

# 豆薯种子一种功能蛋白分离与光学性质初步研究

贾婕 田椿丽 杨柳 马晓聪 刘超\*

乐山师范学院应用生物技术创新研究中心, 中国·四川 乐山 614004

**摘要:**目的: 为探究豆薯 (*Pachyrhizus erosus*) 种子功能蛋白。方法: 以乐山产的豆薯种子为材料。通过生理盐水提取、盐析、阴离子交换层析对功能蛋白纯化, 并用 SDS-PAGE 测定表观分子量, 同时初步探究了不同温度和 pH 值蛋白的光学性质。结果: 结果显示, 在豆薯种子中分离出一种 15.14kDa 功能蛋白, 该蛋白在 20°C~60°C 条件下, 其紫外吸收能力略微下降, 内源荧光强度逐步增强; 在 70°C~80°C 条件下紫外吸收增大, 内源荧光强度逐渐降低后保持不变; 在 pH3.2、3.8、4.4、8.0、8.6 时, 副峰荧光强度增加, 副峰红移至 365nm 附近。结论: 结果表明豆薯种子中 15.14kDa 功能蛋白的色氨酸等生色基团残基主要分布在分子表面的亲水微环境。

**关键词:** 豆薯种子; 蛋白质; 分离纯化; 紫外光谱; 荧光光谱

## Preliminary Study on Separation and Optical Properties of the Functional Protein from *Pachyrhizus Erosus* Seeds

Jie Jia Chunli Tian Liu Yang Xiaocong Ma Chao Liu\*

Applied Biotechnology Innovation Research Center, Leshan normal university, Leshan, Sichuan, 614004, China

**Abstract: Objective:** To investigate the functional proteins of *Pachyrhizus erosus* seeds. **Methods:** Using sweet potato seeds produced in Leshan as materials. Functional proteins were purified by physiological saline extraction, salting out, and anion exchange chromatography. The apparent molecular weight was determined by SDS-PAGE, and the optical properties of proteins at different temperatures and pH values were preliminarily investigated. **Result:** The results showed that a 15.14kDa functional protein was isolated from sweet potato seeds. Under the conditions of 20 °C~60 °C, the UV absorption ability of this protein slightly decreased, and the endogenous fluorescence intensity gradually increased; Under the conditions of 70 °C~80 °C, the UV absorption increases while the intrinsic fluorescence intensity gradually decreases and remains unchanged; At pH 3.2, 3.8, 4.4, 8.0, and 8.6, the fluorescence intensity of the secondary peak increases and the secondary peak shifts to around 365nm. **Conclusion:** The results indicate that the tryptophan and other chromophore residues of the 15.14kDa functional protein in sweet potato seeds are mainly distributed in the hydrophilic microenvironment on the molecular surface.

**Keywords:** *pachyrhizus erosus*; protein; separation and purification; ultraviolet spectrum; fluorescence spectrum

## 0 前言

豆薯 (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urb.), 豆科蝶形花亚科豆薯属一年生草本卷曲藤蔓植物。目前, 从豆薯种子中分离出鱼藤酮类 9 个化合物<sup>[1]</sup>和 5 种蛋白<sup>[2]</sup>。豆薯种子含 25.2%~31.4% 蛋白质<sup>[3]</sup>, 主要为白蛋白占 52.1%~31%, 然后是球蛋白占 30.7%~27.5%, 有些蛋白具有抗病毒活性, 豆薯种子提取物具有白血病细胞毒性活性<sup>[4]</sup>。但对于豆薯种子中所含有蛋白质的研究仍然比较薄弱, 分离纯化的蛋白质基本性质和结构报道较少。本次研究拟对一些蛋白质的基本性质进一步研究, 并解析在不同物理因素影响下这种蛋白的构象变化, 为其深入研究和持续开发前景提供参考。

## 1 材料与设备

### 1.1 实验材料

豆薯种子: 购买自四川省乐山市种子分公司。

### 1.2 实验药品

硫酸铵等药品均为成都科隆化学品有限公司生产; DEAE-Sepharose ff 由上海源叶生物科技有限公司提供; SDS-PAGE 药品和缓冲液均由福州飞净生物公司提供; 蛋白 marker (14kDa-100kDa) 购自天根生化公司。

