

大豆凝集素结构及其活性测定方法的研究进展

张柏林, 秦贵信, 刘 宁, 孙泽威, 赵 元, 王 涛, 王 波

(吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:大豆凝集素是大豆中重要的蛋白质之一,同时也是大豆中主要的抗营养因子之一。自被发现半个世纪以来,大豆凝集素在糖生物化学、血型鉴定、生物医药等领域有着广泛的应用。综述大豆凝集素结构及其活性测定方法,为研究者进一步了解大豆凝集素不同活性测定方法之间的差异,选择合适的大豆凝集素活性测定方法提供依据。

关键词:大豆凝集素;结构;活性测定方法

中图分类号:R151

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)01-0160-04

Advances of Research on Structure and Activity Detecting Method of Soybean Agglutinin

ZHANG Bo-lin, QIN Gui-xin, LIU Ning, SUN Ze-wei, ZHAO Yuan, WANG Tao, WANG Bo

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: Soybean agglutinin is the main protein, as well as the main antinutritional factor in soybean. Since discovered more than half of a century, it was widely used in many fields, such as glycobiochemistry, blood type identification, bio-medical. The study reviewed the structure and activity detecting method of soybean agglutinin, which may contribute to learning the difference of different detecting methods better and provide the information for choosing suitable detecting method.

Key words: Soybean agglutinin; Structure; Activity detecting method

大豆种质资源丰富,蛋白质含量较高且氨基酸比例较平衡,是动物优质的植物性蛋白质饲料来源。但是大豆中含有多种抗营养因子,包括胰蛋白酶抑制因子、凝集素、异黄酮、抗原蛋白等^[1]。这些抗营养因子通过干扰动物对营养物质的消化、吸收和代谢等多种方式危害人和动物尤其是幼龄动物的生长和健康。大豆凝集素是大豆中主要的抗营养因子之一,在成熟种子中约占大豆蛋白总含量的10%,其含量在一定程度上抑制了大豆的广泛应用,因此建立大豆凝集素活性的灵敏、快速的检测方法引起研究者的关注。目前,有关大豆凝集素测定方法已有很多报道,但多数测定方法是围绕凝集活性和免疫活性两个方面展开。针对大豆凝集素活性测定的这两个方面展开综述,有利于研究者进一步了解大豆凝集素不同测定方法之间的差异,为研究者针对不同的试验需要选择合适的大豆凝集素测定方法提供

依据。

1 大豆凝集素的结构

大豆凝集素是指对N-乙酰基D-半乳糖胺/D-半乳糖有结合特异性的一类糖蛋白,是大豆中的主要抗营养因子之一。大豆凝集素是一种大分子蛋白质,分子量约为120 000道尔顿,等电点为5.81,沉降系数为6.0 s,在超速离心时随7s蛋白一起沉降。大豆凝集素具有典型豆类凝集素的四级结构,为含有4个亚基的四聚体,且每个亚基均含有一个单独的糖结合位点。大豆凝集素每个亚基还分别含有一个紧密结合的 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} ^[2],它们对于大豆凝集素特异性地结合糖的活性是必须的,它们距离糖结合位点4.25 Å,处于结合位点的临近效应区,而且按一定的顺序结合,先结合 Mn^{2+} 离子,然后在其它结合位点结合 Ca^{2+} ^[3]。此外,大豆中还存在着另一

收稿日期:2008-11-21

基金项目:国家自然科学基金重资助点项目(30871802)。

作者简介:张柏林(1981-),男,在读硕士,研究方向为饲料抗营养因子。E-mail:zhangbolin19810405@163.com。

通讯作者:秦贵信,教授,博士生导师。E-mail:guixin@public.cc.jl.cn。

种分子量约为 175 000 道尔顿的凝集素,其有两种不同的四个亚基组成。研究表明,其能与 4-O-甲基-D-葡萄糖醛酸、D-葡萄糖醛酸和它们的甲基糖苷发生特异性结合^[4],并且在大豆根部特异性识别、结合根瘤菌并形成根瘤和生物固氮过程中发挥重要作用^[5]。

