

奶花芸豆中凝集素的提取、纯化及鉴定

于雪慧,童军茂,张 建*

(石河子大学食品学院,新疆石河子 832003)

摘要:以新疆奶花芸豆为原料提取凝集素,以单因素实验结果为依据,结合响应面实验对提取工艺进行优化。通过硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-50 和 DEAE-A50 阴离子交换层析进一步纯化,并利用 SDS-PAGE 电泳、质谱/质谱联用(LC-MS/MS)技术进行蛋白鉴定。结果表明,最佳提取工艺为:料液比 1:13 g/mL, pH7.4, 提取时间 18.5 h, 在此条件下凝集素特异性活力为 $(13.26 \pm 0.26) \times 10^3$ HU/mg。经过纯化后的目标蛋白特异性活力达到 $(59.93 \pm 0.31) \times 10^3$ HU/mg。经鉴定目标蛋白为奶花芸豆凝集素,分子量在 31 kDa 左右。

关键词:奶花芸豆,凝集素,液相色谱-质谱/质谱联用(LC-MS/MS),响应面,提取,纯化,鉴定

Extraction, Purification and Identification of Lectin from *Phaseolus vulgaris*

YU Xue-hui, TONG Jun-mao, ZHANG Jian*

(Food College of Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: The *Phaseolus vulgaris* was used as the raw material to extract lectin, based on the single factor experiment, the extraction process was optimized by response surface experiment. Samples were further purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-50 and DEAE-A50 anion exchange chromatography, the purified protein was identified by SDS-PAGE electrophoresis and LC-MS/MS. Results showed that, the optimum extraction conditions were determined as the ratio of material to liquid 1:13 g/mL, pH7.4 and extraction time 18.5 h the hemagglutinating activity of lectin was $(13.26 \pm 0.26) \times 10^3$ HU/mg. The hemagglutinating activity of the purified target protein reached $(59.93 \pm 0.31) \times 10^3$ HU/mg, the target protein was determined as lectin and the molecular weight was around 31 kDa.

Key words: *Phaseolus vulgaris*; lectin; LC-MS/MS; response surface; extraction; purification; identification

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)15-0048-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.15.010

引文格式: 于雪慧,童军茂,张建.奶花芸豆中凝集素的提取、纯化及鉴定[J].食品工业科技,2018,39(15):48-54,59.

奶花芸豆(*Phaseolus vulgaris*)属豆科芸豆属,一年生草本植物,因其豆皮整体呈乳白色,且带有紫色斑点,故得此名。奶花芸豆在我国东北、河北、云贵川、新疆等地区均有较大面积种植,其中新疆阿勒泰地区北屯市已将奶花芸豆发展成为当地的特色种植作物^[1]。据测定,其种子中蛋白质含量 23.1%,比谷物类高 1~3 倍,每 100 g 奶花芸豆中含有脂肪 1.3 g,碳水化合物 56.9 g, B 族维生素的含量丰富^[2]。

凝集素(Lectin)是含有一个或多个能够特异性识别并可逆性结合单糖或多糖的一类非免疫原性、非酶本质的蛋白质或糖蛋白^[3],广泛分布于自然界的有机体中。目前,从动物、植物、微生物、病毒及真菌中均已经得到分离^[4-5]。由于凝集素特异性的糖结合能力,导致其具有细胞凝集能力、诱导细胞凋亡和

自噬能力、抗真菌、免疫调节、抗肿瘤、促进有丝分裂及生物固氮力等能力^[6]。

目前已有从奶花芸豆中分离得到铁蛋白^[7]、黄酮素^[8]、多肽^[9]等的报道,大量学者亦从大豆^[10]、木豆^[11]、绿豆^[12]、刀豆^[13]等豆科植物中分离得到凝集素^[14],但尚未有从奶花芸豆中提取凝集素的相关研究。本文以新疆奶花芸豆为原料,采用水提法,从中分离出一种新型凝集素,利用单因素实验结合响应面实验对凝集素提取工艺进行优化,通过硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-50 和 DEAE-A50 阴离子交换层析进一步纯化,并利用 SDS-PAGE 电泳、质谱/质谱联用(LC-MS/MS)技术进行蛋白鉴定,以为豆类凝集素的开发利用和提高奶花芸豆附加值提供数据参考。

收稿日期:2017-11-15

作者简介:于雪慧(1993-),女,硕士研究生,主要从事食品生物化学方面的研究,E-mail:417950977@qq.com。

*通讯作者:张建(1979-),男,博士,教授,主要从事食品生物化学方面的研究,E-mail:zhangjian0411@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

奶花芸豆(芸豆2号) 新疆生产建设兵团第十师农业科学研究所;新鲜兔血 石河子大学动物科学学院;磷酸二氢钠 天津市福晨化学试剂厂;磷酸氢二钠 天津市福晨化学试剂厂;丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、考马斯亮蓝、十二烷基硫酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED) Sigma公司;二乙基氨基乙基-葡聚糖 A-50(DEAE Sephadex A-50)、交联葡聚糖凝胶 G-50(Sephadex G-50) 美国 GE-Healthcare Bio-Sciences AB公司;以上试剂均为分析纯;甲酸 Adamas公司;乙腈(ACN) Adamas公司;以上试剂均为色谱纯;胰蛋白酶(Trypsin) V5113 Promrga公司。

RHP-600 高速粉碎机 浙江荣浩工贸有限公司;DK-8B 电热恒温水槽 上海精宏实验设备有限公司;ZXRD-7080 全自动新型鼓风干燥箱 上海智城分析仪器制造有限公司;PHS-3C 型 pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司;FDU-1200 冷冻干燥机 东京理化器械株式会社;SP-752PC 紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;电脑紫外检测仪 金坛市盛蓝仪器制造有限公司;电脑全自动部分收集器 上海青浦沪西仪器厂;凝胶成像仪 BIO-RAD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 奶花芸豆豆粉的制备 将奶花芸豆用蒸馏水浸泡 12 h 后,手工脱皮处理,于 40 ℃ 恒温干燥箱内烘干 1 h 后高速粉碎,过 80 目筛后得到细腻的豆粉。

