

绿豆中胰蛋白酶抑制子的纯化及部分性质的研究

游勇来¹, 陈中²

(1. 从化出入境检验检疫局综合技术服务中心, 广东 从化 510900)

(2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本文研究将绿豆经过粉碎、过筛和正己烷脱脂后, 采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换、Sephacryl S-200 凝胶过滤等方法, 对其中的胰蛋白酶抑制因子进行了分离纯化。然后研究了所纯化出的胰蛋白酶抑制子的 pH 和温度稳定性, 实验结果表明: 在 20~100 °C 的范围和 pH 2.2~10.2 范围内, 胰蛋白酶抑制因子性质较稳定。

关键词: 绿豆; 蛋白酶抑制子; 抑制子活力

中图分类号: R284.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078 (2007)05-0008-04

Study on the Purification and Properties of Trypsin Inhibitor (TI) in Mungbean

YOU Yong-lai¹, CHEN Zhong²

(1. Conghua Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Conghua 510900, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: By $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation, DEAE-Sepharose CL-6B anion-exchange chromatographs and Sephacryl S-200 gel filtration, trypsin inhibitor(TI) was purified from degrease Mungbean powder. Then the stability of TI was studied. It was showed that the activity of TI was not obviously changed at temperature of 20~100 °C and with pH value of 2.2~10.2.

Key words: mung bean; trypsin inhibitors; inhibitor activity

绿豆不但含有丰富的蛋白质、碳水化合物, 而且含有核黄素、尼克酸、胡萝卜素等多种维生素及钾、钙等矿物质, 具有清热、消暑、解毒、降压明目、保肝和降低血脂、胆固醇、软化血管等功效。但是, 由于它含有胰蛋白酶抑制因子、植酸、胀气因子、促甲状腺肿因子及血球凝集素和脂肪氧化酶等抗营养因子, 有碍营养素的吸收, 导致身体的不适或豆制品感官上的缺陷, 其中的胰蛋白酶抑制因子在生理上有抑制胰蛋白酶的作用, 会引起胰脏的肿大等不良反应。因此, 只有在去除豆类中的不良因素后再生产豆制品, 才能有效地利用豆类蛋白资源。

1 材料与方法

1.1 材料

原料: 绿豆粉: 市售绿豆, 粉碎过 60 目

试剂: 苯甲基磺酰氟(PMSF), β -巯基乙醇(β -Me) 迭氮钠, 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 丙烯酰胺(Acr),

收稿日期: 2007-01-18

作者简介: 游勇来(1977-), 男, 主要从事进出口食品安全质量控制和敏感成分的性质研究

聚乙二醇(PEG-6000), 二甲亚砜, 甲叉双丙烯酰胺(Bis), 过硫酸铵(AP), N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED), $\text{N}\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride(BAPNA), DEAE-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200 High Resolution, 胰蛋白酶(Trypsin)(活力为 5000 BAEE/mg), Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0), 磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0)。

仪器与设备: 粉碎机, 721 分光光度计, 电泳仪, 台式冷冻高速离心机, 蛋白质纯化系统, WatersTM 650E (Advanced Protein Purification System), Waters AP-1 colume (Protein-PakTM DEAE 15HR)。

1.2 方法

1.2.1 绿豆粉中蛋白酶抑制子的提取纯化

1.2.1.1 硫酸铵分级沉淀

将硫酸铵加入到粗提取液中, 使硫酸铵浓度达到 30%, 冷藏过夜, 4 °C 时 12,000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液, 继续加入硫酸铵, 使其浓度达到 90%, 同样条件离心, 沉淀则用一定体积的磷酸缓冲液溶解, 即得所要的提取液(活性组分)。

1.2.1.2 透析、浓缩和平衡

提取液用凝胶 Sephadex G-25 对磷酸缓冲液进行过滤, 去除残留的硫酸铵, 每 2min 收集 1 管, 然后用 PEG-6000 进行浓缩, 浓缩后对磷酸缓冲液透析平衡。以上所有操作均在 4℃ 下进行。

1.2.1.3 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换

上样后的洗脱流程为: 先用磷酸缓冲液冲洗 30 min, 再梯度洗脱, 5 h 内从磷酸缓冲液变化到磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 8.0, 1.0 mol/L NaCl), 洗脱流速为: 1.5 mL/min, 每 2 min 收集 1 管, 检测每管的蛋白质含量, 收集有抑制活性的组分。将收集的活性组分浓缩、透析平衡。以上所有操作均在 4℃ 下进行。

1.2.1.4 Sephacryl S-200 凝胶过滤

上样洗脱流程为: 采用磷酸缓冲液洗脱, 流速为: 2.0 mL/min, 每 3.5 min 收集一管, 检测每管的蛋白质含量, 收集具有抑制活性的组分。将收集的提取液浓缩、透析平衡。以上所有操作均在 4℃ 下进行。