Lotan^[6]等用降解法对大豆凝集素的组成测定结果显示,大豆凝集素中胱氨酸缺乏,蛋氨酸含量也比较低,但富含酸性和羟基氨基酸,每个亚基中含有 270 个氨基酸残基。Lis 等^[7]用链霉蛋白酶对大豆凝集素进行消化处理,再用葡聚糖凝胶 G-50 和离

子交换层析法进行处理分析,得出大豆凝集素糖蛋白分子式为 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ 。进一步研究发现大豆凝集素包括两类以 N-糖苷键结合的糖单位,即 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ 和 GlcNAcAsn 两部分。两类糖单位都包括了甘露糖和 N-乙酰基-D-半乳糖胺 (GlcNAc),二者摩尔比为 9:2,且两类糖单元都含有相同的结构中心- $\text{Man}\alpha(1,6)[\text{Man}\alpha(1,3)]\text{Man}\beta(1,4)\text{GlcNAc}\beta(1,4)\text{GlcNAc}$;但是它们的支链结构不同。Dorland^[8]等采用高分辨率核磁氢谱测定大豆凝集素糖链的基本结构,得到大豆凝集素的糖链结构,如图 1 所示。

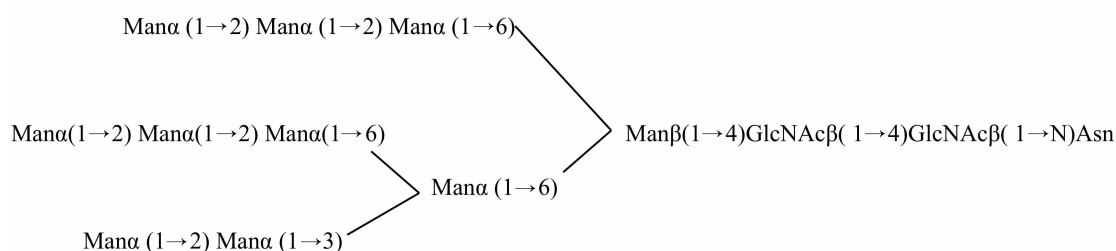


图 1 大豆凝集素的糖链结构

Fig. 1 Sugar chain of soybean agglutinin

2 大豆凝集素的测定方法

大豆凝集素的活性分为凝集活性和免疫活性两个方面,因而其测定方法也按凝集活性测定和免疫活性测定两个方面进行分类。凝集活性测定方法包括红细胞凝集试验和功能性大豆凝集素测定,免疫学测定方法包括火箭免疫电泳、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫印迹法等测定方法。此外,免疫组织化学等一些免疫学技术在大豆凝集素的检测中也得到了一定的应用。但针对不同的试验需求,试验方法的选择也有所不同。

2.1 大豆凝集素凝集活性测定

2.1.1 红细胞凝集反应 凝集作用是植物凝集素与细胞相互作用后最容易被检出的现象。大豆凝集素能够通过与红细胞表面的糖分子结合而凝集兔、鼠、奶牛和人等动物的红细胞。利用大豆凝集素能与动物红细胞结合而产生凝集的特性而对样品中的大豆凝集素进行检测,是检测大豆凝集素的主要方法之一^[9]。红细胞凝集法是 Liener^[10]于 1955 年建立的,后来 Grant 等^[11]对其方法作了一定的修改,基本操作是将大豆提取液作倍比稀释后,加入等体积 5% 的红细胞悬液,置于室温下反应 2 h,然后用肉眼或光学显微镜观察使 50% 红细胞凝集的最小样品

