

大豆胰蛋白酶抑制因子的分离纯化

谷春梅¹, 韩玲玲¹, 曲洪生¹, 宋鑫秀¹, 赵琳琳¹, 潘 姝¹, 秦贵信²

(1. 吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以脱脂豆粉为原料,经 pH7.6 磷酸溶液抽提、65℃ 热变性、硫酸铵分步沉淀等提取技术制备粗提液,之后再经过 DEAE-52 离子交换、亲和层析和葡聚糖凝胶过滤等纯化技术研究大豆胰蛋白酶抑制因子的分离纯化方法。结果表明,从脱脂豆粉中分离纯化的大豆胰蛋白酶抑制因子的比活力高达 4 600 U·mg⁻¹,提纯倍数为 73.85。纯化的大豆胰蛋白酶抑制因子经 SDS-PAGE 电泳分析,呈现 2 条谱带,分子量分别为 21.92 和 20.04 kDa,这 2 种蛋白均为大豆胰蛋白酶抑制因子。该法操作简便,分离纯化效果好,对大豆胰蛋白酶抑制因子的研究与生产有重要的参考价值。

关键词:大豆;胰蛋白酶抑制因子;分离;提取;纯化

中图分类号:S816.4

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)01-0089-04

Extraction and Purification of Soybean Trypsin Inhibitor

GU Chun-mei¹, HAN Ling-ling¹, QU Hong-sheng¹, SONG Xin-xiu¹, ZHAO Lin-lin¹, PAN Shu¹, QIN Gui-xin²

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: In this paper, soybean meal was used as raw material. The crude extract of the soybean trypsin inhibitor (STI) was obtained by the extraction of phosphoric acid buffer (pH7.6), thermal denaturation (65℃) and ammonium sulfate precipitation. Then this extract was purified by DE-52 ion exchange, affinity chromatography and sephadex G-75 gel filtration. The results showed that the specific activity of soybean trypsin inhibitor reached 4 600 U·mg⁻¹ and purification factor of 73.85 was obtained. The purified STI gave two protein bands in SDS-PAGE electrophoresis. Its molecular weights were estimated to be 21.92 and 20.04 kDa. Due to the ease and simpleness of the procedure and high efficiency, the method has an important reference value to research and production of soybean trypsin inhibitor.

Key words: Soybean; Trypsin inhibitor; Separation; Extraction; Purification

自 1917 年 Osborne 和 Mendel^[1]首次发现大豆中含有对动物消化、吸收和利用不利的成分以来,许多学者便开始了大豆抗营养因子的研究,发现 10 余种抗营养因子^[2-3]。各种抗营养因子在大豆中的含量不同,而且抗营养作用也存在差异。其中大豆胰蛋白酶抑制因子(Soybean trypsin inhibitor, STI)是主要抗营养因子,属于多肽类或蛋白质,由 72 ~ 197 个氨基酸残基组成,分子质量为 6 000 ~ 21 500 Da^[4],约有 7 ~ 10 种,目前研究较为广泛的只有 2 种,即 Kunitz 型胰蛋白酶抑制因子(Kunitz trypsin inhibitor, KTI)和 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制因子(Bowman-Birk trypsin inhibitor, BBI),它们在大豆中的含量分别为 1.4% 和 0.6%^[5-6]。

1974 年 Kakade 等^[7]利用 STI 对热和酸环境相对稳定的特性,在制备 STI 时采用了 pH6.8 的磷酸盐缓冲液浸提,50% 饱和度的硫酸铵溶液沉淀,之后用 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析和 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶进行纯化,但 STI 的得率和纯

度低。由于胰蛋白酶抑制因子在营养、医学以及农业等领域具有广泛的应用前景^[8-10],许多研究人员积极探索效率更高的 STI 分离纯化方法,如国外学者 Kortt 等^[11]和 Macedo 等^[12]利用胰蛋白酶抑制因子可抑制胰蛋白酶的专一性,分别从 *Acacia elata* 和 *Dimorphandra mollis* 中纯化出纯度较高的大豆胰蛋白酶抑制因子;国内学者陈星等^[13]采用固定化酶法,得到纯化倍数为 324.6 的胰蛋白酶抑制因子。本研究在总结前人经验基础上,采用胰蛋白酶固定化等方法,制备高纯度的胰蛋白酶抑制因子,旨在为大豆胰蛋白酶抑制因子的科学研究和生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脱脂豆粉,吉林丰正大豆食品有限公司;DEAE-纤维素 DE-52、胰蛋白酶-琼脂糖凝胶 4B、葡聚糖凝

