

热诱导菜豆属 7S 球蛋白纤维聚集研究

刘晶, 唐传核

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 研究了菜豆属球蛋白(芸豆和绿豆)在低 pH 低离子强度条件下热诱导形成的自组装纤维聚集机理。通过对制备的球蛋白进行热性质及临界形成凝胶浓度分析, 选定 85 °C 和 0.5% 作为自组装纤维化的参数。通过硫代黄素 T(ThT) 荧光法, 动态光散射(DLS) 和原子力显微镜 (AFM) 表征蛋白纤维化聚集程度及形态。结果表明: 芸豆和绿豆球蛋白的 Th T 最大荧光强度在 1h 之内剧烈增大 (分别是 765 和 1093), 表明芸豆和绿豆球蛋白自组装纤维化的“构筑单元”主要产生于加热的起始阶段。DLS 结果显示芸豆自组装纤维聚集的能力比绿豆强。但是二者的自组装机理有所不同。AFM 图清晰地显示了芸豆球蛋白在加热 12 h 时自组装形成规则的高度有序的“念珠串状”长线性纤维, 绿豆则形成无规则的短棒状纤维和大量碎片状纤维。这为研究进一步研究超低固形物下基于自组装技术的纤维型植物蛋白凝胶的制备提供参考。

关键词: 菜豆属球蛋白; 纤维聚集; 自组装; 淀粉样纤维; 原子力显微镜

文章编号: 1673-9078(2012)11-1450-1453

Heat-Induced Fibrillar Aggregation of 7S Globulins (vicilins) from *Phaseolus Legumes*

LIU Jing, TANG Chuan-he

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

Abstract: The heat-induced fibrillar aggregations of 7S Globulins (vicilins) from kidney bean (Gk) and mung bean (Gm) at low pH and low ionic strength were characterized using dynamic light scattering (DLS), Thioflavin T (Th T) fluorescence assay and atomic force microscopy (AFM). According to thermal characteristics and phase diagram analysis, 85 °C and 0.5% were chosen as denaturation temperature and proper protein concentration. Results also showed that heating led to fibrillar aggregation. Th T maximum fluorescence intensity of Gk and Gm increased dramatically to 765 and 1093 within one hour, indicating that the building blocks were formed at the initial heating periods. DLS data suggested Gk exhibited stronger ability of self assembly and fibrillar aggregation. However, the extent of aggregation and morphology of formed fibrils varied distinctly. AFM data displayed clearly that Gk formed linear fibrils but Gm formed random fibrils upon heating for 12h. This would give experiment data for preparation of transparent gels at extremely low weight fractions plant proteins based on self-assembly.

Key words: *Phaseolus Legumes* vicilin; fibrillar aggregation; self-assembly; amyloid fibril; AFM

目前国际上对于基于自组装技术的纤维型蛋白凝胶研究较多。热诱导纤维型凝胶网络结构的形成分为三个阶段^[1-3]: (1) 蛋白质变性 (Denaturation)。在酸、热等条件下天然蛋白质发生变性, 球蛋白内部疏水基团暴露, 伴随着容易发生疏水聚集。(2) 纤维聚集 (Aggregation)。蛋白质分子自组装纤维聚集是在疏水作用力和静电斥力作用下共同形成的。当 pH 在 pI 附近或溶液离子强度很高足以屏蔽蛋白质之间的静电排斥

作用时, 蛋白质分子很容易形成无序的凝胶网络 (random aggregates)。当 pH 远离 pI (如强酸) 或低离子强度环境下, 静电排斥力占主导, 此时易形成高度有序的“念珠串状”线性纤维聚集体 (linear aggregates)。

(3) 凝胶 (Gel)。当 pH 远离 pI 或在低离子强度环境下, 若蛋白浓度足够高或加热时间足够长, 或者在盐离子、酶诱导下, 蛋白溶液会形成透明凝胶。该类凝胶可以包埋生物活性物质, 广泛应用于食品生物医药等领域^[4]。国外 Ross-Murphy^[5]、Erik van der Linden^[6] 等人研究了低 pH (pH 2.0)、低 pI 条件下加热诱导 β -乳球蛋白 (BLG) 的自组装纤维型蛋白凝胶, 发现 BLG 在 pH 2.0 条件下形成的蛋白胶凝机理与自组装纤维化过程紧密相关。相比乳清蛋白而言, 国内对植物蛋白自组装纤维化聚集研究报道较少。豆类蛋白是植