浓度,将其称为一个凝集单位(HU)。再将其凝集活性与大豆凝集素标准品的凝集活性进行比较,从而估计出大豆凝集素的含量。

为了提高凝集反应的灵敏度和准确度,研究者进行了多次改进^[12-13]。其中,Ternynck^[14]研究发现红细胞经胰蛋白酶或链霉蛋白酶处理后,与大豆凝集素的凝集反应明显增强。刘林娜^[15]用胰酶处理的猪红细胞来对大豆凝集素活性进行测定,结果显示:未经胰酶处理前,样品的最高稀释度为 128,而胰酶处理后,样品稀释度为 512 时仍有微弱的凝集现象,反应程度可提高 6~8 倍。

红细胞凝集试验能够简捷、快速测定样品中具有凝集活性的大豆凝集素,但其只能对大豆凝集素进行定性和半定量检测,当评价全部凝集素活性时其精确性、准确性和灵敏性不够;对所选择的红细胞有严格的要求,具有种属特异性。如对兔和人红细胞的凝集反应最敏感^[16]。如所选择红细胞不当,则会导致所测大豆凝集素活性偏低。因此,红细胞凝集试验并不总是能够反应大豆凝集素的真实含量。同时,不同的研究者所采用的红细胞的来源并不一致,因而导致测定结果不尽相同,使得红细胞试验的可重复操作性不高^[17]。

2.1.2 功能性大豆凝集素测定 尽管酶联免疫吸

附试验可以对大豆中的凝集素含量进行定量测定,但其所测得的是具有免疫学活性的大豆凝集素,而非大豆凝集素的凝集活性,并且其免疫学活性往往大于凝集活性。这是因为大豆经过加工处理或被动物消化后,大豆凝集素的四级结构可能被破坏。大豆凝集素降解为肽段后仍具有免疫活性,而大豆凝集素降解为单个亚基以下就失去了凝集活性。为了测定具有凝集活性的大豆凝集素含量,Miller等^[21]建立了功能性大豆凝集素测定方法,并对饲料样本和食糜中具有凝集活性的大豆凝集素成功地进行了测定。基本操作如下:将自制的红细胞外壳(red blood cell ghost)稀释为 $10\ \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 包被于微量反应板,用1%牛血清白蛋白进行封闭,再将大豆凝集素样品作梯度稀释,加入包被有红细胞膜的微孔,用大豆凝集素单克隆抗体检测结合于包被红细胞外壳的大豆凝集素,而结合在大豆凝集素上的单克隆抗体则用兔抗鼠碱性磷酸酶标记的IgG进行检测,最后的抗原抗体复合物用磷酸酶底物显色,用ELISA检测仪于492 nm处检测光密度值。然后根据标准曲线和线性方程计算得到样品中功能性大豆凝集素含量。

采用功能性大豆凝集素测定方法对样品中具有凝集活性的大豆凝集素进行测定,具有以下优点:①不仅能检测出样品中具有完整结构的大豆凝集素含量,对样品降解产物中具有凝集活性的部分也可以进行检测;②具有精确度高、易操作且可重复操作性高;③可一次性对多个样本进行检测,适于批量检测。

2.2 大豆凝集素免疫活性测定

2.2.1 火箭免疫电泳 火箭免疫电泳又称为单向电泳扩散免疫沉淀试验,是将单向免疫扩散和电泳相结合的一种定量检测技术。在琼脂糖中掺入适量的抗体,在电场作用下,定量的抗原泳动与抗体相遇而形成抗原-抗体复合物沉淀线,随着抗原量的减少,沉淀带越来越窄,形成火箭峰样沉淀带。沉淀峰面积越大,说明抗原量越多,其峰形高低与抗原量成正比,因此可用于抗原的定量测定。用已知量标准抗原作对照,可以方便地测定未知标本中的抗原含量。其基本方法如下:将含有150 μL 抗大豆凝集素抗体的1%琼脂凝胶(其中含 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 半乳糖)10 mL铺在10 cm \times 8 cm玻璃板上,待凝胶完全后,在每张玻璃板上打12个孔,每孔加5 μL 样品溶解液,在 $4\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电压下进行电泳实验,时间为16 h,然后将凝胶放入生理盐水中浸泡,并进行染色,脱色

