

与纳豆激酶有亲和吸附特性的大豆蛋白性质研究

李希生^{1,2}, 史延茂², 田智斌^{1,2}, 董超²

(1. 河北工业大学 化工学院生物工程系, 天津 300130; 2. 河北省生物研究所, 河北 石家庄 050081)

摘要:采用偶联纳豆激酶的 Sepharose-4B 作为吸附介质, 用亲和层析技术从大豆蛋白中得到了与纳豆激酶具有亲和吸附作用的目的蛋白, 采用变性电泳技术测得其分子量分别约为 30.0 和 26.0 kDa; 采用表面等离子共振技术测定了目的蛋白与纳豆激酶的亲和吸附, 检测出此蛋白中含有与纳豆激酶偶联的结构, 并且推测得出 2 种目的蛋白是 11S (大豆球蛋白) 的 2 个亚基对。

关键词:纳豆激酶; 亲和吸附; 大豆蛋白; 表面等离子共振技术

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)05-0131-04

Properties of Soybean Proteins Having Affinity Adsorption with Nattokinase

LI Xi-sheng^{1,2}, SHI Yan-mao², TIAN Zhi-bin^{1,2}, DONG Chao²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300100; 2. Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang 050081, Hebei, China)

Abstract: Using Sepharose-4B cross-linked with nattokinase as adsorbing medium, the target proteins were obtained from those of the soybean proteins by affinity chromatography. The molecular weights of target proteins were 30.0 and 26.0 kDa, respectively, measured by degeneration electrophoresis technology. Surface plasmon resonance technology was used to determine the affinity adsorption between nattokinase and target soy proteins and the results revealed the protein contains the structure that coupled to nattokinase and the target proteins might be the two subunit pairs of 11S(glycinin).

Key words: Nattokinase; Affinity adsorption; Soy proteins; Surface plasmon resonance technology

纳豆激酶(Nattokinase, NK)是纳豆芽孢杆菌发酵产生的一种碱性丝氨酸蛋白酶^[1], 是 Sumi 等^[2]在 1987 年首次从纳豆中分离提取出来的。纳豆激酶具有直接溶栓作用, 还可以间接产生纤溶酶原激活剂(t-PA), 溶解纤维蛋白能力强, 并且体内半衰期长, 没有毒副作用, 发酵规模容易扩大, 是具有广阔前景的溶栓药物之一, 近年来引起了医学界的广泛关注^[3-4]。

产物的提取分离一直是生物发酵下游的关键技术, 亲和层析法具有操作步骤少, 回收率高, 工艺程序简单等优点。马跃华等^[5]验证了大豆颗粒与 NK 具有亲和吸附特性, 并且通过亲和层析法成功地从粗酶液中提取分离出了电泳纯的纳豆激酶, 但是由于大豆颗粒机械强度低, 易变质等缺点, 使用时限和周期都不令人满意, 如果将大豆蛋白的亲和结构固定到机械强度高的支撑介质上, 即可解决这个问题。该研究利用亲和层析技术提取与纳豆激酶具有亲和吸附特性的大豆蛋白, 采用分子表面等离子共振技术测定了该蛋白与纳豆激酶的亲和性, SDS-PAGE 技术检测了其分子量大小, 根据大豆蛋白的分类及特点推断出了该蛋白种类。

1 材料和仪器

1.1 材料

S-4B 树脂 (Sweden 公司); 牛纤维蛋白原 (Sigma 公司); 琼脂糖 (Solarbio 公司); 凝血酶 (石家庄市华瑞创新生物科技有限公司); 尿激酶 (北京赛生药业有限公司); 甲叉双丙烯酰胺 (天津大茂化学试剂厂); TEMED (Merck Co Germany); SDS (中药集团上海化学试剂公司); Tris (石家庄市华瑞创新生物科技有限公司); 考马斯亮蓝 R-250 (中国医药集团上海化学试剂公司); Marker (Takara 公司); 纳豆激酶 (河北省科学院生物研究所细胞生化实验室提取制备)。

1.2 仪器

DH-21-88 紫外检测仪 (上海淇特分析仪器有限公司); DYY-6C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); 752 型紫外分光光度计 (上海光谱仪器厂有限公司); TH-300 梯度混合仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司); N2000 双通道色谱工作站 (浙江大学智达信息工程有限公司); HL-2S 恒流泵 (上海青浦沪西仪器厂); BLACORE 3000 (通用医学 Sweden 公司)。