收稿日期: 2012-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171632)

作者简介: 刘晶 (1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白研究

通讯作者: 唐传核 (1973-), 男, 博士, 副教授, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白研究

物蛋白最重要的来源,因此,研究热诱导豆类蛋白自组装纤维化过程对植物蛋白资源利用具有重要意义。

本文以菜豆属球蛋白(芸豆和绿豆球蛋白)为研究对象,围绕其在低pH和低离子强度条件下的热诱导自组装纤维过程,重点表征加热程度对其纤维聚集的影响规律。运用Th T荧光法和动态光散射技术检测球蛋白自组装纤维的形成过程,并用原子力显微镜观察纤维聚集体的微观结构,分析这两种球蛋白热致自组装纤维的形成机理。旨在为进一步研究超低固形物下基于自组装技术的新型植物蛋白纤维型凝胶的制备提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

芸豆和绿豆购自广州华润万家超市中粮燕之坊;Th T(美国Sigma-Aldrich公司);标准分子量蛋白(Marker)(上海鼎国);高速冷冻离心机(日本HITACHI, CR22G);冷冻干燥机(德国CHRIST, DELTAI-24/LSC);激光动态粒度扫描仪(英国Malvern Instruments, Zetasizer Nano ZS);荧光分光光谱仪(日本HITACHI, F-7000);原子力显微镜(美国Veeco, Dimension 3000)。

1.2 球蛋白(Vicilin)制备^[7]

将超市购买的芸豆浸泡、去皮、冷冻干燥后磨粉,取100 g芸豆粉溶于含0.025 mol/L HCl的0.5 mol/L NaCl溶液中(1:10, *m/V*),室温下搅拌1 h,用5 mol/L HCl微调,使pH维持在3.5,继续搅拌1 h。然后离心(8500 r/min, 30 min, 4 °C),取上清液过100目筛。收集上清液,用5倍体积的去离子水(4 °C)稀释,冰浴静置过夜,离心(8500 r/min, 30 min, 4 °C)收集沉淀。将得到的白色沉淀复溶于0.5 mol/L NaCl溶液中,搅拌至充分溶解,重复上述步骤两次。最终得到的沉淀再溶于0.5 mol/L NaCl溶液中,用去离子水透析48 h,冷冻干燥,即得到纯度较高的芸豆球蛋白(Gk)。绿豆球蛋白(Gm)制备方法同上。制备的Gk和Gm的蛋白质含量、亚基纯度和热性质分别通过凯氏定氮、SDS-PAGE^[8]和差示扫描量热仪(DSC)测定。

1.3 临界成胶浓度(Cp)

制备pH 2.0条件下不同浓度梯度(0.5%、1%、2%、3%、4%和5%, *m/V*)的蛋白样品,加盖密封,在85 °C水浴下加热不同时间(0~24 h),即取出冷却至室温,随后将密封瓶倒置,观察瓶内蛋白分散液的流动情况。可据此判断出此条件下形成凝胶所需的最低临界蛋白浓度(Cp)。

1.4 球蛋白自组装纤维化反应

将制备的球蛋白(Gk或Gm)溶于蒸馏水(pH 2.0)溶液中,均匀搅拌1 h后,用2 M HCl复调pH使其维持在2.0,继续搅拌1 h,制得0.5% (*m/V*)的蛋白溶液。离心(10000 g, 30 min)以去除不溶性杂质,上清液过膜0.22 μm。将过膜后制得的溶液分装至玻璃管中,密封后置于85 °C水浴锅中加热不同时间(0~24 h)。样品加热至指定时间后,取出后立刻冰浴冷却,进行下列实验。