反应。杨丽杰等^[18]成功利用火箭免疫电泳法对黑龙江几个大豆品种中的凝集素进行了定性和定量分析,结果表明大豆中凝集素平均含量为 $3\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。火箭免疫电泳具有准确度高、敏感性高、快速等优点但相对繁杂的操作步骤限制了该项技术的推广和应用。

2.2.2 间接抑制酶联免疫吸附测定 间接抑制酶联免疫吸附法是一种定量测定食品和饲料中抗原物质的免疫学方法,已经广泛应用于大豆凝集素、大豆抗原蛋白等大豆抗营养物质的检测。其检测方法如下:将大豆凝集素标准品稀释至最适浓度,每孔100 μL 加入反应孔中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育3 h,洗涤3次;加入0.5%牛血清白蛋白封闭2 h,洗涤3次;将待测大豆凝集素样品作适当稀释,标准样品作梯度稀释后,取100 μL 加入到酶标反应孔中,并每孔加入 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 兔抗大豆凝集素多克隆抗体,产生抗原-抗体复合物,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育2 h,洗涤3次;加入羊抗兔酶标二抗对抗原-抗体复合物进行标记;然后进行显色和终止反应并在492 nm处测定其吸光度。李振田^[19]对几个不同品种大豆及部分加工产品中大豆凝集素的含量的测定结果表明,其检测下限低于 $10\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。间接抑制酶联免疫吸附法具有较高的灵敏度和准确度的特点,且一次可对多个样本进行测定。但由于不同来源的大豆样品的生物学特性不同,因而需要制备不同的抗体。而特异性抗体需要通过对兔等动物进行免疫原注射而获得,并且需要对抗体滴度进行测定,因而试验动物的选择和抗体制备程序的制定十分关键。另外,大豆是动物日粮的主要蛋白源,致敏后难以获得高效价的抗体,因此选用未食用大豆蛋白的实验动物可在一定程度上克服这一问题^[20]。

2.2.3 免疫印迹法 免疫印迹(immunoblotting)又称为蛋白质印迹(western blotting),是在凝胶和固相免疫测定技术基础之上发展起来的一种免疫生化技术,是一种借助特异性抗体鉴定抗原的有效方法。其基本原理是首先将蛋白质经分离后从凝胶转移到固相支持物上,然后用特异性的抗体进行检测。由于免疫印迹具有聚丙烯酰胺凝胶电泳的样品用量少,高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性,因此可用于抗原的定量和半定量测定检测。

此外,可以利用凝集素与糖、糖蛋白或糖结合蛋白发生特异性的结合的特性而对其含量进行检测。另外,对于内源性大豆凝集素,也可采用免疫组织化

学方法进行检测。

3 结语

目前国内外检测大豆凝集素的方法已有多种,应用也较广泛,但仍存在一定的不足:①红细胞凝集试验相对于其它大豆凝集素测定方法而言,其操作方法相对简单,并且在进行凝集活性测定方面是其它测定方法所无法比拟的;②火箭免疫电泳、间接抑制酶联免疫吸附试验等免疫学测定方法克服了红细胞凝集试验不能定量测定大豆凝集素的缺点,并且其检测灵敏度和准确度较高;③功能性大豆凝集素具有红细胞凝集试验和免疫学测定方法的优点,不但能测定大豆凝集素的凝集活性,还能对定量测定样品中的大豆凝集素,但相对繁杂的单克隆抗体制备技术限制了该方法的广泛应用;④免疫印迹技术突破了凝集测定和免疫方法测定的极限,能对样品中极低浓度的凝集素含量进行检测,并可应用于凝集素消化动力学研究;⑤以上测定方法主要是针对已知凝集素进行测定,而对未知凝集素的检测技术还有待于发展。