收稿日期: 2011-10-24

基金项目: 河北省科技支撑计划资助项目 (11275508D)。

第一作者简介: 李希生 (1983-), 男, 硕士, 研究方向为发酵及提取技术。

通讯作者: 董超 (1970-), 男, 高级工程师, 从事药用微生物的发酵及应用开发研究。E-mail: dongchao8605@sina.com。

2 实验方法

2.1 大豆蛋白的预处理

将大豆粉碎后过 80 ~ 100 目的分样筛,得到大豆干粉,称取 12.5 g 大豆干粉置于 200 mL 的烧杯中,加入 100 mL 的 PBS(pH 6.0, 0.01 mol·L⁻¹) 缓冲液,室温搅拌 30 min,依次经过 8 层纱布、滤纸和 0.45 μm 水系针头滤器过滤,收集滤液,静置 4℃ 冰箱中,备用。

2.2 亲和吸附体的制备

2.2.1 载体的活化 称取 5 g 充分溶胀的 Sephrose-4B(湿重)置于 80 mL 烧杯中,用去离子水多次洗涤,抽干后,分别加入 8 mL 0.8 mol·L⁻¹ NaOH 溶液、2.5 mL 环氧氯丙烷,室温震荡 20 min,再分别加入 1.5 mL 1,4-二氧六环、10 mg NaBH₄,摇床震荡速度 180 r·min⁻¹,温度 25℃,反应 7 h。反应完毕后用蒸馏水充分洗涤,直至清洗液为中性并且无环氧基检出,然后用 PBS(pH 6.0, 0.01 mol·L⁻¹) 缓冲液清洗、浸泡,室温放置,备用。

2.2.2 纳豆激酶的偶联 称取 0.3 g 纳豆激酶冻干粉,用 10 mL pH 6.0 的 PBS 缓冲液溶解,经透析 12 h 处理后,取 30 μL 利用吸光度差异法^[6]测量,重复 3 次后求平均值,得出偶联前蛋白浓度 C₁,然后将余液倒入烧杯中,加入 4 g 上述已活化的 Sephrose-4B,摇床 80 r·min⁻¹,反应温度 25℃,振荡 4 h,然后静置 4℃ 冰箱中 12 h,抽滤,同样方法的滤液蛋白浓度 C₂,将偶联好的载体用大量蒸馏水洗涤,依次用 0.5 mol·L⁻¹ 的 NaCl、蒸馏水和 PBS(pH 6.0, 0.01 mol·L⁻¹) 缓冲液洗涤,放 4℃ 冰箱中,待用。

2.3 测定方法

2.3.1 活化环氧基含量测定 载体活化后环氧基含量采用硫代硫酸钠滴定法^[7]测定。

2.3.2 蛋白偶联率的测定 根据下面公式计算偶联率:

$$Q = (C_1 V_1 - C_2 V_2) / C_1 V_1 \times 100 \%$$

式中:Q 为反应后 NK 的偶联率, C₁ 为透析后的 NK 液的蛋白浓度 (mg·mL⁻¹), V₁ 为透析后 NK 液的体积 (mL), C₂ 为偶联之后滤液的蛋白浓度 (mg·mL⁻¹), V₂ 为偶联之后滤液的体积 (mL)。

2.3.3 酶活的测定 利用琼脂糖改进纤维蛋白平板^[8]测酶活。

2.4 从大豆蛋白中提取目的蛋白

以偶联 NK 的 Sephrose-4B 作为亲和层析介质装入层析柱 (0.1 cm × 10 cm), 外接紫外检测仪和色谱在线监测系统,用 PBS 洗至平衡,基线平直,取

2.1 节处理好的大豆蛋白液上样,先用 pH 6.0, 0.01 mol·L⁻¹ 的 PBS 缓冲液以 0.6 mol·min⁻¹ 的流速淋洗,得到峰 A;然后换用 0 ~ 1 mol·L⁻¹ NaCl 梯度以同样的流速洗脱,得到峰 B,并收集洗脱峰 B 样液,冷冻干燥后,得到目的蛋白干粉,放 4℃ 冰箱储存。

2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 蛋白分子量测定

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳对上述收集 B 峰的蛋白组分进行分子量测定。

2.6 表面等离子共振技术检测蛋白亲和性

首先,开机 Biocare 3000 预热 30 min,依次用 pH 4.0、4.5、5.0、5.5 的样品缓冲液与 1.9 mg·mL⁻¹ 的目的蛋白样液混合,配制成 80 μg·mL⁻¹ 的 200 μL 蛋白溶液,测定其相对响应值,选择适宜的缓冲液;然后,取 8 μL 目的蛋白与 192 μL 的所选的适宜缓冲液混合,将其固定到检测仪的芯片上,经过数次固定,响应值达到 2 000 以上为宜;最后,配置 1.0 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 的 200 μL (透析) 纳豆激酶样液,自动注射到目的蛋白固定的芯片上,测定共振结果,以吸附扩散值来评价其亲和性。

