

文章编号:1009-038X(2003)05-0083-03

麦胚水溶性糖蛋白的分离纯化及性质测定

朱科学, 周惠明

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:从麦胚水溶性提取物中分离得到粗蛋白-糖复合物,经 DEAE-Cellulose 和 Sephadex G100 柱层析,得到均一的麦胚水溶性糖蛋白(WGWSGP)。Sephacryl CL-6B 凝胶过滤纯度检验表明 WGWSGP 是单一对称峰,经 SDS-PAGE 电泳测定其相对分子质量为 40 260。

关键词:小麦胚芽 糖蛋白 纯化 性质

中图分类号:Q 513.2

文献标识码:A

Purification and Partial Characterization of Wheat Germ Water-Soluble Glycoprotein

ZHU Ke-xue, ZHOU Hui-ming

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Crude protein-carbohydrate complex was isolated from wheat germ water-soluble extracts, and a new homogeneous glycoprotein (WGWSGP) was obtained by chromatography on DEAE-Cellulose and Sephadex G100. The apparent purity was examined by Sepharose CL-6B gel chromatography. Its MW was 40 260 determined by SDS-PAGE.

Key words: wheat germ glycoprotein; purification; characterization

小麦胚芽富含人体所必需的全面均衡的营养素^[1,2] 尤其富含多种生理活性物质,如谷胱甘肽^[3]、黄酮类化合物^[4,5]、麦胚凝集素、膳食纤维^[6]和二十八碳醇^[7]等,因此麦胚一直是食品、营养等领域研究的热点。

作者曾对麦胚水溶性提取物中的蛋白质进行了研究,结果表明其中主要具有生物学功能的蛋白质组分均是(或均含有)糖蛋白,并有一定的免疫调节作用和延缓衰老及抑制肿瘤的功效^[8]。但进一步的研究至今未见报道。作者对麦胚水溶性提取物中的蛋白组分进行了较系统地研究,通过一系列分离纯化步骤,得到一具有免疫活性的组分——麦胚水溶性糖蛋白(简称 WGWSGP),并对其部分性质进

行了测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验原料 新鲜小麦胚芽:上海福新面粉厂提供。

1.1.2 主要试剂 DEAE-Cellulose 52:Sigma 公司产品;Sephadex G100 和 Sepharose CL-6B:Pharmacia 公司产品;低相对分子质量标准蛋白质:中国科学院上海生物化学研究所产品;其余均为国产分析纯试剂。

1.1.3 主要仪器与设备 ZOPR-52D 冷冻离心机:日本东京 Hitachi Koki 公司产品;721-分光光度计:

收稿日期 2003-02-26; 修回日期 2003-05-10。

基金项目 江苏省自然科学基金项目(BK2001020)资助课题。

作者简介 朱科学(1978-),男,河南周口人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生。

上海精密科学仪器有限公司产品;ZFQ85A 旋转蒸发仪:上海医械专机厂产品;层析柱:上海精科生物有限公司产品;DHL-A 电脑恒流泵、BSZ-100 自动部分收集器和 TH-500 梯度混合器:上海沪西分析仪器厂产品;UV-1100 紫外分光光度计:北京瑞利分析仪器厂产品;MC 旋光仪:Perkin-Elmer 公司产品;DYY-III23A 型电泳槽和 ECP300 三恒多用电泳仪:北京市六一仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 WGWSGP 分离提取工艺

将灭酶脱脂的麦胚粉按照一定的料水比加入到 0.05 mol/L pH 8 的 Tris-HCl 缓冲溶液中(内含 0.1 mol/L 的 NaCl 5 mmol/L 的 EDTA,质量分数 2% 的聚乙烯吡咯烷酮,1 mmol/L 2-巯基乙醇)→4 °C 浸泡过夜→高速组织捣碎机匀浆 3 次,每次 30 s→纱布过滤→滤液在 4 °C,10 000 r/min 冷冻离心 10 min→上清液→按 V(上清液):m(硫酸铵)=5 mL:3 g 的比例加入硫酸铵→沉淀蛋白质→4 °C,10 000 r/min 冷冻离心 10 min→沉淀→加水溶解→4 °C,10 000 r/min 冷冻离心 10 min→二次盐析上清液→4 °C 透析→透析液抽滤→滤液冷冻干燥→WGWSGP 粗品。

