

基于 NanoLC-Orbitrap 技术测定六种不同栽培品种大豆中多肽 Lunasin 含量

高梦笛¹, 孟献斌², 幸岑璨¹, 张玥¹, 邓海腾², 王凤忠¹

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193) (2. 清华大学生物医学检测中心, 北京 100084)

摘要: 大豆中含有丰富的蛋白质和多肽, 其中露那辛 (Lunasin) 是一种重要的功能性多肽。为测定国产大豆中 Lunasin 的含量, 本研究以六种国产大豆为实验材料, 采用凝胶电泳法对国产大豆中的 Lunasin 成分进行分离纯化, 得到含有 Lunasin 的凝胶条带, 酶解后利用纳流液相色谱串联轨道阱质谱 (NanoLC-Orbitrap) 平行反应监视法 (PRM) 分析其中的特异性肽段从而测定 Lunasin 的含量。测定结果表明: 在六种国产大豆中, 皖豆 35 大豆中 Lunasin 含量最高, 为 4.66 mg/g; 中黄 13 大豆中含量为 2.24 mg/g; 中黄 75 大豆中含量为 3.35 mg/g; 徐豆 14 大豆中含量为 2.59 mg/g; 黔豆 7 号大豆中含量为 2.03 mg/g; 黑河 43 大豆中含量为 2.87 mg/g。实验结果表明国产大豆中含有丰富的 Lunasin。该方法前处理操作简单, 重复性好, 结果准确, 具有较好的线性关系, 此方法可用于大豆中 Lunasin 的含量的测定及筛选富含 Lunasin 的大豆品种。

关键词: 大豆; 露那辛; 纳流液相色谱串联轨道阱质谱; 平行反应监视法

文章编号: 1673-9078(2018)01-216-220

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.1.033

Determination of Polypeptide Lunasin Content in Six Different Cultivars of Soybean Using NanoLC-Orbitrap Technique

GAO Meng-di¹, MENG Xian-bin², XING Cen-can¹, ZHANG Yue¹, DENG Hai-teng², WANG Feng-zhong¹

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

(2. The Center for Biomedical Analysis of Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Soybean was rich in protein and polypeptide, of which lunasin was an important functional polypeptide. In this study, the lunasin in six kinds of domestic soybeans was separated and purified by SDS-PAGE for the determination of lunasin content in domestic soybeans, and a gel band containing lunasin was obtained. In addition, the specific peptides were analyzed by NanoLC-Orbitrap and PRM after enzymatic hydrolysis, and the lunasin content was determined. The results showed that content of lunasin was 4.66 mg/g in Wangdou35 (highest content among the six kinds of domestic soybeans), 2.24 mg/g in Zhonghuang 13, 3.35 mg/g in Zhonghuang 75, 2.59 mg/g in Xu dou14, 2.03 mg/g in Qian Dou 7, and 2.87 mg/g in Heihe 43, indicating that the domestic soybean was rich in lunasin. The proposed method in this study had the advantages of simple pretreatment, good repeatability, accurate result and good linear relationship, which could be used to determine the content of lunasin in soybean and screen the soybean varieties that were rich in lunasin.

Key words: soybean; lunasin; NanoLC-Orbitrap; PRM

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr) 是我国四大油料作物

收稿日期: 2017-08-16

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系项目 (GARS-04); 中国农业科学院农产品加工研究所基本科研业务费 (S2017JC02); 中国农业科学院创新工程-营养功能因子研究与利用项目 (1251416101535); 特色农产品加工技术与产品开发专项 (Z2016B01N04)

作者简介: 高梦笛 (1993-), 女, 研究生, 研究方向: 功能食品与生物活性物质

通讯作者: 邓海腾 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 质谱和蛋白质组学及代谢组学; 王凤忠 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 功能食品与生物活性物质 (共同通讯作者)

之一, 具有非常高的营养价值。大豆中含有丰富的蛋白质和多肽, 其中露那辛 (Lunasin) 是最早由日本新潟大学医学部的研究小组从大豆中分离纯化并鉴定出来的一种功能多肽, 分子质量为 5.5 ku, 由 43 个氨基酸组成, 氨基酸序列为 SKWQHQQDSCRKQLQGVNLTPEKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD^[1]。2005 年 Lunasin 被美国加利福尼亚大学伯克利分校 de Lumen 研究小组成功克隆, 发现 Lunasin 能破坏细胞有丝分裂并引起染色体破裂和细胞凋亡, 具有抗肿瘤的功效^[2]。2012 年, Gakvez 等^[3]在肝脏细胞 HepG2 中发现 Lunasin 可能通过降低 HMGCR 的活性来降低

