

刀豆凝集素提取、分离及产物分析研究

王洪新, 娄在祥, 朱 松

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 以新鲜刀豆为原料, 实验得出了提取刀豆凝集素的最优条件为: 提取温度为 22℃, 提取时间为 2.5h, 甲酸溶液中 NaCl 浓度为 0.20mol/L, 甲酸浓度为 0.7mol/L, 料液比为 1:50(W/V)。所得刀豆凝集素活力为 102.96HU/g, 蛋白质提取量为 11.15mg/g。提取液经硫酸铵分级沉淀、透析得到刀豆凝集素粗品, 经 HPLC 分析表明, 刀豆凝集初步分离产物有多种不同分子量的蛋白质构成, 分子量分布范围较广, 从 150000D 到 1300D 左右。分子量为 710000 左右的组分占 22.65%, 分子量为 36000D 左右的组分占 15.55%。初步分离产物中刀豆凝集素的含量较高。

关键词: 刀豆; 凝集素; 提取分离; 分析

Study on Extraction, Separation and Analysis of Sword Jackbean Lectin

WANG Hong-xin, LOU Zai-xiang, ZHU Song

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology,
Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Fresh sword jackbean was used as material, and the best technological conditions for the extraction of sword jackbean lectin (SJL) were obtained in this study. The best conditions are as follows: extracting time 2.5 h, extracting temperature 22 °C, concentration of NaCl in formic acid solution 0.20 mol/L, formic acid concentration 0.7 mol/L and ratio of material to water 1:50 (W/V). Under these conditions, the hemagglutinating activity of SJL is 102.96 HU/g, and the extraction mass of protein is 11.15 mg/g. By ammonium sulfate fractionation and dialysis, crude product of SJL is got. HPLC analysis showed that the preliminary product of SJL comprises a number of proteins with different molecular weights, in a wide range, from about 150000 D to 1300 D. The protein with the molecular weight of about 7100 D accounts for 22.65%, and the protein with, the molecular weight of about 36000 D accounts for 15.55%. The results showed that the content of sword jackbean lectin in the initial isolate is high.

Key words: sword jackbean; lectin; extraction and separation; analysis

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)10-0153-04

Landsteiner 和 Raubitschek 发现包括生大豆在内的许多食用豆类的粗提物具有凝集红细胞活性, 但他们并没有意识到这种具有凝集活性物质的重要性。随后的研究表明, 凝集素(lectin)是一类具有糖专一性, 可促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白^[1]。他们广泛存在, 并在各种生命活动中都起着重要作用^[2-3]。豆科植物凝集素具有刺激外周血淋巴细胞 RNA 合成和有丝分裂^[4]、诱发人外周血淋巴细胞产生抗癌淋巴因子、促进巨噬细胞的吞噬作用、使细胞凝集^[5]和使肿瘤细胞失活等生物学活性。

本实验探讨了从新鲜刀豆种子(sword jackbean)中提取分离刀豆凝集素的条件, 得到刀豆凝集素粗品, 并分析刀豆凝集素初步分离产物, 以期刀豆中活性物质

的研究和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜刀豆 广东; 兔血采自新西兰大白兔, 血球经胰蛋白酶处理、戊二醛固定^[6]并配成 5% 的红细胞悬液在 4℃ 冰箱保存备用。

分子量标准蛋白 Sigma 公司; 实验中所用其他试剂均为国产分析纯。

高效液相色谱仪(配 Shodex 紫外检测器) Waters 公司; 台式高速冷冻离心机 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 刀豆凝集素的提取分离^[7-9]

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(3016009)

作者简介: 王洪新(1964-), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然活性成分。E-mail: whx1964@126.com

取适量新鲜刀豆种子, 加入组织捣碎机内处理 3min, 称取 1g, 加适量含有 NaCl 的甲酸溶液, 水浴搅拌抽提、过滤, 取滤液 5000r/min 离心 30min, 得上清液, 上清液采用硫酸铵分段盐析, 取饱和度为 40%~70% 的沉淀, 溶解、透析充分、30℃减压浓缩、28℃真空干燥, 得刀豆凝集素粗品。

