

甘薯糖蛋白的分离、纯化和结构分析^{*}

李亚娜 林永成 余志刚

(中山大学 化学博士后流动站, 广东 广州 510275)

摘 要: 采用二乙基氨基乙基 52 和葡聚糖凝胶 G100 柱层析法, 从甘薯中分离纯化甘薯糖蛋白, 并对其进行结构分析. 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检验纯度和分子量; 根据 β -消除反应判断糖肽键的连接方式; 利用气相色谱法分析单糖组成; 通过红外光谱推断糖苷键类型. 研究表明, 甘薯糖蛋白是以共价键连接而成的结合蛋白, 呈白色粉末状, 易溶于水, 分子量约为 62ku, 属 O-连接方式, 含有 β -糖苷键和典型酰胺羰基结构, 蛋白质含量为 12.01%, 糖链部分含有岩藻糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖.

关键词: 甘薯糖蛋白; 分离; 纯化; 结构分析

中图分类号: Q282.7 文献标识码: A

糖蛋白(Glycoprotein)是一类由糖类同多肽或蛋白质以共价键连接而形成的结合蛋白^[1]. 其结合方式主要有两种: (1) 糖和含羟基的氨基酸以糖苷形式结合, 称为 O-连接; (2) 糖和天冬酰胺基连接, 称为 N-连接. 在生物体内糖蛋白以不同的形式存在而发挥作用, 是细胞膜、细胞间基质、血浆、粘液、激素等的重要构成成分^[2]. 日本营养学家最近发现甘薯中含有一种独特的粘蛋白, 具有抑制胆固醇在体内沉积、增强机体免疫力、减少高血压发生率、减慢人体器官老化速度等特殊生理功能^[3,4]. 近年来巴西的科学家也指出, 甘薯具有防治糖尿病、白血病等多种疾病的作用^[5]. 甘薯是我国四大粮食作物之一, 也是食品工业、轻工业和饲料工业的重要原料, 其中含有的甘薯糖蛋白(SPG)大量存在于甘薯淀粉生产的废水之中, 若采用适当的手段将其分离提取, 将产生显著的经济效益和社会效益.

1 试验材料

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2003-10-21

^{*}基金项目: 渝科委应用基础研究项目(第 28 号(196))

作者简介: 李亚娜(1975-), 女, 博士后, 主要从事天然产物方面的研究. E-mail: nayali@sohu.com

甘薯(Ipomoea batatas LAM): 品种“北京 2 号”, 西南农业大学实验农场; 透析袋: 美国 Sigma 公司, 分子截量 1000u; 二乙基氨基乙基 52(DEAE-52 纤维素): Whatman 公司; 葡聚糖凝胶(Sephadex) G100: 瑞典 Pharmacia 公司; 硼氢化钠: 美国 Sigma 公司; 其它试剂均为化学纯或分析纯.

1.2 主要仪器与设备

LKB 自动柱层析系统; Beckman 高速冷冻离心机; 岛津 UV-120 紫外可见分光光度计; 日立 835-50 型氨基酸自动分析仪; 岛津 IR-440 型傅立叶红外仪; GC-9A 型气相色谱仪; ZK-82A 真空干燥箱.

2 试验方法

2.1 SPG 的分离纯化

称取一定量的甘薯在 60℃ 下烘干并粉碎, 加适量水浸提 3 次, 水溶液部分经无水乙醇沉淀, 所得沉淀物用适量蒸馏水溶解后, 再用 Sevag 法(V(氯仿): V(正丁醇) = 4:1) 脱游离蛋白, 重复 3 次后, 取其水液层透析 4d. 收集透析内液, 离心(4500r/min) 30min, 取上清液, 真空干燥后即得甘薯糖蛋白粗品(淡黄色粉末). 粗品依次经 DEAE-纤维素 52 柱层析(1.6cm × 20cm); 0.05, 0.1, 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液阶段洗脱; Sephadex-G100 柱层析(1.6cm × 80cm), 0.02mol/L Tris-HCl (pH 7.2) 洗脱, 洗脱后经检测得

到一陡峭的大峰,收集此峰即得甘薯糖蛋白纯品(白色粉末)^[5].

