

# 甘薯和花生胰蛋白酶抑制剂的初步研究

田 军<sup>1,3</sup>, 苏昌茂<sup>2</sup>, 周先碗<sup>2</sup>

(1. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 2. 北京大学 生命科学学院, 北京 100871; 3. 高等教育出版社, 北京 100029)

**摘要:** 许多植物蛋白制成品均含有抑制动物消化的蛋白酶抑制剂。目前已从某些豆类及蔬菜种子中分离出多种对胰蛋白酶具有抑制作用的活性物质。该实验以花生、甘薯等为原料, 通过 DEAE-Sepharose 4B FF 阴离子交换柱层析分离胰蛋白酶抑制剂, 以 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE)为底物测定其对胰蛋白酶的抑制活性; 将具有抑制活性的组分通过 SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量(Mr); 以聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质等电点(pI)。结果显示, 甘薯中至少有 4 种胰蛋白酶抑制剂组分, 相对分子质量为 20~25 kD、等电点在 pH5.0~6.6 之间; 花生中至少有三种胰蛋白酶抑制剂组分, 相对分子质量为 30~70 kD、等电点在 pH5.0~5.8 之间。

**关键词:** 胰蛋白酶抑制剂; 等电聚焦电泳; 底物

**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)01-0070-04

## Preliminary study on the trypsin inhibitors in the sweet potato and peanut

TIAN Jun<sup>1,3</sup>, SU Chang-Mao<sup>2</sup>, ZHOU Xian-Wan<sup>2</sup>

(1. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 2. School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; 3. Higher Education Press, Beijing 100029, China)

**Abstract:** The protease inhibitor inhibiting animal digestion exists in many plant products. Now, trypsin inhibitors have been isolated and purified from the beans and vegetable seeds. In this work, trypsin inhibitors were extracted and purified from peanut and sweet potato by DEAE-Sepharose 4B FF column. Then the inhibition activities of the trypsin inhibitors were determined using the BAEE as substrates. The relative molecular weight(Mr) and isoelectric point (pI) of trypsin inhibitors were determined by the SDS-PAGE and isoelectric focusing electrophoresis respectively. The results showed that there were at least four components of the trypsin inhibitors in the sweet potatoes. Mr was about 20-25 kD, pI was between 5.0-6.6 and there were at least three components of trypsin inhibitors in the peanuts, Mr was about 30-70kD, pI was between 5.0-5.8.

**Key words:** trypsin inhibitor; isoelectric focusing electrophoresis; substrate

胰蛋白酶抑制剂是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 胰蛋白酶抑制剂在工业和医学上有用途很广, 因此开展对胰蛋白酶抑制剂的研究具有一定的实际意义和应用前景(Gumbmann 等, 1986; Troll 等, 1987; Malkowicz 等, 2003; 万善霞等, 2003)。据文献报道, 在花生中有一种称之为 2S 蛋白组分, 对胰蛋白酶具有抑制作用, 此外, 还对  $\alpha$ -淀粉酶有一定的抑

制作用, 但对胰凝乳蛋白酶和胃蛋白酶无抑制作用。该蛋白可能是以二聚体形式存在, 氨基酸分析发现它富含 Cys, 属于 Bowman-Birk 胰蛋白酶抑制剂类(BBI)。花生蛋白是目前广泛利用的植物蛋白, 为了避免在花生蛋白制品中残留的蛋白酶抑制剂对产品质量造成的影响, 可采用巯基还原剂在较低温度下钝化其抑制活性(Tixier, 1968; 杨晓泉等, 1998)。

收稿日期: 2008-04-29 修回日期: 2008-11-30

作者简介: 田军(1966-), 女, 北京市人, 在职硕士, 副编审, 生物化学与分子生物学专业, 主要从事生物学教材及专著的编辑工作, (E-mail)tianjun@hep.com.cn.

