

文章编号: 1009-038X(1999)04-0033-05

酪蛋白磷酸肽的分离纯化及分子结构鉴定

冯凤琴¹, 王博诚², 倪莉³, 许时婴³, 王璋³

(1. 浙江大学食品科学系, 浙江杭州 310029; 2. 江苏省原子医学

研究所, 江苏无锡 214063; 3. 无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 将离子交换色谱、凝胶过滤色谱、高压液相色谱及毛细管色谱等分离纯化技术结合使用, 从酪蛋白磷酸肽(CPP)制品中分离出 3 个纯组分, 并对各组分的氨基酸组成和 N 末端 2~3 个氨基酸序列进行了分析测定, 从而确定了 3 个组分的结构, 它们分别是 $\alpha s1(61-79)$ 、 $\alpha s1(43-79)$ 和 $\beta(7-24)$. 与用胰蛋白酶水解酪蛋白得到的 CPP 比较, 用胰酶水解得到的 CPP 肽链较短.

关键词: 酪蛋白磷酸肽; 分离; 纯化; 结构鉴定

中图分类号: Q516 **文献标识码:** A

酪蛋白磷酸肽(Casein Phosphopeptides, 简称 CPP)是以牛乳酪蛋白为原料, 经单一酶或复合酶系水解, 再经分离纯化而得到的含有成簇的磷酸丝氨酰基的肽. 较多研究结果表明, CPP 具有促进人体对钙的吸收和利用的生物活性.

作者采用复合酶——胰酶水解酪蛋白, 用选择沉淀法从酪蛋白的酶解液中分离 CPP, 得到了功能指标优于国外同类产品的 CPP 制品^[1]. 作者将多种分离纯化技术结合使用, 对所得 CPP 进一步分离、纯化, 得到了 CPP 的纯组分, 并分析鉴定了其中 3 种主要组分的分子结构.

1 材料与方法

1.1 材料

D-290 大孔强碱性阴离子交换树脂 南开大学化工厂生产, Sephadex G-25, Pharmacia 公司产品; 乙腈(色谱纯) 江苏淮阴塑料制品厂精细化工研究所制品.

1.2 仪器

高压液相色谱仪 美国 Bio-Rad 公司产品; 835-50 氨基酸分析仪 日本 Hitachi 公司产品; 173A 型毛细管液相色谱仪 美国 PE 公司产品; 476A 型蛋白测序仪 美国 PE 公司产品.

收稿日期: 1999-07-30; 修订日期: 1999-10-10

作者简介: 冯凤琴(1964年 10月生), 女, 河北石家庄人, 工学博士, 讲师.

1.3 方法

1.3.1 离子交换树脂纯化 CPP 采用 D-290大孔强碱性阴离子交换树脂,方法详见文献[1].

1.3.2 凝胶过滤色谱分离 CPP 凝胶材料为 Sephadex G-25,柱规格: 100 cm× 2.6 cm;洗脱液: 0.01 mol/L 盐酸;洗脱速度(体积流量): 40 mL/h; 1.5 g 样品溶于 20 mL 洗脱液中,过滤除去沉淀后上样.

1.3.3 制备型 HPLC 分离 CPP 用 Hi-Pore C18(10~15 μm)反相柱(250 mm× 21.5 mm)对经凝胶过滤色谱所得到的两部分样品进一步分离,洗脱条件为: 0~2 min, A液; 2~70 min, 0%~70% B液; 70~80 min, 70%~0% B液(A液——0.1%三氟乙酸, B液——含0.1%三氟乙酸和 60%乙腈的水溶液).手工收集的各组分经冷冻干燥后,改用下列溶剂系统再次经制备型 HPLC 分离,其它条件不变. A液——25 mmol/L 乙酸铵溶液(pH 6.0), B液——含 50 mmol/L 乙酸铵和 60%乙腈的水溶液(pH 6.0).

