

一种具有胰蛋白酶抑制活性的半夏蛋白的纯化与 N端氨基酸序列分析

王厚伟

(山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘要:目的 分离纯化具有胰蛋白酶抑制活性的半夏蛋白, 分析其对胰蛋白酶的抑制活性、抑制机制与N端氨基酸序列。方法 采用以胰蛋白酶为配体的亲和色谱和 Sephadex G-50 凝胶过滤法, 从半夏蛋白粗提液的 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀中分离纯化活性半夏蛋白; 采用 12% SDS-PAGE 鉴定其纯度, 并估算其相对分子质量; 采用 Edman 降解法分析其N-端氨基酸序列。结果 纯化的活性半夏蛋白经 SDS-PAGE 检测呈现单一条带, 相对分子质量为 1.4×10^4 ; 比活力为 1 059.012 U/mg, 活力回收率为 24.40%; 对胰蛋白酶的质量抑制比为 1:4.72, 抑制常数(K_i)为 7.17×10^{-6} mol/L; 其N端前6个氨基酸残基顺序为 DPVVDG。结论 该活性半夏蛋白是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 为胰蛋白酶的竞争性抑制剂。

关键词:半夏蛋白; 胰蛋白酶抑制剂; 分离纯化; N端氨基酸序列

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)07-1320-04

Purification of a protein with trypsin-inhibiting activity from *Rhizoma Pinelliae* and analysis of its N-terminal amino acid sequence

WANG Hou-wei

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: Objective To purify a *Rhizoma Pinelliae* protein, determine its inhibiting activity and mechanism to trypsin, and analyze its N-terminal amino acid sequence. **Methods** Active *Rhizoma Pinelliae* protein was purified from the 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sediment of the crude extracted protein from *Rhizoma Pinelliae* by affinity chromatography of trypsin-Sepharose CL 4B and gel filtration of Sephadex G-50; 12% of SDS-PAGE was used for determining the purity of the purified *Rhizoma Pinelliae* protein and estimating its molecular weight; N-terminal amino acid sequence of active *Rhizoma Pinelliae* protein was analyzed by Edman degradation. **Results** The purified active *Rhizoma Pinelliae* protein showed a single band on SDS-PAGE gel, which estimated molecular weight was about 1.4×10^4 , its specific activity was 1 059.012 U/mg, and the yield was about 24.40%; The N-terminal sequence of the preceding six amino acid residues of active *Rhizoma Pinelliae* protein was DPVVDG; The quality inhibiting ratio of active *Rhizoma Pinelliae* protein to trypsin was 1:4.72, and the K_i value, the inhibition constant was about 7.17×10^{-6} mol/L. **Conclusion** Active *Rhizoma Pinelliae* protein is a kind of serine protease inhibitor, a competitive inhibitor to trypsin.

Key words: *Rhizoma Pinelliae* protein; trypsin inhibitor; isolation and purification; N-terminal amino acid sequence

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的块茎, 含有生物碱、有机酸、蛋白等成分, 在中医临床上可单独或配伍使用, 用于多种疾病的治疗, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结, 消肿止痛的功效, 对多种肿瘤细胞的增殖也具有抑制作用^[1,2]。胰蛋白酶抑制剂广泛存在于动、植物及微生物体内, 是一种主要对丝氨酸蛋白酶系的多种蛋白水解酶活性具有抑制作用的小分子蛋白质。胰蛋白酶抑制剂可与蛋白酶的活性部位和变构部位结

合, 抑制酶的催化活性或阻止酶原转化为有活性的酶, 它在一系列的生理病理过程中起着关键性的调控作用, 是机体免疫系统的重要组成部分。因此本实验采用以胰蛋白酶为配体的亲和色谱法从生半夏中分离纯化得到一种具有胰蛋白酶抑制活性的半夏蛋白, 并对其抑制活性与N端氨基酸序列进行分析。