## 2 实验方法

### 2.1 蛋白质的分离与纯化

豆薯种子去种皮, 盐析后收集沉淀流水透析, 离心得到蛋白质粗品。蛋白质粗品用 pH 7.8 磷酸缓冲液在 AKTA pure 上进行离子交换层析, 用含 NaCl 的磷酸缓冲液梯度洗脱, 收集蛋白。

### 2.2 蛋白质纯度和相对分子量的测定

用 12% 分离胶和 5% 的浓缩胶以 14kDa~100kDa 的 Marker 进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色。依据蛋白质的相对分子量 MW 的对数与它的相对电泳迁移率 mR

有一定的线性关系式<sup>[7]</sup>进行相对分子质量的测定。

### 2.3 蛋白质紫外吸收和荧光光谱测定

200~400nm 紫外光谱扫描用普析 UV-1901 扫描。荧光光谱扫描以 290nm 为激发波长，在 280~400nm 范围内测定发射光谱。

将蛋白质样品分别置于 20℃~80℃ 范围内以 10℃ 梯度保温 15min 冷却后进行光谱扫描。

相同蛋白质样品分别用 pH (3.2、3.8、4.4、5.0、5.6、6.2、6.8、7.4、8.0、8.6) 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液下透析 12h，并分别进行光谱扫描。

## 3 实验结果与分析

### 3.1 蛋白质的分离纯化

将盐析蛋白粗品经过离子交换层析，用 0.6M NaCl 梯度洗脱后得到如图 1 洗脱曲线图，其中峰 4 为目标蛋白。

### 3.2 电泳测定蛋白质相对分子质量

将洗脱峰中不同蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳得到如

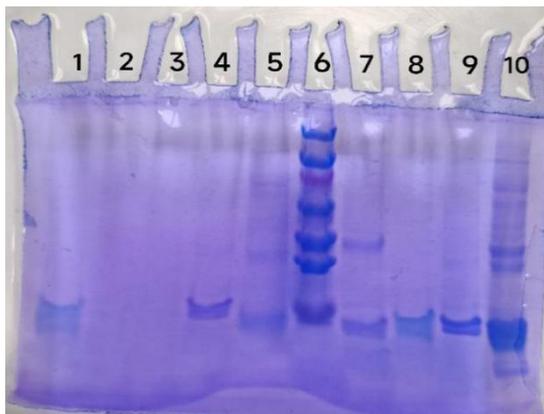


图 2 SDS-PAGE 电泳图和 Marker 的标准曲线 (9 道: 目标蛋白; 6 道: marker)

### 3.3 蛋白质紫外吸收光谱测定

目标蛋白在 274nm 最大吸收。不同温度下蛋白质紫外吸收光谱变化如图 3 (A) 所示。

从图 3 (A) 看出，蛋白的吸收光谱一定程度改变说明蛋白质构象发生变化。红薯种子 15.14kD 蛋白最大紫外吸收波长为 274nm。由于游离色氨酸的最大吸收波长为 280nm，酪氨酸最大吸收波长为 275nm，苯丙氨酸最大吸收波长为 257nm，因此推断红薯种子中的目标蛋白质色氨酸的含量数量很少或者没有，主要的生色氨基酸为酪氨酸。红薯种子中的此目标蛋白在温度从 20℃ 上升至 60℃ 过程中，在 280nm 附近吸光度呈略微下降的趋势。但在 70℃ 上升至 80℃ 过程中，在 274nm 处紫外吸收值明显升高，表明蛋白构象发生巨大变化，生色氨基酸微环境受到破坏，使生色氨基酸逐步暴露于极性环境中。随着温度升高，蛋白质构象改变，极性增强，充分表明该功能蛋白对 60℃ 温度具有较强的耐热性。

蛋白的紫外吸收光谱 (如图 3 (B)) 在 pH 为 6.8 降至 6.2 时其在 280nm 处吸光度变化不大。当 pH 降至 4.4 时，

图 2 (左)，第 9 道为纯的离子交换峰 4 目标蛋白。根据 marker 相对分子量绘制图 2 (右) 标准曲线和回归方程，计算目标分子量为 15.14kDa。