收稿日期:2012-11-01

基金项目:国家自然科学基金项目(31000769)。

第一作者简介:谷春梅(1976-),女,讲师,博士,硕士生导师,研究方向为食品营养与安全及营养代谢调控。E-mail:jjnong2008@126.com。

通讯作者:秦贵信(1956-),男,教授,博士生导师,研究方向为比较营养学。E-mail:qgx@jlau.edu.cn。

胶 G-75, 北京瑞达恒辉科技发展有限公司; 胰蛋白酶、BAPNA (N-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯胺盐酸盐), 上海三杰生物技术有限公司; 预染蛋白 Marker (mid), 北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

FA2004 电子分析天平, 上海上平仪器公司; 78-HW-1 恒温加热磁力搅拌器, 杭州仪表电机有限公司; DZKW-D 水浴锅, 河北黄骅市航天仪器厂; TGL-16G 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; SHZ-D (Ⅲ) 循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司; HD-2000 型核酸蛋白质检测仪、BSZ-100 自动部分收集器, 上海嘉鹏科技有限公司; T6, 北京普析通用仪器有限责任公司; FD-1B-50 冷冻干燥机, YC-2 层析实验冷柜, 北京博医康实验仪器有限公司; DYY-11 型电泳仪, 北京市六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 大豆胰蛋白酶抑制因子粗提液的制备 脱脂豆粉用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.6 的磷酸缓冲液 (1:10, w/v) 抽提 1 h, 然后离心 20 min ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 室温, 下同), 取上清液在 65°C 下热变性处理 10 min , 再离心, 边搅拌边向上清液中加入固体硫酸铵至 35% 饱和度, 4°C 下放置 2 h, 离心, 弃去沉淀, 上清液再加入固体硫酸铵至 75% 饱和度, 4°C 下放置 2 h, 离心, 将沉淀用少量去离子水溶解, 4°C 离心 20 min , 上清液即为 STI 粗提液^[14]。之后用 pH 8.0, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (A 液) 进行透析过夜。

1.3.2 大豆胰蛋白酶抑制因子的分离纯化 离子交换层析: 将透析后的样液上 DEAE-52 纤维素柱^[15], 该柱预先经 A 液平衡, 后用 $0 \sim 0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 进行梯度洗脱, 收集活性峰, 合并后对 B 液 (含 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH8.0) 充分透析。

亲和层析: 透析后的样液上胰蛋白酶-Sepharose 4B 柱^[16], 柱先用 B 液进行平衡, 后用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 酸化水洗脱, 收集洗脱峰并且立即调节 pH 至中性。

凝胶过滤: 将前面收集的活性峰进行浓缩后, 过 Sephadex G-75 柱^[17], 平衡洗脱均采用含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.6 的磷酸缓冲液, 收集具有胰蛋白酶抑制因子活性的组分。

1.3.3 大豆胰蛋白酶抑制因子活性的测定 采用 BAPNA 法^[18], 参考国标 GB/T 21498-2008/ISO 14902:2001, 略加改动。通过加入底物 N-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯胺盐酸盐 (BAPNA) 测量残余的胰蛋白酶活性, 用分光光度法测定释放的对硝基苯胺的量。具体操作如下: 取试样稀释液 1 mL 与

5 mL BAPNA、2 mL 水于试管中并用涡旋混合器混匀于 37°C 水浴中保温 10 min 。再在试管中加入 1 mL 胰蛋白酶使用液, 混匀后, 将试管放回到 37°C 水浴中保温 $10 \text{ min} \pm 5 \text{ s}$, 立即加入 1 mL 乙酸溶液 ($5.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 终止反应, 以不加抑制因子的试样为对照, 用分光光度计, 以水调零, 于 410 nm 处测定吸光值, 与不加抑制因子的样品的吸光值比较, 加入抑制因子的样品每降低 0.001 个单位为一个酶活单位 (U)。

1.3.4 蛋白浓度的测定 采用 Bradford 法^[19], 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白, 通过制作标准曲线检测未知蛋白浓度。

1.3.5 SDS-PAGE 电泳 参考汪家政等^[20]的方法, 浓缩胶的质量浓度为 5%, 分离胶的质量浓度为 12%。将样品与样品缓冲液按照 4:1 的比例于 Eppendorf 管中混合, 100°C 加热 $2 \sim 10 \text{ min}$, 然后离心 1 s 。用微量注射器将蛋白质样品加至样品孔的底部, 将电压调至 100 V, 当染料的前沿迁移至凝胶的底部时关闭电源, 取出胶片进行染色。用考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min 后, 弃去染液, 将凝胶在水中漂洗数次后加入考马斯亮蓝脱色液, 数次更换脱色液并震荡过夜。