1 材料与试剂

ABI491A 型氨基酸测序仪(PE 公司), FD-1D-50 外挂式冻干机(上海)。

收稿日期: 2008-02-29

基金项目: 山东省教育厅资助项目(J06L17); 山东省优秀中青年科学家奖励基金资助项目(2007BSB14087); 山东省中药理论与技术创新团队资助项目

作者简介: 王厚伟(1973—), 山东日照人, 讲师, 主要研究方向中药生物工程。Tel: (0531)82613129 E-mail: houweiw@163.com

半夏鲜品购自山东省菏泽市,经本校鉴定为半夏 *P. ternate*. (Thunb.) Breit. 的块茎。胰蛋白酶与底物 *N*-benzoyl-*DL*-arginine-*p*-nitroaniline (hydrochloride) (BAPNA)均为 Sigma 公司产品;蛋白质相对分子质量标准、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED、Tris 碱、牛血清白蛋白(BSA)均为 Bio-Rad 公司产品;CNBr-activated Sepharose CL-4B、DEAE Sepharose CL-6B、Sephadex-50 均为 Pharmacia 公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 活性半夏蛋白的提取与分离:称取新鲜半夏块茎 100 g,洗净,加入 10×提取缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0, Tris-HCl)匀浆,8 000 r/min 离心 10 min,漂除上层固体脂类物质,收集上清液,冷冻干燥,得半夏总蛋白冻干粉。冻干粉重新溶于适量提取缓冲液中,采用分步盐析法,逐步加入质量浓度为 40%、60%、80% (NH₄)₂SO₄, 4 ℃静置 2 h, 8 000 r/min 离心 10 min,收集各级沉淀,于 4 ℃蒸馏水透析 36 h(透析袋截留相对分子质量范围≥6 000),其间更换透析液 9 次,8 000 r/min 离心 10 min,上清液冷冻干燥,称定质量。

以 BAPNA 为底物,参照文献报道^[3]略有改进,测定胰蛋白酶活性和胰蛋白酶抑制剂的活性。适量样品溶于 0.80 mL Tris-HCl(0.05 mol/L, pH 8.0)缓冲液中,加入 0.10 mg/mL 牛胰蛋白酶 0.20 mL, 37 ℃保温 5 min,加入 1 mmol/L BAPNA 溶液 2.50 mL, 37 ℃反应 5 min,立即加入 0.5 mL 质量浓度为 33%醋酸溶液终止反应。以不加抑制剂的试样为对照,测定 410 nm 处的吸光度(*A*₄₁₀)值。酶活性单位定义为:在实验条件下,使 *A*_{410 nm}达到 0.1 所需的酶量为 1 个 BAPNA 单位。抑制活性单位定义为:在相同条件下,降低 1 个酶活性单位所需的抑制剂的量。蛋白的测定采用 Folin-酚试剂法^[4],以牛血清白蛋白(BSA)作为对照。

半夏总蛋白的各级 (NH₄)₂SO₄ 沉淀结果见表 1,可见总回收率为 96.49%,活性半夏蛋白主要集中于质量浓度为 40% (NH₄)₂SO₄ 沉淀中,比活力是总蛋白的 1.83 倍,活力回收率为 62.38%,沉淀量为 123.67 mg,占总蛋白的 34.13%;质量浓度 60% (NH₄)₂SO₄ 的沉淀量最大,占总蛋白的 56.62%,含有部分活性半夏蛋白,比活力仅为总蛋白的 50%;质量浓度 80% (NH₄)₂SO₄ 的沉淀量最小,检测不到活性半夏蛋白。

2.2 活性半夏蛋白的纯化

2.2.1 亲和色谱分离:参照 Pharmacia 产品说明书(Pharmacia Biotech CNBr-activated Sepharose CL-

表 1 (NH₄)₂SO₄ 盐析法分离活性半夏蛋白粗蛋白及抑制活力检测

Table 1 Isolation of active *Rhizoma Pinelliae* protein in crude protein by salt fractionation with (NH₄)₂SO₄ and determination of its inhibiting activity