1.3.4 CPP 组分的氨基酸组成分析 从第二次制备型 HPLC 接收到的样品液经冷冻干燥后溶于水中,用氨基酸自动分析仪测定各组分的氨基酸组成.

1.3.5 毛细管色谱纯化 CPP 及 CPP 的末端序列测定 在测定 CPP 的末端序列之前,样品先经与蛋白测序仪配套联用的 173A 型毛细管液相色谱仪进一步纯化,再于蛋白测序仪上测定 CPP 的 N 末端 2~3 个氨基酸残基的序列.毛细管液相色谱的条件为: 色谱柱为毛细管 150 mm× 0.5 mm 的 C18 柱,粒径 5 μm,孔径 3 000 nm;洗脱梯度: 0~140 min. 5%~43% B液(A液——0.1%三氟乙酸, B液——含 0.85%三氟乙酸的乙腈)

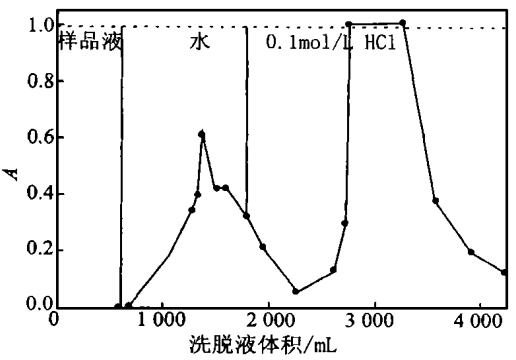
2 结果与讨论

2.1 离子交换树脂纯化 CPP

图 1 为 CPP 在 D-290 阴离子交换树脂柱上的洗脱图谱.经检测 A 峰不含磷, B 峰为分离得到的纯化的 CPP.经 D-290 离子交换树脂纯化后, CPP 的氮磷的物质的量之比由 6.86 降为 5.34,蛋白质的回收率为 74.6%,磷的回收率高达 98.1%,即在前述条件下,经离子交换树脂纯化后, CPP 几乎没有损失,去除的部分(约 25%)均为不含磷酸丝氨酰基的肽(Non-phosphopeptide,简称 NPP).

2.2 Sephadex G-25(coarse)凝胶过滤色谱分离 CPP

经过离子交换树脂纯化后的 CPP,再用凝胶过滤制备柱分离,所得结果如图 2 所示.洗脱图谱中有 3 个峰,每个峰均分别收集,测其氮和磷含量并计算氮磷的物质的量之比.结果表明 A 峰和 B 峰均含磷,其氮磷比值分别为 5.92 和 2.74, A B 两峰的含氮量之比为 6.0,即 A 峰所含 CPP 占 CPP 总量的 85.7%, B 峰只占 14.5%; C 峰则不含磷, C 峰所在的位置(820 mL)超过了 1 倍凝胶床体积(530 mL),这说明 C 峰所含组分与凝胶材料之间有相互作用^[2].将 C 峰合并液浓缩后测其氨基酸组成,结果发现 C 峰中只含有组氨酸(His).

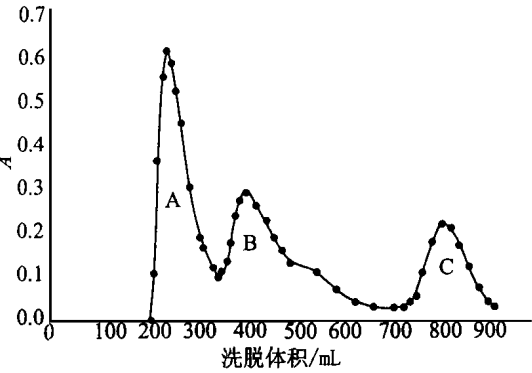


洗脱条件: 树脂平衡至 pH 5.5,洗脱液: 0.1 mol/L HCl,流速: 80 mL/h.

图 1 CPP 在 D-290 阴离子交换树脂柱(50 cm× 5.5 cm)上的洗脱图谱

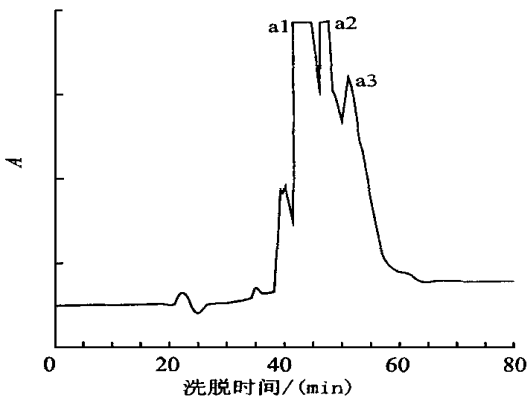
2.3 制备型 HPLC分离 CPP

制备型凝胶过滤洗脱图谱见图 2 中的 A 峰. A 峰的收集液经 HPLC 制备柱分离 (结果见图 3), 对洗脱图中 3 个主要的峰 a1 a2 a3 分别收集, 冷冻干燥后, 改变分离条件, 用分辨率更高的含有乙酸铵的洗脱液代替原三氟乙酸洗脱液^[3], 在制备型 HPLC 上对相应于 a1 a2 和 a3 三个峰的收集液再次进行分离, 峰 a1 和 a2 经第二次 HPLC 分离后除去一些杂质, 所得的主峰分别为组分 1 和组分 2. 峰 a3 则除了去除一些杂质外又分离为两个峰 (见图 4), 将它们分别收集得到组分 3 和组分 4.



