

## 蒜头果蛋白的纯化鉴定及分析

杨 敏<sup>1,2</sup>

(1. 云南农业大学 香料研究所, 昆明 650201; 2. 云南大学 教育部自然资源药物化学重点实验室, 昆明 650091)

**摘要:**采用粉碎、磷酸盐缓冲溶液浸提、硫酸铵沉淀、疏水色谱层析等分离手段,从蒜头果种仁中分离纯化蒜头果蛋白,并对其相对分子质量、氨基酸组成、等电点、中性糖含量、自由巯基含量、细胞活性等进行分析。结果表明:蒜头果蛋白是一种糖蛋白,含有18种氨基酸,等电点为4.6,相对分子质量为61 875 Da,由A、B 2条链通过二硫键连接而成,蒜头果蛋白对Hela和Vero细胞具有强烈的细胞毒性。蒜头果蛋白作为一种新的蛋白质,有较好的药用价值。

**关键词:**蒜头果;蒜头果蛋白;分离纯化

中图分类号:TS201.1;TQ028 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)04-0024-05

### Purification, identification and analysis of malanin from *Malania oleifera*

YANG Min<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Flavour and Fragrance, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China;

2. Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource,

Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** Malanin was isolated from *Malania oleifera* seed kernel by homogenization, extraction with phosphate buffered solution, precipitation by ammonium sulfate and hydrophobic chromatography. The relative molecular weight, amino acid composition, isoelectric point, neutral sugar content, free sulfhydryl content and cell activity were analyzed. The results showed that the malanin was a glycoprotein containing 18 kinds of amino acids, with relative molecular weight of 61 875 Da and isoelectric point of 4.6, and it was linked with two bands of A-chain and B-chain by one or more disulfide bonds. The cytotoxicities of malanin to Hela and Vero cells were very strong. The malanin was a novel protein with good medicinal value.

**Key words:** *Malania oleifera*; malanin; isolation and purification

蒜头果(*Malania oleifera* Chun et S. Lee)又名马兰后、咪民、猴子果、山桐果等<sup>[1]</sup>,常绿乔木,属铁青树科(Olacaceae)蒜头果属,是我国特有单种属稀有植物。蒜头果是国家二级保护树种,广西重点保护野生植物,仅分布于广西西部和云南东南部的狭窄地带,生长于石灰岩的山坡、山脚杂木林中土壤湿润肥沃的地方。国外无蒜头果资源也未见有关蒜头果的研究报道,国内植物学家对蒜头果研究的历史也很短,直到1980年,广西植物研究所的李树刚教授

才正式发表蒜头果的拉丁名为*Malania oleifera*,并将其置于铁青树科。蒜头果种仁富含油脂,含油率高达51.85%~67.0%,油中脂肪酸主要为油酸、棕榈酸和硬脂酸等,为良好的木本油料<sup>[2]</sup>。蒜头果油中含有二十四碳-15-烯酸,其是一种长链单不饱和脂肪酸,具有活跃脑细胞,治疗身体免疫缺乏性疾病、心血管疾病等功用,是合成麝香酮的理想原料<sup>[2]</sup>。目前有关蒜头果的研究并不多,且主要侧重在种质资源调查<sup>[3]</sup>、育苗技术<sup>[4]</sup>、营林、濒危机制<sup>[5]</sup>、所含油脂的利用等方面<sup>[6]</sup>,对蒜头果蛋白的研究鲜有报道。

本文以蒜头果种仁为原料,通过粉碎、抽提、硫

收稿日期:2019-08-28;修回日期:2019-12-15

作者简介:杨 敏(1970),女,助理研究员,主要从事药物和香料的开发研究工作(E-mail)asmm1234@sina.com。

酸铵沉淀、疏水色谱层析等分离手段,分离纯化出蒜头果蛋白,分析测定了其相对分子质量、氨基酸组成、等电点、中性糖含量等基本理化指标及细胞活性,为蒜头果蛋白作为新药的研发奠定基础,为蒜头果资源的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

蒜头果种仁,购自云南文山。Hiprep 16/10 Phenyl FF (High Sub, 20 mL)层析柱,Amersham公司;考马斯亮蓝 G-250; $\beta$ -巯基乙醇,Amresco公司;其余试剂均为国产分析纯。