胆固醇。

研究表明 Lunasin 具抗氧化、抗炎、抗癌及降低胆固醇等功效, 被预测可作为预防癌症和降低心血管疾病风险的药物。由于 Lunasin 来源于天然植物大豆, 安全性相对较高, 几乎没有毒副作用且不良反应少, 使其可能成为保护心血管方面的一线药物。

目前报道的对 Lunasin 的定量分析常采用依赖于抗体的方法, Jeong 等^[4,5]用 Western Blot 法研究了美国市售的部分大豆产品, 包括脱脂豆奶粉、大豆分离蛋白 Lunasin 的含量; Gonzalez 等^[6]用酶联免疫吸附法 (ELISA) 研究发现美国产不同种大豆中 Lunasin 的含量不同, Ren 等^[7]用 LC-MS 的方法检测了藜麦中含有 Lunasin。Western Blot 和 ELISA 检测依赖于 Lunasin 抗体的特异性, 若抗体将具有相同抗原决定簇的其它肽类误认为是 Lunasin, 则可能干扰测定结果。只采用传统 LC-MS 测定 Lunasin, 样品中的复杂基质干扰严重目标肽响应较低^[7], 影响质谱测定的阈值、线性、准确度, 甚至会出现假阳性^[8,9]。本研究尝试采用纳流液相色谱串联轨道阱质谱 Orbitrap Fusion 系统来进行检测, 该仪器可实现三种质量分析器的共同协作, 平行反应监视法 (PRM) 实现了对全部离子碎片的检测, 该方法可以显著提高识别的多肽数量, 能够更好地排除背景干扰和假阳性。

我国大豆资源丰富、产区众多, 品种逾千个, 主要有三大大豆主产区^[10,11]。黑河 43 大豆是东北春大豆区主栽大豆品种; 黔豆 7 号大豆是云贵高原春夏大豆区主栽大豆品种, 是适宜西南山区种植的丰产性好、稳产性强的优质品种; 徐豆 14 大豆、皖豆 35 大豆是黄淮海夏大豆区的主栽品种, 具有高产、籽粒商品性优良等特点; 中黄系列大豆是近年来我国大面积推广栽培的品种之一, 由中国农业科学院作物研究所选育且具有高蛋白、适应性广等特点^[12,13]。美国和韩国等国外大豆品种中的 Lunasin 含量多有研究, 而国产大豆品种中 Lunasin 含量鲜有报道。因此有必要建立有效的方法通过不同品种的比较筛选出富含多肽 Lunasin 的最佳品种, 为功能性食品的开发提供理论支撑。

本研究以六种国产大豆: 中黄 13 大豆、中黄 75 大豆、徐豆 14 大豆、黑河 43 大豆、黔豆 7 号大豆、皖豆 35 大豆为实验材料, 建立了分离提取并测定大豆多肽 Lunasin 的方法, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离降低了基质干扰, 用纳流液相色谱串联轨道阱质谱 (NanoLC-Orbitrap) 平行反应监视法 (PRM) 对六种国产大豆中 Lunasin 含量进行测定, 本测定方法准确可靠, 重现性好。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

黑河 43 大豆由黑龙江省农业科学院大豆研究所提供; 徐豆 14 大豆由徐州市农业科学院提供; 黔豆 7 号大豆由贵州省油料研究所提供; 中黄 13 大豆、中黄 75 大豆由中国农业科学院作物科学研究所提供。

1.1.2 试剂

乙醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、甲酸(色谱纯)、三氟乙酸, 美国赛默飞世尔科技公司; 质谱级碳酸氢氨, 美国 Sigma 公司; 质谱级二硫苏糖醇(DTT), 美国 Sigma 公司; 胰蛋白酶 (Trypsin), 美国 Promega 公司; Mini-PROTEAN® TGX™ 预制胶, 美国 Bio-Rad 公司; Lunasin 标准品, 成都凯捷生物医药科技发展有限公司; Blue Plus® IV 预染 Protein Marker, 北京全式金生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