3 结果与分析

3.1 偶联率的测定

根据偶联前后样液的体积和蛋白浓度的实验数据,计算其偶联率,如表 1 所示。

表 1 偶联纳豆激酶的 Sephrose-4B 的偶联率

Table 1 Detection of coupling rate in immobilized nattokinase preparation test

项目	溶液体积	蛋白浓度	偶联量	偶联率
Item	Volume of solution/mL	Protein concentration/mg·mL ⁻¹	Coupled quantity/mg	Coupled rate/%
偶联前	12.6	0.96	/	/
偶联后	14	0.56	4.256	35.2

由表 1 可以看出,偶联前 NK 液蛋白总量为 12.096 mg,经过偶联后余液中蛋白总量 7.84 mg,偶联到载体上的蛋白总量为 4.256 mg,由以上数据可以计算出纳豆激酶与 Sephrose-4B 树脂的偶联率为 35.2%,说明纳豆激酶已经偶联到了 Sephrose-4B 树脂上。

3.2 酶活的检测

3.2.1 标准曲线的绘制 根据不同活性的尿激酶绘制标准曲线,如图 1 所示。

由图 1 可知,尿激酶酶活在 100 ~ 10 000 U·mL⁻¹ 范围时,酶活对数值与对应的溶圈面积 S 呈线性相关,得出其相应的回归方程,其线性相关系数 R² > 0.95,说明其线性相关性很好。

3.2.2 酶活损失率的测定 根据 3.2.1 中得出的

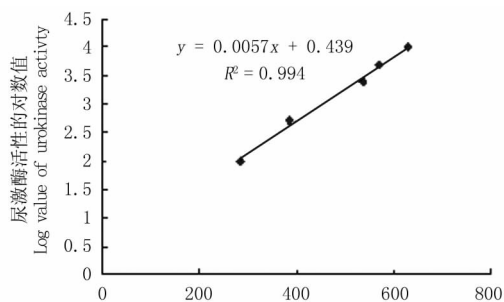


图1 尿激酶活性的标准曲线

Fig.1 The standard curve of urokinase

回归方程,计算偶联前后的酶活。偶联前的纳豆激酶液的酶活为 $34\,999.72\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,与 Sephrose-4B 偶联之后,残余液的酶活为 $22\,286.71\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,减少的酶活力为 $12\,713.01\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,所以,偶联过程中纳豆激酶减少的酶活百分比为 36.3%。减少的酶活包括两部分:一是偶联到 Sephrose-4B 树脂上,二是在偶联过程中失活受损;通过表 1 得出纳豆激酶的偶联率为 35.2%,可以计算出偶联过程中纳豆激酶的损失率为 1.1%,说明在偶联过程中纳豆激酶的失活率很低,可以忽略不计。

3.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对目的蛋白分子量测定

电泳技术对收集的目的蛋白分子量进行检测,如下图 2 所示。

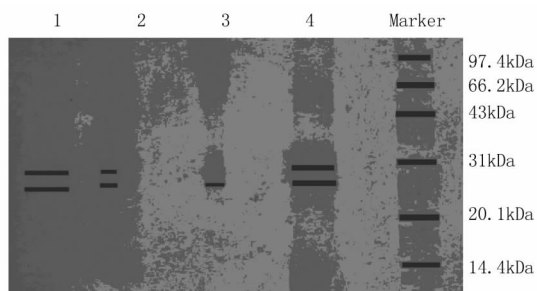


图2 提取大豆目的蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE of target soy proteins

样品 1、2、3、4 分别是不同时间收集的目的蛋白,电泳图 2 显示,在相同的位置出现 2 条带,说明能够与纳豆激酶偶联的目的蛋白有 2 种,与标准参照样品 Marker(分子量范围 14.4 ~ 94.4 kDa)对照,目的蛋白的分子量约为 30.0 和 26.0 kDa。由于 SDS-PAGE 变性电泳过程中加入了巯基乙醇,还原作用使蛋白结构间的二硫键打开,得到蛋白质的一级结构,所以,电泳图中 2 种条带的蛋白可能是二硫键断裂的多聚体的 2 个亚基。

3.4 表面等离子共振技术检测蛋白亲和性

3.4.1 样品缓冲液的选择 不同 pH 的样品缓冲液与目的蛋白液的相对响应值变化趋势见图 3。在 pH 4.0 ~ 5.5 之间的样品缓冲液,随着 pH 的增加,

