

- [2] Ohno N, Hayashi M, Suzuki I et al. Effect of glucans on the antitumor activity of Grifolan[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, 34(5): 2149-2151.
- [3] 李小定, 吴谋成, 曾晓波等. 灰树花多糖PGF-1对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(3): 261-263.
- [4] 李小定, 吴谋成, 曾晓波等. 灰树花多糖的分离、纯化及理化性质[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(2): 186-263.
- [5] Halliwell B, Gutteridge J M C, Aruoma O I. The deoxyribose method: A simple "Test-Tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 165: 215-219.
- [6] 韩玲, 陈可翼. 益心康胶囊含药血清对氧应激所致线粒体损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(3): 25-28.
- [7] 王建华, 张民, 甘露等. 枸杞多糖-2的抗羟基自由基氧化作用[J]. 食品科学, 2001, 22(1): 11-13.
- [8] 李志孝, 黄成钢, 蔡育军等. 天门冬多糖的化学结构及体外抗氧化活性[J]. 药学学报, 2000, 35(5): 358-362.
- [9] 肖湘, 俞丽君, 邱玉莹等. 油柑多糖的提取与清除氧自由基作用的研究[J]. 中国药理学杂志, 1998, 33(5): 279-281.
- [10] 张尔贤, 俞丽君, 邱玉莹等. 多糖类物质对 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的清除作用[J]. 中国生化药物杂志, 1995, 16(1): 9-11.

从小麦胚芽蛋白中分离和鉴定血管紧张素转化酶抑制肽的研究

辛志宏, 马海乐, 吴守一, 骆琳
(江苏大学生物与环境工程学院, 镇江 212013)

摘 要: 用碱性蛋白酶水解小麦胚芽蛋白得到的水解物对血管紧张素转化酶有强的抑制活性($IC_{50}=0.014\text{mg/ml}$), 小麦胚芽蛋白水解物经Sephadex G-15纯化、制备RP-HPLC分离, 得一对ACE有强烈抑制作用的组分X($IC_{50}=5.46\mu\text{mol/L}$), X氨基酸分析、电喷雾质谱确定了X的序列为Ala-Met-Tyr。

关键词: 小麦胚芽蛋白; 血管紧张素转化酶抑制肽; 电喷雾质谱

Abstract: Aldaline protease hydrolyzate extracted from wheat germ embryo protein showed a high angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity ($IC_{50}=0.014\text{mg/ml}$). A high ACE inhibitory fraction X ($IC_{50}=5.46\mu\text{mol/L}$) was obtained by the consecutive separation methods including Sephadex G-15 chromatography and preparation reverse-phase high performance liquid chromatography. The sequence of X was found as Ala-Met-Tyr after the application of amine acid composition assay and electrospray mass spectrometry.

Key words: wheat germ embryo protein; angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide; electrospray mass spectrometry

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)07-0130-04

血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, EC3.4.15.1, 简称ACE)在人体血压调节过程中起重要的生理作用。一方面, 它使无活性的血管紧张素I转化为血管紧张素II, 血管紧张素II能刺激血管收缩使血压升高, 另一方面它能分解降压物质缓激肽成失活片段^[1]。那么抑制ACE的活性使血管紧张素II的生成和缓激肽的破坏均减少就可达到预防和治疗高血压的目的。目前临床上使用的许多降压药都是合成的ACE抑制剂, 如卡托普利(Captopril)、依那普利

(enalapril)等。近年来, 人们又从许多食品蛋白质中发现ACE抑制肽, 如大豆(1993, Kinoshita E), 沙丁鱼肉(1994, Matsufuji H), 酸奶(1995, Nakamura Y), 鸡蛋蛋黄蛋白(2001, Yoshii H)^[2]等。

小麦胚芽是小麦加工的副产品, 其中蛋白质含量为高达30%左右。目前对小麦胚芽的加工主要是从中提取小麦胚芽油和富集维生素E, 而脱脂后的麦胚却没有充分利用。本文以小麦胚芽蛋白为原料, 利用碱性蛋白酶水解从中提取ACE抑制肽。

收稿日期: 2003-02-08

作者简介: 辛志宏(1974-), 男, 在读博士, 现从事农产品加工工程研究。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦胚芽 购自南京面粉厂; 马尿酸组氨酰亮氨酸(Hip-His-Leu,HHL) Sigma公司; 血管紧张素转化酶 Sigma公司; 碱性蛋白酶 无锡酶制剂厂; SephadexG-15 Sigma公司。

1.2 主要仪器

COULTER P/ACETM 毛细管电泳仪 美国BECKMAN-COULTER公司; 柱层析纯化系统 上海精科公司; 1100反相高效液相色谱仪(RP-HPLC) Agilent公司; 电喷雾质谱 WATERS Platform ZMD 4000。

