗净晒干, 用搅拌器粉碎, 过 200 目筛。取适量搅碎的番薯皮加入其 4 倍体积的蒸馏水, 室温浸泡 2 h 后, 用 4 层纱布过滤并收集滤液, 将其所剩滤渣复提 1 次, 再合并 2 次所得滤液, 在 4 000 r/min 下离心 10 min, 收集上层清液即为番薯过氧化物酶粗提液, 放入 4℃ 冰箱中保存备用。

2.2 三相法分离纯化番薯过氧化物酶

取一定体积的粗提液, 边震荡边加入研磨后的硫酸铵使粗提液达到一定饱和度, 持续震荡 2 min 使其完全溶解, 按一定体积比加入有机溶剂用混匀器混匀后于室温静置 1 h, 逐渐形成三相体系。将体系在 4 000 r/min 下离心 10 min, 使中间相浓缩成片状蛋白沉淀。除去上层有机相和下层水相, 并收集中间沉淀相, 依次用少量清水和缓冲液淋洗, 即得番薯过氧化物酶。用适量 pH = 6.0 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 使中间沉淀相溶解, 蒸馏水稀释定容至 10 mL, 对其酶活和蛋白浓度进行测定分析。

分别考查溶剂类型、硫酸铵饱和度 (30% ~ 80%)、溶剂用量 (1 ~ 8 mL)、温度 (20 ~ 40℃)、pH (3 ~ 8) 等因素对番薯过氧化物酶的酶活回收率和纯化倍数的影响。

2.3 响应面分析法优化三相分离提取工艺

在单因素考察结果的基础上, 选取叔丁醇用量 (A)、硫酸铵饱和度 (B)、温度 (C) 3 个因素为自变量, 以酶活回收率和纯化倍数为响应值, 进行 3 因素 3 水平的响应面分析。利用 Design-Expert 8.0.6 Trial 应用软件对实验进行设计, 并对响应结果进行分析处理^[8-9]。响应面分析因素与水平如表 1

所示。

表 1 响应面分析因素水平表

水平	叔丁醇用量(A)/mL	硫酸铵饱和度(B)/%	温度(C)/℃
-1	2	50	20
0	4	60	25
1	6	70	30

2.4 番薯过氧化物酶活力的测定

利用愈创木酚法测定番薯过氧化物酶的活力^[2]。取 2.0 mL 含 0.045 mol/L 愈创木酚和 0.05 mol/L 的过氧化氢, pH = 6.0 的 PBS 缓冲液, 再加入 100 μL 酶液。利用紫外-可见分光光度计检测在 90 s 时 SPP 在 470 nm 处的吸光度变化值。

酶活力的定义: 以 25℃ 下每分钟转化 1 μmol 底物定义为一个酶活单位 (U)。

2.5 蛋白浓度的测定

采用 Bradford 法进行测定, 以牛血清蛋白 (BSA) 为标准蛋白^[10]。

2.6 扫描电镜分析 (SEM)

将粗酶液、三相分离法得到的中间沉淀相和三相分离过程得到的下层水相进行透析处理, 真空冷冻干燥 24 h, 用 S-4800 型高分辨场发射扫描电镜对其蛋白沉淀的结构进行观测及分析。

2.7 SDS-PAGE

SDS-PAGE 采用 Laemmli 法进行测定^[11]。

3 结果与讨论

3.1 三相分离的单因素优化

3.1.1 溶剂对 SPP 三相分离结果的影响

通过正丁醇、乙腈、叔丁醇、异丙醇和 1,4-丁二醇考察有机溶剂对 SPP 三相分离效果的影响, 结果如表 2 所示。由表 2 可以看出, 在硫酸铵饱和度为 60%、pH = 5.0、温度为 20℃、溶剂用量与粗酶液等体积条件下, 用叔丁醇作溶剂时酶活回收率和纯化倍数达最高, 分别为 130.8% 和 2.4。叔丁醇可以降低体系的介电常数, 增大酶蛋白上带电基团间的静电作用力, 促使其发生聚集而形成三相。此外, 叔丁醇有较高的分子尺寸而不会渗透到酶蛋白折叠的三维结构内, 因此不会引起酶的变性^[12]。三相法大大提高了 SPP 的酶活回收率 (大于 100%), 这是由于在三相分离过程中改变了酶的构象, 使其变得与底物更为亲和。