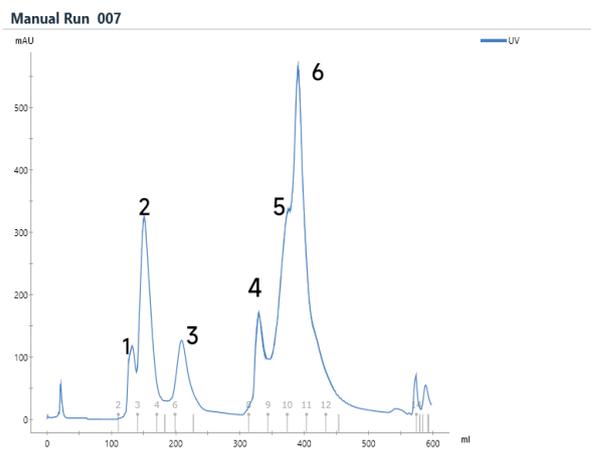
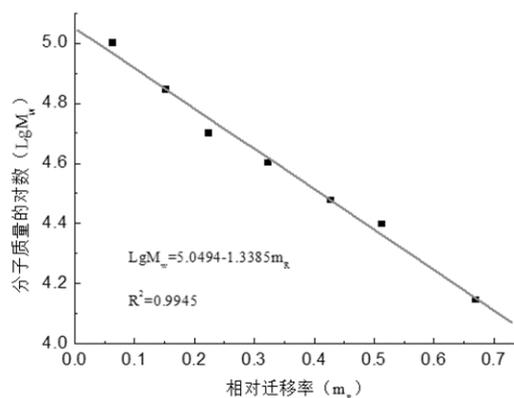


图 1 pH7.8PBS (含 0.6M NaCl) 阴离子交换梯度洗脱曲线图 (峰 4: 目标蛋白峰)



在 280nm 处蛋白质的紫外吸收值逐渐升高；对红薯蛋白质的紫外吸收影响最大的是 pH 为 3.8，pH 为 3.8 时发生蓝移，造成峰蓝移的可能原因氢键效应，即酪氨酸残基的酚羟基在酸性环境中电离受阻，酚氧原子中的孤对电子与芳环之间的激发态电荷转移会受到抑制。当 pH 为 3.8 时紫外吸收值明显增加，可能是溶液中的酸根离子中和了此蛋白质中的碱性电荷，导致空间构象发生改变，甚至可能发生酸水解，肽链延伸使其完全暴露在溶液中，使其吸光值增大。当 pH 降为 3.2 时，吸收峰发生了红移。原因可能是在强酸性环境中，H<sup>+</sup> 容易进攻肽键 C=O 中的氧原子，使其能量增加，发生蓝移，而 H<sup>+</sup> 会进入红薯蛋白质分子的空隙，破坏了分子内的氢键，使蛋白质的结构发生了变化，最终使吸收峰发生红移。当 pH 为 8.6 时，278nm 附近的峰发生红移，酪氨酸残基变得更加亲水，将其解离为谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸等亲水性残基<sup>[5]</sup>，峰形变宽。蛋白质吸收值下降，分析其原因可能是其结构更加紧密，肽键等其他吸收基团被屏蔽在一定构象之内，导致其吸收值减少。

