



植物环蛋白的薄层层析显色反应

许文彦^{①②}, 唐军^{①②}, 嵇长久^{①②}, 贺文军^{①②}, 谭宁华^{①*}

① 中国科学院昆明植物研究所, 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204;

② 中国科学院研究生院, 北京 100049

* 联系人, E-mail: nhtan@mail.kib.ac.cn

2007-10-09 收稿, 2007-11-19 接受

国家杰出青年科学基金(批准号: 30725048)和中国科学院西部之光项目资助

摘要 用碘、碘化铯钾、茚三酮和考马斯亮蓝 G-250 四种显色剂对包括植物环蛋白在内的 3 种寡肽以及氨基酸和蛋白质在薄层层析板上进行了 5 组显色反应研究. 结果表明, 可以综合考马斯亮蓝 G-250 和水解前后对茚三酮的显色来识别环蛋白. 应用该显色方法开展了三色堇、紫花地丁、如意草、木鳖子和苦瓜等 5 种植物的环蛋白的检测和纯化工作, 均检测出环蛋白, 并分离获得十多个环蛋白, 鉴定了其中的 3 个, 为已知环蛋白 cycloviolacin O2, kalata B1 和 vary peptide A.

关键词
环蛋白
薄层层析
显色反应

植物环肽(plant cyclopeptides)^[1~4]一般是指高等植物中主要由氨基酸肽键形成的一类环状含氮化合物. 目前发现的植物环肽主要是由 2 至 37 个 L-构型的编码或非编码氨基酸组成, 其研究历史可以追溯到 19 世纪 80 年代, 自 1959 年第一个植物环肽结构确定, 1964 年提出环肽生物碱概念和 2006 年定义植物环肽为止, 从约 25 科 65 属 120 种高等植物中已发现 450 多个植物环肽, 分为以下 8 个类型: 环肽生物碱(I)、缩酚酸环肽(II)、茄科类型环肽(III)、荨麻科类型环肽(IV)、菊科类型环肽(V)、石竹科类型环肽(VI)、茜草科类型环肽(VII)和环蛋白(VIII).

植物环蛋白(cyclotides)^[1,5]也称堇菜科类型环肽(violaceae-type cyclopeptides), 是植物体内一类富含二硫键, 由 28 至 37 个氨基酸残基通过肽键首尾连接的大环肽. 其分子中除了含有首尾相连的环状骨架外, 还存在 6 个非常保守的半胱氨酸残基, 它们两两之间形成三对二硫键, 其中的两对二硫键和环状骨架形成一内环, 而第三对二硫键则穿过这一内环形成一独特的环状胱氨酸结(cyclic cystine knot, CCK). 植物环蛋白的 CCK 结构特征使其特别稳定, 能耐常规的酶解和酸解. 最早的植物环蛋白报道为 20 世纪 70 年代早期关于非洲热带茜草科植物 *Oldenlandia*

affinis 的报道, 挪威医生 Lorents Gran 发现非洲扎伊尔等地妇女临产前常饮用该植物煎制的茶来催产, 后经其研究从该植物的沸水提取物中发现了一种具有子宫收缩作用的多肽(即 kalata B1)^[6]. 当时通过氨基酸分析只确定了其大多数氨基酸残基和环状特性, 直到 1995 年才由 Craik 等^[7]通过二维核磁共振谱和距离限制模拟退火计算分析(distance-restrained simulated annealing)解析出其氨基酸序列、环状骨架和三维结构. 至今人们已从堇菜科、茜草科和葫芦科十多种植物中发现了近百个环蛋白分子. 植物环蛋白具有广泛而多样的生物活性, 如子宫收缩、抗 HIV、神经紧张素抑制剂、抗微生物活性、胰蛋白酶抑制剂、细胞毒活性和杀虫活性等. 基于环蛋白在堇菜科堇菜属植物中具有组织特异性表达的特点, Craik 等认为环蛋白在植物体内可作为防御性多肽而起杀虫和抗菌的作用, 提出环蛋白可能是一类新的植物防御多肽家族. 环蛋白一方面由于其内在的活性可能被直接用作药物或作为新药研究的先导结构; 另一方面由于其精确的三维结构、高稳定性和其中一些环(loop)中氨基酸残基的可变性, 可连接其他活性新颖的物质而可能成为在多肽药物设计上非常有用的骨架结构^[8].

