

菜豆鲜荚中菜豆凝集素的提取与分离纯化工艺研究

陈 高, 王红波, 郭 瑞, 代祥德, 刘 彤, 陈禅友*

(江汉大学 生命科学学院; 湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心, 湖北 武汉 430056)

摘 要:以 Bean Saint esprit a oeil rouge 菜豆鲜荚为试验材料, 优化了菜豆凝集素的提取和分离纯化工艺, 研究了提取剂、料液比、pH 值和提取时间对菜豆凝集素活性的影响, 建立了硫酸铵分级沉淀、DEAE-52 阴离子交换层析和 Superdex-200 凝胶过滤层析的组合方法用于分离纯化菜豆凝集素。研究表明: 以磷酸盐缓冲溶液为提取剂, 料液比 1:25, pH 值 6~8, 浸提时间 8 h, 菜豆植物凝集素的提取效果适宜。菜豆凝集素浸提液经硫酸铵分级沉淀, DEAE-52 阴离子交换层析, Superdex-200 凝胶过滤层析, 冷冻干燥后可获得纯度较高的菜豆凝集素。纯化的样品经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测为单一条带, 血凝法检测有血凝活性。

关键词: 菜豆; 凝集素; 分离纯化; 血凝活性

中图分类号: R282.71; S643.1 文献标志码: A 文章编号: 1673-0143(2016)06-0496-08

DOI: 10.16389/j.cnki.cn42-1737/n.2016.06.003

Extraction, Separation and Purification of *Phaseolus vulgaris* Agglutinin (PHA) from Common Bean Fresh Pods

CHEN Gao, WANG Hongbo, GUO Rui, DAI Xiangde, LIU Tong, CHEN Chanyou*

(School of Life Sciences, Jianghan University; Hubei Province Engineering Research Center for Legume Plants, Wuhan 430056, Hubei, China)

Abstract: In this paper, the processes of extraction, separation and purification of *Phaseolus vulgaris* agglutinin (PHA) from the common bean "Bean Saint esprit a oeil rouge" fresh pods were optimized. The effects of extracting agent, material-liquid ratio, pH and extracting time on PHA were studied, and the combined method of ammonium sulfate precipitation, DEAE-52 anion exchange chromatography and Superdex-200 gel filtration chromatography for extracting, isolating and purifying the PHA from fresh pods of common bean has been established. The main results were as follow: 1) The optimized technical parameters for common bean extraction process were material-liquid ratio 1:25, pH 6-8, extracting time 8 h, PBS as extracting agent; 2) The high purity PHA was obtained with ammonium sulfate precipitation, dialysis, DEAE-52 anion exchange chromatography, concentrated by ultrafiltration and Superdex-200 gel filtration chromatography. The obtained PHA shows one band with electrophoresis test and has blood clotting activity.

Keywords: common bean; lectin; separation and purification; hemagglutination activity

收稿日期: 2016-11-08

基金项目: 农业部 948 项目(2011-G1-17); 湖北省科技平台项目(鄂科技通[2011]第 101 号); 湖北省资源中心项目(2015BCE091); 武汉市科技攻关项目(201250499145-11)

作者简介: 陈 高(1989—), 男, 实验员, 硕士, 研究方向: 植物细胞工程。

*通讯作者: 陈禅友(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 植物资源与遗传育种。E-mail: ccy@jhun.edu.cn

0 引言

菜豆(*Phaseolus vulgaris* Linn.)又名芸豆或四季豆,是豆科菜豆属一年生草本植物,不仅在我国各地广泛栽培,在亚洲、非洲及拉丁美洲的许多地区也作为一种主要的植物蛋白来源而广泛种植,是世界上种植面积仅次于大豆的食用豆类^[1]。近年来,国内外因食用生的或烹饪不充分的菜豆而引起的中毒事件时有发生,制约了菜豆产业的发展^[2]。目前,人们普遍认为菜豆凝集素(*Phaseolus vulgaris* agglutinin, PHA)是菜豆中主要的毒性成分^[3]。对菜豆凝集素进行深入研究,可以有效指导人们合理开发利用菜豆资源,促进菜豆产业的发展。菜豆凝集素在植物生长发育的各个阶段,以不同的方式起到防卫作用^[4],其不仅具有细胞毒性,可以导致食用菜豆的动物中毒,而且对于多种害虫及病菌都有较强的抵抗作用^[5],其完全烹饪后会失去活性,因而菜豆凝集素可作为一种理想的植物源生物农药来源,具有潜在的经济效益。