Amersham AKTA explorer 100 蛋白纯化系统,Amersham Hoefer SE260 蛋白质电泳系统,HITACHI CR21G 高速冷冻离心机,CHRIST ALPHA1-4 真空冷冻干燥机,Amersham 小型湿法电转仪,Molecular Devices Corporation Spectra Max190 超级酶标仪。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 蒜头果蛋白的提取、纯化

将蒜头果种仁捣碎,加入 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中 4℃ 浸提过夜,纱布过滤,离心去除不溶物,上清液加入 30%~80% 硫酸铵梯度沉淀。用少量去离子水溶解沉淀,离心,收集沉淀充分透析,真空冷冻干燥得粗蛋白干粉。用 20 mmol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(内含 25 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )平衡疏水预装柱 Hiprep 16/10 Phenyl FF (High Sub)后,沉淀用 20 mmol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液溶解后进样,用去离子水按 0%~100% 线性梯度洗脱,流速为 4 mL/min,按峰高用分部收集器收集目标蛋白(malanin)。

#### 1.2.2 纯度鉴定

SDS-PAGE 检测产物纯度:分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 3%,考马斯亮蓝 G-250 染色<sup>[7]</sup>。蒜头果蛋白取样量为 20  $\mu\text{L}$ ,在处理蒜头果蛋白样品时,为了验证蒜头果蛋白中的二硫键,分别在上样缓冲液中一个加入 5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇,另一个则不加  $\beta$ -巯基乙醇,在相同条件下各煮沸 5 min 变性后,再进行 SDS-PAGE 以进行比较。

#### 1.2.3 相对分子质量的测定

样品送至上海中科新生命生物科技有限公司采用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)测定。

#### 1.2.4 氨基酸含量的测定

用 6 mol/L 盐酸将蒜头果蛋白回流煮沸 24 h 左右,使之水解成游离的氨基酸,采用氨基酸自动分析

仪分析各氨基酸的含量。

采用碱水解-荧光分光光度法测定色氨酸含量。在蛋白质的氢氧化钠水解液中,能检测到色氨酸和酪氨酸的荧光。在 pH 为 11 时,色氨酸的荧光强度比酪氨酸的大 100 倍,且两种氨基酸的荧光峰相差 40 nm,因此在有大量酪氨酸存在的情况下可用荧光分光光度法测定色氨酸含量。实验方法按文献[8]进行,在荧光分光光度计上,测定蒜头果蛋白氢氧化钠水解液的荧光强度。根据色氨酸标准溶液的荧光强度曲线,计算蒜头果蛋白色氨酸含量。

#### 1.2.5 等电点的测定

将蒜头果蛋白干粉样品送至上海中科新生命生物科技有限公司采用平板等点聚焦法(IEF-PAGE)测定蒜头果蛋白的等电点。

#### 1.2.6 中性糖含量的测定

##### 1.2.6.1 标准曲线的制作

采用硫酸苯酚法<sup>[9-11]</sup>进行中性糖含量的测定。以葡萄糖作为标准,参照袁燕等<sup>[12]</sup>的方法在波长 490 nm<sup>[13]</sup>下测定不同质量浓度的葡萄糖溶液的吸光度,以葡萄糖溶液质量浓度( $Y$ )为纵坐标,吸光度( $X$ )为横坐标绘制标准曲线,得到标准曲线回归方程: $Y=0.00807+0.03152X(R=0.99814)$ 。

##### 1.2.6.2 样品中性糖含量的测定

取已知质量浓度的蒜头果蛋白溶液 250  $\mu\text{L}$  于 2 mL 离心管中(2 个平行样),加入 150  $\mu\text{L}$  6% 的苯酚,涡旋混匀,再迅速滴入 750  $\mu\text{L}$  浓硫酸,涡旋混匀,于 90℃ 水浴 20 min。待样品冷却至室温后每个样品吸取 200  $\mu\text{L}$  转移至 96 孔酶标板于酶标仪上读取 490 nm 处的吸光度,计算中性糖含量。中性糖含量 =  $V \times w/m \times 100\%$ ,式中: $V$  为样品稀释后的体积, $w$  为由标准曲线得出的糖质量浓度, $m$  为样品的质量。

