

大豆蛋白酶抑制剂的提取及其性质研究

田 军¹,魏志魁²,周先碗²

(¹高等教育出版社,北京 100029; ²北京大学生命科学学院,北京 100871)

摘 要:蛋白酶抑制剂(Protease Inhibitor)是一类对蛋白酶有抑制作用的多肽或蛋白质,对于生物体内许多重要的生理功能具有调节作用。蛋白酶抑制剂广泛存在于动、植物和微生物中,在豆类植物的储藏器官,特别是种子中含量丰富。在大豆种子中其含量可达总蛋白的 6%~8%。且大豆中蛋白酶抑制剂的活性最高。探讨从大豆中提取、分离蛋白酶抑制剂的方法,并对其性质进行初步研究。首先将大豆浸泡液分别通过阴离子和阳离子交换柱层析分离,对获得的各组分进行活性测定、SDS-凝胶电泳和等电聚焦电泳分析。结果显示:最高的组分比活在 15 000 U·mg⁻¹左右、相对分子质量在 21 000D 左右、等电点在 4.55 左右。

关键词:大豆;胰蛋白酶抑制剂;等电聚焦电泳

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2008)06-1085-04

Extraction and Characterization of Soybean Trypsin Inhibitor

TIAN Jun¹, WEI Zhi-kui², ZHOU Xian-wan²

(¹Higher Education Press, Beijing 100029; ²College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract:Protease inhibitor is a kind of polypeptides or proteins which has inhibition effect on protease and its highest inhibition activity was observed in the seed of soybean. The soybean trypsin inhibitors were extracted and purified by DEAE-Sephadex 4B FF and SP-Sephadex 4B FF column, and the activities of each obtained component were measured. Meanwhile, SDS-PAGE and isoelectric focusing electrophoresis were also used to determine the relative molecular weight and isoelectric point. Result showed the component with the highest inhibition activity has the specific inhibition activity of 15 000 U·mg⁻¹, the *M_r* of 21 000 and the isoelectric point of 4.55.

Key words:Soybean; Trypsin inhibitor; Isoelectric focusing electrophoresis

蛋白酶抑制剂(Protease Inhibitor)广泛存在于动、植物和微生物中,是一类对蛋白酶有抑制作用的多肽或蛋白质,能与相应的蛋白水解酶形成一定的动态平衡,调节生物体内许多重要的生命活动^[1-2]。根据其来源不同抑制的蛋白酶有所区别,从大豆中提取的大豆胰蛋白酶抑制剂(Soybean Trypsin Inhibitor, STI)等。在豆类植物的储藏器官,特别是种子中含有丰富的胰蛋白酶抑制剂^[3],例如大豆和绿豆种子中胰蛋白酶抑制剂的含量可达总蛋白的 6%~8%。在不同作物种子中,胰蛋白酶抑制剂的活性各不相同,通常以大豆中胰蛋白酶抑制剂的活性最高^[4]。但是迄今为止,只有 2 种大豆胰蛋白酶抑制剂得到较详细的研究^[5]。分别是库尼兹胰蛋白抑制剂(Kunitz Soybean Trypsin Inhibitor, 简称 KSTI)和鲍曼-贝尔克胰蛋白酶抑制剂(Bowman-Birk Soy-

bean Trypsin Inhibitor, 简称 BBI)。

蛋白酶抑制剂有着重要的生理、生化功能和广泛的应用。研究表明蛋白酶抑制剂具有抗某些病虫害的天然防御功能,能削弱或阻断昆虫消化道内的蛋白酶对食物蛋白质的消化作用而使昆虫非正常发育或死亡^[6]。生物体内许多重要的生理过程都受蛋白酶及其抑制剂的调控,在临床医学的诊断、治疗和预防等方面,蛋白酶抑制剂作为新型药物显示出了广阔的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

大豆(soybean)(购自超市);阴离子交换层析介质 DEAE-Sephadex 4B FF,阳离子交换层析介质 SP-Sephadex 4B FF(Pharmacia)。丙烯酰胺和甲叉双丙

烯酰胺 (AR, Merck), 载体两性电解质 (pH2.5 – 10.5, Pharmacia), N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯 (BAEE) (AR, 上海), 标准胰蛋白酶 (本实验室提供)。紫外检测仪 (LKB BROMMA 2138), 紫外-可见分光光度计 (He λ isoα, UNICAM), 电泳仪 (EPS600, Pharmacia), 超速离心机 (J-30I Beckman)。