植物凝集素已在免疫学、细胞生物学、肿瘤防治、基因工程等诸多方面得到应用,并在医学、农业上呈现出巨大的应用前景^[6]。目前关于菜豆凝集素分离纯化的研究还少有报道。本研究通过对菜豆凝集素的提取和分离纯化工艺进行优化,为大量提取和分离纯化菜豆凝集素提供技术依据,也为进一步研究菜豆凝集素提供优质的试验材料,有利于菜豆凝集素在制备植物源生物农药等领域的进一步开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

由江汉大学湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心蔡甸永安实验基地提供的 Bean Saint esprit a oeil rouge 菜豆种子。试验用大白兔由江汉大学动物房提供。

菜豆凝集素标准品购于 Sigma 公司;牛血清蛋白、DEAE-52、Superdex-200、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、Tris、过硫酸铵、甘氨酸、甘油、溴酚蓝、考马斯亮蓝 R-250、甲醇、冰醋酸、四甲基乙二胺(TEMED)、考马斯亮蓝 G-250、磷酸、无水乙醇、十二水合磷酸氢二钠、两水合磷酸二氢钠、葡萄糖、枸橼酸、枸橼酸钠、氯化钠均为分析纯,购自国药集团。

1.2 仪器设备

DBS-100 电脑全自动部分收集器:上海沪西分析仪器厂有限公司;3057-11 记录仪:重庆川仪速达机电有限公司;HD-2 核酸蛋白检测仪:上海沪西分析仪器厂有限公司;DHL-A 电脑数显恒流泵:上海沪西分析仪器厂有限公司;SK-1 型快速混匀器:金坛市医疗仪器厂;DHG-9070A 电热鼓风干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司;GR21GIII 高速冷冻离心机:HITACHI;5840R 冷冻离心机:Eppendorf;1510 全波长酶标仪:Thermo AG;DL-1 电子万用炉:北京市永光明医疗仪器厂;TS-200B 摇床:上海天呈股份有限公司;JC-SH06 去离子水设备:默克化工技术(上海)有限公司; $\varphi 1.2 \times 100$ cm 中压柱、 $\varphi 2.0 \times 30$ cm 中压柱:上海沪西分析仪器厂有限公司。

1.3 测定方法

1.3.1 凝集素的血凝活性检测 菜豆凝集素的血凝活性检测采用血凝法^[7]。在 96 孔 V 型血凝板的每一孔中加入 25 μ L 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH = 7.2),然后取 25 μ L 样品溶液,加入第一孔,混匀后,取出 25 μ L 加至第二孔,混匀后再取 25 μ L,加至第三孔,以此类推,做倍比稀释,同时每孔加入 25 μ L 2% 的兔红细胞悬液,并将 V 型血凝板放在微型振荡器上振荡 1 min,25 $^{\circ}$ C 下放置 2 h,肉眼观察血凝结果。当一半血红细胞凝成一片,一半血红细胞自然沉降,中间小红点为无凝集现象时的一半,此时为半凝集,记为凝集效价。

$$\text{凝集活力/HU} = 2^n / 50 (\mu\text{L}),$$

$$\text{总活力/HU} = \frac{\text{血凝滴度}(2^n) \times 1000 (\mu\text{L/mL}) \times \text{体积}(\text{mL})}{\text{每孔添加体积}(\mu\text{L})},$$

$$\text{特异性活力}/(\text{HU} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{\text{血凝滴度}(2^n) \times 1000(\mu\text{g}/\text{mg})}{\text{每孔添加体积}(\mu\text{L}) \times \text{凝集素或粗蛋白浓度}(\mu\text{g}/\mu\text{L})}$$