1.5 动态光散射(DLS)测量

球蛋白加热后纤维化聚集体光散射强度的测量是在Malvern公司Zetasizer Nano ZS仪器上进行的。样品稀释液使用之前需要通过0.22 μm的膜过滤,以去除杂质。加热至指定时间后将处理的样品稀释成浓度为0.1%,将样品液加入到比色皿中,记录Deprived Count Rate作为光散射强度值,常温测量是在25 °C条件下进行。

1.6 Th T荧光分析

将8 mg Th T溶于10 mL磷酸缓冲溶液(10 mM, pH 7.0, 150 mM NaCl)中制得Th T浓缩液。充分溶解后用0.22 μm的针头过滤器滤除不溶性物质。Th T储液用金属箔于4 °C的冰箱中密封避光保存,保存期不超过一周。实验前,将浓缩液稀释50倍后制得工作液。将50 μL待测样品与5 mL Th T工作液混合,震荡混匀后反应约1 min后进行测量。将仪器的激发波长设定在460 nm,发射波长490 nm,狭缝间隙5 nm,扫描范围为470~600 nm。

1.7 原子力显微镜(AFM)观察

将样品稀释至2 μg/mL并充分混匀,取2 μL样品分散至干净的云母片上,室温下风干后用原子力显微镜进行观察。采用轻敲模式(Tapping Mode)成像,扫描探针为商用氮化硅针尖,微悬臂常数为180 μm,力常数为3.2 N/m。用双面胶将滴有样品的云母片固定在载物台的金属片上,将金属片放置于AFM的载物台上扫描观察。所有图像只经过自动平滑处理,以消除扫描方向上的低频噪音。

1.8 数据分析

采用OriginPro 8.0 software进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 制备球蛋白的蛋白含量、纯度及热性质分析

通过凯氏定氮仪测得制备的Gk和Gm蛋白含量分别为86.8%和83.6% (N×6.25)。亚基组成电泳分析如图1所示。电泳谱带显示蛋白纯度较高,Gk和Gm均呈现一条主要的泳带,其分子量分别为48 kDa和50 kDa。该电泳是在有还原剂β巯基乙醇的条件下进

行的, Gk 和 Gm 的条带迁移率不受还原剂影响, 是一种典型的 Vicilin, 这与陈玲^[9]此前报道一致。热性质采用 DSC 测定 (表 1), Gk 和 Gm 的初始变性温度分别约 85°C 和 70°C, 变性温度 (Td) 可反应热稳定性, Gk 的热稳定性高于 Gm, 说明 Gk 的结构更紧凑。

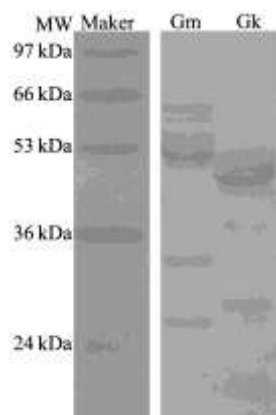


图 1 Gk 和 Gm 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE profile for Gk and Gm

表 1 芸豆和绿豆球蛋白的热性质参数

Table 1 Thermal characteristics of Gk and Gm

Protein samples	热性质参数			
	T_m (°C) ^a	T_d (°C) ^b	ΔH (J/g) ^c	$\Delta T_{1/2}$ (°C) ^d
Gk	84.12±0.04	89.74±0.12	13.22±1.59	6.72±0.12
Gm	70.4±0.50	79.00±1.16	18.48±8.18	8.66±1.28

注:^a T_m 初始变性温度, ^b T_d 变性温度, ^c ΔH 变性焓值, ^d $\Delta T_{1/2}$ 半峰宽。

2.2 临界成胶浓度 (C_p)

蛋白质浓度是形成凝胶和纤维化的决定性因素之一。在一定 pH 和离子强度条件下, 随着蛋白质浓度的增大, 蛋白溶液会经历透明从蛋白溶液、溶胶再到透明凝胶形态的变化。图 2 所示, 蛋白凝胶的形成与加热时间和蛋白浓度成正相关性。加热时间越长, 越有利凝胶的形成; 蛋白浓度越高, 凝胶形成越快。在蛋白浓度高达 4% 时, Gk 在 30 min~1 h 内就形成凝胶, Gm 则需要 3~4 h。说明 Gk 的 C_p 比 Gm 小, Gk 形成纤维化的能力比 Gm 更强。根据表 1 和图 2 选择 85°C 和 0.5% 作为以下热诱导自组装纤维化的加热温度和蛋白浓度。