2000年我们报道了一种检测植物环肽的薄层层析新方法^[9],其原理是植物环肽类化合物在薄层板上实行原位酸水解、游离出N端后再用茚三酮试剂显色.应用该法我们已分离发现了一百多个石竹科类型环肽,该法重复性好,灵敏度高,曾很好地指导了我们在环肽的分离纯化工作,极大地提高了环肽的分离效率.2005年我们在植物小环肽研究基础上,展开了植物环蛋白的研究工作,其间发现原有环肽检测方法在环蛋白的识别中存在不足.本文用碘、碘化铯钾、茚三酮和考马斯亮蓝 G-250 四种显色剂对包括植物环蛋白在内的 3 种寡肽以及氨基酸和蛋白质在薄层层析板上进行了 5 组显色反应研究,建立了环蛋白的新的薄层层析显色反应.应用该显色方法开展了三色堇、紫花地丁、如意草、木鳖子和苦瓜等 5 种植物的环蛋白的检测和纯化工作^[10],均检测出环蛋白,分离获得十多个环蛋白,鉴定了其中的 3 个为已知环蛋白 cycloviolacin O2^[11], kalata B1^[7]和 vary peptide A^[12].

1 材料与方法

(i) 试剂与材料. 常用的氨基酸显色剂有茚三酮^[13]等,蛋白质显色剂有茚三酮^[14]、考马斯亮蓝、双缩脲试剂、Folin 酚试剂^[15]等.考虑到显色方法的简便性和显色对象的广泛性,选择了茚三酮和考马斯亮蓝作为显色剂,我们还选取了通常作为生物碱显色剂的碘和碘化铯钾^[13]作为参考.为了使考马斯亮蓝 G-250 能适用于薄层层析而且对分子量相对较小的环蛋白更为敏感,我们还改进了其配方,配法如下:用 20 mL 乙醇溶解 100 mg 考马斯亮蓝 G-250,然后加入 20 mL 磷酸,以 50%乙醇定容至 200 mL.茚三酮显色剂为 0.2 %的茚三酮乙醇溶液.碘为固体碘.碘化铯钾试剂即改良的 Dragendorff 试剂,配法如下:0.85 g 次硝酸铯溶于 10 mL 冰醋酸,加水 40 mL 为甲液;8 g 碘化钾溶于 20 mL 水中为乙液;1 mL 甲乙液等体积混合液,加 2 mL 醋酸和 10 mL 水混合即得.

我们选取了脯氨酸(P, 亚氨基酸)、赖氨酸(K, 碱性氨基酸)、谷氨酸(E, 酸性氨基酸)、甲硫氨酸(M, 非极性氨基酸)和色氨酸(W, 极性氨基酸)作为各类型氨基酸代表,为上海康达氨基酸厂生产的生化试剂.太子参环肽 B[HB, cyclo-(PPPIFGGL)]^[16]和 cycloviolacin O2[cyclo-(CGESCVWIPCISSAIGCSCKSKVCYRNGIP)]^[11](图 1)为本实验室自行纯化样品,直链肽 HB [PPPIFGGL]为苏州天马医药集团生产的固相合成肽,

牛血清蛋白(BSA)购自 Sigma 公司.硅胶板为青岛美高集团有限公司生产的预制硅胶板(0.20~0.25 mm).其他试剂为天津市试剂二厂生产的分析纯试剂.

(ii) 样品制备. 称取 2.1~2.4 mg 氨基酸用 1 mL 去离子水溶解,称取 2.2 mg HB 用 1 mL 分析纯甲醇溶解,称取 2.1 mg 直链肽 HB 用 1 mL 去离子水溶解,称取 2.1 mg cycloviolacin O2 用 1 mL 70%乙醇溶解,称取 2.2 mg BSA 用 1 mL 去离子水溶解.

(iii) 环肽和环蛋白的显色. 取 5 块相同的 30 mm×50 mm 硅胶 G 板,将样品分别点在板子上,用 BAW 系统(正丁醇:醋酸:水 = 3:1:1, 体积比)系统展开.挥掉溶剂后,板 1, 2, 5 分别用碘、碘化铯钾和考马斯亮蓝 G-250 显色.茚三酮显色时,板 3 搁置,而板 4 悬于底部加有约 1 mL 新鲜浓盐酸的密闭的磨口玻璃缸中(耐酸和耐高温玻璃缸),置于已升温至 110°C 的烘箱中,加热水解 2 h,冷却后取出板 4,在通风柜中挥掉盐酸;然后将未经水解的板 3 和加热酸水解的板 4 同时喷洒 0.2%茚三酮乙醇试剂,用电吹风加热几分钟即可显色.