其中 n 为样品在 96 孔 V 型板中半凝集时倍比稀释的孔数, 2^n 为倍比稀释的倍数, 即为血凝滴度。

1.3.2 蛋白质含量检测 蛋白质含量的测定采用 Bradford 检测法(考马斯亮蓝 G-250 法)^[8]。将牛血清蛋白配制成 1 mg/mL 标准溶液, 向 1.5 mL EP 管中分别加入 0、2.5、5、7.5、10、12.5、15、17.5、20 μL 标准蛋白质溶液, 并分别加入 PBS 至 100 μL , 加入 1 mL Bradford 工作液, 充分振荡混匀, 2 min 后在 595 nm 处测定吸光度, 做 3 份平行, 根据结果绘制标准曲线。

将待测蛋白质溶液移入 EP 管中(不超过 100 μL), 补加 PBS 至 100 μL , 加入 1 mL Bradford 工作液, 充分振荡混匀, 2 min 后在 595 nm 处测定吸光度, 测量应在 1 h 内完成。

1.3.3 蛋白质纯度检测 菜豆凝集素的纯度检测采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测^[9]。配置 8% 分离胶, 5% 浓缩胶, 垂直板电泳, 将电压调节至 80 V 恒压, 当指示染料到达分离胶时, 可将电压调至 120 V, 加快电泳进程, 当指示染料到达底部时关闭电源。将凝胶取出移入考马斯亮蓝染液中染色 20 min, 放在摇床上缓慢振荡。将染液去除, 加入脱色液脱色, 继续在摇床上振荡, 换取脱色液数次, 必要时可过夜。待底色完全脱去时, 拍照记录。

1.4 菜豆凝集素的提取工艺

将菜豆鲜荚与不同 pH 值的提取剂以一定料液比混合, 用匀浆机打碎, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡提取一定时间, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下使用冷冻离心机 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 使用血凝法检测血凝活性。

1.4.1 不同提取剂对菜豆凝集素的影响 在提取时间为 12 h、料液比为 1:10、提取 pH 值为 7.2 的条件下, 分别将提取剂设置为去离子水、PBS、Tris-HCl 缓冲液、生理盐水, 考察不同提取剂情况下菜豆凝集素的凝集活性。

1.4.2 不同料液比对菜豆凝集素的影响 在提取剂为 PBS、提取时间为 12 h、提取 pH 值为 7.2 的条件下, 分别将料液比设置为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40, 考察不同料液比情况下菜豆凝集素的凝集活性。

1.4.3 不同 pH 值对菜豆凝集素的影响 在提取剂为 PBS、提取时间为 12 h、料液比为 1:10 的条件下, 分别将提取 pH 值设置为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 考察不同 pH 值情况下菜豆凝集素的凝集活性。

1.4.4 不同提取时间对菜豆凝集素的影响 在提取剂为 PBS、提取 pH 值为 7.2、料液比为 1:10 的条件下, 分别将提取时间设置为 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h, 考察不同提取时间下菜豆凝集素的凝集活性。

1.5 菜豆凝集素分离纯化工艺

1.5.1 粗提及硫酸铵分级沉淀 将菜豆鲜荚 20 g, 加入 100 mL 0.2 mol/L pH 值为 7.2 的 PBS, 匀浆机打碎, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡提取 12 h, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下使用冷冻离心机 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 加入硫酸铵粉末, 使上清液中的硫酸铵饱和度达到 10%, 冰浴 2 h 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下使用冷冻离心机 10 000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀并标记饱和度。上清液继续加入硫酸铵粉末, 使上清液中的硫酸铵饱和度达到 20%, 冰浴中静置 2 h, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 10 000 r/min 使用冷冻离心机离心 30 min, 收集沉淀并标记饱和度。重复上述操作, 直到硫酸铵饱和度达到 100%。将各饱和度沉淀分别加入原体积 PBS 重溶, 分别进行血凝活性检测, 将具有凝集活性的样品收集起来并测定蛋白质含量。

1.5.2 透析 将具有凝集活性的样品溶液合并起来, 加入透析袋中, 使用 PBS 透析, 每 6 h 换液一次, 直到析出液用 BaCl_2 检测不出白色沉淀。然后对蒸馏水透析, 透析时间及换液次数与此前 PBS 透析一致。透析在低温 4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, 透析过程中, 间隔摇动透析袋, 使沉淀悬起, 或者使用磁力搅拌器, 以提高透析效率。