在甘薯贮藏过程中会产生一种对胰蛋白酶具有抑制作用的物质,性质与大豆胰蛋白酶抑制剂相似,称之为甘薯贮藏蛋白。研究表明它是一类多基因家族编码的蛋白,有两个亚基因家族,分别为 Sporamin A, Sporamin B。它们在氨基酸组成、多肽图谱和免疫特性上都非常相似。它们的氨基酸序列与大豆中 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂相似。大豆胰蛋白酶抑制剂具有一定抗癌作用,甘薯胰蛋白酶抑制剂是否有同样作用还有待进一步的研究(文一等,2003;程龙军等,2001)。

本实验以花生、甘薯为材料,通过 DEAE-Sepharose 4B FF 阴离子交换柱层析分离蛋白酶抑制剂。以 BAEE 为底物测定其对胰蛋白酶的抑制活性;通过 SDS-PAGE 测定蛋白相对分子质量和聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质的 pI。以此对花生和甘薯中存在的胰蛋白酶抑制剂的基本性质进行初步研究。

## 1 实验材料

### 1.1 仪器

紫外检测仪(LKB BROMMA 2138),紫外-可见分光光度计(He  $\lambda$  iso $\alpha$ , UNICAM),电泳仪(EPS600, Pharmacia),旋转蒸发仪(Svc100H, Savant),离心机(Beckman J-30I, Beckman),电子天平(Adventure AR5120, OHAUS Corp.)。

### 1.2 试剂及材料

阴离子交换层析介质:DEAE-Sepharose 4B Fast Flow(Pharmacia);丙烯酰胺(Merck),载体两性电解质(pH2.5-10.5, Pharmacia),N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(简称 BAEE, 国产),甘薯(sweet potato, Ipomoea batatas Lam.),花生(peanut, Arachis hypogaea L.)。

## 2 实验方法

### 2.1 胰蛋白酶抑制剂的提取与分离

2.1.1 甘薯胰蛋白酶抑制剂的提取与分离 (1)甘薯胰蛋白酶抑制剂粗提液的制备:甘薯,洗净去皮,取 196 g,切成条状,在 50 mmol/L pH7.5 Tris-乙酸缓冲液(含 1 mmol/L EDTA, 1% 抗坏血酸)中匀浆,以 8 000 r/min 离心 20 min,上清液再以 25 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。(2)DEAE-Sepha-

rose 4B FF 阴离子交换层析:取一支 10 cm $\times$ 2.5 cm 的层析柱,装入 40 mL DEAE-Sepharose 4B FF 层析介质。用 500 mL 1 mol/L NaCl $\sim$ 0.1 mol/L NaOH 溶液再生,50 mmol/L pH7.5 Tris-乙酸缓冲液平衡,紫外检测仪绘出基线稳定。然后取 200 mL 甘薯提取液上柱吸附,以同一缓冲液平衡至基线稳定。用 0 $\sim$ 0.5 mol/L NaCl 溶液线性梯度洗脱,收集洗脱峰。

2.1.2 花生胰蛋白酶抑制剂的提取与分离 (1)花生胰蛋白酶抑制剂粗提液的制备:50 g 花生仁洗净,50 mmol/L 乙酸溶液中浸泡过夜后去表皮,置于 25 mmol/L, pH8.0 Tris-HCl 缓冲液中匀浆,然后以 25 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。(2)DEAE-Sepharose 4B FF 阴离子交换层析分离方法与甘薯制备方法相同。

### 2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 5%(郝福英等,2004)。

### 2.3 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳

凝胶浓度为 7.5%,交联度 C=3%,两性电解质的浓度为 2.5%。阳极电极液:1 mol/L 磷酸;阴极电极液:0.5 mol/L NaOH(郝福英等,2004)。

### 2.4 胰蛋白酶抑制活性测定

以 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE)为底物,测定对胰蛋白酶的抑制活性。在 1.5 mL BAEE 底物缓冲液(0.05 mol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.05 mol/L pH8.0 Tris-HCl)中,加入胰蛋白酶 8  $\mu$ g 和蛋白酶抑制剂 10  $\mu$ g,混匀后,室温放置 2 min 以上,再加入 1.5 mL 2 mmol/L BAEE 底物混匀,立即在紫外分光光度计 253 nm 处测定吸光值,每 30 s 读取一个数据,以吸光值为纵坐标,时间为横坐标绘出活性曲线(郝福英等,2004)。

