

波叶青牛胆胰蛋白酶抑制剂的纯化及其性质研究^{*}

曾 英, 桑玉英, 胡金勇, 李志坚

(中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 采用亲和层析及电泳制备等方法, 从防己科植物波叶青牛胆 (*Tinospora crispa*) 根茎中分离到一种胰蛋白酶抑制剂 TCTI。对其性质研究表明: TCTI 的相对分子量约为 10.0 kD, 对牛胰蛋白酶的抑制常数 K_i 为 2.08×10^{-7} mol/L (BAPNA 为底物时), 摩尔抑制比为 1:3.5, 是一种抑制活力很强的竞争性抑制剂。TCTI 具有很高的耐热性, 在 100℃ 加热 60 min, 仍保持 93% 的抑制活力。另外, TCTI 在低温容易结晶。

关键词: 波叶青牛胆; 胰蛋白酶抑制剂; 分离和纯化

中图分类号: Q 946 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2700(2002)01-0103-06

Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Tinospora crispa*

ZENG Ying, SANG Yu-Ying, HU Jin-Yong, LI Zhi-Jian

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: A trypsin inhibitor named TCTI was isolated from the rhizomes of *Tinospora crispa* (Menispermaceae) by trichloroacetic acid precipitation, salting out, chromatography on trypsin-Sepharose 4B and SHyper™ 10 FPLC column, preparative PAGE and electroelution. The relative molecular weight of TCTI was 10.0 kD by SDS-PAGE. The inhibition of trypsin by the TCTI was competitive, with a K_i value of 2.08×10^{-7} mol/L (BANPA as substrate) and the mole ratio was about 1:3.5. TCTI was heat-tolerating. When heated up to 100℃ for 60 min, it still had 93% residual activities. On the other hand, TCTI can be easily crystallized under lower temperature.

Key words: *Tinospora crispa*; Trypsin inhibitor; Isolation and purification

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine protease inhibitor, 简称 serpin) 普遍存在于动物、植物、微生物体内。已从慈姑、苦瓜籽等植物中分离得到胰蛋白酶抑制剂, 分子量从 3.0 kD 到 60.0 kD 不等, 对胰蛋白酶的抑制程度也各有不同。来自植物的丝氨酸蛋白酶抑制剂有的在植物体内已经存在, 有的受病原感染而诱导产生。蛋白酶抑制剂被认为是植物天然的自我防御体系, 是植物抗病基因工程的重要目的基因来源 (卢晓风等, 1998)。另一方面, 丝氨酸蛋白酶抑制剂的分子量一般比较小而且稳定, 在自然界含量丰富, 活性明确。因此

* 基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (1999CX077M)

收稿日期: 2000-12-12, 2001-03-26 接受发表

作者简介: 曾 英 (1965-) 女, 研究员, 主要从事植物蛋白与基因资源的研究。

丝氨酸蛋白酶抑制剂非常适合于研究蛋白质的分子进化、蛋白质结构与功能的关系及蛋白质分子间的相互作用机制等。因此,寻找新型的、高活性的丝氨酸蛋白酶抑制剂具有重要的理论和应用价值。

波叶青牛胆 (*Tinospora crispa*) 属于防己科的一种藤本植物,是传统的中草药。由于它有发达的根系,因此具有“千里找根”的佳话。茎由痂浆包裹。根茎有清热解毒,通经活血的功能。可用于治疗骨折、挫伤、刀伤、毒蛇咬伤、痢疾、腹胀等疾病。本文报道波叶青牛胆胰蛋白酶抑制剂 (TCTI) 的分离纯化及其生化特性研究结果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

波叶青牛胆 (*Tinospora crispa*) 根茎采自西双版纳,洗净后于 -20°C 备用。CNBr-activated-Sephrose 4B 为 Pharmacia 产品;低分子量标准蛋白为 GibcoBRL 产品;牛胰蛋白酶 (Trypsin)、大豆胰蛋白酶抑制剂 (Soybean Trypsin Inhibitor)、牛血清白蛋白、Acrylamide (Acr) 为 Sigma 产品;N, N - Methylene-bis-acrylamide (Bis) 为 Fluka 产品;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 制备固相化胰蛋白酶

鸡卵类粘蛋白 (ovomucoid) 的制备和亲和纯化胰蛋白酶参照张龙翔 (1997) 的方法进行。固相化鸡卵类粘蛋白和固相化胰蛋白酶的制备参照 Pharmacia 产品 CNBr-activated-Sephrose 4B 的操作说明书。