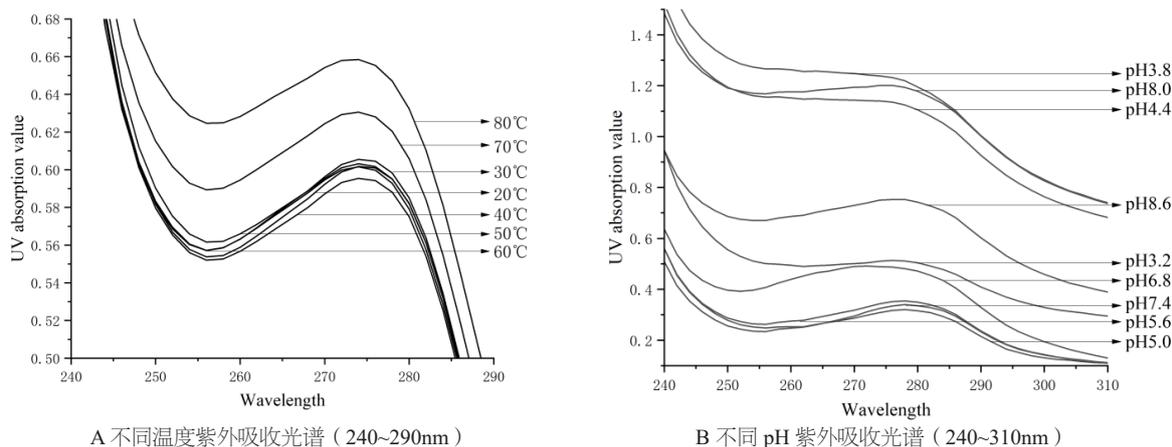


图 3 目标蛋白质紫外吸收光谱图

### 3.4 荧光发射光谱的测定

从蛋白荧光发射光谱 (如图 4) 在 290nm 强荧光发射峰肽键的典型荧光光谱; 在 326nm 荧光发射峰, 是蛋白质生色基团色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的典型荧光发射峰。

#### 3.4.1 蛋白质在不同温度下的荧光发射光谱图

目标蛋白在不同温度下的荧光发射光谱如图 4 (A) 所示。

由图 4 (A) 可知, 在 20°C 至 60°C 范围内, 随着温度的升高, 荧光强度逐渐升高; 在高温 70°C 至 80°C 条件下, 荧光强度并没有升高, 反而降低甚至降低到一定程度后保持不变。这一现象表明蛋白质在温度的作用下发生变性。蛋白质在 20°C 至 60°C 温度范围内荧光强度有所增加。主要原因是其蛋白质分子结构逐渐变的松散, 使其分子内部的荧光基团发生暴露或者肽链延伸, 或者其荧光基团的极性增强, 所以使其荧光强度增加<sup>[6]</sup>。当温度从 70°C 升高到 80°C 时, 蛋白质分子结构发生变化, 其构象变得更加紧密, 使大部分的荧光基团处于疏水环境, 此时蛋白质发生变性, 这也说明当温度升高到 80°C 时, 其活性中心可能已经受到了一定程度的破坏。

#### 3.4.2 蛋白质在不同 pH 下的荧光发射光谱图

目标蛋白在不同温度下的荧光发射光谱如图 4 (B)

所示。

由图 4 (B) 可以看出, 酪氨酸的荧光光谱最大发射波长一般位于 303nm, 而色氨酸荧光光谱对微环境的变化较为敏感, 则色氨酸的荧光光谱最大发射波长一般在 325~350nm 波动。该蛋白质中所含有的生色氨基酸主要为酪氨酸, 色氨酸含量很少。pH 值变化对蛋白质的荧光图谱也有较大影响。由图 4 (B) 可知, 该蛋白质在 290nm 处有最大荧光发射峰, 在 326nm 处有平缓副峰。当溶液 pH 从 3.2 至 8.6 时, 蛋白质的荧光光谱峰形状变化不大, 只是其荧光强度在不断下降。强酸碱性条件下荧光强度的下降主要是因为酸诱导蛋白质的延伸发展, 降低了芳香族氨基酸残基之间的能量传递, 从而引起荧光强度下降。当 pH 为 3.2、3.8、4.4、8.0、8.6 时, 副峰荧光强度增加, 副峰红移至 365nm 附近。当 pH 上升至 8.0 时, 该蛋白可能发生的反应为去质子化反应, 所携带的电荷为负电荷, 进一步影响到了蛋白质内部的静电作用和氢键, 因此结构发生了明显的变化。当副峰红移至 365nm 附近, 说明该蛋白质的生色氨基酸在分子内部与水的接触受到抑制, 这说明碱性环境下蛋白质的生色残基在蛋白质的表面亲水区域移动。