1.5.3 DEAE-52 阴离子交换层析纯化 将透析除盐后样品加入预先平衡好的 DEAE-52 阴离子交换柱中, 用 pH 值为 8.0 的 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱至流出液于 280 nm 处吸光度测定值小于 0.001, 调节流速为 3 mL/min。分别用含 0.05、0.15、0.5、1.0 mol/L NaCl 的 pH 值为 8.0 的 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 用全自动部分收集器收集洗脱液体, 设置流速为 3 mL/min, 收集速度为 3 min/tube, 测

定各峰值的不同浓度洗脱液的凝血活性,将有凝血活性的各管收集并合并起来,冷冻干燥或浓缩。

1.5.4 Superdex-200 凝胶过滤层析纯化 将处理好样品过 0.22 μm 滤膜,加入预先平衡好的 Superdex-200 凝胶柱中(样品体积不可超过 5 mL,如超过可适当浓缩),用 pH 值为 8.0 的 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱,调整流速为 0.3 mL/min,收集速度为 5 min/tube,对各峰值管洗脱液分别检测凝血活性。用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白质纯度。合并有凝血活性且纯度较高的各管,对去离子水透析,冷冻干燥,即可得凝集素干粉。

2 结果与分析

2.1 菜豆凝集素的提取工艺研究

2.1.1 提取剂的确定 不同的提取试剂对于菜豆凝集素的凝集活力及总活力均有影响,由于料液比相同,菜豆凝集素的凝集活力与总活力保持相同的趋势,因而只看其凝集活力变化即可获知总活力的变化。如图 1 所示,去离子水提取的凝集活力为 10.24 HU,生理盐水提取的凝集活力为 40.96 HU,Tris-HCl 提取的凝集活力为 54.61 HU,PBS 提取的凝集活力为 81.92 HU。菜豆凝集素活性在 4 种提取剂中由低到高为:去离子水<生理盐水<Tris-HCl<PBS,因此菜豆凝集素的适宜提取剂为 PBS。缓冲液能抵抗少量外来强酸、强碱或稍加稀释而保持其 pH 值基本不变。不同的蛋白质对缓冲液有不同的需求。娄在祥等^[10]研究表明甲酸溶液提取的刀豆凝集素含量最高,而本试验中 PBS 对于菜豆凝集素有最好的提取效果。

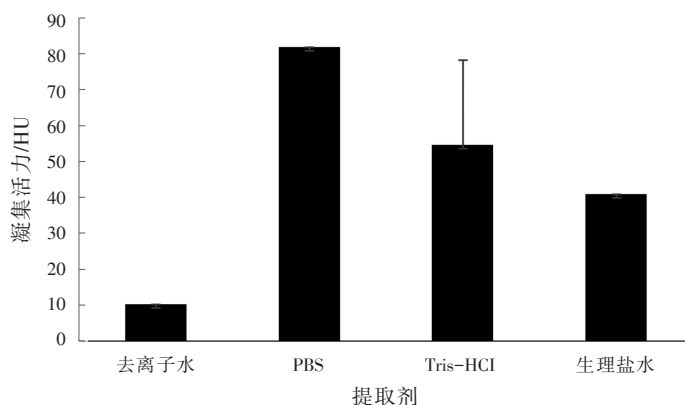


图 1 不同提取剂对菜豆凝集素凝集活力的影响

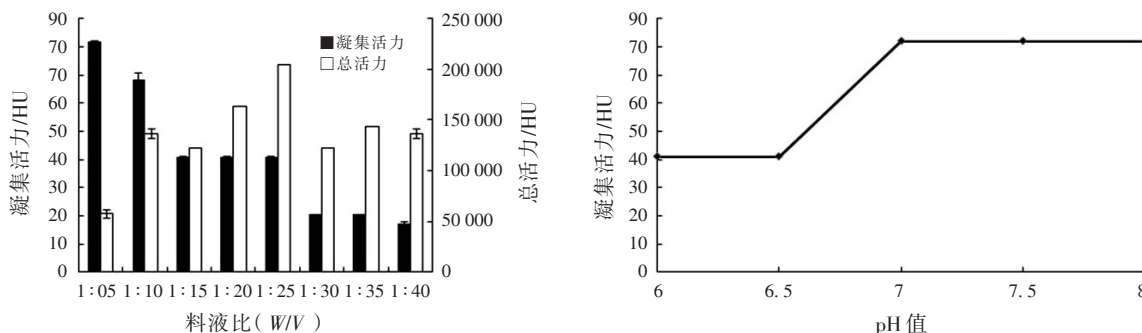
Fig. 1 Effect of different extractant on PHA