1.2.2 奶花芸豆粗蛋白的提取 奶花芸豆豆粉按照一定比例加入蒸馏水,混合均匀后调节混合液的 pH,恒温水浴一定时间,在 4 ℃、10000 r/min 的条件下离心 15 min,经硫酸铵沉淀、透析得到粗提液。

1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 料液比对提取效果的影响 称取 5 g 豆粉,按照 1:4、1:8、1:12、1:16、1:20 g/mL 的料液比加入蒸馏水,固定 pH 为 7.5,于 40 ℃ 下浸提 18 h 后,离心取上清液进行血凝反应,并测定蛋白质含量。

1.2.3.2 pH 对提取效果的影响 准确称取 5 g 豆粉,按照 1:12 g/mL 的比例加入蒸馏水,调节 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,于 40 ℃ 下浸提 18 h 后,离心取上清液进行血凝反应,并测定蛋白质含量。

1.2.3.3 浸提时间对提取效果的影响 准确称取 5 g 豆粉,按照 1:12 g/mL 的比例加入蒸馏水,固定 pH 为 7.5,于 40 ℃ 下分别浸提 2.0、6.0、10.0、14.0、18.0、22.0、26.0 h 后,离心取上清液进行血凝反应,并测定蛋白质含量。

1.2.4 响应面优化实验 结合单因素实验的结果,选取料液比、pH、浸提时间为自变量,以凝集素的特异性活力为响应值,运用 Design Expert 8.0 软件进行响应面实验设计,实验因素水平表见表 1。

1.2.5 硫酸铵分级沉淀法纯化奶花芸豆凝集素 由于凝集素的蛋白特性,采用硫酸铵分级沉淀的方法对粗提液进行初级纯化。向粗提液中缓慢加入饱和

表 1 响应面实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素	水平		
	-1	0	+1
A 料液比(g/mL)	1:8	1:12	1:16
B pH	7.0	7.5	8.0
C 提取时间(h)	14.0	18.0	22.0

硫酸铵溶液,直到混合液中硫酸铵达到 10% 饱和度,4 ℃ 静置过夜,于 8000 r/min 的条件下离心 20 min,将沉淀和上清液分别收集,上清液中继续加入饱和硫酸铵溶液分别至 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 饱和,静置、离心,收集沉淀及上清液;不同饱和度下收集的沉淀分别以蒸馏水复溶,并进行透析,不断更换透析外液,直至用 5% 的 BaCl₂ 溶液检测透析外液中无白色沉淀生成,结束透析。测定复溶液的蛋白含量、总活力和特异性活力,并选取硫酸铵分级沉淀的范围。

1.2.6 离子交换层析与凝胶过滤层析

1.2.6.1 DEAE A-50 阴离子交换层析 参考文献[15],称取 DEAE-A50 填料 5 g,加入 500 mL 蒸馏水,浸泡 24 h 后倾去上层细粒,经过 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 溶液分别洗涤酸洗、碱洗后用蒸馏水洗至中性,煮沸 30 min 脱气。处理完毕后装柱,用 pH6.9 的 PB 缓冲液进行平衡,直至流入液与流出液经过电脑紫外检测仪 280 nm^[4] 下检测的所得吸光值一致。采用 0.1 mol/L、pH6.9 的 PB 缓冲液配制梯度 NaCl 溶液,室温保存。NaCl 梯度洗脱液配制方法如表 2 所示。

表 2 NaCl 梯度洗脱液的配比

Table 2 The gradient eluate of sodium chloride

NaCl 溶液浓度(mmol/L)	溶液体积(mL)
50	100
100	100
150	100

准确上样 3 mL 经硫酸铵沉淀浓缩的粗纯化样品,用 pH6.9 的 PB 缓冲液进行洗脱,然后再分别用不同浓度梯度的 NaCl 缓冲溶液进行洗脱,控制流速在 0.3 mL/min,洗脱液经过电脑紫外检测仪进行蛋白含量检测后,利用全自动部分收集器进行收集,10 min 收集一次,每个试管中收集 3 mL,280 nm^[4] 下测定蛋白含量,收集峰值管。不断重复上述过程富集峰值管,并对富集的峰值管进行浓缩,测定其特异性活力与蛋白质含量,记录体积,保存于 4 ℃ 条件下,已备后续纯化。

1.2.6.2 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱层析 参考文献[16],称取 G-50 填料 5 g,加入 50 mL 去离子水,浸泡溶胀 24 h;倾去上层清水,加入与填料等体积的 1.0 mol/L NaOH 溶液,浸泡 30 min 后洗至中性,重复 3~5 次碱浸过程后,加热煮沸 30 min 脱气,用 pH 为 6.9 的 PB 缓冲液进行平衡装柱,直至流入液与流出液的吸光值一致。

向平衡好的凝胶柱中加入 3 mL 经过离子交换

层析纯化后的样品,用 pH6.9 的磷酸缓冲液进行洗脱,控制流速为 0.8 mL/min,洗脱的同时用电脑全自动部分收集器进行收集,每 5 min 收集一次,每个试管中收集 4 mL,280 nm 下测定蛋白含量,收集峰值管;不断重复上述过程富集峰值管,并浓缩富集的峰值管,通过血凝反应测定其特异性活力,记录体积保存于 4 °C,已备后续纯化。

1.2.7 α -AI 分子量测定 利用 SDS-PAGE 电泳对纯化后的样品进行分析。采用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,10 μ L 样品与 10 μ L 样品缓冲液混合,95 °C 下水浴 5 min 后,加入点样孔,浓缩胶工作电压为 80 V;分离胶工作电压为 160 V。染色 1 h 后脱色,直至看到清晰条带。利用 BIO-RAD 凝胶成像仪得到凝胶影像,分析电泳图谱。预染标准蛋白为混合标准蛋白,分子量范围 25~120 kDa。以 SDS-PAGE 电泳凝胶上已知分子量的标准蛋白质为依据,通过待测蛋白质的迁移条带分析其分子量范围。