1.2.2 蛋白质浓度测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法, 以牛血清白蛋白为标准。所得回归方程为: $y=1.5318A+0.0408$, ($R^2=0.9998$)。

1.2.3 凝集素活力的测定

采用 Liener 法^[8-9], 但是将工作溶液改用 pH7.2 等渗 PBS。

1.3 刀豆凝集素初步分离产物的分子量分布分析

将刀豆凝集素粗品经微孔过滤膜过滤后, 上 Shodex PROTEIN KW-802.5 色谱柱, 以甲状腺球蛋白(VB₁₂Mw:669000)、醛缩酶蛋白(Mw:158000)、牛血清白蛋白(Mw:67000)、卵清蛋白(Mw:43000)、过氧化物酶蛋白(Mw:40200)、腺苷酸激酶蛋白(Mw:32000)、肌红蛋白(Mw:17000)、核糖核酸酶(Mw:13700)、抑肽酶蛋白(Mw:6500)、VR₁₂(Mw:1350)为标准品, 测定初步分离产物的分子量分布。

分析条件: 高效液相色谱仪, Waters 600(配 Shodex 紫外检测器); 色谱柱 Shodex PROTEIN KW-802.5; 流动相 50mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)+0.3mol/L NaCl; 检测 UV220nm; 流速 1.0ml/min; 柱温 25℃。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

选择甲酸溶液、pH7.2 磷酸缓冲液、NaCl 溶液作为提取溶剂在相同条件下分别进行实验, 对刀豆凝集素的提取结果如图 1 所示。可以看出, 甲酸溶液作为溶剂时, 蛋白质提取质量和所得凝集素的活力都最高, 因此宜选择甲酸溶液作为提取溶剂。

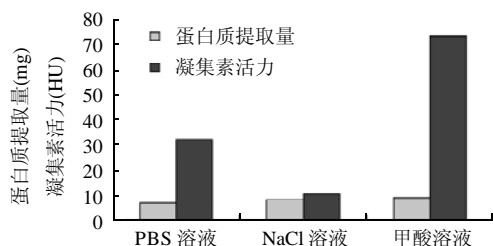


图 1 提取溶剂对 SJL 提取的影响

Fig.1 Effects of extracting solution on SJL yield

2.2 提取时间的选择

以甲酸溶液为提取溶剂, 在提取温度为 25℃, 甲酸溶液中 NaCl 浓度为 0.1mol/L, 甲酸浓度为 0.5mol/L, 料

液比为 1:50(W/V)的条件下, 选择 7 个时间 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4h 进行实验, 确定最佳提取时间。提取结果如图 2 所示。可以看出, 在 2.5h 时, 蛋白质提取量和凝集素活力均达到最大, 继续增大提取时间时, 凝集素活力开始下降, 因此, 提取时间选择 2.5h 为佳。

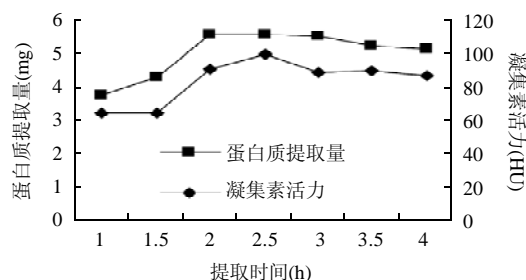


图 2 提取时间对 SJL 提取的影响

Fig.2 Effects of extracting time on SJL yield

2.3 提取温度的选择

以甲酸溶液为提取溶剂, 在提取时间为 2.5h, 甲酸溶液中 NaCl 浓度为 0.1mol/L, 甲酸浓度为 0.5mol/L, 料液比为 1:50(W/V)的条件下, 提取温度对刀豆凝集素提取的影响如图 3 所示。由图 3 看出, 随着温度的升高, 蛋白质提取质量和凝集素活力增大, 在 25℃时, 两者均取得最大值, 温度高于 25℃时, 凝集素活力受到影响, 蛋白质提取量和凝集素活力都开始减小, 所以, 刀豆凝集素的最佳提取温度为 25℃。