2.1.2 提取工艺优化 如图 2(a)所示,菜豆凝集素的凝集活力随着料液比的增加而下降,而菜豆凝集素的总活力却随着料液比的增加整体呈先上升后下降的趋势,并在料液比 1:25 时达到峰值。凝集活力随着料液比升高而下降,主要是因为随着料液比升高,单位体积所含的凝集素含量降低。菜豆凝集素的总活力呈先上升后下降的趋势,主要是因为当料液比较低时,提取缓冲液并不能充分提取样品中的凝集素,因而导致其凝集总活力较低,当料液比达到 1:25 时,样品中的凝集素已被充分提取出来,此时凝集素总活力达到峰值,且凝集活力处于一个较高的水平。

提取缓冲液的不同 pH 环境对于菜豆凝集素的凝集活力及总活力均有影响,由于料液比相同,菜豆凝集素的凝集活力与总活力保持相同的趋势,因而只看其凝集活力变化即可获知总活力的变化。如图 2(b)所示,菜豆凝集素的凝集活力随着提取缓冲液 pH 值的增加而增加。当 pH 值较低时,对菜豆凝集素的活性有抑制作用,当 pH 值到达 7~8 时菜豆凝集素的活性达到峰值,为提取菜豆凝集素的适宜 pH 值。菜豆凝集素的稳定性较强,可以在较广范围的 pH 值中保持较强的活性,因而在 pH 值 6~8 范围内并未出现较大的差异。大部分的植物凝集素的酸碱稳定性均比较好。蔡茜茜等^[11]研究发现黑豆凝集素在 pH 值 2~10 范围内高度稳定,与本研究较为相近。

如图 2(c)所示,菜豆凝集素的凝集活力随着提取时间的增加,呈先升高后降低的趋势,并在 8~20 h 达到峰值。当提取时间较少时,菜豆凝集素还未充分提取,因而其凝集活力较低;当提取时间到达

8 h时,菜豆凝集素已被充分提取,因而达到峰值;当提取时间超过20 h后,由于提取时间过长,部分蛋白质活性降低,从而导致凝集活性下降。在提取8~20 h内,菜豆凝集素的凝集活力均达到最高,但提取8 h所需时间最短,有利于提高效率,因而提取8 h为适宜提取时间。