#### 1.2.7 蒜头果蛋白质谱鉴定

应用 SDS-PAGE 将蒜头果蛋白分离出蒜头果蛋白-A 和蒜头果蛋白-B 2 条蛋白带,从胶中切取目的蛋白条带,经脱色液脱色,二硫苏糖醇还原,碘乙酰胺烷基化,胰蛋白酶酶解,三氟乙酸萃取和用 ZipTip C18 柱脱盐处理,将制备好的样品与基质按 1:1 混匀后点于靶上,采用 MALDI-TOF-MS 分析(激光波长 337 nm,加速电压 20 kV,正离子模式检测,质谱信号为单次扫描累加)对蛋白质进行鉴定<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.8 自由巯基含量的测定

DTNB(Ellman's reagent)可以与巯基结合,形成

的复合物在 412 nm 处有光吸收,因而可以用此法对蛋白中的自由巯基定量。实验参照文献[15]进行。

取一块 96 孔酶标板,选取一块 4 mm × 4 mm 的区域每孔加入 DTNB 工作液 200  $\mu$ L、50  $\mu$ L Tris - HCl 缓冲溶液(1 mol/L Tris - HCl, pH 8.0)、50  $\mu$ L DTNB 贮液(2 mmol/L DTNB, 50 mmol/L 乙酸钠)、100  $\mu$ L 蒸馏水,再分别加入 50  $\mu$ L 160  $\mu$ mol/L 胰蛋白酶(由 PDB 结构数据库查询得知胰蛋白酶不含自由巯基,可作为阴性对照)、蒜头果蛋白、BSA(由 PDB 结构数据库查得每分子 BSA 含 1 个自由巯基,可作为阳性对照),空白对照加入 50  $\mu$ L 蒸馏水,每个样品设置 4 个复孔,37  $^{\circ}$ C 放置 10 min,于酶标仪上读取 412 nm 处的吸光度。

### 1.2.9 蒜头果蛋白的细胞活性测定

将 Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)和 HeLa(人宫颈癌细胞)在含有 10% 灭活小牛血清的 DMEM 培养液内,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下的培养箱中培养 24 h,同时将蒜头果蛋白干粉配成质量浓度分别为 50、10、1、0.1  $\mu$ g/mL 的溶液,在无菌室的超净工作台上用一次性过滤器(0.22  $\mu$ m)过滤除菌后,点样(50  $\mu$ L/孔),继续在培养箱中培养 1 d 后,用倒置显微镜观察结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蒜头果蛋白的分离纯化

图 1 为 280 nm 下蒜头果蛋白分离纯化的疏水色谱层析图。从图 1 可以看出,在 280 nm 下吸收值最大的吸收峰即为蒜头果蛋白。另外,在蒜头果蛋白分离纯化过程中发现,硫酸铵沉淀时,最佳的硫酸铵饱和度区间是 30% ~ 50%,是蛋白集中沉淀区。

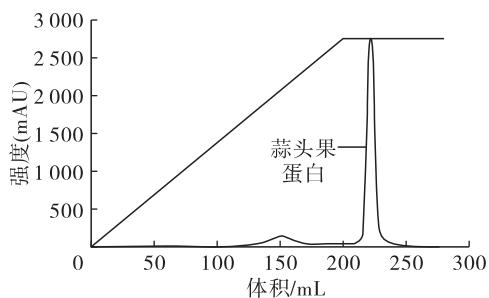
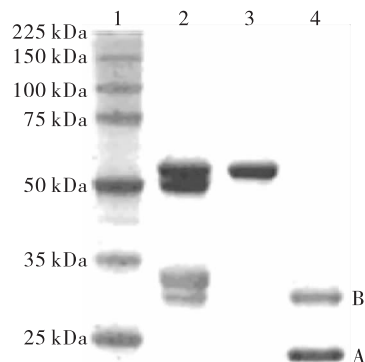


图 1 蒜头果蛋白分离纯化的疏水色谱层析图

### 2.2 蒜头果蛋白的纯度鉴定

图 2 为蒜头果蛋白的 SDS - PAGE 图。由图 2 可见,非还原的蒜头果蛋白样品只有 1 条非常清晰的条带,说明蒜头果蛋白纯度比较高,而用  $\beta$  - 巯基乙醇处理后还原的蒜头果蛋白则被裂解成 A、B 2 条带,说明蒜头果蛋白是一种双链蛋白质。