2.3 动态光散射 DLS

DLS 对检测蛋白质溶液中的微小聚集颗粒十分灵敏, 散射的光密度与聚集体的出现是同步的, 且聚集体所反射的信号强度是单体颗粒的很多倍^[10]。因此, 可以使用 DLS 测量溶液中的光散射强度的变化来表征蛋白质溶液加热形成纤维化反应的动态过程。图 3 显示芸豆比绿豆的光散射强度大, 说明芸豆的自组装纤维化能力比绿豆强, 这与图 2 一致。光散射强度

随着加热时间的增加而增大, 说明纤维聚集程度随着加热时间的延长而增加。但是 Gk 的光散射强度在 6 h 以后变化趋于平缓甚至 24 h 时下降。这可能是因为在长时间加热时 Gk 形成了高度有序的长线性纤维的同时, 碎片状纤维“构筑单元”减少。

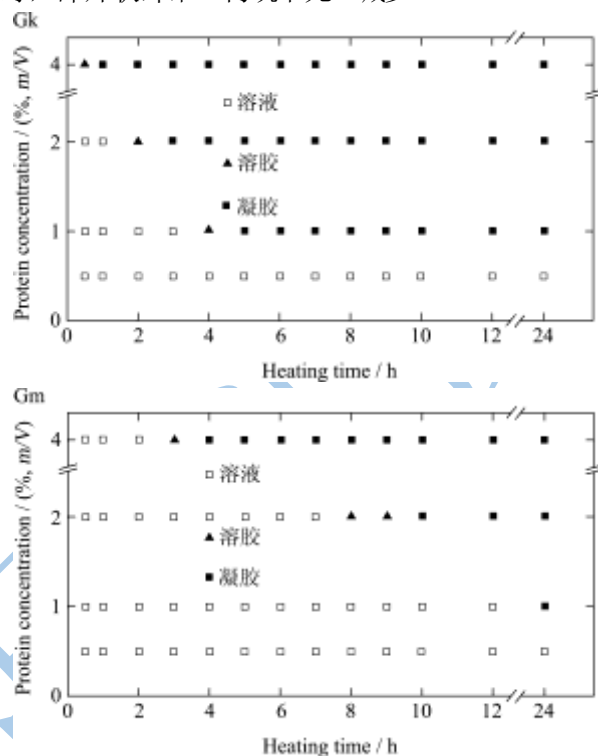


图 2 球蛋白在 pH 2.0 条件下 85°C 加热不同时间形态变化图

Fig.2 Phase diagrams of various protein concentration (0.5~4%, m/V) vicilins solution at pH 2.0 upon heating at 85 °C for different time (0~24 h)

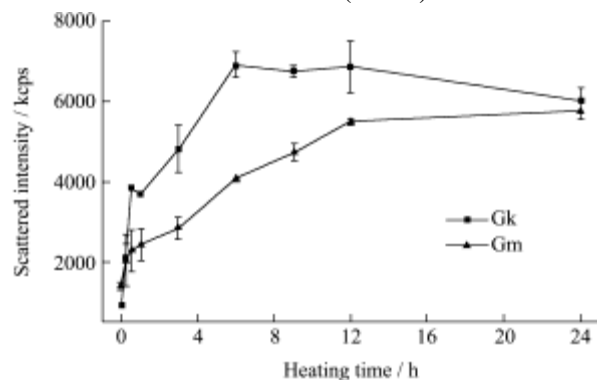


图 3 球蛋白溶液加热不同时间后 (0~24 h) 光散射强度的变化

Fig.3 Scattered intensity of vicilins heated for different time (0~24 h)

2.4 Th T 荧光光谱分析

蛋白溶液在低 pH 低离子强度下加热超过变性温度时, 通常会引发纤维聚集或淀粉样纤维。所谓的蛋白质淀粉样纤维聚集, 是指蛋白质加热产生的单体—“构筑单元”在某些情况下会经过构象的改变, 将 α -helix 转化为 β -sheet 结构或者暴露较多的疏水片段,