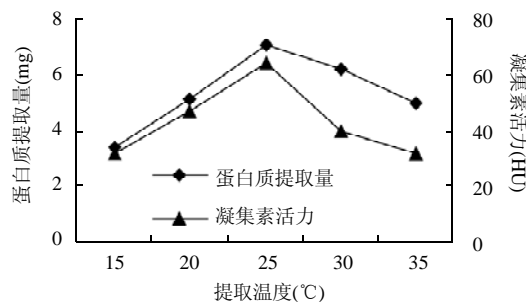


图 3 提取温度对 SJL 提取的影响

Fig.3 Effects of extracting temperature on SJL yield

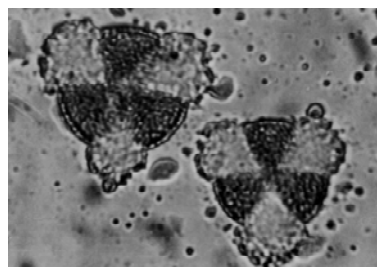


图 4 甲酸浓度对 SJL 提取的影响

Fig.4 Effects of formic acid concentration on SJL yield

2.4 甲酸浓度的选择

以甲酸溶液为提取溶剂,在提取时间为2.5h,提取温度为25℃,甲酸溶液中NaCl浓度为0.1mol/L,料液比为1:50(W/V)的条件下,考察甲酸浓度对刀豆中凝集素提取影响(见图4)。由图4看出,当甲酸浓度为0.5mol/L时,蛋白质提取量达到最大,甲酸浓度高于0.5mol/L时,蛋白质提取量开始下降,凝集素活力虽有上升,但是不明显;同时过大的甲酸浓度会使提取溶剂pH值过低。综合考虑,甲酸浓度选择0.5mol/L为佳。

2.5 NaCl浓度的选择

以甲酸溶液为提取溶剂,在提取时间为2.5h,提取温度为25℃,甲酸溶液中甲酸浓度为0.5mol/L,料液比为1:50(W/V)的条件下,考察NaCl浓度对刀豆中凝集素提取的影响如图5所示。可以看出,当NaCl浓度达到0.2mol/L时,蛋白质提取量和凝集素活力都不再增大,因此,最佳NaCl浓度为0.2mol/L。

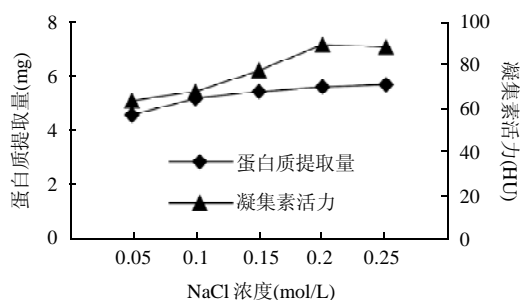


图5 NaCl 浓度对 SJL 提取的影响

Fig.5 Effects of NaCl concentration on SJL yield

2.6 料液比的选择

以甲酸溶液为提取溶剂,在提取时间为2.5h,提取温度为25℃,甲酸溶液中甲酸浓度为0.5mol/L,NaCl浓度为0.1mol/L的条件下,考察料液比对刀豆中凝集素提取影响如图6所示。可以看出,当料液比达到1:50(W/V)时,蛋白质提取量和凝集素活力的增长趋于平缓,因此,最佳料液比为1:50(W/V)。

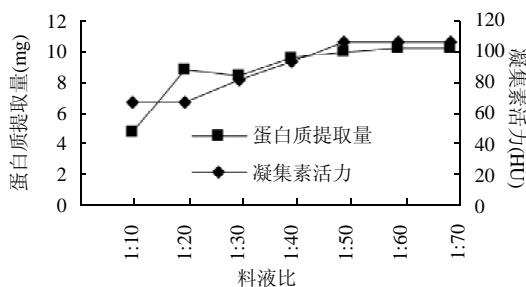


图6 料液比对 SJL 提取的影响

Fig.6 Effects of ratio of material to water on SJL yield

2.7 刀豆凝集素提取工艺优化

影响刀豆凝集素提取效果的因素很多,本实验探讨了其中的主要影响因素:提取温度、提取时间、甲酸浓度、NaCl浓度、料液比等。然后,在单因素试验的基础上,以蛋白质提取量、凝集素活力为指标,选择主要的、需要进一步优化的因素(提取温度、提取时间、甲酸浓度、NaCl浓度),设定实验方案,对刀豆凝集素提取工艺条件进行优化。