注:1. 标准蛋白; 2. 粗蛋白; 3. 非还原的蒜头果蛋白; 4. 还原处理的蒜头果蛋白。

图 2 蒜头果蛋白的 SDS - PAGE 图

### 2.3 蒜头果蛋白的相对分子质量

图 3 为蒜头果蛋白 B 链的质谱图。B 链的表观相对分子质量约为 30 kDa(见图 2),结合图 3 可知, B 链相对分子质量为 29 444.7 Da,前面出现的两个峰分别为二价峰和三价峰。经基质辅助激光解吸飞行时间质谱测定完整的蒜头果蛋白相对分子质量为 61 875 Da,因而 A 链相对分子质量为 32 430.3 Da。

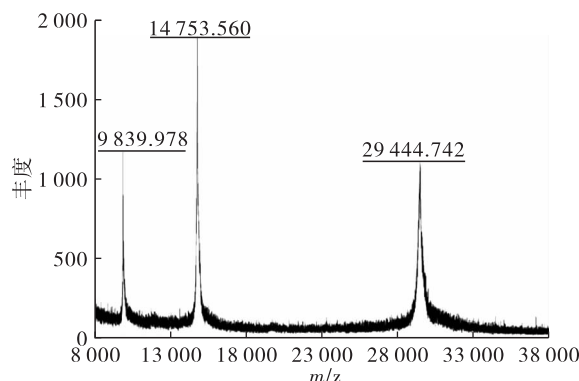


图 3 蒜头果蛋白 B 链的质谱图

### 2.4 蒜头果蛋白的氨基酸含量

蒜头果蛋白的氨基酸组成测定结果见表 1。由表 1 可见,蒜头果蛋白中含有 18 种氨基酸,其中天冬氨酸含量最高,蛋氨酸含量最低。

表 1 蒜头果蛋白的氨基酸组成 %

氨基酸	摩尔分数	氨基酸	摩尔分数	氨基酸	摩尔分数
天冬氨酸	13.8	谷氨酸	11.2	丝氨酸	7.9
组氨酸	1.8	甘氨酸	7.1	苏氨酸	5.9
精氨酸	6.5	丙氨酸	5.7	酪氨酸	3.7
半胱氨酸	0.9	缬氨酸	6.6	蛋氨酸	0.6
苯丙氨酸	4.2	异亮氨酸	4.0	亮氨酸	7.9
赖氨酸	2.8	脯氨酸	5.2	色氨酸	4.2

### 2.5 蒜头果蛋白等电点

蒜头果蛋白的平板等点聚焦电泳图如图 4 所示。由图 4 可见,蒜头果蛋白的等电点约为 4.6。



注:图中左边泳道为Marker,从上往下依次为pH 9.6、pH 8.2、pH 8.0、pH 7.8、pH 7.5、pH 7.1、pH 7.0、pH 6.5、pH 6.0、pH 5.1、pH 4.75、pH 4.5,右边泳道为蒜头果蛋白。

图4 蒜头果蛋白的平板等点聚焦电泳图

## 2.6 蒜头果蛋白中性糖含量

SDS-PAGE中蒜头果蛋白能被高碘酸-Schiff(PAS)染成紫红色,说明其是一种糖蛋白。实验测得蒜头果蛋白中性糖含量为6.0%,蒜头果蛋白的A链中性糖含量为10.4%,B链不含糖。

## 2.7 蒜头果蛋白的质谱鉴定

按照1.2.7方法,采用MALDI-TOF-MS和ESI-MS/MS分别测得A链和B链肽质量酶谱,在蛋白质PeptIdent数据库中进行检索,没有发现与蒜头果蛋白相匹配的蛋白质序列,因此可以确定蒜头果蛋白为新蛋白质。

## 2.8 蒜头果蛋白自由巯基含量

蒜头果蛋白自由巯基含量的测定结果见表2。

表2 DTNB法测定蒜头果蛋白自由巯基的含量

样品	$A_{412}$
空白	$0.105 \pm 0.000577$
胰蛋白酶	$0.103 \pm 0.00115$
蒜头果蛋白	$0.108 \pm 0.00153$
BSA	$0.245 \pm 0.000577$