1.2.8 LC-MS/MS 质谱分析 切下的蛋白胶条经过水洗、脱色、脱水、烷基化等步骤后用胰蛋白酶酶解,提取的肽段用 0.1% 甲酸、2% 乙腈溶解,充分振荡涡旋,13200 r/min,4 °C 离心 10 min,上清转移到上样管中,进行质谱鉴定。

1.2.8.1 液相条件 色谱柱:Acclaim PepMap RSLC C₁₈ (250 mm \times 0.075 mm, 3 μ m);流动相 A:0.1% 甲酸,B:0.1% 甲酸,80% 乙腈;洗脱梯度:0~5 min 5% B,5~55 min 90% B,55~60 min 5% B。

1.2.8.2 质谱条件 离子源:ESI;一级质谱:分辨率 70000,最高离子强度 3e6,最大离子收集时间 40 ms,扫描范围 m/z:350~1800;二级质谱:分辨率 17500,最高离子强度 1e5,最大离子收集时间 60 ms,碰撞能量 27 eV。

1.2.9 蛋白质标准曲线的绘制 采用考马斯亮蓝法^[17],配制考马斯亮蓝溶液及牛血清蛋白标准蛋白液,如表 3 进行编号并加入试剂,混合均匀后在室温下静置 3 min,以管 1 为空白管,于 595 nm 波长下测定各管吸光值,并绘制标准曲线。

表 3 蛋白质标准曲线的制备

Table 3 The preparation of protein standard curve

编号	1	2	3	4	5	6
标准蛋白液(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
生理盐水(mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
考马斯亮蓝 G-250(mL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

样品蛋白浓度的测定:1.0 mL 的待测样品与 5.0 mL 已配制好的考马斯亮蓝 G-250,混合均匀后静

置 3 min 与 595 nm 波长下测定吸光值。根据标准曲线,计算待测样品的蛋白浓度。

1.2.10 凝集素活力的测定 参照并优化杨明亮等^[18]的血凝反应方法,采用 96 孔 V 型板法测定凝集素的特异性活力。

1.2.10.1 红细胞悬液的配制 采集新鲜兔血于肝素钠抗凝管中后,将新鲜血液倒入离心管中 3000 r/min 离心 3 min,去除上层血清,向沉淀中添加生理盐水以清洗红细胞。轻轻颠倒摇匀洗涤,然后再次 3000 r/min 离心 3 min,去除上清液,如此重复操作洗涤 3 次。根据红细胞压积,按照离心出的红细胞体积,加入生理盐水配成 2% 浓度的红细胞悬液,4 °C 保存备用。

1.2.10.2 血凝反应过程 V 型板的 96 孔中各加入 50 μ L 生理盐水,向第一孔中加入 50 μ L 样品溶液,混匀后从第一孔中吸取 50 μ L 的混合液置于第二孔中,混匀后,再从第二孔中吸取 50 μ L 液体置于第三孔中,按此方式依次稀释至第 12 孔,最后从第 12 孔中吸出 50 μ L 混合液,弃去。12 孔的液体倍比稀释结束后,分别向每孔中加入 50 μ L 红细胞悬液。静置 1.5 h 后观察记录凝集结果。

1.2.10.3 凝集程度的判断 由于凝集素与糖蛋白的特异性结合,血红细胞之间可形成交叉网络,从而导致血球不下沉,反之则会形成一个凝集的红点。按照图 1 及表 4 判断凝集效果。

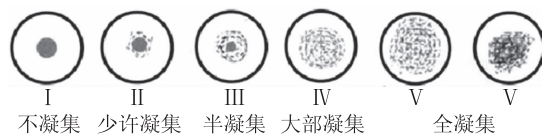


图 1 凝集程度示意图

Fig.1 The schematic of the degree of agglutination

1.2.10.4 凝集素特异性活力的计算:

$$\text{凝集活力(HU)} = \frac{2^n}{\text{每孔混合液体积}}$$

总活力(HU) = [血凝滴数(2ⁿ) \times 1000 \times 红细胞悬液体积] / 每孔添加体积

特异性活力(HU/mg) = [血凝滴数(2ⁿ) \times 1000] / (每孔添加体积 \times 凝集素或粗蛋白浓度)

式中,n 为样品经过倍比稀释后在 96 孔 V 型板上的凝集孔数;2ⁿ 为倍比稀释的稀释倍数,即血凝滴度。

1.3 数据处理

采用 Origin 8.0 和 Design Expert 8.0 软件对所得数据进行分析。

表 4 孔板法评价凝集程度

Table 4 Assess the degree of agglutination used ninety-six well plate

图 1 编号	凝集程度	现象
I	不凝集	红血球沉于 V 孔底部,形成一个红点
II	少许凝集	红血球大部分沉于底部,少许凝集,红点较小
III	半凝集	红血球一半沉于底部,一半凝集未沉,红点为 I 的一半
IV	大部凝集	少许红血球沉于 V 孔底部,红点边缘模糊
V	全凝集	红细胞凝集成网络或凝集成块,无沉积点

2 结果与分析

2.1 蛋白质标准曲线

以牛血清标准蛋白浓度为横坐标, 595 nm 波长下测定的吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见图 2。