组分	总蛋白 /mg	总活力 /U	活力回收率/%	比活力 / (U·mg ⁻¹)
总蛋白	362.33	34 750	100.00	95.91
40% (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	123.67	21 677	62.38	175.81
60% (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	205.14	9 883	28.44	48.18
80% (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	20.81	0	0.00	0.00
总 (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	349.62	31 560	90.82	90.27

4B Instructions, 1998),将适量胰蛋白酶与 CNBr-activated Sepharose CL-4B 偶联,制备亲和载体。以质量浓度为 40% (NH₄)₂SO₄ 沉淀作为活性半夏蛋白粗品,称取 20 mg,溶于 200 mL Tris-HCl 平衡缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0)中,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,上亲和色谱柱,分别用含 1 mol/L NaCl 的平衡缓冲液、蒸馏水和 pH 2.4 的 HCl 酸化水洗柱,收集酸化水洗脱峰,并迅速滴加 2.0 mol/L Tris 溶液中和,合并多次重复上样的洗脱峰用于下一步纯化,见图 1。可见活性半夏蛋白粗品经亲和色谱分离,形成 2 个蛋白峰(*A*_{280 nm}),P1 为盐洗脱峰,未检测到活性半夏蛋白,P2 为亲和吸附的活性峰。

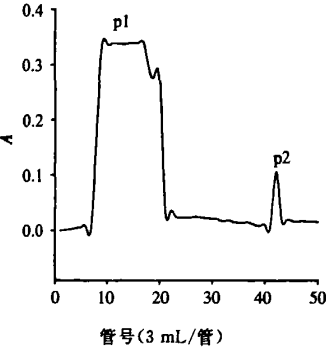


图 1 胰蛋白酶-Sepharose 4B 亲和色谱图谱

Fig. 1 Affinity chromatogram on tyrosin-Sepharose 4B

2.2.2 凝胶过滤纯化: P2 组分经 Tris 溶液中和后,上 Sephadex G-50 色谱柱,以 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)洗脱,见图 2。可见 P2 组分经 Sephadex G-50 分离后,形成 4 个蛋白峰,p1 和 p2 为活性半夏蛋白峰,活性主要集中于 10~16 号试管。2.2.3 SDS-PAGE 检测^[5]:分离胶浓度为 12%,采用考马斯亮蓝 R-250 染色。经 12% SDS-PAGE 纯度检测, Sephadex G-50 分离的活性组分仅 10~12 号试管(p1 峰的前半部分)显示较为单一的蛋白条

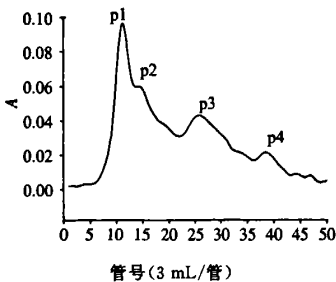


图 2 Sephadex G-50 凝胶过滤图谱

Fig. 2 Chromatogram of Sephadex G-50 gel filtration

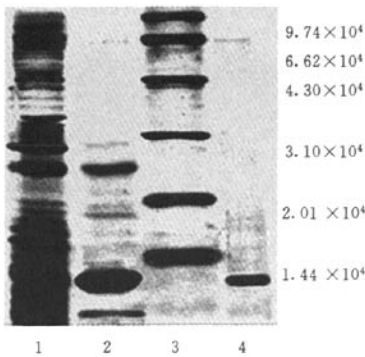
带,估算纯度达 90%以上。收集、合并多次重复上样的 10~12 号试管洗脱液,得纯化的活性半夏蛋白,见图 3。可见活性半夏蛋白粗品蛋白条带复杂,经亲和色谱可去除大部分杂蛋白,仅保留两条明显主带。再经凝胶滤过,获得较为均一的活性半夏蛋白主带,其表观相对分子质量约为 14 000。