1.2.2 WGWSGP 粗品纯化工艺

WGWSGP 粗品→加少量水溶解,透析平衡→DEAE-Cellulose52 离子交换柱→梯度洗脱,洗脱条件:0.02~1.0 mol/L NaCl(0.01 mol/L, pH 8.0, Tris-HCl)线性梯度洗脱,体积流量 0.5 mL/min,10 mL/管→逐管检测 $A_{280\text{ nm}}$ 及 $A_{490\text{ nm}}$ (先经硫酸-苯酚显色)→收集峰组分透析浓缩→Sephadex G100 凝胶柱层析→洗脱,洗脱液为 0.02 mol/L NaCl(0.01 mol/L, pH 8.0, Tris-HCl),体积流量 0.1 mL/min,3 mL/管→逐管检测 $A_{280\text{ nm}}$ 及 $A_{490\text{ nm}}$ (先经硫酸-苯酚显色)→收集峰形对称的蛋白质-糖组分→去离子水透析浓缩→冷冻干燥→WGWSGP 纯品。

1.2.3 WGWSGP 纯度检验

将 Sepharose CL-6B 凝胶装填于 $D 1.0\text{ cm} \times 100\text{ cm}$ 的层析柱中,装填高度为 95 cm,用 0.05 mol/L NaCl 溶液平衡,取 10 mg WGWSGP 冷冻干燥制品溶解到 2 mL 水中,3 000 r/min 离心,取上清液加入到凝胶柱中,然后用 0.05 mol/L NaCl 溶液进行洗脱,洗脱液流速为 0.1 mL/min,每 30 min 收集一管,逐管检测糖和蛋白质的含量,蛋白质的含量用 280 nm 紫外检测法测定,糖的含量用苯酚-硫酸比色法测定。

1.2.4 WGWSGP 相对分子质量测定

采用 SDS-PAGE 电泳法,按照 Laemmli 的方法^[9],采用 pH

8.8 的 1.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液,分离胶质量浓度为 12 g/dL,采用考马斯亮蓝 R-250 染色;同时,采用鸡蛋清溶菌酶、胰蛋白酶抑制剂、牛碳酸酐酶、兔肌动蛋白、牛血清白蛋白和兔磷酸化酶 B 作相对分子质量标准,溴酚蓝为指示剂(迁移率为 1.0),以各蛋白质相对迁移率对相对分子质量对数作标准曲线,根据 WGWSGP 的相对迁移率可求得得其相对分子质量。

2 结果与讨论

2.1 WGWSGP 的纯化

2.1.1 DEAE-Cellulose52 离子交换层析

WGWSGP 粗品经 DEAE-Cellulose52 离子交换柱所得洗脱曲线见图 1,洗脱得到的 3 个组分,收集第一个峰组分进行透析浓缩,作为下一道层析柱的分离对象。

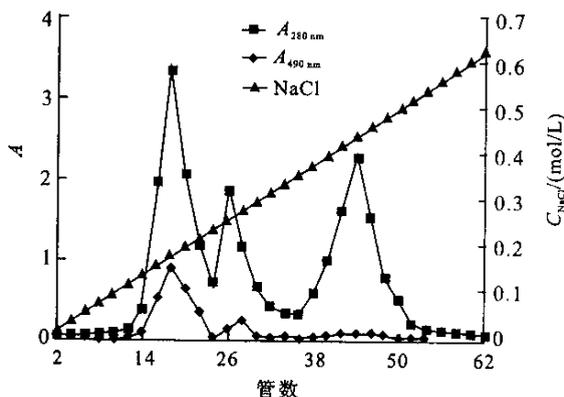


图 1 DEAE-Cellulose52 离子交换层析的洗脱曲线

Fig.1 DEAE-Cellulose52 ion-chromatogram of WGWSGP

2.1.2 Sephadex G100 凝胶过滤层析

粗 WGWSGP 经 Sephadex G100 凝胶过滤柱($D 1.6\text{ cm} \times 90\text{ cm}$)所得的洗脱曲线见图 2,得到 2 个峰形对称的蛋白质-糖组分,这 2 个蛋白质组分均为糖蛋白,收集第一个峰组分,经水透析后冷冻干燥,即得到高纯度 WGWSGP。

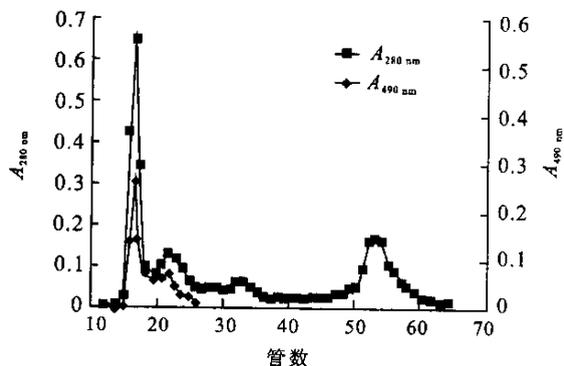


图 2 Sephadex G100 凝胶过滤层析的洗脱曲线

Fig.2 Sephadex G100 gel -chromatogram of WGWSGP

2.2 WGWSGP 的物理性质

WGWSGP 为白色絮状固体,得率为脱脂小麦胚芽粉质量的 1.36%,易溶于水,水溶液呈中性,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂,比旋度为 $[\alpha]_D^{20} = +53.5^\circ(\text{H}_2\text{O})$ 。