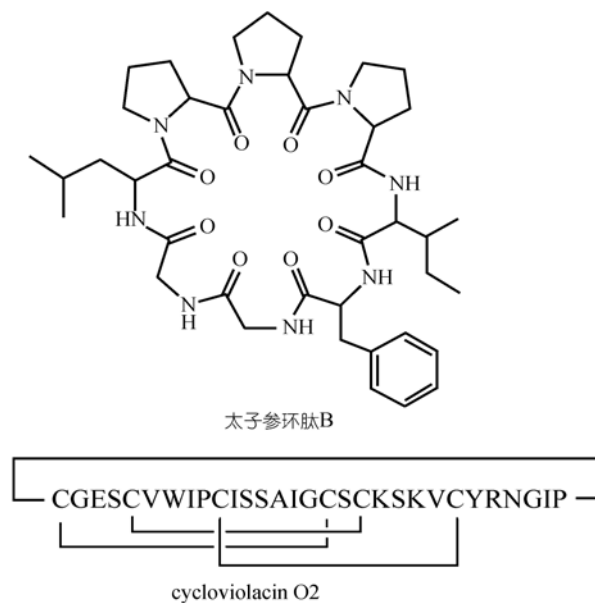


图 1 太子参环肽 B 和 cycloviolacin O2 的结构

(iv) 环蛋白的显色量下限. 2.1 mg/mL 的 cycloviolacin O2 溶液用 70%乙醇分别按 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 稀释,未展开直接进行显色或用 BAW 系统(正丁醇:醋酸:水 = 3:1:1, 体积比)展开后显色.

2 结果与讨论

2.1 薄层层析显色

碘是通用显色剂, 碘化铋钾是生物碱显色剂, 环肽、直链肽和蛋白质应用它们能显色, 但大部分氨基酸不显色, 专一性不强. 茚三酮薄层原位检测方法是环肽的显色方法, 应用该法能将环肽和环蛋白与直链肽、蛋白质和氨基酸区分开来, 即环肽和环蛋白在水解后对茚三酮显紫红色或黄色, 水解前则不显色或只有微弱的红色斑点, 直链肽、蛋白质和氨基酸在水解前后对茚三酮的显色变化不明显. 考马斯亮蓝 G-250 是蛋白质显色剂, 应用考马斯亮蓝 G-250 可以识别环肽和环蛋白, 环蛋白对 G-250 呈正反应, 而环肽不显色, 即在薄层层析板上环蛋白显青色, 背景显红色. 蛋白质极性大, 展开后在原点附近, 容易识别, 在图中未画出. 综合以上显色反应结果, 可以判断供试样品中是否含有环蛋白(表 1, 图 2).

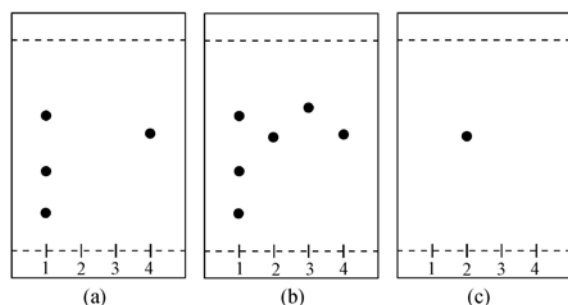


图 2 氨基酸、环蛋白、环肽和直链肽的 3 种显色反应结果示意图

(a)~(c)分别为: 水解前茚三酮显色、水解后茚三酮显色和考马斯亮蓝 G-250 显色, 点样顺序 1~4 分别为: 氨基酸混合样、环蛋白(cycloviolacin O2)、环肽(HB)和直链肽(直链肽 HB). 层析条件: 硅胶 G 板, 展开剂为正丁醇:醋酸:水(3:1:1, 体积比). (a)和(b)为白色背景上的紫红色或黄色斑点, (c)为红色背景上的青色斑点

2.2 茚三酮和考马斯亮蓝 G-250 显色的灵敏度

在实验中, 我们发现环蛋白的上样量为 2 μg 时(浓度为 0.21 mg/mL 的 cycloviolacin O2, 上样体积为

10 μL), 水解后茚三酮显色不明显, 而 G-250 显色仍比较清晰, 这提示我们样品在进行检测之前需要浓缩, 以防漏检.

2.3 水解时间对显色反应的影响

一般小分子环肽只需水解 0.5~1 h 即可用茚三酮显色; 但环蛋白的环状胱氨酸结使其分子对酸水解有一定抗性, 酸度和水解时间须保证, 实验结果表明环蛋白需要用新鲜的浓盐酸饱和蒸气 110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 2 h 后才能用茚三酮显色.

环蛋白的高级结构相当保守, 故此我们推测水解 2 h 可以保证打开所有环蛋白骨架, 而从本实验室的应用来看, 也没有出现过漏检.