由表2可知,与DTNB工作液反应后,蒜头果蛋白、胰蛋白酶溶液的 $A_{412}$ 与空白相近,而BSA溶液的 $A_{412}$ 明显高出许多。可据此得出结论:蒜头果蛋白不含自由巯基。

## 2.9 蒜头果蛋白细胞活性

按1.2.9方法,发现点样后培养1d就可以观察到细胞的病变,用倒置显微镜观察,开始时有部分细胞紧缩,然后可见整片的细胞呈网状,继而细胞发生崩解。与阴性对照比较,蒜头果蛋白表现出非常强烈的细胞毒性,即使在 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,Hela和Vero细胞2d后全部死亡。图5、图6分别为观测的未加蒜头果蛋白、加蒜头果蛋白( $0.1 \mu\text{g/mL}$ )培养的Hela细胞。

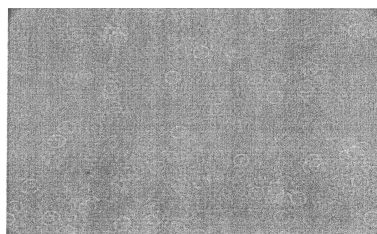


图5 未加蒜头果蛋白培养的Hela细胞

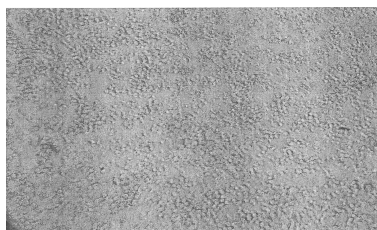


图6 加蒜头果蛋白( $0.1 \mu\text{g/mL}$ )培养后的Hela细胞

有研究发现蒜头果蛋白能抑制肝癌细胞HepG-2的生长<sup>[16]</sup>,对白血病HL-60细胞的生长具有明显的抑制作用,且呈一定的剂量和时间依赖性<sup>[17]</sup>,具有明显抑制人白血病K562细胞体外生长的作用<sup>[18]</sup>。

## 3 结论

本研究采用磷酸盐缓冲溶液浸提、硫酸铵沉淀、疏水色谱层析得到了高纯度的蒜头果蛋白(malanin)。实验发现最佳的硫酸铵饱和度区间是30%~50%,是蛋白集中沉淀区。蒜头果蛋白含有18种氨基酸,相对分子质量为61875 Da,等电点为4.6,中性糖含量为6.0%,由A、B链通过二硫键连接而成。本研究发现蒜头果蛋白具有抑制Hela和Vero细胞体外生长的作用,且毒性非常大,具有用于免疫毒素治疗癌症的应用前景。蒜头果蛋白的理化性质以及细胞毒理学有待进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] 丘华兴,林有润. 中国植物志:第二十四卷[M]. 北京:科学出版社,1988:89-90.
- [2] 欧乞铎. 一个重要脂肪酸CIS-TETRCOS-15-ENOIC的新存在——蒜头果油[J]. 云南植物研究,1981,3(2):181-184.
- [3] 王才明,黄仕训,王燕. 广西国家级珍稀濒危保护植物种质资源调查研究[J]. 广西植物,1994,14(3):277-288.
- [4] 潘晓芳. 蒜头果育苗情况初报[J]. 广西农业生物科学,1999,18(3):236-238.
- [5] 梁月芳,吴曙光,黎向东. 蒜头果的濒危原因研究[J]. 广西植物,2003,23(5):404-407.
- [6] 赖家业,兰健,曹毅. 蒜头果组织培养再生系统的初步研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2005,42(4):739-843.

(下转第31页)

平板烘干机出来的糖浆豆皮经过气流干燥并输送到立式烘干灭酶机,进一步去水和灭酶,直至达到产品要求。

### 3.6 节能降耗

本工艺技术均采用化工过程能量综合技术的方法论——夹点技术,运用相关软件进行逐一反复运算,力求所有能量都能够充分发挥作用,具体成果如表5所示。

表5 节能降耗成果(4万t/年)

二次蒸汽源	换热器	节约水蒸气量/(kg/t)
卧式圆盘干燥机	预蒸发器	130
立式脱溶干燥机	第三效蒸发器	300
第一蒸发器	第二效蒸发器	330
闪蒸汽	乙醇预热器	80
冷凝水	浸出器	60
节能合计		900