2.3 WGWSGP 的纯度检验

Sephacryl S4B 凝胶过滤检测结果见图 3。从图中可以看到,凝胶过滤色谱的洗脱曲线为一蛋白质和糖对称的吸收峰,由此判断所得小麦胚芽水溶性糖蛋白制品为纯度较高的均一组分。

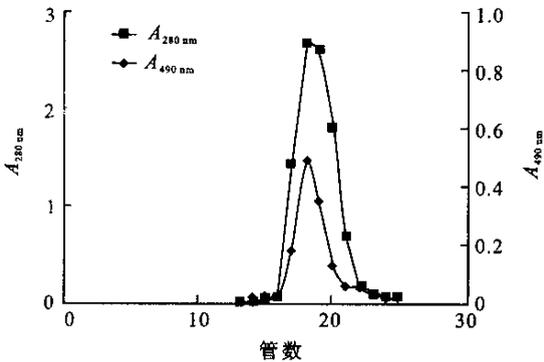


图 3 WGWSGP 的 Sepharose CL-6B 凝胶过滤检测图
Fig.3 Sepharose CL-6B gel-chromatogram of WGWSGP

2.4 WGWSGP 的相对分子质量测定

WGWSGP 的电泳扫描图谱见图 4。由于 WGWSGP 中糖分的组成所占比例较大(占 43%左右),所以样品的电泳图谱变得很宽,这也是糖蛋白制品

最为显著的特点即微观不均一性的反映^[10]。

通过计算 WGWSGP 的相对迁移率(M_r),将其代入标准相对分子质量回归方程进行计算可得到 WGWSGP 的相对分子质量为 40 260。

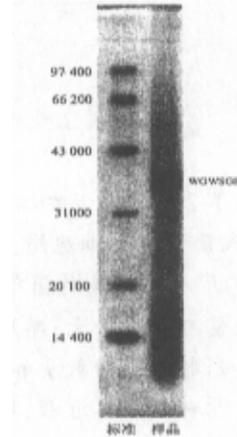


图 4 WGWSGP 电泳扫描图谱
Fig.4 The electrophorogram of WGWSGP

3 结 论

1) 经过对麦胚进行水提、硫酸铵沉淀、离心、透析、浓缩、冻干后得到粗的 WGWSGP 制品,然后再经过离子交换层析和凝胶过滤层析后得到 WGWSGP 纯品。

2) 通过 Sepharose CL-6B 凝胶过滤检验,结果表明 WGWSGP 是单一对称峰。SDS-PAGE 电泳测定结果显示其相对分子质量为 40 260。

参考文献：

[1] Amado R, Arigoni E. Nutritive and functional properties of wheat germ[J]. *International Food Ingredients*, 1992, 4 : 30 - 34.

[2] Y Pomeranz. *Wheat Chemistry and Technology*[M]. Madison :AACC INC ,1988. 11 - 13.

[3] Anderson M E. Glutathione and glutathione delivery compound[J]. *Advances in pharmacology*, 1997, 38 : 65 - 78.

[4] 吴冰,徐贵发,任翔,等. 麦胚黄酮类提取物对 DMBA 诱导的大鼠乳腺肿瘤的抑制作用[J]. *现代预防医学*, 2002, 29(1): 4 - 6.

[5] 于长青,柳巨雄,牟光庆,等. 麦胚黄酮类提取物对血脂和抗氧化的影响[J]. *营养学报*, 2001, 23(4): 390 - 392.

[6] 汤鲁宏,姚惠源. 麦胚生物活性物质的研究进展[J]. *粮食储藏*, 1997, 26(4): 38 - 45.

[7] 宋建华,陈明德. 新型健康食品添加剂二十八烷醇的开发研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1998, 37(3): 414 - 418.

[8] 周惠明. 小麦胚水溶性提取物中功能性成分的研究[D]. 无锡:江南大学, 2001. 1 - 3.

[9] 夏其昌. *蛋白质化学研究技术与进展*[M]. 北京:科学出版社, 1999.

[10] Beeley J G. *Glycoprotein and Proteoglycan Techniques as Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*[M]. New York :Elsevier science publishing company INC ,1985. 73 - 78.

(责任编辑 朱明)