1.2 方法

1.2.1 大豆胰蛋白酶抑制剂粗提液的制备 将 50 g 大豆用 350 mL 0.05 pH 8 Tris-HCl 缓冲液浸泡过夜, 匀浆。磁力搅拌提取 30 min, 然后用两层纱布过滤。滤液用 0.05 mol · L⁻¹ pH 8 的 Tris-HCl 缓冲液稀释到 500 mL, 然后在 5 000 r · min⁻¹ 下离心 15 min, 取上清液, 在 25 000 r · min⁻¹ 下离心 40 min, 取上清液, 滤纸过滤去脂, 滤液静置过夜。

1.2.2 DEAE-Sephrose 4B FF 阴离子交换层层析分离 得到的滤液虹吸出上清, 0.05 mol · L⁻¹ pH 8 Tris-HCl 缓冲液稀释 3 倍上 DEAE-Sephrose 离子交换柱。用 0.05 mol · L⁻¹ pH 8 Tris-HCl 缓冲液平衡, 0 ~ 0.5 mol · L⁻¹ NaCl 溶液进行梯度洗脱, 收集洗脱峰, 并对各组分进行胰蛋白酶抑制活性。

1.2.3 SP-Sephrose 4B FF 阳离子交换柱层析分离 经 DEAE-Sephrose 阴离子交换柱上样流出的液调到 pH 4.0, 滤纸过滤。滤液上 SP-Sephrose 4B FF 阳离子交换柱, 以 0.1 mol · L⁻¹ pH4 醋酸-醋酸钠缓冲液平衡, 0.17 mol · L⁻¹、0.27 mol · L⁻¹、0.5 mol · L⁻¹ 和 1 mol · L⁻¹ 的 NaCl 溶液分步洗脱。收集各组分, 分别测定其胰蛋白酶抑制活性。

1.2.4 大豆胰蛋白酶抑制剂抑制活性测定^[7] 以 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯 (BAEE) 为底物, 测定对胰蛋白酶的抑制活性。在 1.5 mL BAEE 底物缓冲液 (0.05 mol · L⁻¹ CaCl₂, 0.05 mol · L⁻¹ pH 8.0 Tris-HCl) 中, 加入胰蛋白酶 8 μg 和大豆胰蛋白酶抑制剂 10 μg, 混匀后, 室温放置 2 min 以上, 再加入 1.5 mL 2 mmol · L⁻¹ BAEE 底物混匀, 立即在紫外分光光度计 253 nm 处测定吸光值, 每 30 s 读取一个数据, 以吸光值为纵坐标, 时间为横坐标绘出活性曲线。

1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[7] 分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 5%, 蛋白浓度为 1 mg · mL⁻¹, 上样量为 10 ~ 15 μL。60 V 稳压 15 ~ 20 min, 等样品全部进入分离胶之后, 110 V 稳压直到溴酚蓝指示剂距离前沿 0.5 cm 处左右停止电泳, 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色。

1.2.6 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳^[7] 凝胶浓度为

7.5%, 交联度 C = 3%, 两性电解质的浓度为 2.5%。阳极电极液: 1 mol · L⁻¹ 磷酸; 阴极电极液: 0.5 mol · L⁻¹ NaOH, 样液浓度 1 mg · mL⁻¹, 吸取约 5 μL 样液滴加在加样纸上, 60 V 恒压 15 min, 然后恒流直至电压上升到 550 V 时关闭电源, 揭去加样纸, 再打开电源, 调节电压至 580 V, 恒压直到电流降接近零时停止电泳, 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色。

1.2.7 Folin-酚法测定蛋白浓度^[7] 以牛血清清蛋白为标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 层析分离结果

2.1.1 DEAE-Sephrose 4B FF 阴离子交换柱层析分离结果 经 DEAE-Sephrose 4B FF 阴离子交换柱层析分离, 用 NaCl 梯度洗脱得到三个组分, 结果如图 1。平衡液: 0.05 mol · L⁻¹ pH 8 Tris-HCl 缓冲液, 洗脱液 A: 0.05 mol · L⁻¹ pH 8 Tris-HCl 缓冲液, B: 0.5 mol/L NaCl-0.05 mol · L⁻¹ pH 8 Tris-HCl 缓冲液。