电子天平 YQ116-01, 梅特勒-托利多公司; 超速多功能粉碎机, 浙江永康公司; 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造公司; 离心机(LYNX6000), 美国赛默飞世尔科技公司; ZLS-1 真空离心浓缩仪, 湖南赫西仪器装备有限公司; 电泳仪(JY600C), 北京君意东方电泳设备有限公司; EASY-Spray column(50 μm ×15 cm, 2 μm)色谱柱, 美国赛默飞世尔科技公司; 纳流液相色谱串联轨道阱质谱 (EASY-nLC 1000-Orbitrap Fusion Tribrid), 美国赛默飞世尔科技公司; 配制试剂所用的水为经美国密里博公司的 Milli-Q Advantage 超纯水仪处理过的超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 Lunasin 的提取

Lunasin 的提取: 将六种大豆粉碎过 60 目筛, 参考 Krishnan 等^[14]人的提取方法并稍作改动, 称量中黄 13 大豆、中黄 75 大豆、徐豆 14 大豆、黑河 43 大豆、黔豆 7 号大豆、皖豆 35 大豆, 各 100 mg, 每份分别加入 1 mL 超纯水, 1 mL 30% 的乙醇。在 37 °C 震荡提取 30 min, 于 4 °C 12000 r/min 转速离心 10 min, 收集上层清液。取上层清液加入 20 μL 100 mM 氯化钙, 混匀, 静置 5 min, 于 4 °C 12000 r/min 转速离心 10 min, 弃去上层清液, 取下层风干。

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 (SDS-PAGE): 将上述样品用 1 ml 1X SDS loading buffer 溶解后离心, 取上清液移至干净的 EP 管中, 煮沸 5

min, 上样量 5 μL, 用 Bio-rad 预制胶和垂直电泳槽, 恒定电压 80 V 电泳 120 min, 考马斯亮蓝染色后脱色。

切下对应凝胶条带, 进一步切碎成 1 mm³ 小块, 转移于 EP 管中, 用乙腈和碳酸氢氨脱色, 二硫苏糖醇 (DTT) 还原二硫键, 用胰蛋白酶 (trypsin) 酶解, 37 °C 过夜处理, 然后用 10% 的三氟乙酸终止酶解反应, 所得到的肽段用含 0.1% 的三氟乙酸的 50% 丙酮溶液提取两次, 然后将提取好的肽段用真空离心浓缩仪进行浓缩, 再用 0.1% 的甲酸超纯水复溶, 高速离心混匀, 用于质谱检测。

1.2.2 Lunasin 标准品的配制

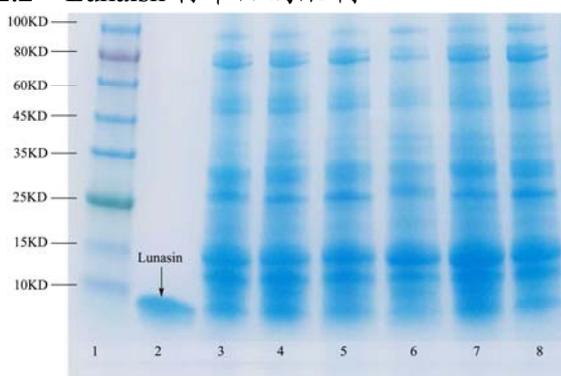


图 1 大豆提取物及 Lunasin 标准品 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis of soybean extracts and lunasin standard

注: 1 为蛋白 Marker; 2 为 Lunasin 标准品; 3~8 依次为中黄 13、中黄 75、徐豆 14、黑河 43、黔豆 7 号、皖豆 35 大豆提取物。

Lunasin 标准品的配制: 精密称取 Lunasin 标准品 20 mg, 配成 20 mg/mL 的高标, 并梯度稀释为 2000 mg/L, 100 mg/L、500 mg/L、250 mg/L 和 125 mg/L。SDS-PAGE 和酶解用同上 1.2.1 所述的条件进行处理。

1.2.3 Lunasin 的测定

用纳流液相色谱串联轨道阱质谱 (NanoLC-Orbitrap) 平行反应监视法 (PRM) 测定六种大豆中 Lunasin 含量。

色谱条件: 色谱柱: EASY-Spray column (50 μm×15 cm, 2 μm); 柱温: 25 °C; 流速: 300 nL/min; 进样体积 2 μL; A 液: 0.1% 甲酸水溶液, B 液: 0.1% 甲酸的乙腈溶液; 洗脱程序如表 1 所示。