1.3 试验方法

1.3.1 碱性蛋白酶水解小麦胚芽蛋白

称取自制的小麦胚芽蛋白100g, 加去离子水1000ml溶解, 于恒温水浴锅中加热至50℃并调pH至9.0, 然后加入24Au/Kg的碱性蛋白酶, 水解5h, 水解过程中不断调整pH并搅拌。水解结束后调节pH至7.0并于沸水浴中加热15min钝化酶, 水解液经5000g离心后取上清液备用。

1.3.2 ACE抑制活性的测定方法^[3]

采用高效毛细管电泳法, 具体操作为取蛋白水解液溶于50mmol/L pH8.3的硼酸缓冲液中, 吸取20μl, 加入5μl ACE酶液于37℃保温5min, 随后加入50μl 6.5mmol/L HHL, 在37℃恒温水浴中保温30min, 然后加入85μl 1N HCl中止反应, 用毛细管电泳自动进样分析。电泳缓冲液, 50mmol/L pH8.3的硼酸缓冲液, 毛细管柱, 熔融石英毛细管柱(75μm i.d × 25cm), 电泳条件: 温度25℃, 进样压力0.5psi, 进样时间3s, 分离电压20kV, 检测波长228nm。麦胚水解物对ACE的抑制率用下式表示:

$$R = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

式中, R: 小麦胚芽蛋白水解物对ACE的抑制率; A: 对照组的马尿酸峰值; B: 添加小麦胚芽蛋白水解物的马尿酸峰值。IC₅₀定义为抑制50%ACE活性所需抑制剂的浓度。

1.3.3 SephadexG-15纯化ACE抑制肽

吸取上述水解液5ml上SephadexG-15柱(1.6 × 100cm)纯化, 用0.1NpH7.0的磷酸缓冲液洗脱, 洗脱速度30ml/h, 在220nm下检测。洗脱组分分管收集, 每管4ml, 分别测定每管的ACE抑制活性。

1.3.4 制备型RP-HPLC分离ACE抑制肽

SephadexG-15纯化的高活性组分用RP-HPLC分离。分离在Zorbax反相柱(9.2 × 250mm)上进行, 流动相A为60%乙腈(含0.1%TFA), B为H₂O(含0.1%TFA), 洗脱采用梯度洗脱, 洗脱条件为0~9min, 10%A, 9~60min, 10%~100%A, 60~65min, 100%A-0, 流速为2ml/min, 检测波长为220nm。分管收集单个组分, 测每个组分的活性。

1.3.5 分析型RP-HPLC分离ACE抑制肽

将制备RP-HPLC分离得到高活性组分, 用分析柱(4.6 × 150mm)分离, 流动相为30%乙腈, 流速为0.5ml/min, 检测波长为220nm。

1.3.6 高效毛细管电泳鉴定活性组分纯度

将制备柱分离后的高活性组分用HPCE分离以确定其是否为单组分。电泳条件: 电泳缓冲液50mmol/L pH7.0的磷酸缓冲液温度25℃, 进样时间3s, 分离电压20kV。

1.3.7 氨基酸成分分析

向高活性组分中加入6mol/L的HCl溶液, 真空封口, 在110℃下水解24h, 冷却后定容、过滤、柱前衍生后上agilent 1100液相色谱仪分析。

1.3.8 电喷雾质谱测定肽序列

质谱离子方式为ESI⁺, 毛细管电压为4.03kV, 锥孔电压为23V, 离子源温度120℃, 脱溶剂气温度200℃, 质量范围: 150~600m/z, 光电倍增器电压650V, 真空度2.6e-5mBar, 氮气流速4.2L/h。

2 实验结果

2.1 SephadexG-15纯化ACE抑制肽

SephadexG-15纯化ACE抑制肽示于图1。其中A、B、C、D、E、F6管具有高的ACE抑制活性, 将A、B、C、D、E、F合并用旋转蒸发器浓缩后上RP-HPLC进一步分离。