样品缓冲液与目的蛋白之间的相对响应值逐渐降低,说明目的蛋白对偏酸性的样品缓冲液灵敏度高。相对响应值最高的是 pH 4.0,最低的是 pH 5.5 的样品缓冲液,最终选择 pH 4.0 的样品缓冲液作为稀释测定液。

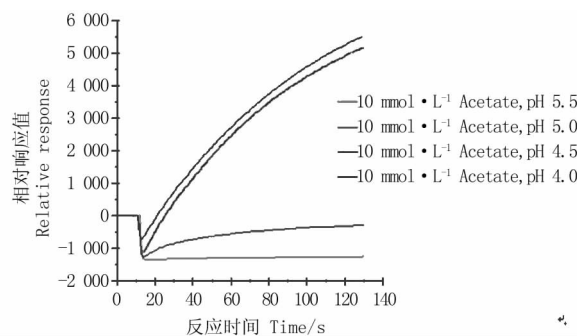


图3 不同 pH 样品缓冲液与目的蛋白的相对响应变化趋势

Fig.3 Change of relative response of different pH buffer and purpose protein

3.4.2 大豆蛋白在芯片上的固定 将目的蛋白固定到芯片上的过程见图 4。

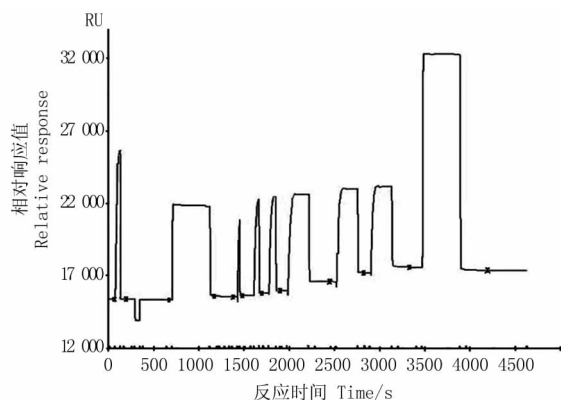


图4 在芯片上固定目的蛋白的过程

Fig.4 Target protein on the chip

该实验是将大豆目的蛋白键合在生物传感器的表面,使其固定到芯片上,达到适宜的固定量。由图 4 所示,每个峰底部分(有 × 的水平线)为固定蛋白的量,从 650 s 开始固定,1 ~ 7 次固定量逐渐累计增加,第 7 次达到最大累计值,曲线的最高相对响应值与基线差值为 2 034,此时达到适宜值,而第 8 次固定后相对响应值低于固定前,说明固定量达到饱和后开始下降。

3.4.3 目的蛋白与纳豆激酶之间的亲和性测定

由图 5 可以看出,在纳豆激酶注射到大豆目的蛋白芯片后,电压相应开始升高,曲线越陡直说明亲和性越强,并且曲线最高值与基线的相应差值达到 10.3, Biocare3000 说明书显示差值达到 10 以上,就可以认为具有亲和吸附特性,所以该数据表示大豆目的蛋白与纳豆激酶具有亲和性。

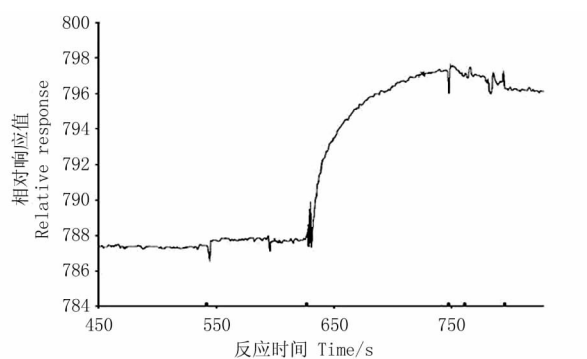


图5 目的蛋白与纳豆激酶在芯片上的亲和响应

Fig.5 The relative response of target protein and Nattokinase on the chip

4 结论与讨论

该实验以固定化纳豆激酶作为介质,亲和层析提取分离了大豆蛋白成分,可以得到与纳豆激酶偶联的大豆目的蛋白。变性电泳实验结果显示,与纳豆激酶偶联的蛋白分子量约为 30.0 和 26.0 kDa;相关研究^[9-10]表明大豆分离蛋白可分为 2S、7S、11S 和 15S 4 种组分,11S 的球蛋白由 6 个亚基对组成,每对由 1 个分子量约为 32 kDa 亚基与 1 个分子量约为 20 kDa 构成,中间有二硫键连接。该研究获得的大豆目的蛋白的分子量比较接近于 11S 球蛋白的单个亚基,并且构成亚基对的 2 个亚基分子量与 2 种目的蛋白的分子量非常的接近,推测这 2 种目的蛋白是 11S 球蛋白中的构成亚基对的 2 条单链蛋白。