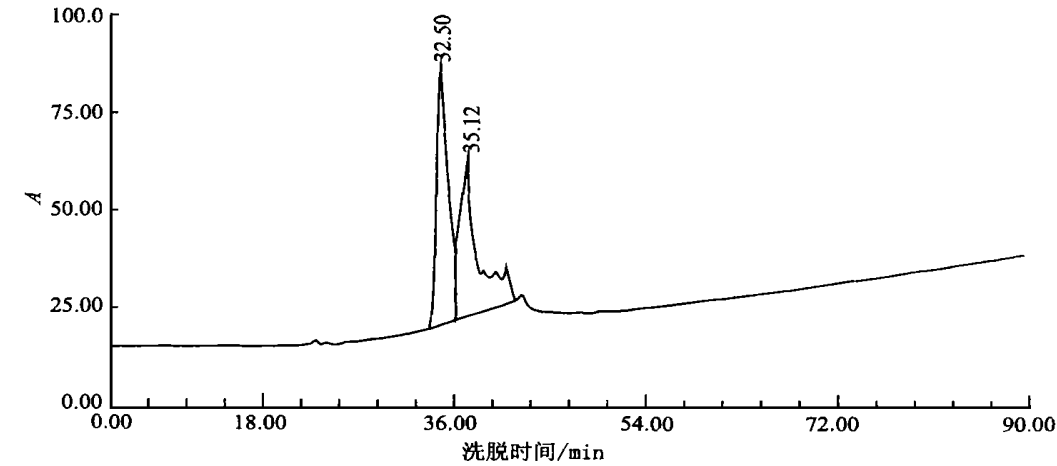
洗脱液: 0.01 mol/L 的 HCl; 流速: 40 mL/h; 检测波长: 220 nm.

图 2 CPP在 Sephadex G-25(coarse)制备柱 (100 cm× 2.6 cm)上的洗脱图谱



流速: 3.0 mL/min; 检测波长: 214 nm.

图 3 A峰收集液在 Hi-Pore反相 C18 制备柱上的洗脱图



流速: 3.0 mL/min; 检测波长: 214 nm. 梯度洗脱条件: 0~ 1 min, 0~ 2% B; 1~ 40 min, 2% ~ 100% B; 40~ 42 min, 100% B; 42~ 43 min, 100% ~ 0% B. A 25 mmol 乙酸铵 (pH 6.0); B 含 50 mmol 乙酸铵和 60% 乙腈的水溶液 (pH 6.0).

图 4 a3峰所含 CPP在 Hi-Pore反相 C18制备柱上的洗脱图

2.4 CPP组分的氨基酸组成分析和末端序列分析

CPP经凝胶过滤色谱得到的 A 峰再经两次 HPLC(制备柱)分离后, 得到 4 个 CPP组

分,经冷冻干燥后,将样品分别溶于水,每个样品都分成两部分,一部分用于氨基酸自动分析仪测定氨基酸组成,另一部分用来测定 N末端的氨基酸序列.

在测序之前,样品又经过与测序仪连用的毛细管色谱,再次对样品纯化.图 5为组分 4的毛细管色谱洗脱图.收集主峰中包含的样品,在蛋白测序仪上测定其 N末端氨基酸排序.表 1为全部 4个组分的氨基酸组成分析结果和测序结果.依据纯化的 CPP组分的氨基酸组成 N末端序列以及已知的牛乳酪蛋白的一级结构,即可推断 CPP组分在酪蛋白中的位置.

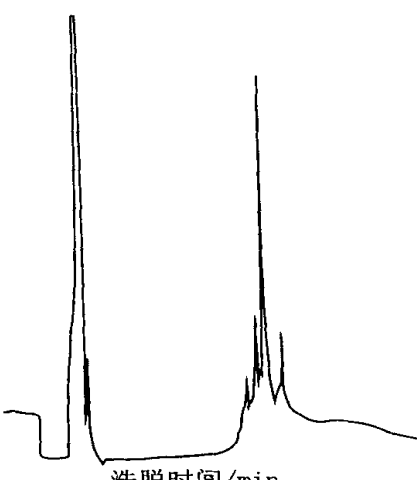
CPP经凝胶过滤色谱得到的 A峰(见图 2)占 CPP总量的 85%,从 A峰中分离出 4个组分,其中 3个组分的结构已被确定,它们分别是 α s1(61~ 79)、 α s1(43~ 79)和 β (7~ 24),见表 1.