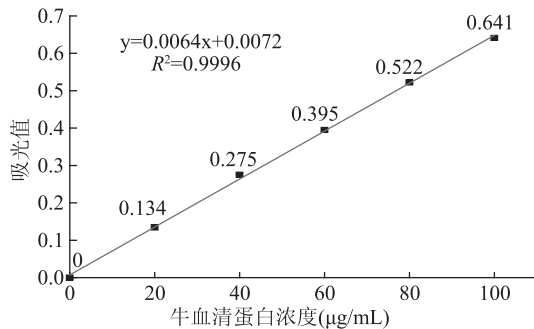


图2 牛血清蛋白含量的标准曲线

Fig.2 The standard curve of bovine serum protein content

2.2 单因素实验

2.2.1 料液比奶花芸豆凝集素提取效果的影响 蛋白质在溶解过程中, 传质动力增加, 随着料液比的增加, 蛋白质的提取率也会随之上升。由图 3 可知, 当料液比从 1:4 g/mL 增加至 1:12 g/mL 时, 蛋白质浓度不断增加, 特异性活力与总活力亦呈上升趋势; 在料液比为 1:12 g/mL 时达到最大值, 蛋白含量为 (10.63 ± 0.2) g/100 g, 总活力为 $(12.77 \pm 0.36) \times 10^7$ HU, 特异性活力为 $(12.01 \pm 0.42) \times 10^3$ HU/mg; 继续增加浸提液, 蛋白质含量及凝集活性均呈略微下降的趋势, 这就说明在料液比为 1:12 g/mL 时, 凝集素已经完全析出, 继续加大浸提液体积, 不能获得更大的蛋白溶解率, 且会增加成本和工作量, 故选择料液比 1:12 g/mL 作为提取的适宜条件。

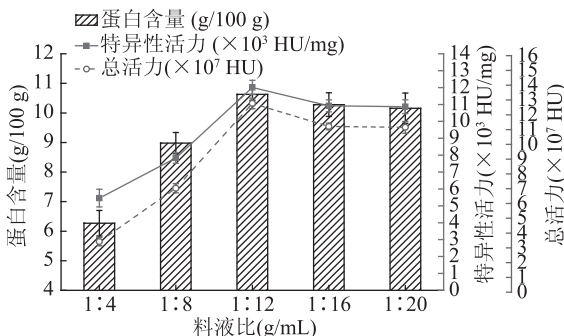


图3 料液比对奶花芸豆凝集素提取效果的影响

Fig.3 Effect of ratio of material to liquid

on the extraction of lectin from *Phaseolus vulgaris*

2.2.2 pH 对奶花芸豆凝集素提取效果的影响 蛋白质会在 pH 的等电点附近发现沉淀, 从而影响提取效果, 豆类凝集素的等电点大多数均集中在 5.4~6.5 之间^[4], 调节适当的 pH, 可提高凝集素提取效果。由图 4 可知, 蛋白质含量随着 pH 的增大呈不断上升趋势, pH8.0 时蛋白含量达到最大 (9.71 ± 0.23) g/100 g, 总活力与特异性活力随着提取液碱性逐渐增加, 在 pH7.5 时均达到最大值, 总活力为 $(10.79 \pm 0.21) \times 10^7$ HU, 特异性活力为 $(12.73 \pm 0.41) \times 10^3$ HU/mg, 继

续增加 pH, 提取活力开始下降, 这就说明在弱碱性环境中目标蛋白可最大限度的溶解于混合液中, 且凝集活性可达到最高, 而过碱环境中, 虽溶解总蛋白含量增加, 但目标蛋白已失活。为了获得最佳的提取效果, 保证蛋白含量较高且凝集素活性较稳定, 选择 pH7.5 作为提取的适宜条件。

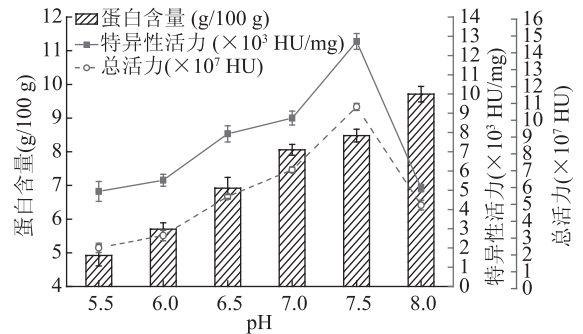


图4 pH 对奶花芸豆凝集素提取效果的影响

Fig.4 Effect of pH on the extraction of

lectin from *Phaseolus vulgaris*

2.2.3 提取时间对奶花芸豆凝集素提取效果的影响 由图 5 可知, 随着浸提时间的增加, 蛋白质含量及凝集活力均呈现上升趋势, 在提取时间为 18 h 时, 达到最佳提取效果, 蛋白含量为 (11.56 ± 0.38) g/100 g, 总活力为 $(15.22 \pm 0.4) \times 10^7$ HU, 特异性活力为 $(13.17 \pm 0.31) \times 10^3$ HU/mg。这就代表时间的延长有利于凝集素的溶出, 但随着时间继续的增加, 豆粉中亦会溶解滋生出一些酶及微生物, 分解消耗蛋白质, 降低凝集素提取率, 因此, 选择 18 h 为提取的适宜时间。

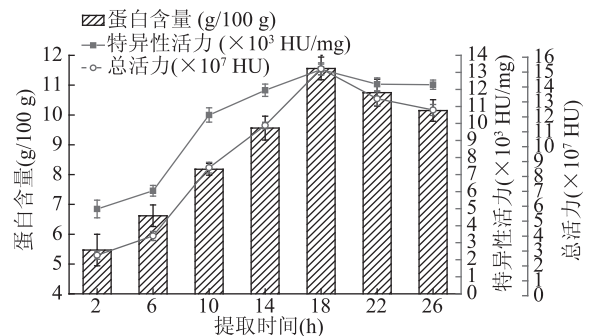


图5 提取时间对奶花芸豆凝集素提取效果的影响

Fig.5 Effect of extraction time on the extraction of

lectin from *Phaseolus vulgaris*

2.3 响应面实验

以单因素实验结果为依据, 以料液比 (A)、pH (B)、浸提时间 (C) 为自变量, 以凝集素特异性活力 (Y) 为响应值, 根据 Box-Behnken 实验设计进行响应面实验。响应面实验设计及结果如表 5。

利用表中数据结果进行多元回归拟合, 得到奶花芸豆凝集素特异性活力 (Y) 对以上因素的二次多项回归模型为: $Y = 13.23 + 1.06A - 1.18B + 0.47C - 0.087AB + 0.11AC + 0.39BC - 2.98A^2 - 2.85B^2 - 1.95C^2$ 。