表2 溶剂对 SPP 三相分离的影响

有机溶剂	酶活回收率/%	纯化倍数
正丁醇	113.5±2.08	2.4±0.06
乙腈	120.8±2.05	2.3±0.07
叔丁醇	130.8±1.73	2.4±0.04
异丙醇	68.7±2.45	2.0±0.04
1,4-丁二醇	12.4±2.43	1.2±0.03

3.1.2 硫酸铵饱和度对 SPP 三相分离结果的影响

硫酸铵饱和度在三相分离中起着重要作用,因其负责蛋白间的相互作用,利用盐析机理使蛋白沉淀。在快速震荡、pH=5.0、温度为20℃的条件下,改变硫酸铵饱和度从30%增加至80%,并按体积比1:1加入叔丁醇。硫酸铵饱和度对 SPP 三相分离的影响如表3所示。由表3可以看出,随着(NH₄)₂SO₄饱和度的增加,SPP的酶活回收率和纯化倍数在饱和度为60%时达最高点,分别为139.5%和2.7。(NH₄)₂SO₄饱和度进一步增加时,中间相的 SPP 的选择性分配减少,酶活回收率和纯化倍数降低,也许是过高的硫酸铵饱和度会导致酶失活的原因。

表3 硫酸铵饱和度对 SPP 三相分离的影响

硫酸铵饱和度/%	酶活回收率/%	纯化倍数
30	13.4±1.83	0.9±0.02
40	38.8±4.87	1.0±0.03
50	81.6±2.56	1.8±0.045
60	139.5±1.22	2.6±0.05
70	135.3±1.02	2.5±0.07
80	126.1±3.76	2.3±0.03

3.1.3 叔丁醇用量对 SPP 三相分离结果的影响

在硫酸铵饱和度为60%、pH=5.0、温度为20℃时,粗提液与叔丁醇的体积比对 SPP 三相分离的影响如表4所示。由表4可以看出,随着叔丁醇用量的增加,SPP的酶活回收率和纯化倍数均先增加后减少,体积比为1:1时酶活回收率和纯化倍数达最高,分别为128.0%和1.8。体系中加入叔丁醇后,

表4 叔丁醇用量对 SPP 三相分离的影响

V(粗提液):V(叔丁醇)	酶活回收率/%	纯化倍数
4:1	88.1±1.89	1.3±0.05
2:1	100.8±2.32	1.5±0.04
1:1	128.0±1.77	1.8±0.04
1:1.5	125.5±2.39	1.7±0.04
1:2	75.4±1.06	1.5±0.04

其从水相中吸引了更多的水,水相中的盐浓度增加,使酶蛋白在界面处沉淀。但继续增加叔丁醇用量,两相之间的浓度梯度减小,反而降低了 SPP 的分离效果。

3.1.4 温度对 SPP 三相分离结果的影响

温度是影响酶和体系整体稳定性的重要参数。在粗酶与叔丁醇体积比为1:1、硫酸铵饱和度为60%、pH=5.0的条件下,温度对 SPP 三相分离结果的影响如表5所示。由表5可以看出,随着温度的升高,酶活回收率和纯化倍数先增加后减小。在25℃时 SPP 的酶活回收率和纯化倍数达最高,分别为123.6%和3.3。在20~25℃条件下,叔丁醇会产生明显的渗透性和拥挤效应,增强 SPP 的分配,而温度为25℃以上时,渗透和拥挤效应明显减弱,酶的热失活反而使酶活性和纯化因子降低^[11]。