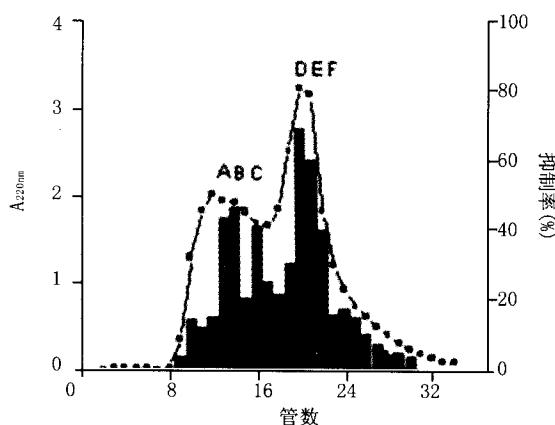


图1 SephadexG-15纯化ACE抑制肽

2.2 RP-HPLC 分离 ACE 抑制肽

制备 RP-HPLC 分离 ACE 抑制肽于图 2。将 SephadexG-15 纯化后的高活性组分用制备 RP-HPLC 分离,经活性测定,X 组分具有最强的抑制 ACE 活性,IC₅₀ 为 5.46 μmol/L。重复进样,合并每次收集液,并经旋转蒸发器浓缩后,用制备 RP-HPLC 再分离一次后用分析柱(4.6 × 150mm)分离,分析型 RP-HPLC 图如图 4 所示,为一单峰,X 组分经 HPCE 分离后也为单峰如图 5 所示,因此可确定其为单一组分。

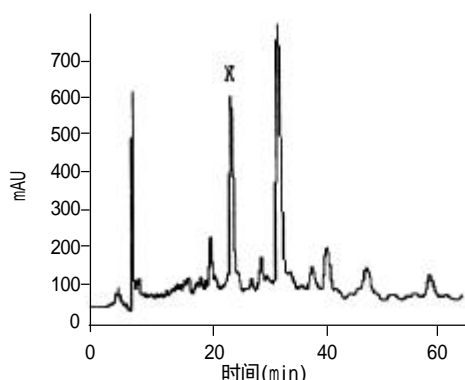


图2 RP-HPLC分离ACEI肽

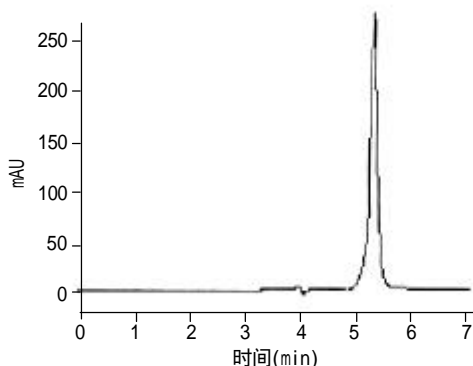


图3 X的RP-HPLC图

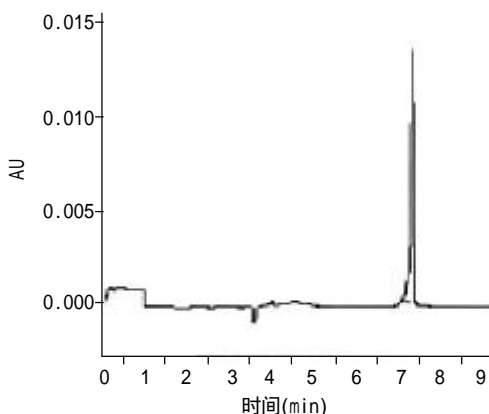


图4 X的HPCE图

表1 X的氨基酸组成

氨基酸	以Met为基准的相对摩尔比
Ala	1.12
Tyr	1.08
Met	1.01

2.3 X的氨基酸组成

X 的氨基酸组成示于表 1。由表 1 可知, X 的氨基酸组成为 Ala, Met 和 Tyr, 所以 X 是由这三种氨基酸组成的三肽。

2.4 电喷雾质谱测定 X 的序列

多肽、蛋白质、DNA 片段等生物分子的序列分析,传统的方法是用氨基酸顺仪或埃德曼降解方法,但这些方法样品用量多、耗时、样品纯度要求高等不足之处。近年来,虽着 FAB、ESI、MALDI 等软电离方法的诞生,使得质谱在生物领域的应用很快得到发展。研究发现,肽的断裂遵循一定的规律,因而从质谱碎片中能得到的肽序列信息^[4,5]。肽的断裂规律如图 5 所示。N 端碎片离子用 a、b、c 表示,C 端碎片用 x、y、z 表示,数字下标注明碎片离子在哪个氨基酸残基处产生,从 N 端到 C 端形成 a、b、c 碎片,从 C 端到 N 端形成 x、y、z 离子。在肽的质谱中,最易出现的碎片离子是 y 离子和 b 离子。

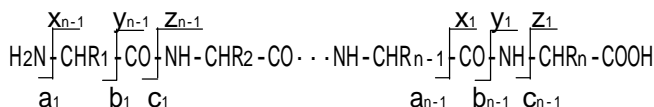


图5 肽碎片离子的命名

由 X 的三种氨基酸组成可知肽序列有 6 种可能组合,理论上,这 6 种肽的序列及其在质谱中可能出现的 y 离子和 b 离子示于表 2。对于三肽只要找出两个 y 离子,即可确定三肽的序列。