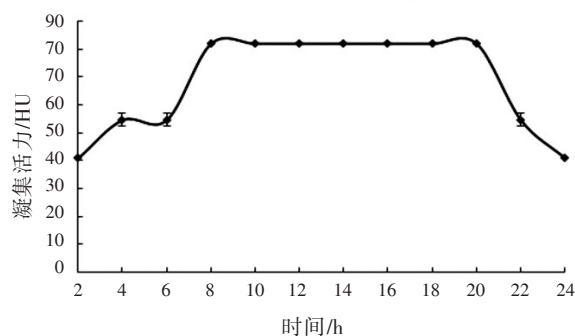


(a) 料液比对菜豆凝集素的影响

(a) Effect of different material-liquid ratio on PHA

(b) pH 值对菜豆凝集素的影响

(b) Effect of different pH on PHA



(c) 提取时间对菜豆凝集素的影响

(c) Effect of different extracting time on PHA

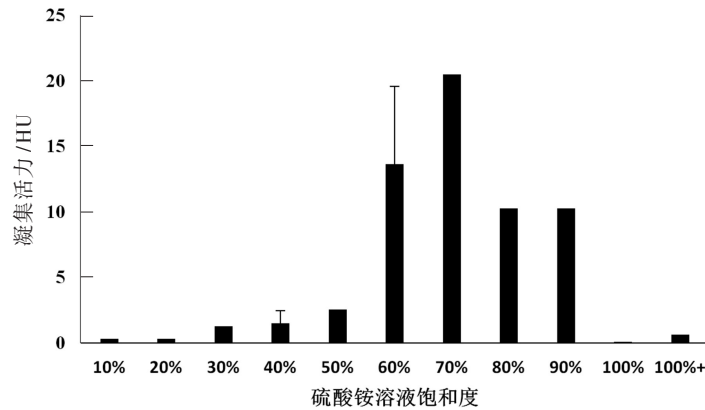
图2 菜豆凝集素提取工艺优化

Fig. 2 Optimization of extraction process of PHA

2.2 菜豆凝集素分离纯化

2.2.1 粗提及硫酸铵分级沉淀 菜豆凝集素是一种水溶性蛋白质,其在提取液中的溶解度受到盐离子浓度的影响。在低盐浓度时,蛋白质分子因为静电作用在外围聚集了大量带相反电荷的离子,进而使其水合作用加强,提高了蛋白质的溶解度;而当盐离子浓度升高时,盐离子与蛋白质分子竞争水分子,从而降低了蛋白质分子与水分子的水合作用,导致蛋白质分子聚集而沉淀^[12]。硫酸铵是一种常用的盐析溶剂,可以有效去除菜豆凝集素粗提液中的部分杂蛋白质。如图3所示,菜豆凝集素的凝集活性随着硫酸铵的饱和度升高,呈先升高后下降趋势,并在70%时达到峰值,为20.48 HU。本试验所用菜豆品种为前期试验中筛选出凝集素含量最高的品种,因而在全部硫酸铵饱和度提取液均可检测出凝集活性。硫酸铵饱和度达到10%、20%、100%时,重溶液虽然仍有少许血凝活性,但考虑到杂蛋白质过多,不利于菜豆凝集素的纯化,因而舍去,选取硫酸铵饱和度30%~90%区间内血凝活性较高的提取液进行下一步试验。

对菜豆凝集素粗提液进行检测,蛋白质含量为40.01 mg/g,凝集总活力为 2.048×10^6 HU,特异性活力为19 975.13 HU/mg;合并硫酸铵饱和度30%~90%的提取液,并检测其蛋白质含量为30.38 mg/g,凝集总活力为 1.8×10^6 HU,特异性活力为35 923.79 HU/mg,纯化倍数为1.80。



注:100%+为硫酸铵饱和度100%之后离心所得的上清液。

图3 硫酸铵溶液的饱和度对凝集活力的影响

Fig. 3 Effect of saturation of ammonium sulfate on PHA

2.2.2 DEAE-52 阴离子交换层析 离子交换层析主要是依据物质的分子大小、酸碱性和极性的差异而使其分离。菜豆凝集素的等电点(pI)根据文献[7]所查为5.5~6.0之间,阴离子交换层析所选用缓冲液pH值应大于pI值,因此本试验所用的DEAE-52为阴离子交换树脂,选用pH值为8.0的0.01 mol/L的Tris-HCl溶液为缓冲液。如图4所示,峰1为含0.05 mol/L NaCl的0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液洗脱下来的峰,峰2为含0.15 mol/L NaCl的0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液洗脱下来的峰,峰3为含0.5 mol/L NaCl的0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液洗脱下来的峰,峰4为含1 mol/L NaCl的0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液洗脱下来的峰。经过血凝活性检测,发现峰2、峰3具有血凝活性,而峰1、峰4无血凝活性。合并具有血凝活性的各管,检测蛋白质浓度为5.7 mg/g,凝集总活力为 1.65×10^6 HU,特异性活力为37 050.75 HU/mg,纯化倍数为1.85。