2.2 甘薯糖蛋白的鉴定

2.2.1 SPG 的纯度鉴定及分子质量的测定

甘薯糖蛋白的粗品和纯品同时进行 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶质量分数为 15%,电极缓冲液为 pH = 8.3 的 1.5mol/L Tris-Gly-SDS 溶液,采用考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色液为 7% 的冰乙酸,上样量 50μg. 同时,采用小牛白蛋白、卵蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶原、β-乳球蛋白和溶菌酶作为分子质量标准. 溴酚蓝为指示剂,其迁移率为 1.0,以各蛋白质相对迁移率对分子质量对数作出标准曲线,根据甘薯糖蛋白纯品的相对迁移率可求得分子质量^[6~8].

2.2.2 糖含量的测定

采用苯酚 - 硫酸法,以葡萄糖为标准品^[9].

2.2.3 蛋白质含量的测定

采用 Folin - 酚法,以牛血清白蛋白为标准品^[9].

2.2.4 水分和灰分含量的测定

水分用烘干法测定,灰分用灼烧法测定^[9].

2.2.5 SPG 的氨基酸组成

日立 835-50 型氨基酸自动分析仪.

2.2.6 SPG 的单糖组成分析

取 SPG 10mg 置于安瓿管中,分别加入 2mL 2mol/L 三氟醋酸 (CF_3COOH),封管,置于烘箱中 120℃ 水解 2h,冷至室温,用玻璃棉滤去残渣,用少量水洗残渣 2 次,合并滤液,减压蒸干以除去残存的 CF_3COOH . 取水解物少许在真空干燥箱中 70℃ 减压干燥过夜. 分别加入约 10mg 盐酸羟胺及 1mL 无水吡啶,温热溶解后在 90℃ 反应 30min,冷至室温,加入 1mL 无水醋酸酐,在 90℃ 下继续反应 30min,冷至室温,加入 1mL H_2O 搅拌,再用氯仿萃取 3 次,每次 1mL,合并氯仿层,减压抽干. 置真空干燥箱减压干燥 24h. 同样方法制备各种标准单糖的糖腈乙酸酯衍生物,分别进行气相色谱分析^[10].

3 结果与讨论

3.1 SPG 的一般性质

提纯后的 SPG 呈白色粉末状,易溶于水,不溶于乙醇、丙酮、正丁醇等有机溶剂,蛋白质的含量为 12.01%. 当其溶液质量浓度为 1.02g/mL 时,特性粘度为 2.95mPa·s, $\text{pH} \approx 5.6$,比旋度 $[\alpha]_D^{25} = +46^\circ (\text{C} =$

0.29, H_2O),紫外吸收峰为 280nm.

3.2 DEAE - 52 纤维素柱层析纯化 SPG

从图 1 可知,在 DEAE - 52 纤维素层析柱上,SPG 粗品经 0.05, 0.1, 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液阶段洗脱后,可得到 1 个主峰. 其中 490nm 多糖吸收峰和 280nm 蛋白吸收峰出现的时间一致,表明具有糖蛋白的特征,收集此主峰部分进行透析干燥,可得到白色粉末状的甘薯糖蛋白.