2 结果与分析

2.1 大豆胰蛋白酶抑制因子粗提液的制备

大豆脱脂豆粉经过磷酸缓冲液抽提、 65°C 热处理、35% 和 75% 硫酸铵分步盐析与透析后得到大豆胰蛋白酶抑制因子的粗提液, 由 10 g 大豆脱脂豆粉可以制备大约 50 mL 粗提液, 蛋白质浓度测定为 $0.668 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右, 用 BAPNA 法测定 STI 对胰蛋白酶的抑制比活力为 $62.28 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 表明脱脂豆粉粗提液中含有大豆胰蛋白酶抑制因子。

2.2 大豆胰蛋白酶抑制因子的分离纯化

2.2.1 DEAE 纤维素 DEAE-52 离子交换层析 由图 1 可知, 大豆胰蛋白酶抑制因子粗提液通过 DEAE-52 离子交换层析后得到 4 个峰, 分别是用 0.1 、 0.2 、 0.3 、 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱时的洗脱峰, 分别对 4 个峰进行收集, 之后进行活性测定, 发现前 3 个峰均为活性峰, 第 4 个峰没有活性。

2.2.2 Trypsin-Sepharose 4B 亲和层析 合并由离子交换层析得到的活性峰进行胰蛋白酶-琼脂糖凝胶 4B 亲和层析, 经洗脱后得到 2 个峰 (图 2), 即第 1 个峰为穿透峰, 第 2 个峰为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 酸化水洗脱峰, 该洗脱峰为活性峰。

2.2.3 Sephadex G-75 凝胶过滤 将前面收集的活

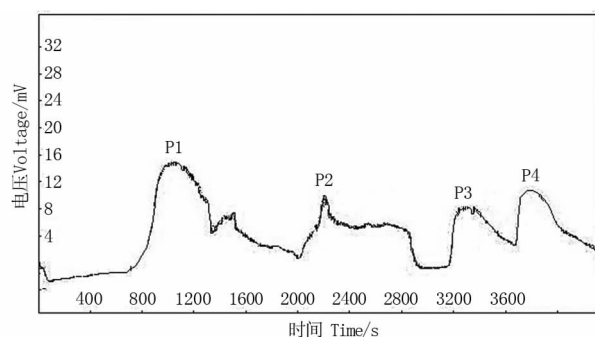


图1 DEAE-52 离子交换层析蛋白纯化吸收峰

Fig.1 Ion-exchange chromatography on DEAE-52

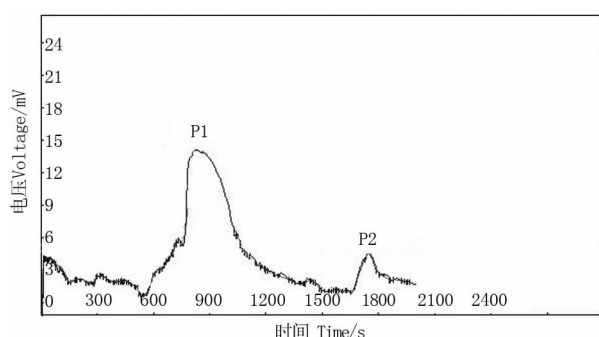


图2 胰蛋白酶-琼脂糖凝胶 4B 亲和层析蛋白纯化吸收峰

Fig.2 Affinity chromatography on
trypsin-sepharose 4B column

性峰进行浓缩后,过葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 柱,经洗脱后得到 2 个主要峰,活性测定后发现 2 个峰均为活性峰(图 3)。

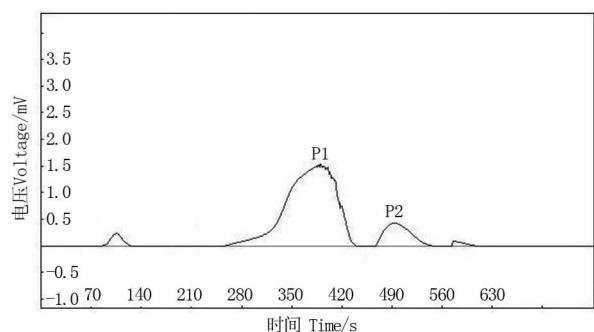


图3 葡聚糖凝胶 G-75 凝胶过滤蛋白纯化吸收峰

Fig.3 Gel filtration by sephadex G-75

2.2.4 分离纯化中几个参数的检测 由表 1 可知,经各步纯化后,STI 的比活力为 $4\,600\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,比原来粗品的比活力($62.28\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$)提高了约 74 倍,说明纯化效果比较好。此外,与离子交换层析相比,亲和层析纯化效果明显提高,从比活力($772.11\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$)和纯化倍数(12.40)上已得到证实,说明亲和层析去除杂蛋白的效果好,这主要归功于胰蛋白酶-琼脂糖凝胶 4B 亲和层析对胰蛋白酶具有专一性。