质谱条件: 离子源: 电喷雾电离源 (ESI); 扫描方式: 平行反应监视法 (PRM); 采用正离子模式, 离子传输管温度 320 °C; 一级全扫描范围为 m/z 350~1550, 自动增益控制 (AGC) 和离子注入时间 (IT) 分别设为 2.0×10^5 和 50 ms; 二级扫描 (dd-MS2) AGC 设为 5.0×10^4 , 离子注入时间 IT 设为 100 ms, 碰撞能量为 32 eV, 对所有质谱结果使用 Proteome Discover (Vesion

PD1.4) 软件在 Uniprot/Swiss-prot 数据库进行检索, 得到最合适的鉴定结果。

表 1 洗脱程序

Table 1 Elution program

时间/min	A 液/%	B 液/%	流速/(nL/min)
0	97	3	300
5	92	8	300
107	72	28	300
110	20	80	300
120	20	80	300

2 结果与讨论

2.1 大豆提取物及 Lunasin 电泳结果

恒定电压 80 V 电泳 120 min, 以考马斯亮蓝 G-250 染色后脱色, 以 Marker 及阳性对照 Lunasin 标准品作为参照物, 电泳结果见图 1。从大豆提取物及 Lunasin 标准品电泳结果图中可以看出, 在 2 号阳性对照 Lunasin 标准品条带相应的位置, 3~8 号都有条带出现, 可能是多肽 Lunasin。六种大豆的提取物的电泳条带样式近似, 但颜色深浅不同。

2.2 Lunasin 含量的测定

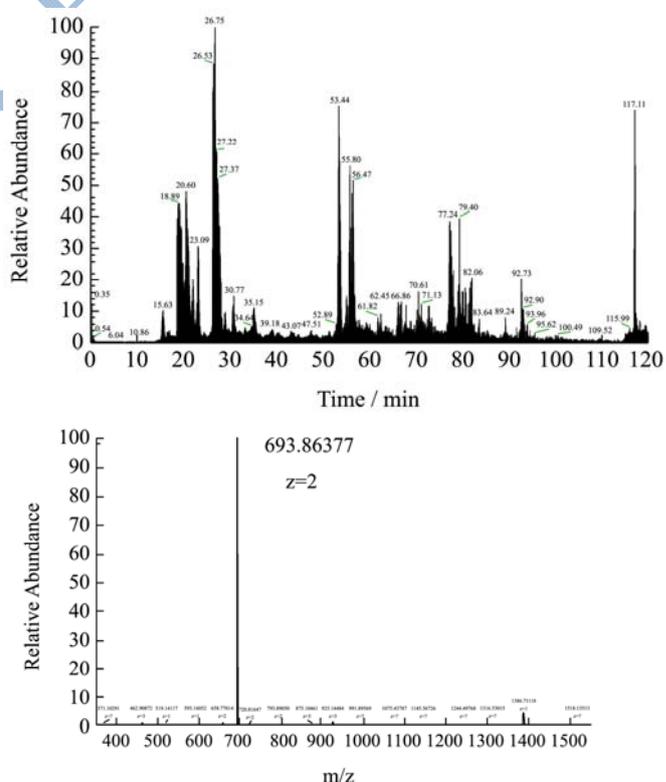


图 2 标准品总离子流图和一级质谱图

Fig.2 Total ion chromatogram and mass spectrogram of standard substance

2.2.1 Lunasin 定量肽段的确定及标准曲线的建立

如图 2 所示是酶解后的标准品的总离子流图和一级质谱图,从总离子流图中可以看出,响应最强的化合物保留时间为 26.53~27.37 min 的峰,一级质谱图显示该峰对应的质荷比 (m/z) 是 693.86377。用 NCBI 中大豆蛋白库 Blast 检索得 QLQGVNLTPECK 是大豆中 Lunasin 的特异性肽段,是其氨基酸序列 SKWQHQQDSCRKQLQGVNLTPECKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD 中的一部分,符合胰蛋白酶酶切位点特征,实际检测出来的 m/z 是 693.86377 (理论值 693.85999,误差 5.81×10^{-6}),误差小于 10×10^{-6} ,可以认为是同一肽段。