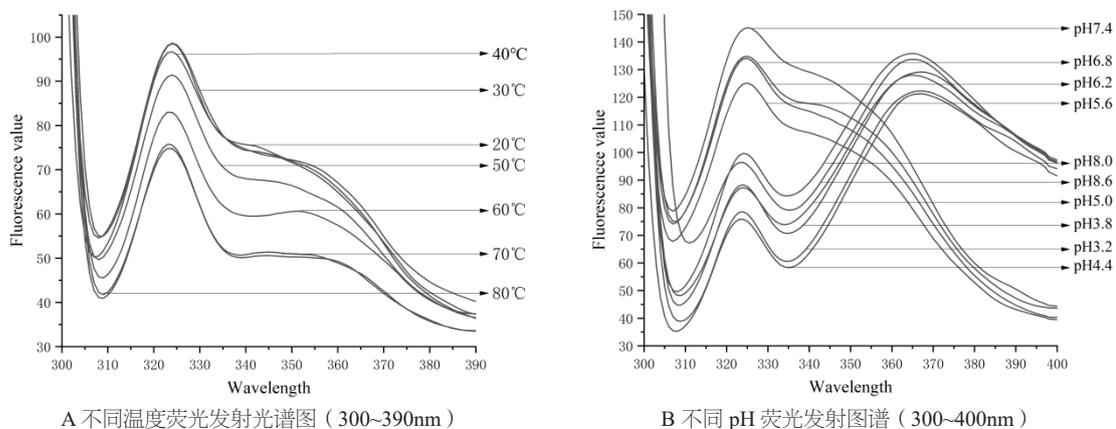


图 4 目标蛋白质的荧光发射光谱图

## 4 结论

通过对豆薯种子蛋白质进行粗提取、分离及纯化以及电泳测定其相对分子质量为 15.14kDa。蛋白质在温度从 20℃ 上升至 60℃ 过程中, 蛋白质吸光度略微下降, 荧光强度增加; 但在 70℃ 上升至 80℃ 过程中, 蛋白质在 280nm 处吸光度增大, 荧光强度降低后保持不变。由此可知随着温度的升高, 蛋白质的构象发生变化, 极性增强, 其芳香族氨基酸的残基暴露出来, 因此吸光值增大。在不同的 pH 作用下, 肽链延伸使其暴露在溶液中, 蛋白质结构松散, 所以其荧光强度增大。当 pH 从 3.2 至 8.6 时, 其荧光光谱峰的形状没有变化, 荧光强度下降。当 pH 为 3.2、3.8、4.4、8.0、8.6 时, 副峰荧光强度增加, 副峰红移至 365nm 附近, 说明蛋白质中的生色残基微环境改变, 导致蛋白质构象发生变化, 从而使生色氨基酸向蛋白质表面亲水域伸展。

### 参考文献:

- [1] 龚苏晓. 豆薯种子中的成分及其抗 HSV 活性的研究[J]. 国外医学(中医中药分册), 2003(4): 238.
- [2] 吴红京, 郝冰, 唐根源, 等. 高效凝胶过滤色谱法分离测定豆薯种子蛋白[J]. 色谱, 1997(2): 153-155.
- [3] E O Leidi, R Sarmiento D N Rodriguez-Navarro. Ahipa

(*Pachyrhizus ahipa* [Wedd] Parodi): an alternative legume crop for sustainable production of starch, oil and protein[J]. *Industrial Crops & Products*, 2003, 17(1): 27-37.

- [4] 蔡建华, 林玉娟, 叶晓明, 等. 豆薯种子中一种具有抗植物病毒活性的蛋白质的初步晶体学研究[J]. *结构化学*, 2001(2): 149-150.
- [5] 刘超, 汪淑芳, 杨瑶君, 等. 番茄凝集素荧光光谱学研究[J]. *安徽农业科学*, 2008(2): 401-403.
- [6] 李阳, 赵怡, 谢丽思, 等. 荧光光谱分析超氧化物歧化酶的构象变化及其功能[J]. *光谱实验室*, 2011, 28(6): 2763-2769.
- [7] 魏慧敏, 张年辉, 杜林方. 用蛋白内源荧光法考察盐溶液中两种外周蛋白构象的变化[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2003(5): 953-957.

作者简介: 贾婕(2002-), 女, 中国四川成都人, 本科, 从事功能蛋白分离与纯化研究。

通讯作者: 刘超, 教授、研究生导师, 从事植物功能蛋白结构与性质研究。

课题项目: 乐山师范学院重点项目(项目编号: LZD 011); 大学生创新创业训练国家级项目(项目编号: 202310649046)。