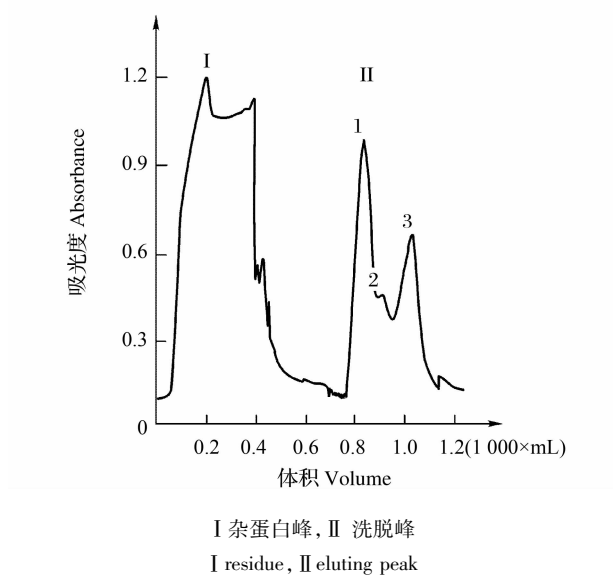


图 1 DEAE-Sephrose 4B FF 分离大豆胰蛋白酶抑制剂层析图谱

Fig. 1 DEAE-Sephrose 4B FF patterns of the isolation of the soybean trypsin inhibitors

2.1.2 SP-Sephrose FF 阳离子交换柱层析分离结果 经 SP-Sephrose FF 阳离子交换柱层析分离, 用不同浓度的 NaCl 分步洗脱得到 4 个组分, 结果如图 2。

平衡液: 0.1 mol · L⁻¹ pH 4 醋酸-醋酸钠缓冲液, 洗脱液分别为 0.17 mol · L⁻¹ NaCl-0.1 mol · L⁻¹

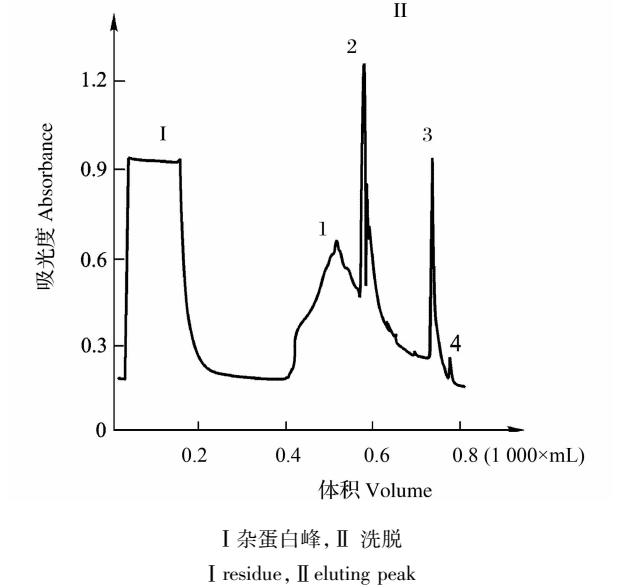


图2 SP-Sepharose 4B FF 分离大豆胰蛋白酶抑制剂层析图谱

Figure 2 SP-Sepharose 4B FF patterns of the isolation of the soybean trypsin inhibitors

pH 4 醋酸-醋酸钠缓冲液、0.27 mol · L⁻¹ NaCl-0.1 mol · L⁻¹ pH 4 醋酸-醋酸钠缓冲液、0.5 mol · L⁻¹ NaCl-0.1 mol · L⁻¹ pH 4 醋酸-醋酸钠缓冲液和1.0 mol · L⁻¹ NaCl-0.1 mol · L⁻¹ pH 4 醋酸-醋酸钠缓冲液。

2.2 大豆胰蛋白酶抑制活性测定结果

2.2.1 DEAE - Sepharose 阴离子交换层析分离的大豆胰蛋白酶抑制剂活性测定结果见表1,最高活性接近 15 000 U · mg⁻¹,最低活性在 700 U · mg⁻¹左右。

表1 大豆胰蛋白酶抑制剂抑制活性测定结果

Table 1 The inhibition activity of every eluting peak and the sample

组分 Component	总蛋白量 Total protein/mg	抑制比活 Specific inhibition activity/U · mg ⁻¹	总活性回收率 Total yield/%
样液 Sample	4230	728	
峰1Peak 1	33.6	6000	15.7
峰2Peak 2	18.4	14533	
峰3Peak 3	23.1	714.3	