### 2.5 Folin-酚法测定蛋白酶抑制剂浓度

以牛血清蛋白为标准蛋白。

## 3 实验结果

### 3.1 甘薯胰蛋白酶抑制剂分离与活性测定结果

(1)将甘薯提取液通过 DEAE-Sepharose 4B FF 阴离子交换柱层析分离,获得 4 个洗脱峰。层析结果见图 1。(2)经 DEAE-Sepharose 4B FF 阴离子交换柱层析从甘薯提取液中分离的 4 个洗脱峰,选择其中含量较高的 3 个洗脱峰,分别测定其对胰蛋

白酶的抑制活性,测定结果见表1。

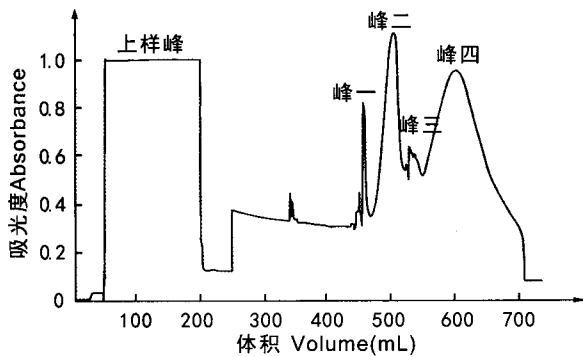


图1 甘薯提取液 DEAE-Sepharose 4B  
FF 阴离子交换柱层析分离图

Fig.1 DEAE-Sepharose 4B FF chromatographic separation profile of the sweet potato extracts  
平衡液:50 mmol/L pH7.5 Tris-乙酸缓冲液;洗脱液:  
A.50 mmol/L pH7.5 Tris-乙酸缓冲液 250 mL;B.0.5  
mol/L NaCl-50 mmol/L pH7.5 Tris-乙酸缓冲液。

表1 甘薯胰蛋白酶抑制剂的抑制活性测定结果

Table 1 The inhibition activity of every eluting peak

组分 Component	峰一 Peak 1	峰二 Peak 2	峰四 Peak 4
标准胰蛋白酶活性 Standard trypsin activity(u/min)	89.1	89.1	89.1
待测组分加入体积 Volume( $\mu$ L)	10	10	10
待测组分活性 Inhibition activity(u/min)	8.5	23.4	19.1
待测组分剂浓度 Density(mg/mL)	0.933	1.583	0.95
待测组分抑制比活 Specific inhibition activity(u/mg)	911.0	1478.2	2010.5

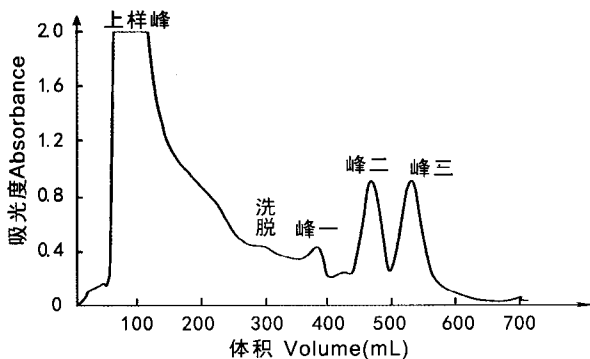


图2 花生蛋白 DEAE-Sepharose 4B  
FF 阴离子交换柱层析分离图

Fig.2 DEAE-Sepharose 4B FF chromatographic separation profile of the peanut extracts  
平衡液:50 mmol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液。洗脱液:A.50  
mmol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液,250 mL;B.0.5 mol/L  
NaCl-50 mmol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液,250 mL。

### 3.2 花生胰蛋白酶抑制剂分离与活性测定结果

(1)将花生提取液通过 DEAE-Sepharose 4B

FF 阴离子交换层析分离,获得 3 个洗脱峰,结果见图 2。(2)经 DEAE-Sepharose 4B FF 阴离子交换柱层析从花生提取液中分离的 3 个洗脱峰,分别测定其对胰蛋白酶的抑制活性,测定结果见表 2。