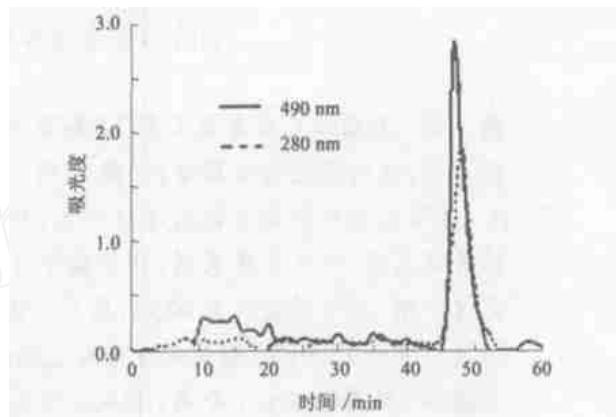


图 1 SPG 在 DEAE - 52 纤维素层析柱上的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curves of SPG on DEAE-52 cellulose column

3.3 Sephadex G100 纯化 SPG

将 DEAE - 52 纤维素柱层析纯化后的甘薯糖蛋白,进一步经 Sephadex G100 柱层析. 从图 2 洗脱曲线可知,得到的两个分离主峰中,峰 II 峰值高,峰宽小,分离度好. 因此,将所得的峰 II 组分合并,透析后干燥即得到甘薯糖蛋白纯品(白色粉末).

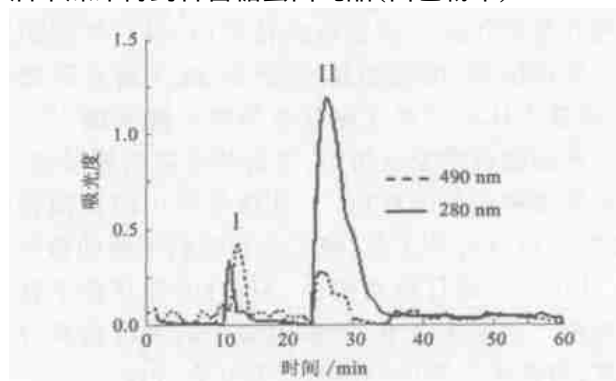


图 2 SPG 在 Sephadex G100 层析柱上的洗脱曲线

Fig. 2 Elution curves of SPG on Sephadex G100 column

3.4 SPG 分子质量的凝胶电泳测定

由图 3 可见,SPG 纯品经 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,只有一条染色带,表明 SPG 纯品已经得到纯化,其纯度可供生物和理化性质研究用. 此外,根据 SPG 纯品的相对迁移率,可求得分子质量,约为 62ku.

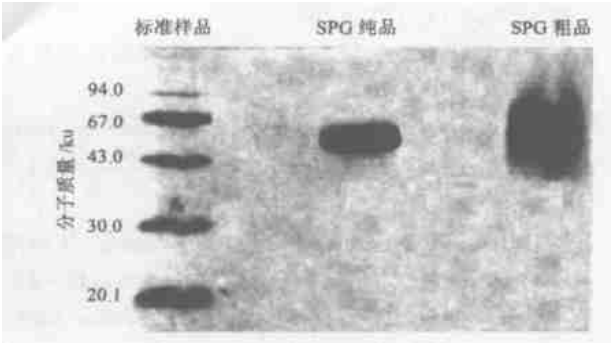


图 3 SPG 的 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳图
Fig. 3 The SDS-PAGE photograph of SPG

3.5 SPG 的氨基酸组成分析

将 SPG 在 0.1mol/L 氢氧化钠 + 1.0mol/L 硼氢化钠溶液中 β -消除反应前后分别经盐酸充分水解后,由氨基酸自动分析仪测定其组分,比较各氨基酸相对含量及其变化,以判断糖蛋白中糖肽键的连接方式,结果如表 1 所示.

表 1 SPG 经 β -消除反应前后的氨基酸成分比较
Table 1 Comparison of amino acid composition of SPG before and after β -eliminate reaction mg/ g

氨基酸	β -消除 反应前	β -消除 反应后	氨基酸	β -消除 反应前	β -消除 反应后
天冬氨酸	13.64	13.28	蛋氨酸	1.23	1.38
苏氨酸	8.15	7.93	亮氨酸	7.80	7.38
丝氨酸	8.60	5.92	酪氨酸	3.61	3.35
谷氨酸	13.59	13.33	苯丙氨酸	3.21	3.38
脯氨酸	7.49	6.87	组氨酸	2.36	2.97
甘氨酸	6.96	6.65	赖氨酸	6.39	6.82
丙氨酸	5.44	6.84	精氨酸	5.64	5.83
缬氨酸	6.03	6.19	羟脯氨酸	12.13	12.30
异亮氨酸	3.97	4.06	胱氨酸	0.49	0.58