表5 温度对 SPP 三相分离的影响

温度/℃	酶活回收率/%	纯化倍数
20	117.6±1.26	3.1±0.06
25	123.6±1.28	3.3±0.06
30	99.6±1.54	2.9±0.05
35	66.4±1.68	2.4±0.04
40	39.1±1.98	1.8±0.05

3.1.5 pH 对 SPP 三相分离结果的影响

pH的变化促进了目标蛋白质净电荷的变化并影响蛋白质的分配行为^[13]。在(NH₄)₂SO₄饱和度为60%、粗酶液与叔丁醇体积比为1:1、温度为25℃的条件下,研究不同pH(3~8)对番薯过氧化物酶三相分离的影响,结果如表6所示。由表6可以看出,在pH=5.0时获得了最高酶活回收率和纯化倍数,分别为133.9%和3.4,所以pH=5.0为三相分离中的最佳验点。

表6 pH对 SPP 三相分离的影响

pH	酶活回收率/%	纯化倍数
3	10.3±1.47	0.3±0.03
4	117.0±4.50	2.6±0.18
5	133.9±1.33	3.4±0.21
6	128.0±1.85	3.1±0.05
7	122.2±2.17	2.9±0.15
8	112.5±1.0	3.2±0.07

3.2 响应面分析法优化 SPP 三相分离提取工艺

试验组的试验方案及结果如表7所示。回归模型方差分析结果如表8所示。

表 7 响应面分析结果

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
A/mL	4	2	4	2	2	6	4	4	6	2	4	4	6	4	6	4	4
B/%	60	60	60	60	50	60	60	50	60	70	50	60	50	70	70	60	70
C/°C	25	20	25	30	25	30	25	20	20	25	30	25	25	20	25	25	30
酶活回收率/%	125.60	75.81	131.00	104.90	12.30	106.80	124.00	39.53	112.80	109.30	33.56	123.80	88.18	104.50	107.50	123.00	116.60
纯化倍数	3.4	1.9	3.3	2.2	1.5	2.9	3.3	1.4	2.7	2.8	1.7	3.3	2.5	2.7	3.3	2.9	3.0

表 8 回归模型方差分析表

方差来源	平方和		自由度		均方和		F 值		P 值	
	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂
A	1299.28	1.1	1	1	1299.28	1.1	45.07	49.75	0.0003	0.0002
B	9474.52	2.82	1	1	9474.52	2.82	328.69	127.94	<0.0001	<0.0001
C	105.73	0.15	1	1	105.73	0.15	3.67	6.69	0.0970	0.0361
AB	1546.02	0.058	1	1	1546.02	0.058	53.63	2.61	0.0002	0.1502
AC	305.57	4.84×10 ⁻⁴	1	1	305.57	4.84×10 ⁻⁴	10.60	0.022	0.0139	0.8865
BC	81.13	2.10×10 ⁻⁴	1	1	81.13	2.10×10 ⁻⁴	2.81	9.53×10 ⁻⁴	0.1373	0.9250
A ₂	391.83	0.26	1	1	391.83	0.26	13.59	11.65	0.0078	0.0112
B ₂	5518.42	0.96	1	1	5518.42	0.96	191.45	43.39	<0.0001	0.0003
C ₂	1034.42	1.42	1	1	1034.42	1.42	35.89	64.49	0.0005	<0.0001
残差	201.77	0.15	7	7	28.82	0.022				
失拟项	163.14	0.024	3	3	54.38	8.16×10 ⁻⁴	5.63	0.25	0.0642	0.8573
纯误差	38.63	0.13	4	4	9.66	0.033				
总离差	20502.08	7.19	16	16						
模型	20300.30	7.04	9	9	2255.59	0.78	78.25	35.42	<0.0001	<0.0001