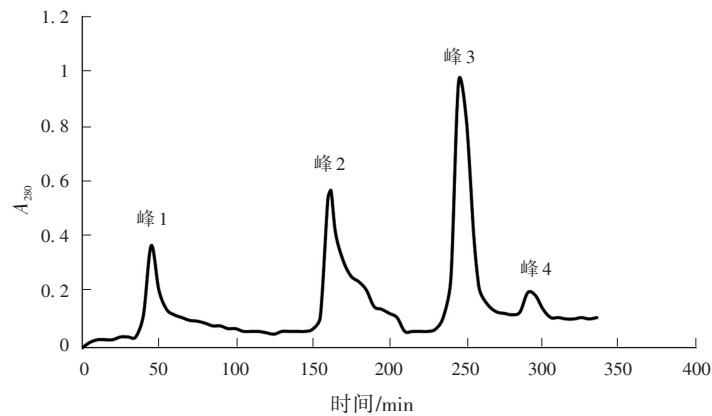


图4 DEAE-52阴离子交换层析

Fig. 4 DEAE-52 anion exchange chromatography

2.2.3 Superdex-200 凝胶过滤层析 凝胶过滤层析主要是根据蛋白质的分子大小进行分离,Superdex-200是一种以葡聚糖和琼脂糖为基质的交联凝胶,其不溶于水且具有不同孔隙度的立体网状结构,分子较大的蛋白质不经过网状结构,先被洗脱出来,分子较小的蛋白质会进入网状结构,后被洗脱出来,这样就会根据分子的大小先后出现数个峰值。如图5所示,样品经Superdex-200层析出现两个较为明显的峰值,经过血凝活性检测,两个峰均有血凝活性。经过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯度,如图6所示,泳道3为Superdex-200层析峰1,为单一条带,纯度较高,并且其蛋白质大小与菜豆凝集素标品相同,约为120 ku左右;泳道4为Superdex-200层析峰2,有较多杂质,需再过一次分子筛纯化。对峰1进行含量检测,蛋白质含量为0.214 mg/g,凝集总活力为 1.03×10^5 HU,特异性活力为45 040.64 HU/mg,

纯化倍数为2.25。

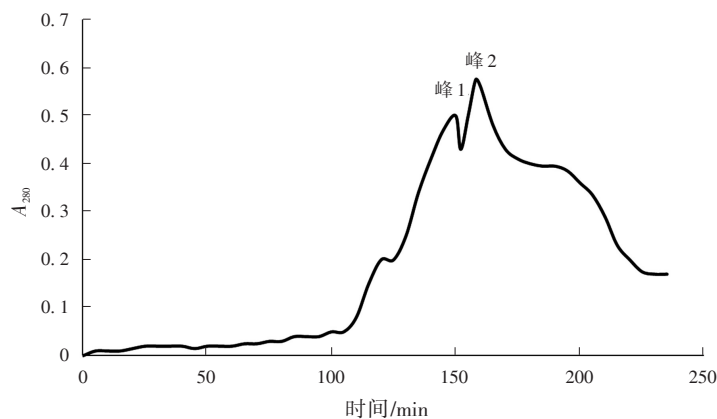
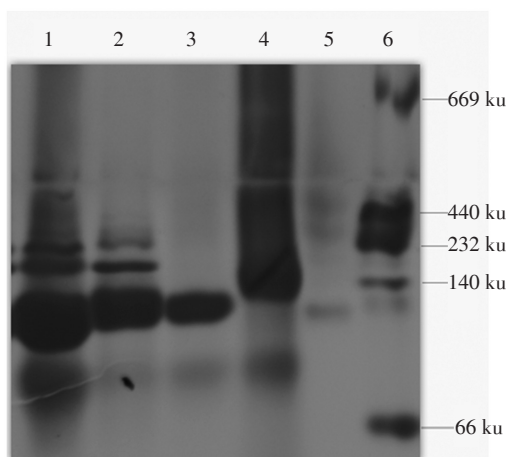


图5 Superdex-200凝胶过滤层析

Fig. 5 Superdex-200 gel filtration chromatography



注:泳道1为DEAE-52阴离子交换层析峰3;泳道2为DEAE-52阴离子交换层析峰2;泳道3为Superdex-200凝胶过滤层析峰1;泳道4为Superdex-200凝胶过滤层析峰2;泳道5为菜豆凝集素标品;泳道6为Marker。