从表 1 可以清楚地知道,SPG 经 β -消除反应前后氨基酸含量发生了变化,总氨基酸含量(质量分数,下同)由 11.67% 下降为 11.13%. 每克 SPG 中,丝氨酸含量由 8.60mg 下降为 5.92mg,而丙氨酸含量由 5.44mg 上升为 6.84mg. 这种变化表明,糖蛋白中存在糖—O—丝氨酸的连接方式. 因为与羟基氨基酸连接的 O—糖苷键,在温和的碱性条件下,很容易被 β -消除反应解离,丝氨酸转化为 2-氨基丙烯酸,同时糖链被释放. 当有硼氢化钠存在时进行碱处理,2-氨基丙烯酸转化为 dl-丙氨酸的消旋混合物.

3.6 SPG 的单糖组成分析

气相色谱条件:OV-225 玻璃毛细管柱(0.29mm $\times$ 25m);柱温 235 ; N_2 为载气,流速46mL/ min.

通过比较图 4(a)、(b)可知,SPG 中的单糖成分包括:岩藻糖(1)、阿拉伯糖(2)、甘露糖(3)、葡萄糖(4)、半乳糖(5),此外还有痕量的鼠李糖和木糖.

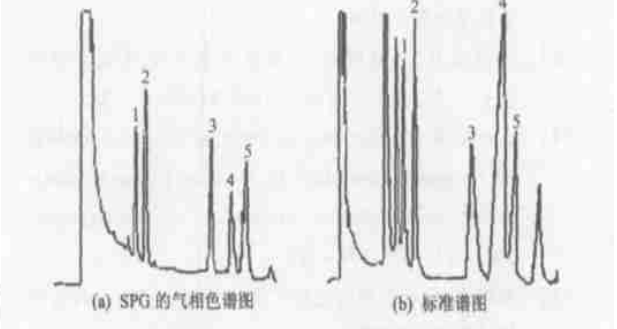


图 4 糖腈乙酸酯衍生物的气相色谱图
Fig. 4 GLC patterns of alditol acetate derivatives of carbohydrates

3.7 SPG 的红外(IR)光谱

从图 5 可知,SPG 的特征吸收峰分别为:3367 ($-\text{OH}$), 2927, 2958 ($-\text{N}-\text{H}$), 1654, 1544, 1459 ($-\text{C}-\text{C}-$), 1083 ($-\text{C}-\text{O}-$), 845, 692 ($-\text{C}=\text{C}-\text{H}$) cm^{-1} . 其中:1654, 1544 cm^{-1} 为肽链上酰胺羰基的吸收峰;3367 ($-\text{OH}$), 1083 ($-\text{C}-\text{O}-$) cm^{-1} 是多糖分子的特征吸收峰;845 cm^{-1} 附近的振动吸收表明 SPG 中含有 β -糖苷键,由1083 cm^{-1} 附近的吸收峰可推知 SPG 的糖苷类型主要为吡喃型.

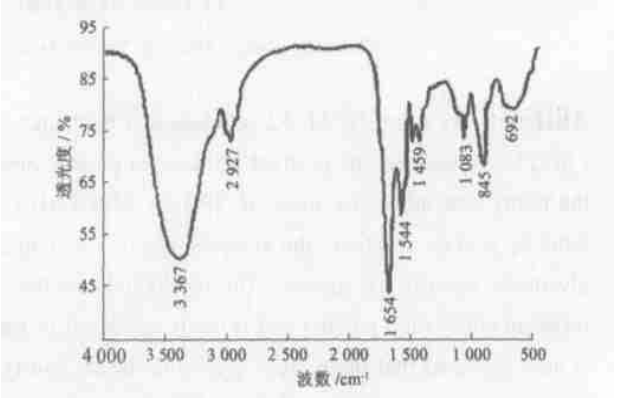


图 5 SPG 的红外光谱
Fig. 5 IR spectra of SPG

4 结论

本研究结果表明,SPG 分子质量约为 62ku,属 O-连接方式. 经红外光谱分析,发现 SPG 含有 β -糖苷键和典型酰胺羰基结构. 成分分析发现 SPG 中蛋