研究用胰酶水解酪蛋白,从 α s1-酪蛋白得到的 CPP主要是 α s1(61~ 79),另外还有少部分 α s1(43~ 79);从 β -酪蛋白得到的 CPP主要是 β (7~ 24).

Adamson和 Reynolds 也曾报道,从酪蛋白的胰酶水解产物分离到的含磷酸丝氨酰簇的 CPP的主要组分是 β (7~ 24)、 α s1(61~ 78)和 α s1(59~ 78)^[4],本研所得结果与此报道相似.与用胰蛋白酶水解酪蛋白得到的 CPP比较,用胰酶水解得到的 CPP肽链较短^[5],显然这是胰酶中的胰凝乳蛋白酶和羧肽酶作用的结果.

表 1 CPP组分的氨基酸分析和测序结果

氨基酸 种类	组分 1		组分 2		组分 3		组分 4	
	含量 / mmol	理论 比值	含量 / mmol	理论 比值	含量 / mmol	理论 比值	含量 / mmol	理论 比值
Asp	1. 737	1	1. 336		5. 250	4	1. 889	1
The	—	—	0. 944		2. 204	1	1. 236	1
Ser	6. 035	5	2. 850		4. 925	7	4. 707	5
Glu	9. 450	6	6. 441		12. 281	11	6. 598	4
Gly	—	—	—		1. 455	1	1. 058	1
Ala	1. 525	1	—		1. 832	2	—	—
Val	2. 608	2	1. 478		1. 813	2	2. 399	2
Met	—	—	—		0. 250	2	—	—
Ile	2. 560	2	1. 389		3. 685	4	2. 342	2
Leu	—	—	—		—	—	1. 301	1
Lys	1. 169	1	0. 758		2. 141	2	—	—
Pro	0. 566	1	—		0. 918	1	0. 817	1
N末端序列	Glu- Ala- Glu-		—		Asp- Ile- Gly-		Asn- Val-	
分子结构	α s1(61~ 79)		—		α s1(43~ 79)		β (7~ 24)	



流速 : 3. 0 mL/min;检测波长: 214 nm. 梯度洗脱条件: 0~ 140 min, 5%~ 45% B A: 0. 1% 三氟乙酸; B 含 0. 85%三氟乙酸的乙腈

图 5 CPP组分 4在反相 C18毛细管色谱柱上的洗脱图

参考文献:

[1] 冯凤琴,许时婴,王璋.低 N /P酪蛋白的生产制备及功能性质的研究 [J].中国食品学报,1998, 2(3): 1

- [2] 韩冬.水溶性凝胶色谱中的非体积排除效应[J].色谱,1995,13(6):432~436.
- [3] LEMIEUX L, AMIOT J. High-performance liquid chromatography of casein hydrolysates phosphorylated and dephosphorylated I, peptide mapping[J]. J Chromatogr, 1990, 519: 299~321.
- [4] ADAMSON N J, REYNOLDS E C. Characterization of multiply phosphorylated peptides selectively precipitated from a pancreatic casein digest[J]. J Dairy Sci, 1995, 78: 2653~2659.
- [5] HIRAYAMA M, TOYOTA K, YAMAGUCHI G, et al. HPLC analysis of commercial casein phosphopeptides (CPP)[J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(7): 1126~1127.

Separation, Purification and Identification of Molecular Structure of Pancreatic Casein Phosphopeptides

FENG Feng-qin¹, WANG Bo-cheng², NI Li³, XU Shi-ying³, WANG Zhang³

(1. Department of Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029; 2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063; 3. School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract The casein phosphopeptides (CPP) obtained by pancreatic hydrolysis was purified by anion-exchange resin, and then was further separated into two fractions after gel-filtration. From the main fraction containing 83% of the total CPP, four major components were purified by two runs of HPLC on C₁₈ reverse-phase column. The amino acid composition and the sequence of the N-terminal of each component were analyzed respectively by an amino acid analyzer and a protein sequencer. Among the four components, three were identified respectively as α s1(61~79), α s1(43~79) and β (7~24). The peptide chains of pancreatic CPP were found to be shorter than that of tryptic CPP.

Key words casein phosphopeptides; separation; purification; identification of molecular structure