表2 花生胰蛋白酶抑制剂抑制活性测定结果

Table 2 The inhibition activity of every eluting peak

组分 Component	峰一 Peak 1	峰二 Peak 2	峰三 Peak 3
标准胰蛋白酶活性 Standard trypsin activity (u/min)	96.9	96.9	96.9
待测组分浓度 Density (mg/mL)	2.033	2.067	1.283
待测组分加入体积 Volume ( $\mu$ L)	10	10	10
抑制活性 Inhibition activity (u/min)	12.7	8.4	6.6
待测组分抑制比活 Specific inhibition activity (u/mg)	624.7	406.4	514.4

### 3.3 蛋白质相对分子质量测定

将对胰蛋白酶具有抑制活性的蛋白峰通过 SDS-PAGE 电泳分析,测定其相对分子质量。结果甘薯蛋白峰一、峰二、峰四的相对分子质量分别为 22.0、23.0、24.0 kD;花生蛋白峰一、峰二、峰三的相对分子质量分别为 70.0、50.0、30~50.0 kD(图 3)。

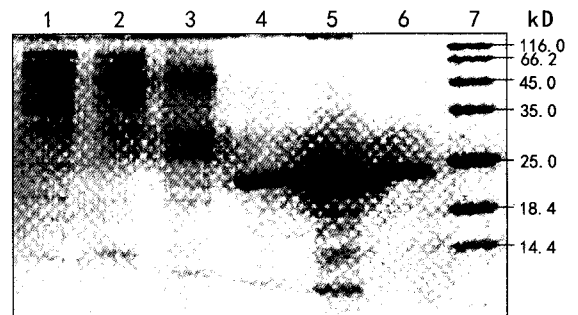


图3 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE

加样顺序自左向右:1,2,3,花生蛋白洗脱峰一、峰二、峰三;4,  
5,6,甘薯蛋白洗脱峰一、峰二、峰四;7,Marker(自上而下分别为  
116.0、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4、14.4 kD)。

### 3.4 蛋白质等电点测定

将对胰蛋白酶具有抑制活性的蛋白峰进行聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳分析,测定其等电点。结果是甘薯蛋白峰一、峰二、峰四的 pI 分别为 5.7、5.8、5.2;花生蛋白峰一、峰二、峰三的 pI 分别为 5.6、4.5、5.0(图 4)。

## 4 讨论

本实验选择甘薯和花生两种植物作为胰蛋白酶

抑制剂的研究对象,结果表明在甘薯和花生中均存在着胰蛋白酶抑制剂,但它们对胰蛋白酶的抑制活

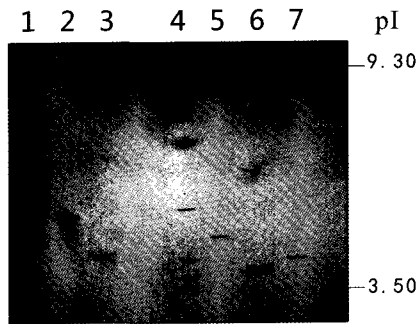


图 4 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳图

Fig. 4 Isoelectric focusing electrophoresis patterns

加样顺序自左向右分别是 1,2,3 甘薯蛋白峰一、峰二、峰四; 4. Marker(自上而下 pI 为 9.30, 8.65, 8.45, 8.15, 7.35, 6.55, 5.85, 5.20, 4.55, 3.50); 5,6,7 花生蛋白峰一、峰二、峰三。

性有较大的差异,甘薯胰蛋白酶抑制剂的抑制比活最高可达到 2 000 u/mg,而花生胰蛋白酶抑制剂的抑制比活只有 600 u/mg。从它们的相对分子质量和等电点来看也存在一定的差异,甘薯蛋白的相对分子质量与文献报道的相近;花生蛋白的相对分子质量与文献报道的平均值 17 KD 相差较大,这可能是所采用方法提取的抑制剂是大分子或是聚合物。这说明甘薯和花生中存在的胰蛋白酶抑制剂不具有同源性。不同来源的植物材料所存在的胰蛋白酶抑制剂不仅含量有差异,而且对胰蛋白酶的抑制活性、相对分子质量、等电点等性质上也存在着较大的差异。

#### 参考文献:

郝福英,周先碗,黄玉芝,等. 2004. 生命科学实验技术[M]. 北

京:北京大学出版社,95—106

Cheng LJ(程龙军),Guo DP(郭得平),Ge HJ(葛红娟). 2001. The special proteins in sweet potato tuber-sporamin(甘薯块根特异蛋白——Sporamin 的研究进展)[J]. *Chin Bull Bot(植物学通报)*,**18**(6):672—677