表 6 为回归方程方差分析结果, 结果显示该回归模型 $p < 0.0001$, 失拟项 $p = 0.1265 > 0.05$, 不显著,

表5 响应面实验设计及结果

Table 5 Design and results of response surface experiment

实验号	A 料液比	B pH	C 提取时间	Y: 特异性活力 ($\times 10^3$ HU/mg)
1	1	1	0	7.25
2	-1	0	-1	6.90
3	1	-1	0	9.72
4	-1	-1	0	7.38
5	0	-1	-1	9.56
6	0	1	-1	6.34
7	0	0	0	13.21
8	0	0	0	13.22
9	0	1	1	8.08
10	0	0	0	13.19
11	1	0	-1	8.76
12	-1	0	1	7.62
13	0	0	0	13.28
14	1	0	1	9.92
15	0	0	0	13.26
16	-1	1	0	5.26
17	0	-1	1	9.74

表明该回归模型显著。模型回归系数 $R^2 = 0.9998$, $R^2_{Adj} = 0.9996$, 表明该模型拟合程度较好, 误差小, 可以用此模型对凝集素特异性活力进行分析和预测。从模型系数的显著性分析可知, 模型的一次项 A、B、C 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 均达到极显著水平 ($p < 0.01$); 交互项中, BC 交互效应极显著 ($p < 0.01$), AC 和 AB 交互效应影响显著 ($p < 0.05$)。由 F 值的大小可以得出, 各因素对奶花芸豆凝集素特异性活力影响的强弱次序为: pH > 料液比 > 提取时间。

各因素交互作用的响应曲面图见图 6。等高线的形状可反映出交互效应的强弱, 图形趋向椭圆且椭圆轴线与坐标轴的角度越大, 交互作用越明

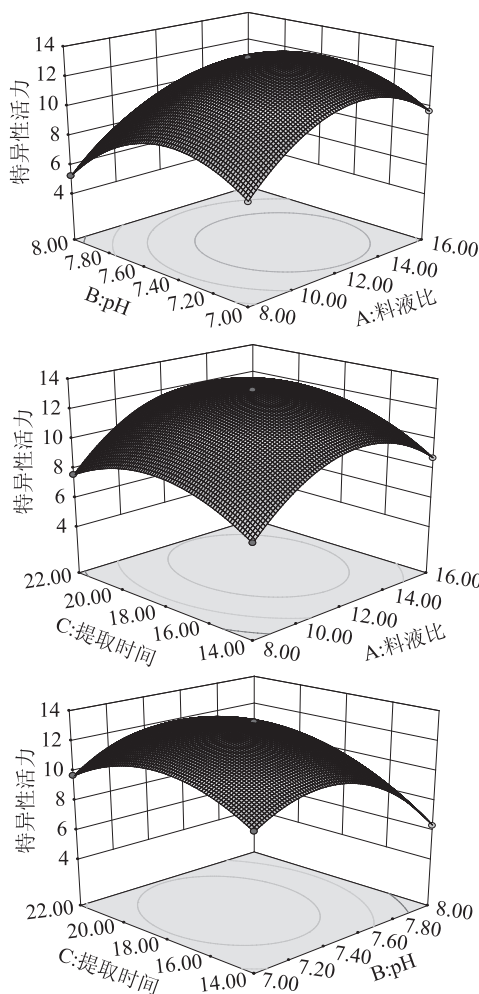


图6 各因素交互作用的响应曲面图

Fig.6 Response surface plot of interaction of various factors 显^[19]。图 6 可知, 料液比、pH、提取时间这三个因素两两之间交互作用均显著, 这与回归分析结果相吻合。

通过软件分析, 奶花芸豆凝集素特异性活力的

表6 回归方程方差分析结果

Table 6 Variance analysis of regression equation

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	Pr > F	显著性
模型	120.22	9	13.36	4661.38	<0.0001	**
A	9.01	1	9.01	3144.23	<0.0001	**
B	11.22	1	11.22	3915.30	<0.0001	**
C	1.80	1	1.80	628.57	<0.0001	**
AB	0.031	1	0.031	10.69	0.0137	*
AC	0.048	1	0.048	16.89	0.0045	*
BC	0.61	1	0.61	211.23	<0.0001	**
A^2	37.37	1	37.37	13041.85	<0.0001	**
B^2	34.21	1	34.21	11936.89	<0.0001	**
C^2	16.06	1	16.06	5602.97	<0.0001	**
残差	0.020	7	2.866E-003			
失拟项	0.015	3	4.860E-003	3.55	0.1265	不显著
纯误差	5.480E-003	4	1.370E-003			
总离差	120.24	16				

注: * 表示显著 ($p < 0.05$), ** 表示极显著 ($p < 0.01$)。

最优参数为:料液比 1:12.73 g/mL, pH7.4, 提取时间 18.42 h, 在此条件下预测所提取出的凝集素特异性活力可达 13.4748×10^3 HU/mg。考虑到操作的方便性, 对软件给出的最优参数进行修正: 料液比 (g/mL) 为 1:13, pH 为 7.4, 提取时间为 18.5 h, 在此条件下重复三次实验, 得到奶花芸豆凝集素特异性活力为 $(13.26 \pm 0.26) \times 10^3$ HU/mg, 与预测值接近, 说明采用响应面法优化的奶花芸豆凝集素提取工艺具有可行性。

2.4 硫酸铵分级沉淀法纯化结果与分析

本实验对于不同饱和度的硫酸铵纯化效果进行考察, 实验结果如图 7 所示。由图 7 可知, 硫酸铵饱和度低于 30% 时, 随着硫酸铵饱和度的增加, 沉淀复溶液中的蛋白含量不断上升; 硫酸铵饱和度达到 30% 时, 在沉淀复溶液中检测到凝血活性, 并在 70% 饱和度时达到最大, 蛋白含量为 (8.93 ± 0.24) g/100 g, 总活力 $(12.84 \pm 0.27) \times 10^7$ HU, 特异性活力为 $(14.38 \pm 0.29) \times 10^3$ HU/mg, 纯化倍数为 1.08。因此, 本实验选择 30%~70% 作为硫酸铵分级盐析的范围。