各纯化步骤的活性回收见表 2。经亲和和色谱分离后比活提高了 3.45 倍,再经 Sephadex G-50 分离,得到均一组分,活性回收率为 24.40%,活性半夏蛋白纯化倍数为 6.02 倍。

2.3 活性半夏蛋白对胰蛋白酶抑制曲线:以 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液配制 10 $\mu\text{g/mL}$ 活

性半夏蛋白溶液,依次稀释为 5.00、2.50、1.25、0.625 $\mu\text{g/mL}$,测定对胰蛋白酶的抑制活性,制备相应的抑制曲线。结果表明活性半夏蛋白在 0~4 μg 与胰蛋白酶的相对活性之间呈现良好的线性关系,线性方程为 $Y = -23.265 X + 98.659$ ($R^2 = 0.9988$),由此可以计算出饱和 20 μg 的胰蛋白酶所需活性半夏蛋白的量为 4.24 μg (BAPNA 作为底物),活性半夏蛋白对胰蛋白酶的质量抑制比为 1 : 4.72,摩尔抑制比为 1 : 2.82(胰蛋白酶的相对分子质量为 2.34×10^4)。

2.4 抑制动力学实验:BAPNA 底物浓度分别为 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L,测定胰蛋白酶反应速度。根据 Lineveaver-Burk 作图法,在胰蛋白酶的反应初速度范围内,进行活性半夏蛋白的抑制动力学实验,确定抑制类型和抑制常数。由图 4 可见,活性半夏蛋白为竞争性抑制类型;根据胰蛋白酶与 BAPNA 反应的线性方程 $Y = 2.6973 X + 1.3655$ 计算出 K_m 值为 1.98×10^{-3} mol/L;由 0.52 μg 活性半夏蛋白抑制胰蛋白酶与 BAPNA 反应的线性方程 $Y = 6.1667 X + 1.3575$ 计算出 $K_m' = 4.54 \times 10^{-3}$ mol/L,已知反应液活性半夏蛋白的浓度为 9.29×10^{-6} mol/L,根据公式 $K_m' = K_m(1 + [I]/K_i)$,计算得出抑制常数 $K_i = 7.18 \times 10^{-6}$ mol/L;同理,根据 0.15 μg 活性半夏蛋白抑制胰蛋白酶与 BAPNA 反应的线性方程 $Y = 3.6043 X + 1.3255$,计算出抑制常数 $K_i = 7.17 \times 10^{-6}$ mol/L。 $K_i \ll K_m$,说明抑制剂和酶亲和力大于酶和底物的亲和力。因而,活性半夏蛋白是一种抑制活力很强的抑制剂。



1-40 % (NH₄)₂SO₄ 沉淀 2-亲和色谱 3-分子量标记
4-凝胶过滤
1-40 % (NH₄)₂SO₄ sediment 2-affinity chromatograph
3-molecular marker 4-gel filtration

图 3 活性半夏蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of active *Rhizoma Pinelliae* protein

表 2 活性半夏蛋白的分离纯化过程

Table 2 Isolation and purification of active *Rhizoma Pinelliae* protein

纯化步骤	总蛋白 /mg	总活力 /U	比活力 /(U · mg ⁻¹)	活力回收 率/%
40% (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	20	3 516.2	175.81	100
胰蛋白酶-Sepharose 4B 亲和色谱分离	2.19	1 326.5	605.707 8	37.73
Sephadex G-50 凝胶滤过	0.81	857.8	1 059.012	24.40