Gumbmann MR,Spangler WL,Dugan GM,*et al.* 1986. Safety of trypsin inhibitors in the diet; effects on the rat pancreas of long-term feeding of soy protein isolate[J]. *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods*,33

Malkowicz SB,Liu SP,Broderick GA,*et al.* 2003. Effect of the Bowman-Birk inhibitor(a soy protein)on in vitro bladder neck/urethral and penile corporal smooth muscle activity[J]. *NeuroUrology Urodyn*,**22**(1):54—57

Tixier R. 1968. Isolation from peanut seeds of an inhibitor of proteolytic enzyme[J]. *Compt Rend Acad Sci (Paris)*,**266**:2 498—2 500

Troll W,Frenkel K,Wiesner R,*et al.* 1987. Protease inhibitors: possible preventive agents of various types of cancer and their mechanisms of action[J]. *Prog Clin Biol Res*,**239**:297—315

Wan ShX(万善霞),Wang WW(王碗碗),Hua J(滑静),*et al.* 2003. Research status of trypsin inhibitor in different fields(胰蛋白酶抑制剂在不同领域的研究概况)[J]. *J Beijing Agric Coll(北京农学院学报)*,**18**(2):152—155

Wen Y(文一),Zhao GH(赵国华),Kan JQ(阚建全),*et al.* 2003. The special proteins in sweet potato tuber-sporamin(甘薯贮藏蛋白研究进展)[J]. *Cereals and Oils(粮食与油脂)*,**8**:24—26

Yang XQ(杨晓泉),Zhang ShH(张水华),Li Y(黎茵),*et al.* 1998. Separation, purification and characterization of 2S protein from peanut(*Arachis hypogaea*) seeds(花生 2S 蛋白的提取分离及部分性质研究)[J]. *J South China Univ Tech (Nat Sci)(华南理工大学学报·自然科学版)*,**26**(4):1—5

Yang XQ(杨晓泉)Fang WD,(文方德),Zhang ShH(张水华),*et al.* 1998. Purification and inactivation of trypsin inhibitor from peanut(*Arachis hypogaea*) seeds(花生胰蛋白酶抑制剂的纯化及钝化研究)[J]. *Acta Nut Sin(营养学报)*,**20**(3):337—341

(上接第 65 页 Continue from page 65)

表现性比较)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin(西北植物学报)*,**25**(10):2 030—2 034

Ma HX(马鸿翔),Sheng BC(盛炳成),Dai ZL(戴子林),*et al.* 1995. Study on Genetic variability of quantitative characters of strawberry cultivars(草莓数量性状遗传变异研究)[J]. *J Fruit Sci(果树科学)*,**12**(增刊):68—72

Neilson JA. 1968. New and important additions to the flora of the southwestern Yukon Territory [J]. *Canada Can Field Natur*,**82**:114—119

Pan BR(潘伯荣),Yi LK(尹林克),Wang Y(王烨). 1991. Introduction and contrast test on three kinds of grasses grown in desert[J]. *Arid Zone Research(干旱区研究)*,**2**:8—11

Romo JT,Redmann RE,Kowalenko BL,*et al.* 1995. Growth of

winterfat fowling defoliation in Northern Mixed Prairie of Saskatchewan[J]. *Range Manage*,**48**:240—245

Woodmansee RG,Potter LD. 1971. Natural reproduction of winterfat(*Eurotia lanata*)[J]. *Range Manage*,**24**:24—30

Yang QK(杨庆凯). 1975. analysis of genetic and environmental variability of the important agronomic characters in early generations of soybean crosses(大豆杂交材料主要农艺性状早代遗传变异的试验分析)[J]. *Acta Genet Sin(遗传学报)*,**2**:225—230

Yi J(易津),Wang XM(王学敏),Wuren QMG(乌仁其木格)*et al.* 2003. Advances in the study of biological characteristics of genus *ceratoides*(驼绒藜属植物生物学特性研究进展)[J]. *Acta Agr Sin(草地学报)*,**11**(2):88—89