表1 试验方案的确定

Table 1 Project of test

水平	因素			
	A提取时间(h)	B提取温度(℃)	C NaCl浓度(mol/L)	D甲酸浓度(mol/L)
1	22	2.0	0.15	0.3
2	25	2.5	0.20	0.5
3	28	3.0	0.25	0.7

在单因素试验的基础上,按表1的设定方案,通过正交试验,寻找最佳提取条件。以蛋白质提取量为指标时,结果如表2所示。以 k_1 、 k_2 、 k_3 为纵坐标,分别对A、B、C、D作图得出蛋白质提取质量与4个因素的关系如图7所示。

表2 试验结果分析表(I)

Table 2 Analysis table of results of test (I)

	A	B	C	D
K_1	23.522	19.969	20.03	17.640
K_2	21.378	23.829	27.811	21.623
K_3	19.785	20.887	16.844	25.422
k_1	7.841	6.656	6.677	5.88
k_2	7.126	7.943	9.270	7.208
k_3	6.595	6.962	5.615	8.474
R	3.737	3.860	10.967	7.782

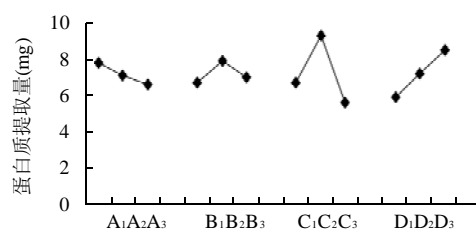


图7 蛋白质提取量随提取条件变化曲线

Fig.7 Relationship between protein mass and extracting conditions

由表2极差分析表明,提取温度、提取时间、甲酸浓度、NaCl浓度对刀豆蛋白质提取量均有不同程度的影响,各种因素对蛋白质提取量影响的大小顺序为:C>D>B>A,刀豆中蛋白质提取的最优水平组合为A₁B₂C₂D₃,即提取温度22℃,提取时间2.5h,甲酸溶液中NaCl浓度0.20mol/L,甲酸浓度0.7mol/L。

在单因素试验的基础上,按表1的设定方案,以刀豆凝集素活力为指标时,正交试验结果如表3。以 k_1 、 k_2 、 k_3 为纵坐标,分别对A、B、C、D作图得出凝集素活力与4个因素的关系如图8所示。

表3 试验结果分析表(II)
Table 3 Analysis table of results of test (II)

	A	B	C	D
K_1	229.521	207.608	220.901	125.055
K_2	176.408	223.686	204.357	254.536
K_3	234.647	209.282	215.318	257.985
k_1	76.507	69.203	73.634	41.685
k_2	58.803	74.562	68.119	84.845
k_3	78.216	69.761	71.773	85.995
R	58.239	16.078	16.544	132.93

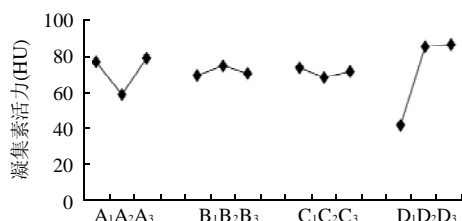


图8 刀豆凝集素活力随提取条件变化曲线

Fig.8 Relationship between SJL hemagglutinating extracting conditions activity and extracting conditions

由表3极差分析表明,提取温度、提取时间、甲酸浓度、NaCl浓度对提取所得的刀豆凝集素的活力均有不同程度的影响,各种因素对凝集素活力影响的大小顺序为: $D > A > C > B$ 。以凝集素活力为指标时,提取的最优水平组合为 $A_3B_2C_1D_3$,即提取温度为 28°C 、提取时间为2.5h、甲酸溶液中NaCl浓度为 0.15mol/L 、甲酸浓度为 0.7mol/L 。