注:Y₁ 为酶活回收率;Y₂ 为纯化倍数。

以酶活回收率和纯化倍数为评价指标,分别对自变量叔丁醇用量(A)、硫酸铵饱和度(B)、温度(C)进行二次方程拟合,得到二次回归模拟方程:

$$\text{酶活回收率}(Y_1) = 125.4 + 12.74A + 34.41B + 3.64C - 19.66AB - 8.74AC + 4.50BC - 9.65A_2 - 36.20B_2 - 15.67C_2$$

$$\text{纯化倍数}(Y_2) = + 3.25 + 0.37A + 0.59B + 0.14C - 0.12AB - 0.011AC + 0.00725BC - 0.25A_2 - 0.48B_2 - 0.58C_2$$

由表 8 方差分析可以看出,对于酶活回收率该模型达到显著(P<0.01)。二次回归模型中的决定系数是 A、B、AB、A₂、B₂、C₂,其 Prob>F 值分别为 0.0003、<0.0001、0.0002、0.0078、<0.0001、0.0005,即叔丁醇用量和硫酸铵饱和度对三相法提取番薯过氧化物酶的影响较大,硫酸铵饱和度的影

响较为显著。

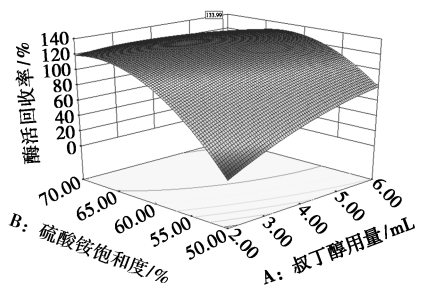
对于纯化倍数,此模型达到显著(P<0.01),二次回归模型中的决定系数是 A、B、B₂、C₂,其 Prob>F 值分别为 0.0002、<0.0001、0.0001、<0.0001,即硫酸铵饱和度和温度对三相法提取番薯过氧化物酶的影响较大,而硫酸铵饱和度的影响较为显著。

二次回归模拟方程的“Prob>F”值小于 0.01,表明该模拟二次方程非常显著,且失拟项不显著,该回归方程拟合程度非常好。同时,利用响应面分析法所得到的二次回归方程是精确、可信的,可以利用该方程模拟真实的 3 因素 3 水平的分析。

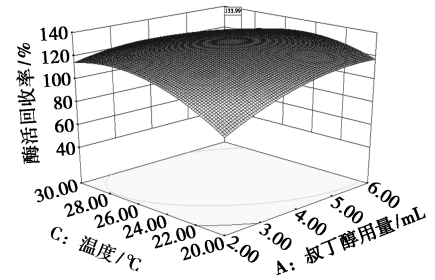
3.2.1 各因子交互作用对 SPP 酶活回收率的影响

各因子交互作用对 SPP 酶活回收率的交互影响如图 1 所示。

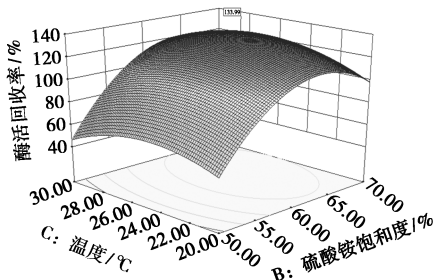
由图 1 可以看出,温度和硫酸铵饱和度的交互



(a) 叔丁醇用量和硫酸铵饱和度的交互



(b) 叔丁醇用量和温度的交互



(c) 硫酸铵饱和度和温度的交互

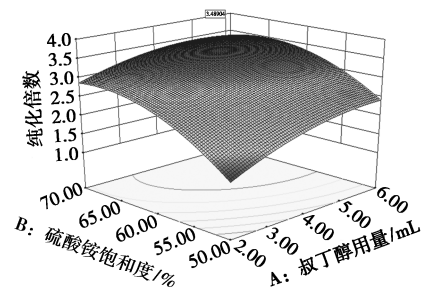
图1 各因子交互作用对SPP酶活回收率的交互影响

作用对酶活回收率的影响较大。由等高线图可以看出,沿硫酸铵饱和度轴向的等高线变化密集,而沿温度轴向等高线变化稀疏,说明硫酸铵饱和度对酶活回收率大小的影响比温度更大。由 Box-Behnken Design 软件分析得到较高酶活回收率的三相分离提取的最佳工艺结果为:叔丁醇用量为 4.06 mL(粗酶液体积为 4 mL),硫酸铵饱和度为 64.91%,温度为 25.87℃,理论上预测酶活回收率大小为 133.5%。