参考文献

- [1] Brik Y. Protein proteinase inhibitors of plant origin and their significance in nutrition [G] // Huisman J, van der Poel T F B, Liner I E. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Wageningen; Wageningen Press, 1989.
- [2] DeBoeck H, Lis H, van Tilbeurgh H, et al. Binding of simple carbohydrate and some chromophore derivatives of soybean agglutinin as followed by titrimetric procedure and stopped flow kinetics [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1984, 259: 7067-7074.
- [3] Sharon N, Lis H. How proteins bind carbohydrate: Lessons from legume lectins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002, 50: 6586-6591.
- [4] Pustai A. Plant lectins [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
- [5] Smith R J, Gallon J R. Nitrogen fixation [G] // Lea P J, Leegood R C. Plant Biochemistry and Molecular Biology. Chichester: John Wiley & Sons, 1993.
- [6] Lotan R, Siegelman H W, Lis H, et al. Subunit structure of soybean agglutinin. [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1974, 249: 1219-1224.
- [7] Lis H, Sharon N. Soybean agglutinin - A plant glycoprotein: Structure of the carbohydrate unit [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1978, 253: 3468-3476.
- [8] Dorland L, van Halbeek H, Vliegthart J F. Primary structure of the carbohydrate chain of soybean agglutinin: A reinvestigation by high resolution mass spectroscopy [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1981, 256: 7708-7711.
- [9] Jaffe W G. Haemagglutinins [C] // Toxic Constituents in Plant Foodstuffs Academic Press, New York, 1980: 73.
- [10] Liener I E. The photometric determination of the haemagglutination activity soyin and crude soya bean extracts [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1955, 54: 223-226.
- [11] Grant G, More L J, McKenzie N H, et al. A survey of the nutritional and haemagglutinin properties of legume seeds generally available in the UK [J]. British Journal of Nutrition, 1983, 50: 207-212.
- [12] Van Schukthass G K, Giglio McConnell D S, Benedek G B. Detection of agglutination reactions using anisotropic light scattering: an immunoassay of high sensitivity [J]. Molecular Immunology, 1980, 17: 81-82.
- [13] Kohle H, Kauss H. Improved analysis of haemagglutination assays for quantitation of lectin activity [J]. Analytical Biochemistry, 1980, 103: 227-229.
- [14] Ternynck T, Guesdon J L, Avramides S. The use of avidin-biotin interaction in immuno-enzymatic techniques [J]. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1979, 27(8): 1131-1139.
- [15] 刘林娜. 不同种属动物对大豆凝集素敏感性的比较研究. [D]. 长春: 吉林农业大学, 2006: 10-12. (Liu L N. Comparative studies on the sensitivity to SBA in different species of animal [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2006: 10-12.)
- [16] Pereira M E A, Kaabat E A, Sharon N. Immunochemical studies on the specificity to soybean agglutinin [J]. Carbohydrate Research, 1974, 37: 89-102.
- [17] Wang T H, Lee M H, Su N W. Screening of lectins by an enzyme-linked adsorbent assay [J]. Food Chemistry, 2009, 15: 1218-1225.
- [18] 杨丽杰, 李素芬, 张永成, 等. 黑龙江几个大豆品种中抗营养因子含量的分析. [J]. 大豆科学, 1999, 18(1): 77-80. (Yang L J, Li S F, Zhang Y C, et al. The content of main antinutritional factors in thirteen soybean species planted widely in Heilongjiang area [J]. Soybean Science, 1999, 18(1): 77-80.)
- [19] 李振田, 谯士彦, 李德发, 等. 间接抑制酶联免疫吸附法测定大豆凝集素方法的建立 [J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40(8): 9-11. (Li Z T, Qiao S Y, Li D F, et al. Establishment of indirect inhibiting ELISA method to detect soybean agglutinin in the soybean products [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2004, 40(8): 9-11.)
- [20] Brandon D L, Bates A, Hand Friedman M. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay of the Bowman-Birk protease inhibitor of soybeans [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1989 (37): 1192-1196.
- [21] Miller B G, Thorpe J, Patel D, et al. Technique to determine levels of soybean lectin in feed samples and digesta samples collected in vivo [C] // Fansman A J M, Hill G D, Huisman J, et al. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and rapeseed. Wageningen; Wageningen Press, 1998.