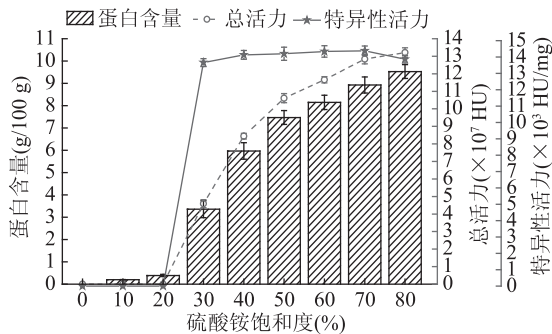


图7 奶花芸豆凝集素硫酸铵分级沉淀法纯化结果

Fig.7 Results of purification of lectin from *Phaseolus vulgaris* by ammonium sulfate fractional precipitation

2.5 离子交换层析与凝胶过滤层析

2.5.1 DEAE A-50 阴离子交换层析

凝集素是一类两性电解质, 其等电点在 6.5~7.5 之间, 同时考虑到酸碱度对纯化效果的影响, 选择阴离子交换层析进行纯化分离, pH6.9 的磷酸盐缓冲液进行洗脱。

梯度洗脱图如图 8 所示, 分别在 pH6.9 缓冲溶液、NaCl 浓度 100 mmol/L 和 NaCl 浓度 150 mmol/L 出现了三个蛋白峰。经血凝反应检测, 只有峰 1 收集的蛋白具有凝集活性。多次富集 DEAE-A50 洗脱得到的峰 1 蛋白液, 经过透析除去磷酸盐, -50°C 真空冷冻干燥冻干后收集备用。经检验该峰值管内蛋白含量为 (4.12 ± 0.19) g/100 g, 总活力 $(13.43 \pm 0.24) \times 10^7$ HU, 特异性活力 $(32.60 \pm 0.22) \times 10^3$ HU/mg, 纯化倍数为 2.46。

2.5.2 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱层析

如图 9 所示, 经过 G-50 凝胶柱后出现了一个蛋白峰, 富集峰值管蛋白液, 透析除盐后冷冻干燥。通过血凝反应在峰值管中检测到了凝集能力, 蛋白含量为 (1.31 ± 0.07) g/100 g, 总活力为 $(7.85 \pm 0.20) \times 10^7$ HU, 特异性活力为 $(59.93 \pm 0.31) \times 10^3$ HU/mg, 纯化倍数为 4.52。

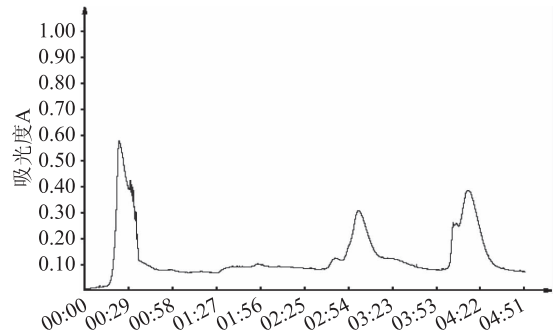


图8 DEAE-A50 阴离子交换层析

Fig.8 Anion exchange chromatography on DEAE A-50 column

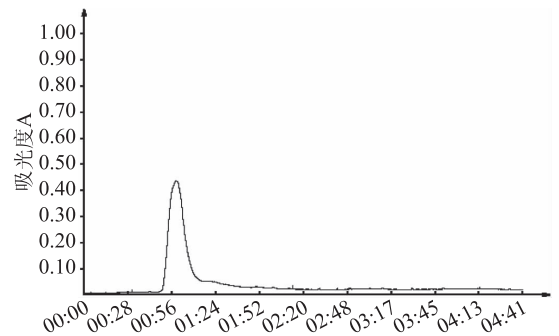


图9 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱层析

Fig.9 Gel chromatography on Sephadex G-50 column

2.6 奶花芸豆凝集素分子量的鉴定

图 10 为经过 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱层析后样品进行 SDS-Page 得到的电泳图。从图 10 中可以看出, 经过盐析、离子交换层析和凝胶柱层析后, 样品杂蛋白大致被除去, 在 31 kDa 左右呈现出一条清晰的条带, 因此推测从奶花芸豆凝集素的分子量在 31 kDa 左右。

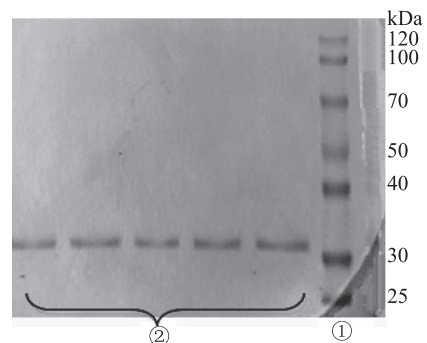


图10 奶花芸豆纯化样品的 SDS-Page 电泳图

Fig.10 SDS-PAGE of purified lectin from *Phaseolus vulgaris*
注:①为标准分子量蛋白质,②为 G-50 纯化后凝集素样品。

2.7 奶花芸豆凝集素 LC-MS/MS 蛋白鉴定

蛋白胶条经过酶切成肽段, 通过液相使样品以离子化的方式从液滴表面蒸发, 进入质谱, 一级质谱可以获得肽段的质量数信息, 选择强度最高的 20 个峰的肽段进行碎裂, 得到每个肽段的二级质谱, 根据二级质谱图与 Uniprot 数据库进行比对, 从而得到肽段的序列信息, 根据肽段的信息进一步比对蛋白质序列, 得到蛋白的鉴定信息。