白质的含量为 12.01%,糖链部分主要单糖有岩藻糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖。

参考文献:

- [1] 孙册,莫汉庆.糖蛋白与蛋白聚糖结构、功能和代谢[M].北京:科学出版社,1998.
- [2] 孙志贤.现代生物化学理论与研究技术[M].北京:军事医学出版社,1995.
- [3] 怡谷章夫,上野川修一.食品由采の免疫賦活物质[J].バイオサにゲストリ,1993,51(9):30-33.
- [4] Cambie R C, Ferguson L R. Potential functional foods in the traditional Maori diet [J]. Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2003, 523 - 524:109 - 117.
- [5] 张维杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987.
- [6] 田庚元,王晨,冯宇澄.枸杞子糖蛋白分离纯化、物化性质及糖肽键特征[J].生物化学与生物物理学报,1995,27(2):201-206.
Tian Geng-yuan, Wang Chen, Feng Yu-cheng. Isolation, purification and properties of LbGP and characterization of its glycan-peptide bond [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 1995, 27(2):201-206.
- [7] 王翎.虫花菌胞外糖蛋白的分离、纯化及其性质研究[J].真菌学报,1996,15(1):48-52.
Wang Ling. Research of isolation, purification and property on *Conghua Fungus* extracellular glycoprotein [J]. Mycosystema, 1996, 15(1):48-52.
- [8] 张翼伸.有关糖复合物的分级纯化、结构确定、生物活性的几个问题[J].生命的化学,1994,14(6):42-43.
Zhang Yi-shen. Several problems about gradation purification, structural identification and biological activity of saccharide complexes [J]. Chemistry of Life, 1994, 14(6):42-43.
- [9] 胡明方,王光慈.食品分析[M].重庆:西南师范大学出版社,1992.
- [10] 李志孝,黄成钢,陈谦,等.天门冬半乳葡聚糖的化学结构及其抑瘤活性的研究[J].兰州大学学报(自然科学版),2000,36(5):77-81.
Li Zhi-xiao, Huang Cheng-gang, Chen Qian, et al. Studies on chemical Constitution and antitumor activity of galactoglucan from *Asparagus cochinchinensis* [J]. Journal of Lanzhou University (Natural Sciences), 2000, 36(5):77-81.

Isolation, Purification and Structure Analysis of Sweet Potato Glycoprotein

Li Ya-na Lin Yong-cheng She Zhi-gang

(Chemistry Postdoctor, Sun Yat-sen Univ., Guangzhou 510275, Guangdong, China)

Abstract: By using DEAE-52 cellulose and Sephadex G100 column chromatography, sweet potato glycoprotein (SPG) was isolated and purified from sweet potato, and its structure was analyzed including the determination of the purity and molecular mass of SPG by SDS-PAGE, the identification of the linkage mode of glycopeptide bond by β -erase reaction, the analysis of monose composition by GLC, and the deduction of the linkage type of glycosidic bond by IR spectra. The results indicate that SPG is a kind of conjugated protein with covalent bond, takes on white solid powder and is easily dissolved in water, with a molecular mass of 62ku and an O-linkage. It is also indicated that there are β -glycosidic bonds and typical amido-carbonyl groups in SPG containing 12.01% protein (mass fraction), and that SPG saccharide chain is composed of fucose, arabinose, mannose, glucose and galactose.

Key words: sweet potato glycoprotein; isolation; purification; structure analysis