1.2.2 蛋白质浓度、抑制子活性测定及纯度鉴定

1.2.2.1 蛋白质浓度的测定

取数支试管编号, 依次分别加入 0 L, 10 L, 20 L, 40 L, 60 L, 80 L 标准蛋白质溶液, 再各加入 5 mL 染色液, 摇匀, 室温 (25℃) 下放置 15 min。595 nm 波长比色, 并作标准曲线, 如图 1, 标准曲线的回归方程为: 蛋白质含量(mg/mL)=(A595-0.01707)/5.579, R=0.9949。另取 50 L 未知浓度的蛋白质溶液同上操作, 从其 A595 nm 值推算出其浓度大小。

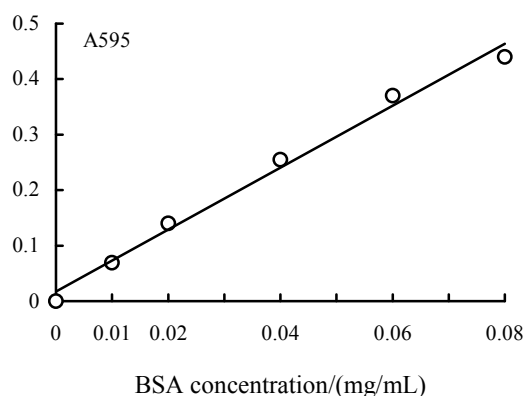


图 1 蛋白质含量标准曲线

1.2.2.2 抑制子抑制胰蛋白酶活力的测定

利用合成底物 BAPNA 测定胰蛋白酶活力, 实验步骤如下:

样品: 抑制子溶液 0.1 mL+0.1 mL Trypsin+PBS (0.05 mol/L, pH 8.0) 0.1 mL→37℃ 水浴反应 10 min→加入 2 mL BAPNA 溶液→37℃ 水浴反应 10 min→加入 30%冰醋酸溶液 0.1 mL→410 nm 比色

对照样: 0.1 mL Trypsin+0.3 mL PBS (0.05 mol/L, pH 8.0) +2 mL BAPNA 溶液→37℃ 水浴反应 10 min→30%冰醋酸溶液 0.1 mL→410 nm 比色

空白样: 0.3 mL PBS (0.05 mol/L, pH 8.0) +2 mL BAPNA 溶液+30%冰醋酸溶液 0.1 mL

用空白样作参比, 分别取样液及对照样溶液在 410 nm 下比色, 通过比较加入与不加入抑制子溶液的样品的吸光值, 就可通过残留的胰蛋白酶活性间接反映出蛋白酶对抑制子的水解程度。

抑制子溶液 (PTI) 的相对活力 (%) = 对照样的 A410 值-样液的 A410 值 / 胰蛋白酶活力 (A410 值)

1.2.2.3 纯度检测: 各步纯化后的抑制子液经稀释后制成电泳样品, 留待用 SDS-PAGE 分析。

1.2.2.4 抑制子部分性质的研究

1.2.2.4.1 对酸碱的敏感性

在抑制子溶液中分别加入 0.5 mol/L, pH 值为 2.2 和 4.2 的柠檬酸缓冲液及 pH 值为 6.2、8.2 和 10.2 的 Tris-HCl 缓冲液, 混匀后放置一定时间, 然后测定残存的抑制子抑制胰蛋白酶的活力, 方法见 1.2.2.2。

1.2.2.4.2 对温度的敏感性

将抑制子溶液分别至于 20, 40, 60, 70, 80, 90 和 100℃ 水浴中保温一定时间, 然后测定残存的抑制子抑制胰蛋白酶的活力, 方法见 1.2.2.2。

2 结果与讨论

2.1 硫酸铵分级沉淀

表 1 盐析法提纯抑制子时 (NH₄)₂SO₄ 饱和度的确定

/(NH ₄) ₂ SO ₄ 饱和度	蛋白质提取量/mg	比活性/(BAEE/mg)	纯化倍数	活性回收率/%
0	4615.6	364.01	—	100
0~50%	205.14	65.52	0.18	0.8
50%~90%	2545.6	595.385	1.636	90.21

由表 1 知, 经过二次盐析分级沉淀实验, 在 50%~90% (NH₄)₂SO₄ 饱和度时, 纯化出的抑制子比活力较高, 纯化倍数和活性回收率也较高。

2.2 透析除盐平衡

实验发现, 8~16 管有吸收峰, 所以 8~16 管含有蛋白质, 可用于进一步分离纯化。

2.3 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换

盐析获得的抑制子在 4℃ 下用 PEG-6000 浓缩后, 对磷酸缓冲液透析除盐及平衡, 上柱。洗脱图谱见图 2 和图 3, 对图 2 和图 3 洗脱出的 3 个蛋白峰检测活性, 结果表明峰 1 抑制活性较高。另外, 还可看到洗脱的蛋白峰有重叠, 因此仍需进一步纯化。