2.2.2 经过 SP-Sepharose 4B FF 阳离子交换层析分离大豆胰蛋白酶抑制剂活性测定 结果见表2。最高活性 15 000 U · mg⁻¹以上,最低活性在 2 800 U · mg⁻¹左右。

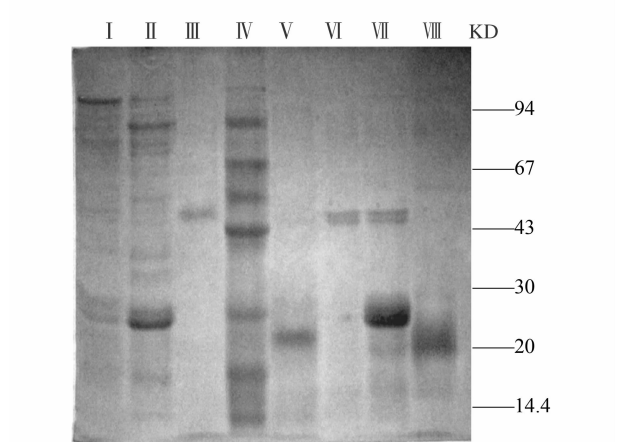
2.3 电泳结果

2.3.1 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定相对分子量 结果见图3,经 DEAE- Sepharose 4B FF 柱层析分离得到的组分和 SP-Sepharose 4B FF 柱层析分离得到的组分,它们的相对分子量相多数在 20 ~ 30 KD 左右。

表2 大豆胰蛋白酶抑制剂抑制活性测定结果

Table 2 The inhibition activity of every eluting peak and the sample

组分 Component	总蛋白量 Total protein/mg	抑制比活 Specific inhibition activity/U · mg ⁻¹	总活性回收率 Total yield/%
样液 Sample	3020	651	
峰1Peak 1	14.7	5136	18.6
峰2Peak 2	7.6	2821	
峰3Peak 3	16.8	15642	
峰4Peak 4	0.4	16125	



I , II , III 与 V , VI , VII , VII 为层析分离的组分,IV 为低分子量蛋白标志物

I , II , III and V , VI , VII , VII are components from SDS- PAGE. IV is the Mr marker

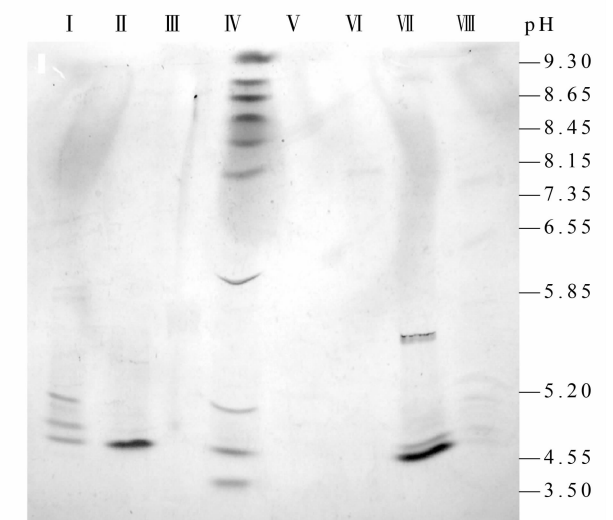
图3 大豆胰蛋白酶抑制剂的 SDS- PAGE 图谱

Fig.3 SDS- PAGE results of soybean trypsin inhibitors

I , II , III 分别是 DEAE- Sepharose 4B FF 层析分离得到的组分一,组分二和组分三。V , VI , VII , VIII 分别是 SP- Sepharose 4B FF 层析分离得到的组分 A、组分 B、组分 C 和组分 D,IV 是低分子量蛋白标志物,自上而下分别为磷酸化酶 b(94KD)、牛血清清蛋白(67KD)、卵清蛋白(43KD)、碳酸酐酶(30KD)、大豆胰蛋白酶抑制剂(20.1KD)和 α- 乳清蛋白(14.4KD)。