1.3 波叶青牛胆胰蛋白酶抑制剂 (TCTI) 的制备

根茎经高速组织捣碎机捣碎后,用 0.1 mol/L pH 5.0 NaAc-HAc 缓冲液提取 24 h, $6\text{ }160\times g$ 离心 30 min 弃沉淀,在上清液中缓慢加入 30% 的三氯乙酸至最终浓度为 3.0%,在 4°C 放置 2 h, $36\text{ }200\times g$ 离心 20 min,所得上清液调 pH 至中性后 80°C 加热 10 min, $36\text{ }200\times g$ 离心 20 min 取上清液,加固体硫酸铵至 80% 饱和度, 4°C 下静置过夜,离心收集沉淀,用少量双蒸水溶解,对亲和平衡液 (0.1 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 内含 0.05 mol/L CaCl_2) 充分透析, $43\text{ }400\times g$ 离心 15 min 后直接上胰蛋白酶-Sephrose 4B 亲和柱,收集活性洗脱峰,经阳离子柱 FPLC (S HyperDTM 10, Beckman) 进一步纯化。最后通过电泳制备获得纯化的 TCTI。通过 SDS-PAGE (Rosenberg, 1996) 鉴定蛋白质的纯度。

1.4 胰蛋白酶抑制剂的活性测定

以 BAPNA 为底物 (Godbole 等, 1994) 测定胰蛋白酶和胰蛋白酶抑制剂的活性,待测抑制剂与 0.05 mol/L , pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液共 0.8 mL,加入 0.2 mL 牛胰蛋白酶 (0.1 mg/mL),在 37°C 保温 5 min,加 BAPNA 溶液 2.5 mL (1 mmol/L), 37°C 反应 5 min,立即加入 0.5 mL 33% 醋酸溶液终止反应,以不加抑制剂的试样为对照,在 410 nm 处测定吸收值 (光程 1 cm)。酶活性单位定义为:在实验条件下,使 $\text{OD}_{410\text{nm}}$ 达到 0.1 所需的酶量为 1 个 BAPNA 单位;抑制剂活性单位定义为:在相同条件下,降低 1 个酶活性单位所需的抑制剂量。

1.5 抑制剂的分子量测定 (SDS-PAGE)

参照 Rosenberg (1996) 的方法,采用低分子量蛋白电泳的 SDS-PAGE 系统。分离胶浓度为 16.5% ($C=6\%$),浓缩胶浓度为 4% ($C=2.67\%$),凝胶厚度 0.75 mm。电泳条件为 180 V 恒压, 10°C 水循环。以相对迁移率为横坐标,标准蛋白分子量的对数 ($\log\text{MW}$) 为纵坐标,得出线性方程,计算目的蛋白的相对分子量。

1.6 抑制剂对温度稳定性实验

TCTI 用 0.05 mol/L , pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液溶解 ($5\text{ }\mu\text{g/mL}$),分别在 20、40、60、80 和 100°C 恒温下处理 30 min 和 60 min,迅速冷却,取 0.2 mL TCTI 溶液按前述方法测定其抑制活性。

1.7 抑制动力学实验

以 BAPNA 为底物, 浓度分别为 0.4、0.6、0.8 和 1 mmol/L, 按前述方法测定反应速度, 根据 Lineweaver - Burk 作图法, 确定 TCTI 的抑制类型和抑制常数。

1.8 蛋白质含量

蛋白质含量测定采用考马斯亮兰染色法 (李建武等, 1994)。

2 结果与讨论

2.1 TCTI 的分离纯化

波叶青牛胆根茎提取物经 3.0% 三氯醋酸、80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析以及亲和柱层析, 得到抑制剂粗品。经阳离子柱 FPLC (S HyperD™ 10, Beckman) 进一步分离得到具有强抑制活性的峰 1 (图 1), 用含明胶的常规 PAGE 检测峰 1 (桑玉英等, 2001), 发现有多条带具有胰蛋白酶抑制活性 (图 2a)。最后通过常规 PAGE 和电泳脱获得纯化的 TCTI, 经 SDS - PAGE (图 2b) 检测显示单一谱带。各纯化步骤的活性回收见表 1, 经过这些纯化步骤, TCTI 可被纯化 22 倍, 收率为 17%。

根据 TCTI 的相对迁移率, 由线性方程计算得出 TCTI 的相对分子量约为 10.0 kD。

表 1 TCTI 的分离纯化

Table 1 Purification of the trypsin inhibitor from *Tinospora crispa*

纯化步骤 purification step	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (U)	比活力 Specific activity (U·mg ⁻¹)	活性回收 Yield (%)
抽提液, Crude extract	200	40800	204	100
TCA 处理, TCA soluble	159	38340	241	94
热变性, heat soluble	100	30310	303.1	74.3
80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	84	29736	354	72.9
亲和层析 Affinity chromatography	21	18000	857	44
S HyperD™ 10. FPLC	2.63	14490	5520	35.5
电泳制备 Preparative native - PAGE	1.5	6796	4531	17