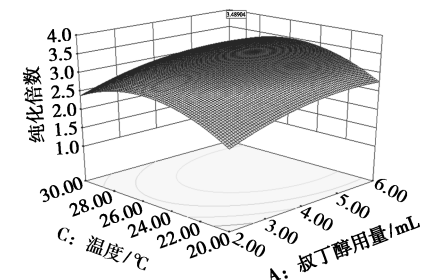
3.2.2 各因子交互作用对 SPP 纯化倍数的影响

各因子交互作用对 SPP 纯化倍数的交互影响如图 2 所示。

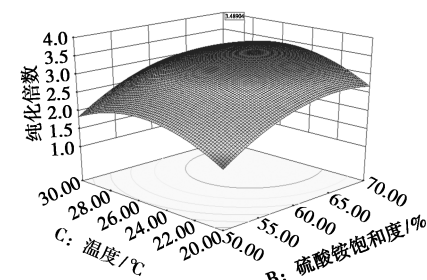
由图 2 可以看出,硫酸铵饱和度和叔丁醇的交互作用对纯化倍数的影响较大。由等高线图中可以看出,沿叔丁醇用量轴向的等高线变化密集,而沿硫酸铵饱和度轴向的等高线变化稀疏,说明叔丁醇用量比硫酸铵饱和度更能影响纯化倍数的大小。由 Box-Behnken Design 软件分析得到较高纯化倍数的三相分离提取的最佳工艺结果为:叔丁醇用量为



(a) 叔丁醇用量和硫酸铵饱和度的交互



(b) 叔丁醇用量和温度的交互



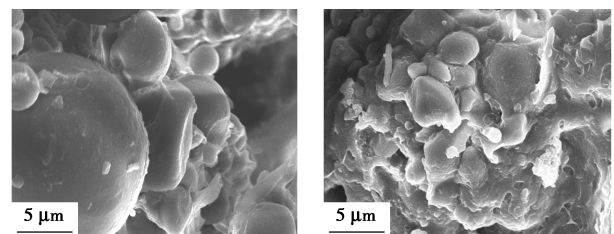
(c) 硫酸铵饱和度和温度的交互

图2 各因子交互作用对SPP纯化倍数的交互影响

4.8 mL(粗酶液体积 4 mL),硫酸铵饱和度为 64.59%,温度为 25.49℃,理论上预测纯化倍数大小为 3.5。

3.3 扫描电镜(SEM)形貌分析

粗提法和三相法所得 SPP 酶的 SEM 图如图 3 所示。



(a) 粗提取液

(b) 三相分离法纯化

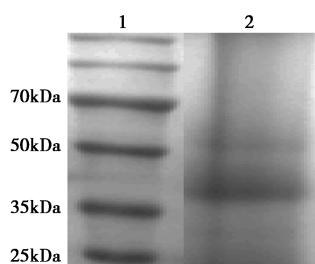
图3 粗提法和三相法所得SPP酶的SEM图

由图 3 可以看出,粗提液中 SPP 酶蛋白沉淀的微观形态结构为聚集在一起的球状颗粒。而三相分离法形成的 SPP 酶蛋白沉淀的微观形态结构主要为光滑的片状结构。三相分离法所得的 SPP 是由