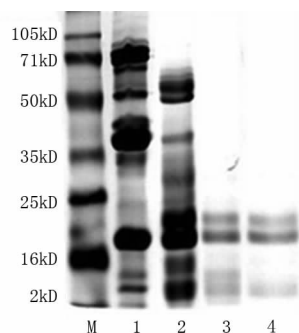
表 1 参数检测结果

Table 1 Result of parameters detection

纯化步骤 Purification step	总蛋白 Total protein/mg	总活力 Total activity/U	比活力 Specific activity/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	纯化倍数 Purification fold
STI 粗提液 Crud extract of STI	33.40	2080	62.28	1.00
DEAE-52 DEAE-Cellulose column52	16.00	1530	95.63	1.54
亲和层析 Trypsin Sepharose 4B column	1.90	1467	772.11	12.40
葡聚糖凝 G-75 Sephadex G-75	0.08	368	4600.00	73.85

2.3 STI 分子量的测定

分别将大豆胰蛋白酶抑制因子粗提液以及分离纯化各步骤中收集的活性峰样品进行 SDS-PAGE



M:Marker;1:稀释 10 倍的粗提液;2:DEAE-52 活性组分;3:Trypsin-Sepharose-4B 活性组分;4:Sephadex G-75 所得活性组分。

M:Marker;1:Crude extract with being diluted 10 times;2:Active fraction after DEAE-52;3:Active fraction after Trypsin-Sepharose-4B;4:Active fraction after Sephadex G-75.

图4 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis

电泳。大豆胰蛋白酶抑制因子粗提液经多步分离纯化后,最终得到 2 条蛋白质谱带(图 4)。据图 4 中的 Marker 做标准曲线(图 5),得方程 $y = -1.2085x + 2.1275$, $R^2 = 0.9913$ (x 为标准蛋白质的相对迁移率, y 为 $\lg Mr$)。根据标准曲线计算出这 2 条谱带的分子量分别为 21.92 和 20.04 kDa。与之前文献报道^[2,4]的大豆胰蛋白酶抑制因子分子量相符。

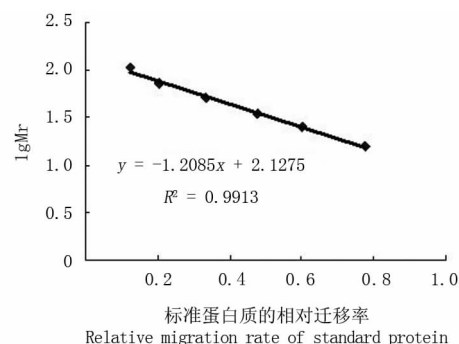


图5 分子量测定标准曲线

Fig.5 Standard curve of molecular weight measure

3 讨论

3.1 大豆胰蛋白酶抑制因子粗提液的制备

在大豆粗提液的制备过程中,采用 65℃ 加热 10 min,目的是通过热变性除掉非抑制因子的杂蛋白,这样就简化了纯化步骤。根据 Rackis 等^[21]的报道,大豆胰蛋白酶抑制因子具有很高的热稳定性,即使在 105℃ 的高温下处理 10 min 仍然保有活性。因此,在制备粗提液时采用 65℃ 热处理去除杂蛋白的方法是可取的,也是行之有效的。

各种蛋白质在不同盐浓度中的溶解度不同,而且不同饱和度的盐溶液沉淀的蛋白质不同。依据这一原理,可以将目的蛋白从其它蛋白中分离出来,且在盐析过程中,蛋白质在其等电点附近时有最大析出量。由于大豆胰蛋白酶抑制因子是一种酸性蛋白质,而硫酸铵是一种强酸弱碱盐,它不仅能够使蛋白质产生盐析作用,还能够使溶液的 pH 值降低,因此本实验选用硫酸铵进行分步盐析。在粗提液的制备过程中,首先加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 35% 饱和度,弃去沉淀,除去碱性或中性杂蛋白,然后再加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 75% 饱和度,收集沉淀,大豆胰蛋白酶抑制因子则存在于该沉淀中,用少量去离子水溶解透析即可。