2.2 抑制曲线和抑制类型

为保证测定抑制剂活性时底物是过量的, 实验了一定底物浓度下胰蛋白酶浓度与反应速度的关系, 确定反应系中底物 BAPNA 为 1.1 mg, 酶量为 20 μg 时, 反应都呈线性关系, 从而保证了在抑制曲线和抑制类型的测定时底物是过量的; 反应时间确定为 5 min, 以保证酶反应是在初速度范围内。

取不同量的 TCTI 按方法 1.4 测定 TCTI 对胰蛋白酶抑制曲线 (图 3), 根据线性方程可知当 TCTI 为 2.3835 μg 时 (BAPNA 作为底物), 即可饱和 20 μg 的胰蛋白酶。从而得出 TCTI 对胰蛋白酶的重量抑制比为 1:8.4, 摩尔抑制比为 1:3.5 (胰蛋白酶的分子量 23.4 kD)。另外, 在相同条件下测定了大豆胰蛋白酶抑制剂的抑制比活力为 2 736 U/mg, TCTI 的抑制比活力为 4 531 U/mg, TCTI 明显高于大豆胰蛋白酶抑制剂。

按 Lineweaver - Burk 做图法, 以 BAPNA 为底物, 在胰蛋白酶的反应初速度范围内进行 TCTI 的抑制动力学实验, 确定 TCTI 为竞争性抑制类型 (图 4)。根据胰蛋白酶与 BAPNA 反应的线性方程 $a(y = 4.4236x + 1.1477)$ 计算 K_m 为 3.854×10^{-3} mol/L; 根据

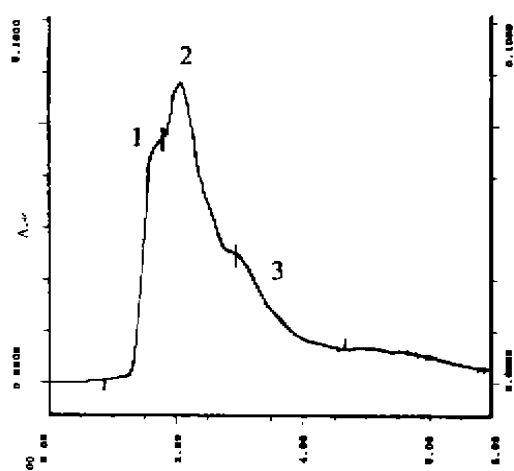


图1 TCTI 和 FPLC 层析

平衡液: 0.05 mol/L, pH 7.0 Tris - HCl 柱: S HyperD™ 10 蛋白纯化柱流速: 0.6 mL/min

Fig.1 Elution profile of TCTI on S HyperD™10

FPLC column

The column was eluted with pH 7.0, 0.05 mol/L Tris - HCl. Proteins were monitored by 280 nm absorption. Flow rate was 0.6 mL/min.

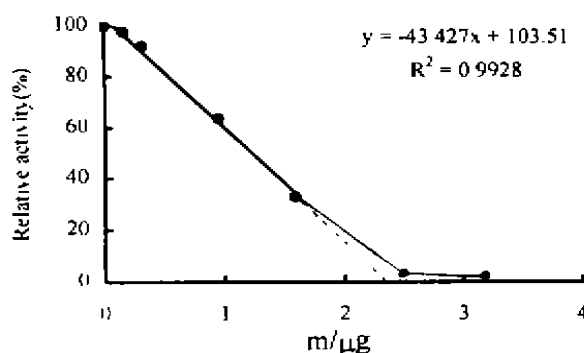


图3 TCTI 对胰蛋白酶的抑制曲线

Fig.3 Inhibition of TCTI to trypsin

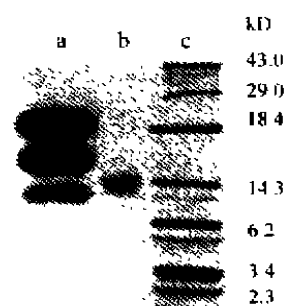


图2 PAGE 检测 TCTI

a. 含明胶的常规 PAGE (峰1); b. 纯化的 TCTI (TSDS - PAGE); c. 标准分子量蛋白质 (TSDS - PAGE)

Fig.2 PAGE of TCTI

a. Native PAGE containing gelatin; b. Purified TCTI (TSDS - PAGE); c. Standard proteins (TSDS - PAGE)

TCTI ($0.318 \mu\text{g}$, 与酶保温的体积 1.0 mL) 抑制胰蛋白酶与 BAPNA 反应的线性方程 c ($y = 5.978x + 1.345$), 按公式 $K_m' = K_m (1 + [I] / K_i)$ 计算得出抑制常数 K_i 为 $2.08 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。根据 TCTI ($0.159 \mu\text{g}$, 与酶保温的体积 1.0 mL) 抑制胰蛋白酶与 BAPNA 反应的线性方程 b ($y = 5.2072x + 1.2576$), 计算抑制常数 K_i 为 $2.14 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。 K_i 值远小于 K_m 值, 说明抑制剂和酶亲和力大过酶和底物的亲和力。因而, 波叶青牛胆胰蛋白酶抑制剂是一种抑制活力很强的抑制剂。