注:热源为200℃过热水蒸气,汽耗潜热按2 225 kJ/kg计算,原料处理量8 t/h。

由表5可知,全流程能量平衡后水蒸气消耗节约900 kg/t(以原料计),节能降耗效果显著。

### 3.7 智能化控制

本技术装备电控部分是在西门子的PLC控制系统上进行了二次开发。本系统实现了全智能化运行,系统根据现场实际情况自主调整全套生产线的工作状态,有效降低人为操作的干扰,提高生产稳定性和安全性,可以实现对温度、压力、流量、液位、物位等参数的现场检测、远程控制及管理。当系统运行出现故障现场无法有效解决时,工程技术人员可通过远程的方式,及时对整个控制系统进行监控和操作,及时对故障作出分析和判断,迅速高效地排除

(上接第27页)

- [7] 任金琪,刘建东,周曾芬. 一种大规模、快速的幽门螺杆菌脲酶分离纯化方法研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2006,28(S1):361-364.
- [8] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物营养成分测定法[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,1991:2528.
- [9] SEGARRA E, LAO E, LOPEZ-TAMAMES E, et al. Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharides levels in winemaking products[J]. Am J Enol Viticult, 1995,46:564-570.
- [10] 达胡白乙拉,乌仁,任晓娟,等. 荞麦花多糖的提取及含量测定[J]. 光谱实验室,2007,24(2):116-118.
- [11] 季宇东,汲晨锋. 野西瓜成熟果实中多糖的含量测定及毛细管电泳分析[J]. 中国药学杂志,2006,41(15):1186-1189.
- [12] 袁燕,戴晓畅,郭丽红,等. 蒜头果蛋白性质的鉴定及其中性糖含量的测定[J]. 安徽农业科学,2009,37(31):

故障,保证系统的正常稳定运行。

## 4 应用效果

将该工艺用于4万t/年SPC生产线上,主要消耗指标见表6。

表6 主要消耗指标

项目	指标
电耗/(kW·h/t)	135
蒸汽消耗/(kg/t)	960
乙醇消耗/(kg/t)	4

注:表中消耗指标以原料质量计。

## 5 结束语

综上所述,开发的醇法制备大豆浓缩蛋白工艺技术装备生产的大豆浓缩蛋白产品指标能够满足市场要求,各项消耗指标均为国际领先水平,智能化程度高;废水零排放,环境友好,副产品得到综合利用;产品市场需求巨大,有广阔的发展前景。目前我们已经联合相关企业和大专院校在装备超大型化、进一步优化工艺、进一步节能降耗、进一步提高产品质量、进一步拓展市场等方面进行更加深入的创新研究。

### 参考文献:

- [1] 黄庆生. 我国饲料行业发展现状与趋势[J]. 北方牧业,2018(23):7.
- [2] 董季,林凤岩. 醇法制备大豆浓缩蛋白工艺[J]. 中国油脂,2008,33(6):24-25.
- [3] 赵捍东,刘瑞莲,王军. 卧式圆盘连续干燥机在醇法大豆浓缩蛋白加工中的应用[J]. 中国油脂,2013,38(2):96-97.
- [4] 曹瑞军,郑圣军,申燕. 立式脱溶干燥机在醇法大豆浓缩蛋白加工中的应用[J]. 中国油脂,2014,39(9):80-82.
- [5] 15097-15098.
- [13] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Anal Biochem, 1956,28(3):350-356.
- [14] HEILMANN R M, SUCHODOLSKI J S, STEINER J M. Purification and partial characterization of canine calprotectin[J]. Biochimie, 2008,90(9):1306-1315.
- [15] BULAJ G, KORTEMME T, GOLDENBERG D P. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides[J]. Biochemistry, 1998,37(25):8965-8972.
- [16] 张薇. 蒜头果蛋白诱导 HepG-2 细胞凋亡的研究[D]. 昆明:云南民族大学,2015.
- [17] 陈睿彦. 蒜头果蛋白(malanin)诱导的人白血病 HL-60 细胞凋亡及其机制研究[D]. 昆明:云南大学,2009.
- [18] 袁燕,张薇,李彬,等. 蒜头果蛋白对人白血病 K562 细胞体外生长的抑制作用[J]. 食品工业科技,2014,35(20):379-382.