我们用 Lunasin 酶解后的特征性肽段 QLQGVNLTPECK 来进行定量。如图 3 所示是 Lunasin 标准品的二级质谱图,从图中可以看出响应最高的离子为 y^{4+} 离子。因此,选择肽段 QLQGVNLTPECK,母离子 m/z 为 693.86377,特征子离子 $y^{4+}m/z$ 为 533.24133,来进行大豆中 Lunasin 的定量。

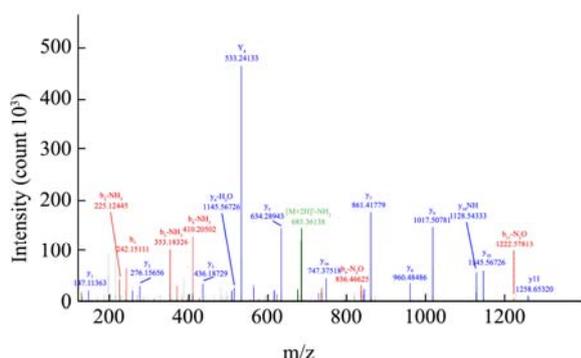


图 3 标准品二级质谱图

Fig.3 Two stage mass spectrogram of standard substance

按照 1.2.2 中的方法, Lunasin 标准品为 2000 mg/L、1000 mg/L、500 mg/L、250 mg/L 和 125 mg/L 系列稀释溶液用纳流液相色谱串联轨道阱质谱 (NanoLC-Obitrap), 平行反应监视法 (PRM) 法依次进行检测。以标准品峰面积对其浓度进行线性回归, 质量浓度 (mg/L) 为横坐标, 峰面积为纵坐标制作标准曲线, 结果显示得到标准曲线为 $y=7993552.01x-1264601495.50$, $R^2=0.998$, 线性关系良好, 适用于定量分析。

2.2.2 精密度及样品加标回收率实验

精密度实验: 取 2.2.1 标准品溶液, 以 2 μ L 进样量连续进样 6 次, 计算得峰面积的 RSD 分别为 0.21%。

回收率实验: 样品加标回收实验参照许高燕^[15]的方法, 取同一大豆样品粉末 2 份各 100 mg, 一份作为

对照, 另一份加入 0.2 mg Lunasin 标准品, 按照 1.2.3 中方法提取并进行 NanoLC-Obitrap 分析, 重复三次。实验结果表明: PRM 方法测定大豆中 Lunasin 含量, 可操作性强, 方法准确可靠, 回收率为 81.00%, RSD 为 2.10%。结果显示, 本法具有较好的重复性与灵敏度, 适用于定量分析。

2.2.3 六种国产栽培大豆中 Lunasin 含量测定

取中黄 13 大豆、中黄 75 大豆、徐豆 14 大豆、黑河 43 大豆、黔豆 7 号大豆、皖豆 35 大豆, 各 100 mg, 按上述方法, 用纳流液相色谱串联轨道阱质谱 (NanoLC-Obitrap), 平行反应监视法 (PRM) 法依次进行检测其中多肽 Lunasin 含量, 具体结果见表 2。

表 2 六种国产栽培大豆中 Lunasin 含量

Table 2 Lunasin content in six different cultivars of domestic soybeans

大豆品种	含量/(mg/g)	RSD/%
中黄 13	2.24	2.30%
中黄 75	3.35	1.50%
徐豆 14	2.59	0.90%
黑河 43	2.87	1.60%
黔豆 7 号	2.03	2.40%
皖豆 35	4.66	2.30%

3 结论

本文利用纳流液相色谱串联轨道阱质谱 (NanoLC-Obitrap) 平行反应监视法 (PRM) 对六种国产大豆中 Lunasin 的含量进行了测定。发现国产的六种大豆中均含有 Lunasin, 皖豆 35 大豆中 Lunasin 含量最高, 为 4.66 mg/g; 中黄 13 中含量为 2.24 mg/g; 中黄 75 中含量为 3.35 mg/g; 徐豆 14 中含量为 2.59 mg/g; 黔豆 7 号中含量为 2.03 mg/g; 黑河 43 号含量为 2.87 mg/g。实验结果表明大豆中 Lunasin 含量丰富。