表7 LC-MS/MS 检测鉴定结果

Table 7 Detection and identification results of LC-MS/MS

蛋白编号	数据库中蛋白登录号	出峰时间 (min)	蛋白得分	蛋白质量 (Da)	匹配上蛋白的二级谱数	匹配上蛋白的肽段数	蛋白丰度	蛋白描述
(1)	PHAE_PHAVU	74.37	10815	29728	321(285)	17(16)	23.64	Erythroagglutinating phytohemagglutinin
(2)	PHAL_PHAVU	78.32	13204	39538	341(330)	10(10)	10.46	Leucoagglutinating phytohemagglutinin
(3)	Q43628_PHAVU	49.73	8826	29462	255(233)	9(8)	9.62	Phytohemagglutinin
(4)	PHAM_PHAVU	52.09	2281	29403	84(70)	6(5)	9.41	Leucoagglutinating phytohemagglutinin
(5)	PVAP_PHAVU	43.22	1269	1303	53(52)	1(1)	7.95	Antifungal lectin
(6)	Q9S8B2_PHAVU	73.98	152	2398	4(4)	3(3)	7.74	GNL-2 alpha subunit
(7)	Q8RVX5_PHAVU	11.35	815	29608	42(33)	7(6)	5.86	Lectin
(8)	Q9S8B4_PHAVU	30.62	49	2741	1(1)	1(1)	5.02	34 kDa POD lectin alpha subunit
(9)	T2DN52_PHAVU	76.81	572	29351	36(28)	3(3)	4.60	Phytohemagglutinin
(10)	A0A165TQ41_PHAVU	59.18	583	36676	36(27)	3(2)	4.18	Mannose lectin FRIL
(11)	Q9S9E1_PHAVU	32.35	603	15395	16(15)	8(7)	3.77	Alpha-amylase inhibitor beta subunit
(12)	A0T2V2_PHAVU	70.36	667	26988	22(21)	9(8)	3.35	Alpha amylase inhibitor
(13)	Q43632_PHAVU	47.64	346	47525	16(13)	11(10)	2.09	Phaseolin
(14)	T2DPN9_PHAVU	27.51	113	41828	5(4)	4(3)	1.46	Actin
(15)	T2DLI2_PHAVU	23.69	110	36760	5(4)	3(3)	0.84	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

电泳条带中共鉴定出 15 种蛋白质, 鉴定结果如图 11 及表 7 所示, 其中蛋白得分与丰度较高的前 10 种蛋白均属于凝集素这一大类蛋白。剩余的五种蛋白为酶抑制剂、菜豆素、肌动蛋白、磷酸脱氢酶, 它们的蛋白得分与丰度很低。因此, 由鉴定结果可以确定, 通过层析纯化得到的目标蛋白即为奶花芸豆凝集素。

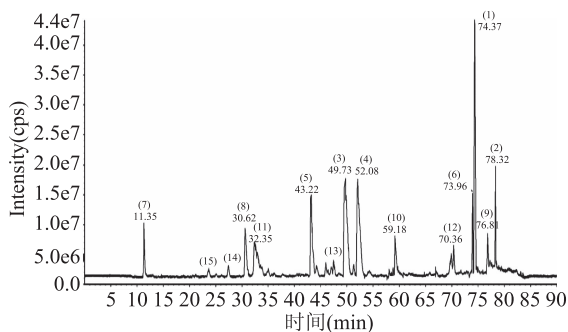


图 11 LC-MS/MS 质谱峰图

Fig.11 The mass spectra peak of LC-MS/MS

3 结论

本实验以新疆奶花芸豆为原料, 提取奶花芸豆凝集素。利用单因素实验结合响应面实验得到奶花芸豆凝集素的最优提取条件为: 料液比 1: 13, pH7.4, 提取时间 18.5 h, 在此条件下凝集素特异性活力为 $(13.26 \pm 0.26) \times 10^3$ HU/mg; 经过 30~70% 硫酸铵分级沉淀、DEAE A-50 阴离子交换层析和 Sephadex G-50 凝胶层析后的凝集素特异性活力达到 $(59.93 \pm 0.31) \times 10^3$ HU/mg, 纯化倍数为 4.52。SDS-Page 电泳确定目标分子量在 31 kDa 左右, 并通过 LC-MS/MS 检测确定分离的蛋白即为奶花芸豆凝集素。

参考文献

[1] 李恩超, 马瑞, 韩英, 等. 阿勒泰地区发展特色产品奶花芸豆的前景与对策[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(2): 101-102.

[2] 赵林同, 李慕春, 芦云, 等. ICP-OES 测定奶花芸豆中的微量元素[J]. 光谱实验室, 2012, 29(6): 3361-3363.

[3] Van Damme EJM, Peumans WJ, Pusztai A, et al. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications [J]. John Wiley and Sons, Chichester, 1998, 100(4): 463.

[4] 王超. 豆类凝集素的提取分离及纯化[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013: 1-64.

[5] Rudiger H, Gabius HJ. Plant lectins: occurrence, biochemistry functions and applications [J]. Glycoconjugate Journal, 2001, 18(8): 589-613.

[6] Marilyn EE, Kalsi G. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1999, 96(10): 5856-5861.

[7] 田童童, 江英, 张建, 等. 花芸豆铁蛋白的分离纯化[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(9): 30-35.

[8] 李慕春, 王飞. 双波长分光光度法测定奶花芸豆总黄酮含量[J]. 广东农业科学, 2012(12): 110-111.

[9] 张静, 陈浩然, 王笑颖, 等. 花芸豆多肽提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 315-318.

[10] 车东升, 刘飞飞, 穆成龙, 等. 大豆凝集素的分离纯化及活性鉴定[J]. 吉林大学学报: 理学版, 2012, 50(5): 1041-1044.

[11] 罗瑞鸿, 潘有强, 魏源文, 等. 木豆凝集素提纯[J]. 广西农业生物科学, 2008, 27(4): 461-464.

[12] 黄泽华, 王倩文, 张贺, 等. 响应面实验优化绿豆凝集素提取工艺[J]. 食品科学, 2014, 35(20): 31-36.

[13] Wong JH, Ng TB. Isolation and characterization of a glucose/mannose/rhamnose-specific lectin from the knife bean canavalia gladiata [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 439(1): 91-98.