2.4 应用

在本方法的检测下, 开展了堇菜科堇菜属(*Viola*)和葫芦科苦瓜属(*Momordica*) 5 种植物即紫花蔓地丁(*Viola labridorica*)、三色堇(*V. tricolor*)、如意草(*V. hamiltoniana*)、苦瓜(*Momordica charantia*)和木鳖子(*M. cochinchinensis*)的环蛋白的检测和纯化工作^[10], 均检测出环蛋白, 分离获得十多个环蛋白, 鉴定了其中的 3 个为已知环蛋白 cycloviolacin O2^[11], kalata B1^[7]和 vary peptide A^[12].

3 结论

考马斯亮蓝 G-250 是一种常用的蛋白质显色剂, 主要应用在蛋白质凝胶电泳染色中, 其原理是利用该染料与蛋白质的分子间相互作用而染色, 其中分子量较大的环蛋白能与之发生相互作用而染色, 而分子量较小的环肽则不能染色. 在考马斯亮蓝 G-250 的配制中, 我们提高了 G-250 和酒精的浓度; 高浓度的 G-250 提高了灵敏度, 酒精浓度的提高使显色后溶剂较快挥干, 从而减少样品的扩散, 从而使考马斯亮蓝 G-250 能较好地应用于硅胶薄层层析上. 2000 年我们报道的方法^[9]成功地将环肽区分于其他生物碱, 极

表 1 氨基酸、环蛋白、环肽、直链肽和蛋白质对不同显色剂的显色反应结果^{a)}

	氨基酸	环蛋白	环肽	直链肽	蛋白质
碘	- 或+或+++	+++	+	+	+
碘化铋钾	- 或+	+++	- 或+	+	+++
茚三酮(水解前)	+++	- 或+	-	+++	+
茚三酮(水解后)	+++	+++	+++	+++	+++
考马斯亮蓝 G-250	-	+	-	-	+++

a) - 表示不显色; +表示显色; +++表示显色明显

大地提高了植物环肽的分离效率。本文引入考马斯亮蓝 G-250 显色反应后, 可以较好地地区分环蛋白和小分子环肽, 这一方法重现性较好, 有一定的灵敏度, 专一性强, 有利于发现环蛋白, 不仅能有效地预测某种植物提取物是否含有环蛋白, 还可以指导环蛋白的分离和纯化。

参考文献

- 1 Tan N H, Zhou J. Plant cyclopeptides. *Chem Rev*, 2006, 106(3): 840—895
- 2 Gournelis D C, Laskaris G G, Verpoorte R. Cyclopeptide alkaloids. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products Vol. 75*. New York: Springer, 1998. 1—179
- 3 Itokawa H, Takeya K, Hitotsuyanagi Y, et al. Macrocyclic peptide alkaloids from plants. In: *The Alkaloids Vol. 49*. New York: Academic Press, 1997. 301—387
- 4 Craik D J, Simonsen S, Daly N L. The cyclotides: Novel macrocyclic peptides as scaffolds in drug design. *Curr Opin Drug Discovery Dev*, 2002, 5(2): 251—260
- 5 Simonsen S M, Sando L, Ireland D C, et al. A continent of plant defense peptide diversity: Cyclotides in Australian *Hybanthus* (Violaceae). *Plant Cell*, 2005, 17(11): 3176—3189
- 6 Gran L. Oxytotic principles of *Oldenlandia affinis*. *Lloydia*, 1973, 36(2): 174—178
- 7 Saether O, Craik D J, Campbell I D, et al. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry*, 1995, 34(13): 4147—4158
- 8 Craik D J, Daly N L, Mulvenna J, et al. Discovery, structure and biological activities of the cyclotides. *Curr Protein Pept Sci*, 2004, 5(5): 297—315
- 9 Zhou J, Tan N H. Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(20): 1825—1831
- 10 唐军, 谭宁华, 许文彦, 等. 植物环蛋白的结构研究. *云南植物研究*, 2008, 待发表
- 11 Craik D J, Daly N L, Bond T, et al. Plant cycotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structure motif. *J Mol Biol*, 1999, 294: 1327—1336
- 12 Claeson P, Goransson U, Johansson S, et al. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. *J Nat Prod*, 1998, 61(1): 77—81
- 13 曹治权. 层析显色试剂手册. 北京: 中国商业出版社, 1986. 61—73
- 14 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 等. 生物化学. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2002. 139
- 15 夏其昌, 曾嵘, 曹兴军, 等. 蛋白质化学与蛋白质组学. 北京: 科学出版社, 2004. 8—9
- 16 Tan N H, Zhou J, Chen C X, et al. Cyclopeptides from the roots of *Pseudostellaria heterophylla*. *Phytochemistry*, 1993, 32(5): 1327—1330