图6 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 6 Native-PAGE

3 讨论

单纯地利用一种纯化方法很难获得高纯度的样品,因而目前较为常用的分离纯化方法多为数种纯化方法相结合。如先盐析粗提,透析除盐,再上亲和层析柱;或者先盐析粗提,透析除盐,再上阴/阳离子交换层析柱和凝胶过滤层析柱(分子筛)。当被纯化物质的特异性结合糖基已知时,可以使用亲和层析。如果糖结合特异性未知,则主要使用阴/阳离子交换层析和凝胶过滤层析(分子筛)的组合。而本研究中菜豆凝集素的糖结合特异性还未知,因而利用DEAE-52阴离子交换层析与Superdex-200凝胶过滤层析相结合,获得了纯度较高的菜豆凝集素。

使用离子交换层析纯化样品时,首先要根据目的蛋白质的pI值来选择合适的柱填料和缓冲溶液^[13]。当选择的柱填料或缓冲溶液不对时,目的蛋白质不会吸附在层析柱上,可能会直接被洗脱下来,达不到所期望的纯化效果,甚至会导致目的蛋白质大量流失。本试验中目的蛋白质的pI值为5.5~6.0之间,因而选用pH值为8.0的0.01 mol/L的Tris-HCl溶液为缓冲液,顺利获得目的蛋白质。但是单纯的阴离子交换层析还未能将杂蛋白质完全排除,因而本试验在其后再进行一次凝胶过滤层析,并最终获得纯度较高的菜豆凝集素。

4 结语

笔者以菜豆鲜荚为材料,研究了菜豆凝集素的提取、分离和纯化工艺。优化后菜豆植物凝集素的提取工艺技术参数为:料液比1:25,pH值6~8,浸提时间8h,提取剂为PBS。菜豆浸提液经硫酸铵分级沉淀、透析、DEAE-52阴离子交换层析、超滤浓缩、Superdex-200凝胶过滤层析、冷冻干燥后可获得纯度较高的菜豆凝集素。样品经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测为单一条带,血凝法检测有血凝活性。试验结果为大量提取、纯化菜豆凝集素提供了技术依据,也为后期进一步研究菜豆凝集素的理化性质提供了高纯度的样品。

参考文献(References)

- [1] SHANG R, WU H, GUO R, et al. The diversity of four anti-nutritional factors in common bean[J]. Horticultural Plant Journal, 2016, 2(2):97-104.
- [2] 李明,黄涌,梁戈清,等.一起四季豆食物中毒的调查研究[J].中国卫生监督杂志,1998,5(5):203-204,202.
- [3] 李佳楠,杨薇,彭娜,等.菜豆毒性分析及毒性预测模型建立[J].中国农业科学,2015(4):727-734.
- [4] LIU Y Q, WU H, CHEN H, et al. A gene cluster encoding lectin receptor kinases confers broad-spectrum and durable insect resistance in rice [J]. Nature Biotechnology, 2014, 33(3):301-305.
- [5] VENTURELLI G L, BROD F C, ROSSI G B, et al. A specific endogenous reference for genetically modified common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) DNA quantification by real-time PCR targeting lectin gene [J]. Molecular Biotechnology, 2014, 56(11):1060-1068.
- [6] FRASSINETTI S, GABRIELE M, CALTAVUTURO L, et al. Antimutagenic and antioxidant activity of a selected lectin-free common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in two cell-based models [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2015, 70(1):35-41.
- [7] 王超.豆类凝集素的提取分离及纯化[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2013.
- [8] 王永刚,王世伟,李云春,等.考马斯亮蓝G-250与牛血清白蛋白的相互作用研究[J].现代食品科技,2016(1):89-94.
- [9] 郭饶君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,2005.
- [10] 娄在祥,王洪新.刀豆凝集素提取分离条件的优化及其凝集活性[J].江苏农业学报,2008(2):216-218.
- [11] 蔡茜茜,洪永祥,汪少芸.黑芸豆中新型凝集素的分离纯化及其功能活性[J].中国食品学报,2015(6):96-101.
- [12] 罗瑞鸿.木豆凝集素的提纯、部分性质及生物学活性研究[D].南宁:广西大学,2006.
- [13] VAJDA J, WEBER D, STEFANIAK S, et al. Mono- and polyprotic buffer systems in anion exchange chromatography of influenza virus particles [J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1448:73-80.

(责任编辑:陈 旷)