3.2 大豆胰蛋白酶抑制因子的分离纯化

随着人们对大豆胰蛋白酶抑制因子研究和应用的不断深入,提出简便易行、容易推广、效率高的分离纯化方法势在必行。

大豆胰蛋白酶抑制因子是酸性蛋白质,因此选用阴离子交换剂 DEAE 纤维素-52 进行纯化。结果显示,该步纯化效果较好,但由于梯度洗脱造成了活性液中盐浓度过高,所以最后要通过透析除盐,以降低中性盐对蛋白质溶解度的影响。由于 STI 能够与胰蛋白酶特异性结合^[22-24],所以选用亲和层析做进一步纯化。结果显示,经过该步纯化,STI 的比活力达到了 $772.11 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,纯化倍数提高了 12.40 倍。纯化效果远远好于离子交换层析。本试验依据 Sephadex G-75 能将不同分子量物质分开的特性做最后纯化,发现纯化倍数比粗品提高了约 74 倍,这明显好于康庄等^[25]的纯化效果,而且具有操作简单的优势。另外,根据电泳图谱,本研究最终得到 2 条蛋白质谱带,分子量分别为 21.92 和 20.04 kDa,它们均在文献报道的 STI 分子量范围内^[4],可能是同源的大豆胰蛋白酶抑制因子,这与 Kortt 等^[11]的研究结果相似。

4 结论

通过 DEAE-纤维素-52、胰蛋白酶-琼脂糖凝胶

4B、葡聚糖凝胶 G-75 柱层析,从脱脂豆粉中分离纯化出比活力为 $4\,600 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、纯化倍数为 73.85 的大豆胰蛋白酶抑制因子,通过 SDS-PAGE 电泳检测显示 2 条蛋白质谱带,且分子量分别为 21.92 和 20.04 kDa。与文献报道结果相比较,该法操作简便,分离纯化效果好。

参考文献

- [1] Osborne T B, Mendel L B. The use of soybeans as food[J]. Journal of Biochemistry, 1917, 32:369-387.
- [2] 金蓓,田少君. 大豆胰蛋白酶抑制剂研究概况[J]. 粮食与油脂, 2005(6):3-5. (Jin B, Tian S J. Research survey in soybean trypsin inhibitor[J]. Cereals and Oils, 2005(6):3-5.)
- [3] 龙玲,吴达. 饲料抗营养因子概述[J]. 饲料博览, 2001(7):12-14. (Long L, Wu D. Overview of anti-nutritional factors in feed[J]. Feed Review, 2001(7):12-14.)
- [4] 杨丽杰,吴非,霍贵成,等. 豆制品中胰蛋白酶抑制剂的研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2004(3):53-55. (Yang L J, Wu F, Huo G C, et al. Studies on trypsin inhibitor from soy products[J]. Machinery for Cereals, Oil and Food Processing, 2004(3):53-55.)
- [5] Wolfram B, Robert H. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinase[J]. Journal of Biochemistry, 1992, 204:433-451.
- [6] 刘欣,冯杰. 大豆胰蛋白酶抑制因子(STI)的研究进展[J]. 广东饲料, 2005, 14(6):39-40. (Liu X, Feng J. Studying progress in soybean trypsin inhibitor[J]. Guangdong Feed, 2005, 14(6):39-40.)
- [7] Kakade M L. Biochemical basis for the differences in plant protein utilization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1974, 22(4):550-555.
- [8] 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, 18(2):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, 18(2):152-155.)
- [9] 文方德,傅家瑞. 植物种子的蛋白酶抑制剂及其生理功能[J]. 植物生理学通讯, 1997(1):1-9. (Wen F D, Fu J R. Protease inhibitors and their physiological functions in plant seeds[J]. Plant Physiology Communications, 1997(1):1-9.)
- [10] Franco O L, Dias S C, Magalhães C P, et al. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil[J]. Phytochemistry, 2004, 65:81-89.
- [11] Kortt A A, Jermyn M A. Acacia proteinase inhibitors purification and properties of the trypsin inhibitors from *Acacia elata* seed[J]. The Journal of Biochemistry, 1981, 115:551-557.
- [12] Macedo M L, de Matos D G, Machado O L, et al. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties[J]. Phytochemistry, 2000, 54:553-558.
- [13] 陈星,刘蕾,刘辉. 固定化酶法分离纯化大豆胰蛋白酶抑制剂[J]. 食品科技, 2004(12):12-15. (Chen X, Liu L, Liu H. Soybean trypsin inhibitor was separated and purified with immobilized trypsin method[J]. Food Science and Technology, 2004(12):12-15.)

(下转第 97 页)