从而导致“构筑单元”生成聚集甚至诱导形成了不可溶的纤维作为最终产物^[1]。Th T 是一种阳离子的苯并噻唑，与蛋白质 β -sheet 结构结合后其荧光强度会显著增强，因此被广泛应用于鉴定淀粉样纤维的特定染料。

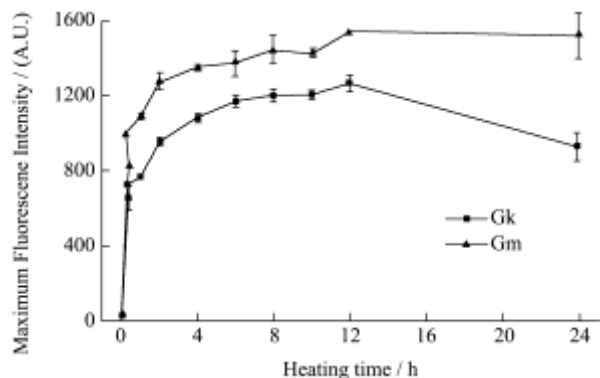


图4 蛋白溶液加热不同时间的 Th T 荧光光谱图

Fig.4 Th T Maximum fluorescence spectroscopic profiles of vicilins heated for different time

如图4所示，最大荧光强度在加热的起始阶段(< 1.0 h)增幅最为强烈，Gk 和 Gm 分别从 26 和 42 增至 765 和 1093。这是因为在加热初始阶段大量蛋白质变性水解，形成“构筑单元”，这与 DLS 数据(图3)一致。而后随着加热时间的延长而不断增加，但是变化趋于平缓，这表明球蛋白自组装纤维的“构筑单元”主要生成于起始阶段，而延长加热时间则有利于“构筑单元”或纤维的形成。

不同样品的最大荧光强度不同。如图4所示，Gm 热诱导形成的 β -sheet 结构比 Gk 多。可能是因为 Gm 更多则是用加热形成的“构筑单元”形成无序状纤维，而芸豆本身表面电荷高，静电斥力强，因此 Gk 用加热形成的“构筑单元”自组装成高度有序的线状纤维。因此，相对而言，Gm 的“构筑单元”比 Gk 数量多。此外，Gk 加热 24 h 的最大荧光强度反而比 12 h 低。一方面可能是因为 Gk 在自组装成有序的线状结构的同时，“构筑单元”在酸和热长时间作用下有所水解；另一方面可能是因为实验中芸豆成胶能力强，Gk 加热 24 h 形成弱溶胶。这从侧面反映了采用 Th T 荧光手段表征淀粉样纤维的动力学方面存在一定的局限性。它只能检测 β -sheet 结构， β -sheet 虽然在自组装过程中形成，但是不能简单地将 β -sheet 与自组装纤维化过程等同。Th T 荧光也不适用于样品出现弱凝胶或者凝胶，因为弱凝胶或凝胶不能完全分散与 Th T 荧光染料充分结合，从而可能导致测量结果偏低。

2.5 AFM 分析

图5为 Tapping mode 所观察到的 Gk 和 Gm 蛋白溶液(0.5%, m/V)在 pH 2.0 条件下 85 °C 加热 12 h 的原子力图。AFM 图证实了前面 DLS 和 Th T 分析中