表2 X的可能序列及在质谱中可能出现的y离子和b离子

肽序列	y ₁	y ₂	b ₁	b ₂
Ala-Met-Tyr	182	313	72	203
Ala-Tyr-Met	313	150	72	235
Tyr-Met-Ala	221	90	164	295
Tyr-Ala-Met	221	150	164	235
Met-Ala-Tyr	253	182	132	203
Met-Tyr-Ala	253	90	132	295

X 的电喷雾质谱示于图 6。从图 7 可知,只有 Ala-Met-Tyr 序列中 y 离子(y₁=182.4, y₂=313.4)在质谱图中出现。故 X 的序列为 Ala-Met-Tyr, 经谱库检索确定 X 的序列也为 Ala-Met-Tyr。

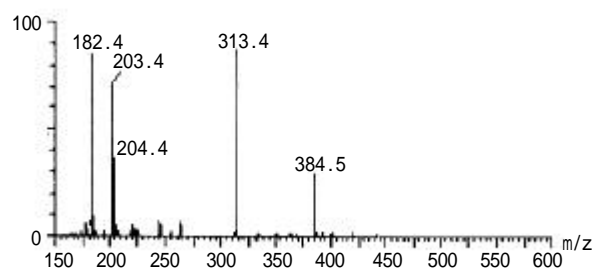


图6 X的电喷雾质谱图

X各峰的解释见表3。由于溶剂中微量的钠离子存在,在高灵敏度的质谱中就能检出,所以质谱峰中也出现了 $(M+Na)^+204.4$ 。

表3 X样的质谱峰解释

正离子峰	解释
182.4	y_1, Tyr^+
203.4	b_2
204.4	y_1+Na^+
313.4	y_2
384.5	分子离子峰 $(M+H)^+$

在对肽结构与ACE抑制活性关系的研究中, Cheung等人^[6]研究表明N末端为Val、Ile、Ala等疏水性氨基酸, C末端为Tyr、Trp、Pro则有较强的抑制作用。从小麦胚芽蛋白中分离的ACE抑制肽N端为Ala, C端为Tyr, 与Cheung等人的研究结果一致。目前从许多食品蛋白质提取的ACE抑制肽也具有这种结构特点^{[1][3,4]}, 这类肽不仅在体外具有很强的ACE抑制作用, 在体内也有明显的降血压作用。这说明从小麦胚芽蛋白中提取的ACE抑制肽可能成为一种生理功能食品。

3 结 论

3.1 用碱性蛋白酶水解小麦胚芽蛋白得水解物有较强的ACE抑活性, IC_{50} 为0.014mg/ml。

3.2 将小麦胚芽蛋白水解物经SephadexG-15纯化、RP-HPLC制备得一ACE抑制活性较强的单一组分X, IC_{50} 为5.46 μ mol/L。

3.3 X经氨基酸分析、电喷雾质谱确定其序列为Ala-Met-Tyr。

参考文献:

- [1] Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T et al. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate[J]. Agric Biol Chem, 1991, 55(5):1313-1318.
- [2] Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N et al. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases[J]. Biofactors, 2000, 12(1-4):143-146.
- [3] Bin-Wha Chang et al. Assays for angiotensin converting enzyme inhibitory activity[J]. Analytical Biochemistry, 2001, 291:84-88.
- [4] Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure[J]. Biomed Environ Mass Spectrom, 1988, 16:99-111.
- [5] Bruins A P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. J Chromatogr, 1998, 794:345-357.
- [6] Cheung H S, Wang F L, Ondetti M A et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. J Biol Chem, 1980, 255:401-407.

水提山茱萸多糖的理化性质及抗氧化活性研究

李 平, 王艳辉, 马润宇

(北京化工大学可控化学反应科学与技术基础教育部重点实验室, 北京 100029)

摘 要: 山茱萸经热水抽提、Sevag法脱蛋白、乙醇沉淀、DEAE-纤维素柱层析分离, 再通过Sephadex G-200柱层析进一步纯化, 得到白色粉末状多糖PFCAⅢ。对该多糖进行完全酸水解、薄层层析、红外光谱分析, 结果证明此多糖由鼠李糖、阿拉伯糖和葡萄糖以13.74:50.54:35.72的摩尔比组成, 平均分子量为 1.74×10^4 。该多糖可以有效抑制猪油和芝麻油的氧化, 并对邻苯三酚自氧化系统产生的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)具有一定的清除能力。用Fenton反应测定PFCAⅢ对羟基自由基($\cdot OH$)的清除作用, 对 $\cdot OH$ 的清除率达50%所需浓度(EC_{50})为430 μ g/ml。

收稿日期: 2002-11-28

作者简介: 李平(1973-), 女, 博士研究生, 研究方向为生化分离工程, 天然产物有效成分提取及分离。