[14] Nausicaa L, Wouter V, Paul P, et al. Expression of the nucleocytoplasmic tobacco lectin in the yeast Pichia pastoris [J]. Protein Expression and Purification, 2007, 53(2): 275-282.

(下转第 59 页)

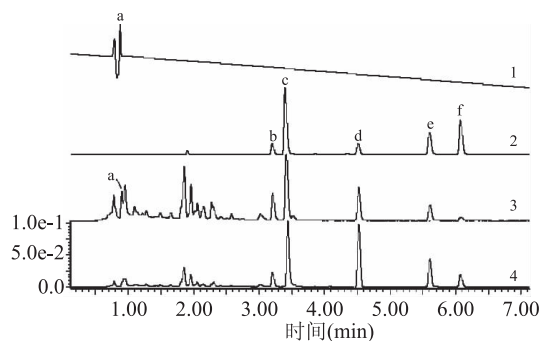


图7 大黄提取物分离纯化前后的色谱图

Fig.7 Chromatograms of the rhubarb extract before and after separation and purification

注:1.离子液体溶液;2.标准品溶液;
3.纯化前提取液;4.纯化后洗脱液;
a.[bmim]Br;b.芦荟大黄素;c.大黄酸;
d.大黄素;e.大黄酚;f.大黄素甲醚。

树脂吸附和解吸率最为理想;筛选得到大黄5种蒽醌分离纯化的优化条件为:层析柱径高比为1:8,上样溶液5种蒽醌总含量为3.64 mg/mL,上样流速1.0 BV/h,上样体积为2.0 BV,85%的乙醇为洗脱溶液,洗脱流速1.0 BV/h,洗脱体积为3.0 BV。经该工艺纯化后,5种蒽醌总含量由原来粗提物中的7.13%提高到20.5%,是原来的2.88倍。同时,提取物中残留的[bmim]Br被除去,表明本实验选择的优化条件具有可行性。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2005:17.
- [2] 邓丽红,谢臻,麦蓝尹,等.蒽醌类化合物抗菌活性及其机制研究进展[J].中国新药杂志,2016,25(21):2450-2455.
- [3] Mishra S, Tiwari S, Shrivastava A, et al. Antidyslipidemic effect and antioxidant activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi* rhizomes in dyslipidemic rats[J].Journal of Natural Medicines,2014,68(2):363-371.
- [4] Hu BY, Zhang H, Meng XL, et al. Aloe-emodin from rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages[J].Journal of Ethnopharmacology,2014,153(3):846-853.
- [5] Neyrinck AM, Etcheberria U, Taminiau B, et al. Rhubarb extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota[J].Molecular Nutrition & Food Research,2017,61(1):
- [6] Liu J, Zhang K, Zhen YZ, et al. Antitumor activity of rhein

lysinate against human glioma U87 cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Oncology Repor,2016,35(3):1711-171.

[7] 卫生部药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2010:22-23.

[8] 李会丽,杜丽东,史彦斌,等.大黄游离总蒽醌的组合式提取和纯化工艺研究[J].兰州大学学报:医学版,2017,40(3):62-70.

[9] Zhao LC, Liang J, Li W, et al. The use of response surface methodology to optimize the ultrasound-assisted extraction of five anthraquinones from *Rheum palmatum* L.[J].Molecules 2011,16(7),5928-5937.

[10] Tan T, Lai CJS, Yang HO, et al. Ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction and aqueous two-phase system for analysis of caffeoylquinic acids from *Flos Lonicerae Japonicae* [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 120:134-141.

[11] Bhan M, Satija S, Garg C, et al. Optimization of ionic liquid-based microwave assisted extraction of a diterpenoid lactone-andrographolide from *Andrographis paniculata* by response surface methodology [J]. Journal of Molecular Liquids, 2017, 229: 161-166.

[12] Lu CX, Wang HX, Lv WP, et al. Ionic liquid based ultrasonic/microwave assisted extraction combined with UPLC for the determination of anthraquinones in rhubarb [J].Chromatographia, 2011,74(1):139-144.

[13] Gao M, Huang W, Liu CZ. Separation of scutellarin from crude extracts of *Erigeron breviscapus* (vant.) Hand. Mazz. by macroporous resins [J].Journal of Chromatography B,2007.858, 22-26.

[14] 刘景玲,张治海,李鑫,等.大孔树脂法分离纯化大血藤中原花青素[J].食品工业科技,2017,38(1):112-120.

[15] 刘宛玲,肖建辉,黄占旺,等.大孔树脂分离纯化麦胚黄酮研究[J].食品工业科技,2017,38(2):293-296.

[16] 徐晶,于艳,王晓荣,等.大孔吸附树脂纯化大黄中5种游离蒽醌及总蒽醌的含量测定[J].时珍国医国药,2013,24(4):862-863.

[17] 叶殷殷,曾元儿,曹骋,等.不同型号大孔树脂分离大黄蒽醌类成分的研究[J].中成药,2011,33(1):168-170.

[18] 李倩.离子液体微波辅助提取葛根总黄酮及纯化的研究[D].武汉:武汉工程大学,2012.

[19] Lu CX, Tang ZG, Liu CB, et al. Determination of ionic liquid cations in soil samples by ultrasound-assisted solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J].Analytical Methods,2015,7:5924-5933.

(上接第54页)

[15] Li S, Gao A, Dong S, et al. Purification, antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from soybean residue fermented with *Morchella esculenta* [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2017,96:26-34.

[16] 刘晓洁.鹰嘴豆 α -淀粉酶抑制剂的分离、鉴定及特性研究[D].辽宁:大连工业大学,2011:1-55.

[17] 李娟,张耀庭,曾伟,等.应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J].中国生物制品学杂志,2000,13(2):118-120.

[18] 杨明亮,宋雯雯,康明.大豆凝集素含量测定方法的改进与种质资源分析[J].大豆科学,2008,27(2):310-314.

[19] 林建原,季丽红.响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J].中国食品学报,2013,13(2):84-90.