关于 11S 球蛋白分子的空间结构有不同的说法。Basley 等^[11]提出 6 个亚基对堆积成 2 个折叠的六元环,Plieta 等^[12]称大豆蛋白的 6 个亚基对在中性疏水条件下的最佳聚集结构是三方反棱柱密堆积结构,而 Lawrence 等^[13]认为 11S 六聚体结构也许是由 2 个 7S 三聚体背对背堆积而成的。由该实验结果推测 11S 球蛋白的亚基对中可能具有与纳豆激酶结合的亲和氨基酸序列或位点,并且该位点在 2 个亚基中是重复的。

表面等离子共振 (SPR) 实验结果显示目的蛋白与纳豆激酶之间发生了结合现象,使得生物传感器表面的质量增加,二者相对响应值升高,说明大豆目的蛋白与纳豆激酶具有亲和性;该实验表明大豆目的蛋白的确具有与纳豆激酶亲和吸附的结构位点,其具体的位点尚未清楚,相关实验及验证需要进一步研究。

参考文献

- [1] Fujita M, Nomura K, Kong K. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197(3): 1340-1347.
- [2] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia, 1987, 43: 1110-1111.
- [3] 苟金霞, 高栋. 纳豆激酶集成化分离技术[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(1): 119-123. (Gou J X, Gao D. Nattokinase integrated separation technology[J]. China Biological Engineering Impurities, 2008, 28(1): 119-123.)
- [4] 丁贵平, 蔡正森, 王正刚. 纳豆激酶的分离纯化及生化研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(3): 13-16. (Jing G P, Cai Z S, Wang Z G. Isolation and purification of nattokinase and biochemical research[J]. Amino Acids and Biological Resources, 2001, 23(3): 13-16.)
- [5] 马跃华, 董超, 杨明, 等. 纳豆激酶的亲和吸附工艺研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(2): 306-309. (Ma Y H, Dong C, Yang M, et al. Adsorption of Nattokinase by soybean microspheres[J]. Soybean Science, 2010, 29(2): 306-309.)
- [6] 陆健, 周楠迪, 史峰, 等. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 273-274. (Lu J, Zhou N D, Shi F, et al. Protein purification technology and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 273-274.)
- [7] 任广智, 李振华, 何炳林. 磁性壳聚糖微球用于酶的固定化研究[J]. 离子交换与吸附, 2001, 17(3): 224-229. (Ren G Z, Li Z H, He B L. Magnetic chitosan microspheres used in the immobilized enzyme[J]. Ion Exchange and Adsorption, 2001, 17(3): 224-229.)
- [8] 杨明, 董超, 史延茂, 等. 纤维蛋白平板法测定纳豆激酶方法的改进[J]. 中国酿造, 2008(7): 77-80. (Yang M, Dong C, Shi Y M, et al. Fibrin flat method to determine the accept beans kinase method improvement[J]. China Brewing, 2008(7): 77-80.)
- [9] 田琨, 管娟, 邵正中, 等. 大豆分离蛋白结构与性能[J]. 化学进展, 2008, 20(4): 565-573. (Tian K, Guan J, Shao Z Z, et al. Soybean protein isolated structure and performance[J]. Chemical Progress, 2008, (4): 565-573.)
- [10] 麻浩, 王显生, 刘春, 等. 706 份中国大豆种质贮藏蛋白 7S 和 11S 组分及其亚基相对含量的研究[J]. 大豆科学, 2006, 25(1): 11-17. (Ma H, Wang X S, Liu C, et al. The content variation of 7S, 11S globulins and their subunits of seed storage protein of 706 Chinese soybean germ plasm[J]. Soybean Science, 2006, 25(1): 11-17.)
- [11] Basley R A, Atkinson D, Hauser H, et al. The structure physical and chemical properties of the soybean protein glycinin[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1975, 412(5): 214-228.
- [12] Plieta P, Drescher B, Damaschun G. Relationship between the amino acid sequence and the domain structure of subunits of the 11S seed globulins[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1987, 9: 161-165.
- [13] Lawrence M C, Izard T, Beuchat M, et al. Structure of phaseolin at 2.2 Å: resolution implications for a common vicilin legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 1994, 238: 748-776.