于硫酸铵和叔丁醇的共同作用,受多方面作用力影响而形成较明显的片状结构,并迁移到中间相并沉淀。

3.4 SDS-PAGE 电泳分析

将三相分离法所得的 SPP 溶液进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,番薯过氧化物酶的分子质量大小为 40 kD 左右,该分子质量在不同来源的过氧化物酶的分子质量范围之内^[14-15]。三相法分离所得到的酶蛋白沉淀的球状颗粒周围的杂蛋白含量相较于粗提液明显要少。



1—标准蛋白;2—三相分离法纯化的 SPP

图 4 SPP 的 SDS-PAGE 电泳图谱

4 结论

以酶活回收率和纯化倍数为考察指标,对三相法提取番薯过氧化物酶的工艺条件进行优化。在单因素实验的基础上,选取叔丁醇用量、硫酸铵饱和度、温度 3 个因素为自变量,以酶活回收率和纯化倍数为响应值,根据 Box-Behnken 设计原理,采用 3 因素 3 水平的响应面分析法确定最佳工艺。结果表明,以叔丁醇为溶剂,在硫酸铵饱和度为 66%,粗提物与叔丁醇体积比为 1.0:1.13,温度为 26℃,pH = 5.0 的条件下,其酶活回收率和纯化倍数分别达 133.5% 和 3.5。三相法操作简便、耗时短、成本低,此外分离过程增强了 SPP 酶与底物的亲和力,大大提高了酶活回收率,有利于工业化应用。

参考文献

- [1] Alpeeva I, Sakharov I. Liminol-hydrogen peroxide chemiluminescence produced by sweet potato peroxidase [J]. *Luminescence*, 2007, 22(2): 92-96.
- [2] Leon J, Alpeeva I, Chubar T, et al. Purification and substrate specificity of Peroxidase from sweet potato tubers [J]. *Plant Science*, 2002, 163(5): 1011-1019.
- [3] Kosman J, Juskowiak B. Peroxidase-mimicking DNazymes for biosensing applications; A review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 707(1-2): 7-17.
- [4] Patil P, Yadav G. Application of microwave assisted three phase partitioning method for purification of laccase from *Trametes hisuttia* [J]. *Process Biochemistry*, 2018, 65: 220-227.
- [5] Mangesh D, Virendra K. Three phase partitioning: A novel technique for purification of peroxidase from orange peels [J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2015, 94: 284-289.
- [6] Yan J, Wang Y, Qiu W, et al. Ultrasound synergized with three-phase partitioning for extraction and separation of corbicula fluminea polysaccharides and possible relevant mechanisms [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2018, 40: 128-134.
- [7] Yadav N, Gupta M, Khare S. Three phase partitioning and spectroscopic characterization of bioactive constituent from halophilic *Bacillus subtilis* EMB M15 [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 242: 283-286.
- [8] Li D, Zheng D, Cao Z. Response surface methods for slope reliability analysis: Review and comparison [J]. *Engineering Geology*, 2016, 203(25): 3-14.
- [9] Yusri I, Majeed A, Mamat R, et al. A review on the application of response surface method and artificial neural network in engine performance and exhaust emissions characteristics in alternative fuel [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 90: 665-686.
- [10] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(s 1-2): 248-254.
- [11] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [12] Wang S, Wu P, Han Z. Random conjugated polybenzazole copolymers; Synthesis, characterization, and exciton confinement effects in photophysical properties [J]. *Journal of Materials Science*, 2004, 39(8): 2717-2726.
- [13] Dennison C, Lovrien R. Three phase partitioning: Concentration and purification of proteins [J]. *Protein Expression & Purification*, 1997, 11(2): 149.
- [14] Zhang Z, Lai J, Wu K. Peroxidase-catalyzed chemiluminescence system and its application in immunoassay [J]. *Talanta*, 2018, 180: 260-270.
- [15] Vetal M, Rathod V. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (citrus sinenses) [J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2014, 94: 284-289.
- [16] Duman Y, Kaya E. Purification, recovery, and characterization of chick pea (*cicer arietinum*) β -galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique [J]. *Protein Expression and Purification*, 2013, 91: 155-160. ■