2.3.2 大豆胰蛋白酶抑制剂的聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定结果 无论是经 DEAE- Sepharose

4B FF 分离的蛋白峰还是 SP-Sephrose 4B FF 分离的蛋白峰,它们的等电点大多数都在 pH 4.5 ~ 5.5 之间,见图 4。



I, II, III 与 V, VI, VII, VIII 为层析分离的组分,IV 为标准蛋白质等电点标志物
I, II, III and V, VI, VII, VIII are components from SDS- PAGE.
IV is pI marker

图 4 大豆胰蛋白酶抑制剂的等电聚焦电泳图谱
Fig.4 Isoelectric focusing electrophoresis patterns

I, II, III 分别是 DEAE- Sepharose 4B FF 层析分离得到的组分一,组分二和组分三。V, VI, VII, VIII 分别是 SP-Sephrose FF 层析分离得到的组分 A,组分 B、组分 C 和组分 D。IV 是标准蛋白质等电点标志物,自上而下分别为胰蛋白酶原 (pI 9.30)、晶状体凝集素 (pI 8.65)、晶状体凝集素 (pI 8.45)、晶状体凝集素 (pI 8.15)、马肌红蛋白 (pI 7.35)、人碳酸酐酶 B (pI 6.55)、牛碳酸酐酶 B (pI 5.85)、 β -乳球蛋白 A (pI 5.20)、大豆胰蛋白酶抑制剂 (pI 4.55) 和淀粉葡萄糖苷酶 (pI 3.50)。

3 讨论

大豆中含有丰富的胰蛋白酶抑制剂,通过阴离子或阳离子交换层析均能得到有效的分离。将得到的各种组分分别进行对胰蛋白酶抑制活性测定,活

性最高的组分可达到 $16\,000\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,活性最低的组分在 $700\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 左右,说明各蛋白组分对胰蛋白酶活性中心的抑制作用存在较大的差异,这可能是抑制剂与胰蛋白酶分子之间的亲和力不同,也可能是各组分不纯所造成的。从 SDS- PAGE 和聚丙烯酰胺等电聚焦电泳图谱可以看出每一个组分度含有一定的杂蛋白,有的组分有几个蛋白条带。此外,该结果还表明采用阴离子或阳离子交换柱层析法均能得到较好的分离,但是从层析图谱分析 DEAE-Seph-
arose 4B FF 层析图谱比 SP-Sephrose 4B FF 层析图谱略好一些。因为它们的等电点都在偏酸性范围,属酸性蛋白,因此,建议采用 DEAE-Sephrose 4B FF 阴离子柱层析更好。

参考文献

[1] 曾仲奎,谢文胜,鲍锦库,等. 水稻巯基蛋白酶抑制剂的分离纯化及性质研究[J]. 生物化学杂志, 1996, 12 (6): 703 - 708. (Zeng W Z, Xie W S, Bao J K, et al. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor[J]. Journal of Biochemistry, 1996, 12(6): 703 - 708.)

[2] Pandya M J, Smith D A, Yarwood A, et al. Complete amino acid sequences of two trypsin inhibitors from buckwheat seed[J]. Phytochemistry, 1996, 43: 327 - 331.

[3] Rackis J J, Anderson R L. Isolation of four soybean trypsin inhibitor by DEAE cellulose chromatography[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1964, 15: 320 - 335.

[4] 万善霞,王婉琬,滑静,等. 胰蛋白酶抑制剂在不同领域的研究概况[J]. 北京农学院学报, 2003, 4: 152 - 155. (Wan S X, Wang W W, Hua J, et al. Research status of trypsin inhibitor in different fields[J]. Journal of Beijing Agricultural College, 2003, 4: 152 - 155.)

[5] 周春晖,黄惠华. 大豆胰蛋白酶抑制剂失活方法研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2001, 4: 19 - 22. (Zhou C H, Huang H H. The research advance in the inactivating methods of soybean trypsin inhibitor[J]. Cereal & Feed Industry, 2001, 4: 19 - 22.)

[6] Ryan C A. Protease inhibitors in plant: genes for improving defenses against insects and pathogens[J]. Annual Reviews in Phytopathology, 1990, 8: 425 - 449.

[7] 陈雅惠. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2005. (Chen Y H. Principle and method of biochemistry experiment[M]. Beijing: Peking University Press, 2005.)