本研究以国产六种大豆为实验材料, 建立了提取大豆多肽 Lunasin 的方法, 采用 SDS-PAGE 分离的方法降低了基质干扰, 并采用纳流液相色谱串联轨道阱质谱 (NanoLC-Obitrap) 平行反应监视法 (PRM) 对大豆中 Lunasin 含量进行测定。本测定方法准确可靠, 重现性好。为全面认识不同品种大豆中 Lunasin 及优质蛋白和多肽, 开展大豆品种营养评价奠定了必要的理论基础。同时 Lunasin 作为大豆中目前发现的含量较高的多肽, 通过该分析方法检测多肽的含量, 可以用于筛选富含 Lunasin 大豆的优势品种, 或许可能作为大豆质量评价的一个方法, 为功能性食品的开发提供支撑。

参考文献

- [1] Lule V K, Garg S, Pophaly S D, et al. Potential health benefits of Lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(3): 485-494
- [2] De Lumen B O. Lunasin: a cancer preventive soy peptide [J]. *Nutrition Reviews*, 2005, 63(1): 16-21
- [3] Galvez A F. Identification of Lunasin as the active component in soy protein responsible for reducing LDL cholesterol and risk of cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2012, 126(21): A10693
- [4] Jeong H J, Jeong J B, Kim D S, et al. Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide Lunasin [J]. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(3): 632-637
- [5] Park J H, Jeong H J, de Lumen B O. Contents and bioactivities of Lunasin, Bowman-Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(20): 7686-7690
- [6] Gonzalez de M, E Vasconez, M de Lumen B O, et al. Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products [J]. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(19): 5882-5887
- [7] Ren G, Zhu Y, Shi Z, et al. Detection of Lunasin in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) and the in vitro evaluation of its antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(12): 4110-4116
- [8] Nakurte I, Klavins K, Kirchner I, et al. Discovery of Lunasin peptide in triticale (*X Triticosecale Wittmack*) [J]. *Journal of Cereal Science*, 2012, 56(2): 510-514
- [9] Dinelli G, Bregola V, Bosi S, et al. Lunasin in wheat: a chemical and molecular study on its presence or absence [J]. *Food Chemistry*, 2014, 151(4): 520-525
- [10] 李莉峰. 我国大豆加工利用发展研究[J]. *农业科技与装备*, 2011, 1(199): 6-8
LI Li-feng. Research on the processing and utilization of soybeans in China [J]. *Agricultural Science & Technology and Equipment*, 2011, 1(199): 6-8
- [11] 赵力超, 陈永泉, 金越. 我国大豆加工利用研究的综合分析[J]. *现代食品科技*, 2015, 21(1): 157-159
ZHAO Li-chao, CHEN Yong-quan, JIN Yue. Analysis of Chinese soybean processing and utilization [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2005, 21(1): 157-159
- [12] 韩德志, 闫洪睿, 梁吉利, 等. 黑河 43 号大豆品种大面积推广分析[J]. *中国西部科技*, 2013, 11: 55-56
HAN De-zhi, YAN Hong-rui, LIANG Ji-li. Heihe 43 soybean large extension analysis [J]. *Science and Technology of West China*, 2013, 11: 55-56
- [13] 成雪峰, 张凤云. 黄淮海夏大豆生产现状及发展对策[J]. *大豆科学*, 2010, 29(1): 157-160
CHENG Xue-feng, ZHANG Feng-yun. Present conditions and countermeasures of soybean production in Huang-Huai-Hai region [J]. *Soybean Science*, 2010, 29(1): 157-160
- [14] Krishnan H B, Wang T T. An effective and simple procedure to isolate abundant quantities of biologically active chemopreventive Lunasin Protease Inhibitor Concentrate (LPIC) from soybean [J]. *Food Chemistry*, 2015, 177: 120-126
- [15] 许高燕, 刘莹雯, 银董红. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水溶性迷迭香提取物中迷迭香酸、阿魏酸和咖啡酸的含量[J]. *分析科学学报*, 2006, 22(1): 567-569
XU Gao-yan, LIU Ying-wen, YIN Dong-hong. Simultaneous determination of rosmarinic acid, caffeic acid and ferulic acid in water-soluble extract of rosemary by LC/MS/MS [J]. *Journal of Analytical Science*, 2006, 22(5): 567-569