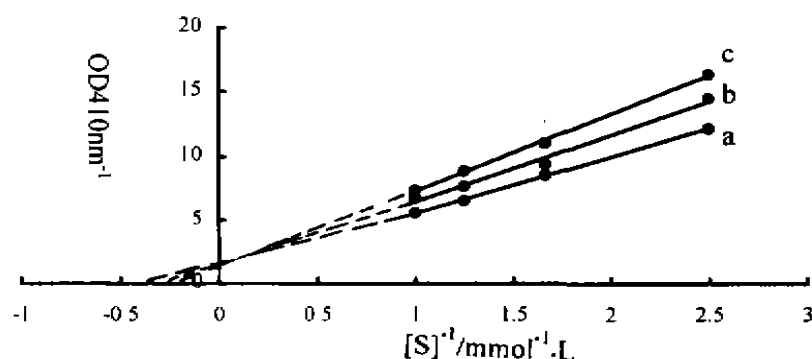


图4 抑制动力学作图

a. 不含 TCTI; b. TCTI 0.159 μg ; c. TCTI 0.318 μg

Fig.4 Lineweaver - Burk plots of Trypsin activity

a. Without TCTI; b. TCTI 0.159 μg ; c. TCTI 0.318 μg

2.3 抑制剂的稳定性

TCTI 经不同温度、不同时间处理后,以 BAPNA 为底物按方法 1.4 测定抑制活力的变化(图 5),结果表明,在 100℃ 加热 30 min 后, TCTI 对胰蛋白酶的抑制活性无明显变化;即使在 100℃ 的受热时间延长为 60 min,仍保持 93% 的抑制活力,可见 TCTI 具有极高的热稳定性。

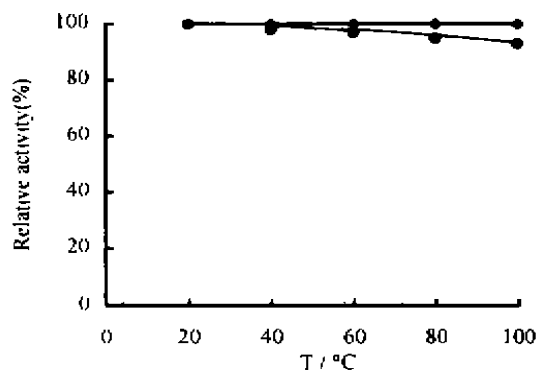


图5 TCTI 的热稳定性

◆ 30 分钟, □ 60 分钟

Fig.5 Heat stability of TCTI at different temperature

◆ 30 min, □ 60 min

此外,经测定发现 TCTI 对胰蛋白酶有较强的抑制专一性,对胃蛋白酶、木瓜蛋白酶未表现抑制作用。

本实验室已从天南星科植物海芋分离到胰蛋白酶抑制剂(王东等,1996)。本文报道的波叶青牛胆胰蛋白酶抑制剂 TCTI,就多肽类抑制剂的重量抑制比而言, TCTI 仅次于抑制活力最强的天花粉胰蛋白酶抑制剂(谭复隆等,1985),后者的重量抑制比为 1:10。我们在实验过程中发现 TCTI 在低温容易结晶。根据上述特性,推测 TCTI 在蛋白质结构上可能存在特别之处,有可能成为研究蛋白质结构与功能的理想材料。

〔参考文献〕

- 李建武, 萧能庚, 余瑞元等, 1994. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 174—176
- 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 1997. 生化实验方法和技术, 第二版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 129—133
- Godbole SA, Krishna TG, Bhatia CR, 1994. Purification and characterization of protease inhibitors from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) seeds [J]. *J Sci Food Agric*, 64: 87—93
- Liu XF (卢晓凤), Xia YX (夏玉先), Pei Y (裴炎), 1998. Roles of plant proteinase inhibitors in the resistance of plant against insects and pathogens [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物物理与生物化学进展), 25 (4): 328—333
- Rosenberg IM, 1996. Protein Analysis and Purification [M]. Boston: Birkhauser
- Sang YY (桑玉英), Hu JY (胡金勇), Zeng Y (曾英), 2001. A fast method for the detection of trypsin inhibitors using polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 23 (2): 236—238
- Tan FL (谭复隆), Zhang GD (张国梯), Mu JF (慕见凤), et al, 1985. Study on the peptide double-headed trypsin inhibitor from trichosanthes [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 17 (4): 530—537
- Wang D (王东), Ji BR (季本仁), Zeng Y (曾英), et al, 1996. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from *Alcea macrostachya* [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 18 (4): 454—458