推论。

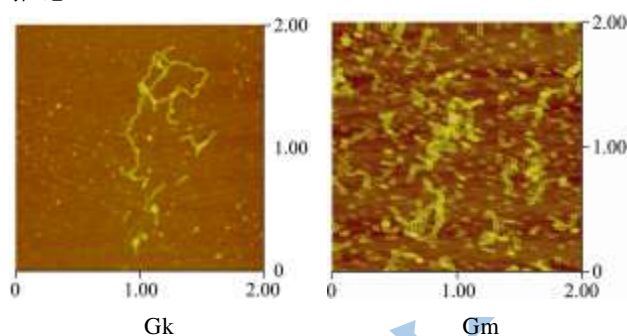


图5 Gk 和 Gm 蛋白溶液(0.5%, m/V)加热 12 h 后的 AFM 图

Fig.5 AFM images of Gk and Gm (0.5%, m/V) after heating for 12 h

图5显示，加热处理使两种球蛋白都能发生自组装形成淀粉样纤维，但形态(长度和柔韧性)却存在显著差别。Gk 形成的纤维总体长度较长，轮廓清晰，所形成了“念珠串状”长纤维，不规则的短棒状纤维很少，是一种高度定向有序的自组装纤维化行为，有利于形成外观透明或半透明的凝胶。而 Gm 所形成的纤维则相对无规则，长短不一，大量长棒状纤维和无规则短纤维碎片共存。这进一步解释了 Th T(图4)中 Gk 的最大荧光强度比 Gm 小的原因。这种形态差异说明两种蛋白形成的纤维化机理是不同的，这是由蛋白结构不同决定的。

3 结论

3.1 芸豆和绿豆球蛋白自组装的“构筑单元”主要生成于加热起始阶段，延长加热时间有利于“构筑单元”或纤维的形成。芸豆球蛋白的自组装纤维化能力比相同条件下的绿豆球蛋白强。芸豆球蛋白三级结构十分紧凑，表面电荷多，静电斥力强，在静电斥力和疏水作用力等分子作用力的共同作用下，芸豆球蛋白在低 pH 低离子强度条件下将“构筑单元”自组装形成了高度定向规则的长线状纤维(linear aggregates)，同时芸豆球蛋白形成的部分“构筑单元”在加热后期在酸热条件下水解。因此芸豆球蛋白在长时间加热时体系中形成高度有序的线状纤维的同时，散落的“构筑单元”数量减少；绿豆球蛋白的自组装纤维化机理与芸豆有所不同。绿豆球蛋白由于其分子结构比较疏松，形成的纤维并不规则，形成高度有序的线状纤维能力没有芸豆球蛋白那么强，因此更多地形成了短棒状纤维和碎片状纤维(random aggregates)。

3.2 实验结果显示了蛋白质淀粉样纤维的形成依赖于加热时间，较长时间的加热会提高蛋白质淀粉样纤维的程度。但是调控蛋白质的淀粉样纤维聚集程度的还有其它因素，如离子强度和蛋白浓度等对这两种球

蛋白纤维聚集的影响,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Erik van der Linden, Paul Venema. Self-assembly and aggregation of proteins [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2007, 12: 158-165
- [2] Erik van der Linden. From peptides and proteins to micro-structure mechanics and rheological properties of fibril systems [J]. *Food Hydrocolloids*. 2010, 26(2): 421-426
- [3] M Weijers, Sagis LMC, et al. Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength [J]. *Food Hydrocolloids*, 2002, 16: 269-276
- [4] Anne Maltais, Gabriel E Remondetto, et al. Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23: 1647-1653
- [5] Kavanagh GM, Clark AH, Ross-Murphy SB. Heat-induced gelation of globular proteins: part 3. Molecular studies on low pH on β -lactoglobulin gels [J]. *International Journal Biological Macromolecules*. 2000, 28: 41-50
- [6] Sagis LMC, Veerman, Erik van der Linden, et al. Mesoscopic structure and viscoelastic properties of β -lactoglobulin gels at low pH and low ionic strength [J]. *Food Hydrocolloids*, 2002, 16: 207-213
- [7] 陈玲,唐传核.热致芸豆 7S 球蛋白透明凝胶性能研究[J].现代食品科技,2010,26(5):433-436
- [8] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 681-685
- [9] 陈玲.新型植物蛋白凝胶的制备及形成机理[D].广州:华南理工大学,2010
- [10] Arnaudov L N, de Vries R, Ippel H, et al. Multiple steps during the formation of beta-lactoglobulin fibrils [J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(6): 1614-1622
- [11] Yumiko O, Kazuhiro H, Hironobu N, et al. Optimum Amyloid Fibril Formation of a Peptide Fragment Suggests the Amyloidogenic Preference of β -Microglobulin under Physiological Conditions [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(11): 10814-10821

(下转第 1499 页)