结合提取刀豆中蛋白质的最优条件进行分析,提取温度取 22°C 和 28°C 时,所得凝集素的活力相差较小;当NaCl浓度为 0.15mol/L 和 0.20mol/L 时,凝集素活力的变化与蛋白质提取量的变化相比,幅度很小,因此提取刀豆凝集素的最优条件应该为:提取温度为 22°C ,提取时间为2.5h,甲酸溶液中NaCl浓度为 0.20mol/L ,甲酸浓度为 0.7mol/L 。经实验验证,在该条件下,所得到的蛋白质的提取量和凝集素活力都是最高的,因此该条件是提取刀豆凝集素的最优条件。

2.8 刀豆凝集素初步分离产物分子量分析

刀豆凝集素提取分离产物的分子量分布如图9所示。可以看出,刀豆凝集初步分离产物的组分较为复杂,有多种不同分子量的蛋白质构成,分子量分布范围较广,从 150000D 到 1300D 左右。分子量为 71000D 左右的组分占22.65%,分子量为 36000D 左右的组分占15.55%;这两个组分应该是刀豆凝集素或者是它的一个

亚基。这说明初步分离产物中刀豆凝集素的含量较高,只要进一步纯化就可以得到高纯度的凝集素。

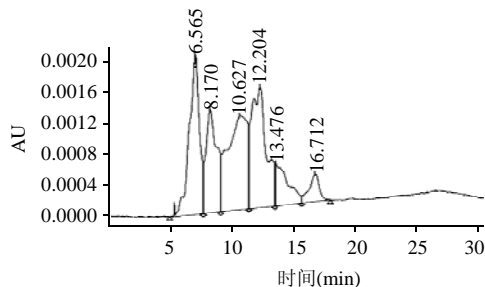


图9 刀豆凝集素提取分离产物液相图谱

Fig.9 Liquid chromatogram of raw extracts of sword jackbean lectin

3 结论

以新鲜刀豆种子为原料,提取刀豆中凝集素的最佳溶剂是甲酸溶液,凝集素提取的最优工艺条件为:提取温度为 22°C 、提取时间为2.5h、甲酸溶液中NaCl浓度为 0.20mol/L 、甲酸浓度为 0.7mol/L 、料液比为1:50(W/V)。提取所得刀豆凝集素活力为 102.96HU/g 、蛋白质提取量为 11.15mg/g 。

凝集素提取液经硫酸铵分级沉淀、透析等处理后得到刀豆凝集素(SJL)粗品。经HPLC分析表明,刀豆凝集初步分离产物的组分较为复杂,有多种不同分子量的蛋白质构成,分子量分布范围较广,从 150000D 到 1300D 左右。分子量为 71000D 左右的组分占22.65%,分子量为 36000D 左右的组分占15.55%。这说明初步分离产物中刀豆凝集素的含量较高。

参考文献:

- [1] GUILLOT L, KONSKA G. Lectins in higher fungi[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1997, 25(3): 203-230.
- [2] WEIR W I, DRICKAMER K. Structural basis of lectin- carbohydrate recognition[J]. Amru Re Biochem, 1996, 65: 441-473.
- [3] LIS H, SHARON N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition[J]. Chem Rev, 1998, 98: 637-674.
- [4] WANG H X, BUNNG T, OOI V E. Lectins from mushrooms[J]. Mycology Research, 1998, 102(8): 897-960.
- [5] PEUMANS W J, BARRE A, QIANG H, et al. Minireview: Higher Plants development structurally different motifs to recognize foreign glycans[J]. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2000, 64(12): 83-101.
- [6] TURNER R H, LIENER I E. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins[J]. Anal Biochem, 1975, 68:651-653.
- [7] 瓦尔基 A. 糖生物学基础[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 410-413.
- [8] LIENER I E. The photometric determination of the hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1955, 54: 223-231.
- [9] 潘鑫, 刘山莉. 中药桑寄生凝集素的分离及体外抗肿瘤活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006,18(2): 210-213.