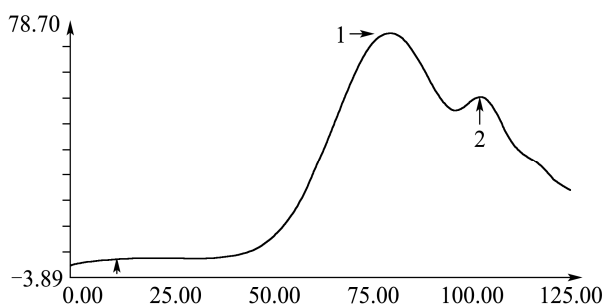


图2 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换洗脱图谱

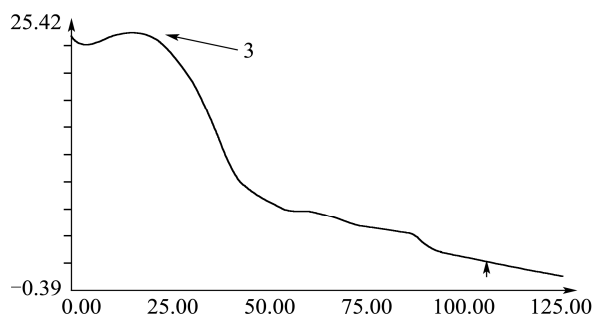


图3 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换洗脱图谱

2.4 Sephacryl S-200 凝胶过滤

将抑制子于 4 °C 下用 PEG-6000 浓缩后, 对磷酸缓冲液透析除盐及平衡, 上柱。洗脱图谱见图 4, 从对图 4 洗脱出的 2 个蛋白峰进行测活, 结果表明峰 2 抑制活性较高。另外, 从图 4 可看出凝胶过滤时洗脱出的蛋白峰是比较的尖, 分离基本达的要求。

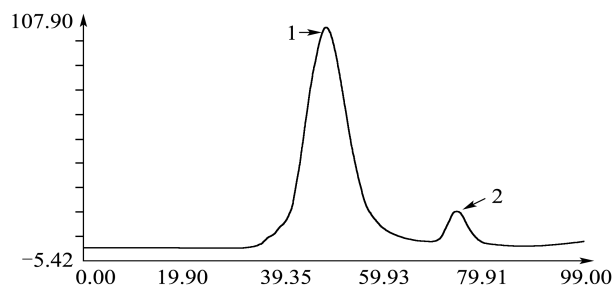


图4 Sephacryl S-200 凝胶过滤洗脱图谱

2.5 纯化方案的评价

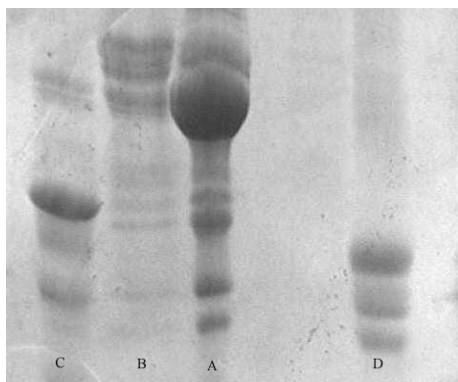
测定纯化后的蛋白质提取量及抑制活性, 计算其比活性、纯化倍数和活性回收率, 结果见表 2。

表2 绿豆中胰蛋白酶抑制子的纯化

纯化步骤	抑制子提取量/mg	比活力/(BAEE/mg)	纯化倍数	活性回收率/%
粗抑制子液	4 615.6	364.01	1.00	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 分级沉淀(50%~90%)	2 545.6	595.39	1.64	90.21
DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换	150.11	7 243.64	19.89	64.72
Sephacryl S-200	87.97	10855.68	29.8	56.84

表 2 可见, 20 g 绿豆经过破碎提取粗抑制子液、盐析、离子交换、凝胶过滤和离子交换等四步分离纯化过程, 提纯出来的抑制子活性回收率为 56.84%, 纯化倍数达到 29.8 倍。不过提取出来的抑制子需进一步由 SDS-PAGE 检测其纯度。

2.6 抑制子提取液纯度检测



A: 粗抑制子提取液; B: (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀; C: DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换; D: Sephacryl S-200 凝胶过滤

图5 SDS-PAGE 电泳检测胰蛋白酶抑制因子的纯度

SDS-PAGE 电泳结果见图 5。由图 5 知经过四步

的分离纯化步骤后, 所提取的抑制子蛋白含杂蛋白的量逐渐减少, 抑制子的纯度逐步提高, 最后只剩下一条泳带, 这说明抑制子蛋白已较纯。

2.7 部分性质的研究

2.7.1 对温度的敏感性

如表 3, 胰蛋白酶抑制因子对温度不敏感。

表3 不同温度对胰蛋白酶抑制因子的活性检测结果

温度/°C	20	40	60	70	80	90	100
吸光值	0.351	0.360	0.310	0.356	0.288	0.310	0.285
抑制活性	5.7	5.5	6.2	5.6	6.4	6.3	6.5

活力单位: ×10⁴BAEE/mg

2.7.2 对酸碱的敏感性

如表 4, 胰蛋白酶抑制因子对 pH 值不敏感。

表4 不同 pH 值对胰蛋白酶抑制因子的活性检测结果

pH 值	2.2	4.2	6.2	8.2	10.2
抑制活性	5.5	5.2	4.9	5.1	5.0

活力单位: ×10⁴BAEE/mg

3 结论

(下转第 25 页)