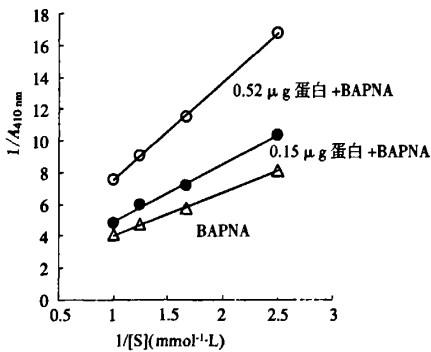


图 4 活性半夏蛋白抑制动力学图

Fig. 4 Inhibitory dynamics of active *Rhizoma Pinelliae* protein

2.5 活性半夏蛋白的 N-端氨基酸序列分析与同源性比较:活性半夏蛋白纯品经 SDS-PAGE 电泳、转膜后,测定 N 端氨基酸序列,见图 5。根据测序结果,可依次读出活性半夏蛋白的 N-端前 6 个氨基酸残基顺序为:1-DPVVDG-6。

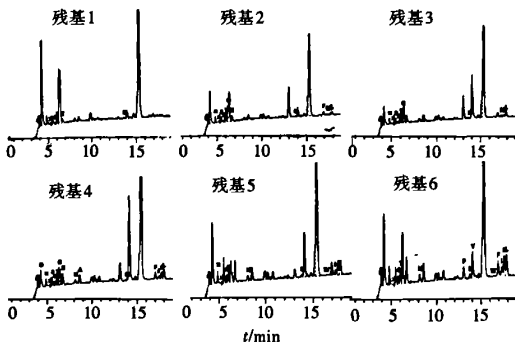


图 5 活性半夏蛋白的 N 末端氨基酸序列分析的 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC Chromatograms of N terminal amino acid sequence of active *Rhizoma Pinelliae* protein

经 NCBI 的 Blast 程序检测,活性半夏蛋白的 N 端前 6 个氨基酸序列与慈菇蛋白酶抑制剂 A、B 完全相同,只有第 6 个氨基酸残基存在差异,前者为甘氨酸残基,后者为丝氨酸残基,二者的同源性高达 80% 以上,见表 3。

表 3 5 种蛋白酶抑制剂 N 端氨基酸序列和同源性比较

Table 3 N Terminal amino acid sequence of five kinds of protease inhibitors and comparison of their homology

编号	名称	N 端氨基酸序列	同源性
	半夏胰蛋白酶抑制剂	1 DPVVDG 6	5/6 (83.33%)
BAA02972.1	慈菇蛋白酶抑制剂 A 前体	25 DPVVDS30	5/6(83.33%)
BAA02973.1	慈菇蛋白酶抑制剂 B 前体	25 DPVVDS 30	5/6(83.33%)
1818181A	慈菇蛋白酶抑制剂 A	1 DPVVDS 6	5/6(83.33%)
1208229A	慈菇蛋白酶抑制剂 B	1 DPVVDS 6	5/6(83.33%)

3 讨论

活性半夏蛋白的 N 端前 6 个氨基酸残基顺序与慈菇丝氨酸蛋白酶抑制剂的 N 端序列高度同源,同源性达 83% 以上;活性半夏蛋白对胰蛋白酶活性具有强烈的抑制作用,与胰蛋白酶之间有很强的亲和力($K_i \ll K_m$)。由此判定,活性半夏蛋白是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,根据 Lineveaver-Burk 作图,其抑制机制为胰蛋白酶的竞争性抑制剂。机体的多种消化酶为丝氨酸蛋白酶,这类酶的活性一旦受到抑制,常常引起腹胀、呕吐、水泻等症状,与生半夏不良反应的临床症状相似。由此推断,活性半夏蛋白为半夏的毒性成分之一,也是一种降逆止呕的药效成分。因为,适当的抑制消化酶活性,可以适度调理和改善机体的消化功能,减轻消化酶对消化道病变部

位的进一步消化损伤。

以半夏总蛋白的 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀作为活性半夏蛋白粗品,获得基本纯化的活性半夏蛋白,活性回收率可达 24.40%,但以总蛋白计算,活性回收率仅为 15.26%。20 mg 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀的抑制活力为 3 516.2 U,略高于按总蛋白的总活力计算得出的活力单位(3 505.62 U),这可能是样品称量和活性测定操作的误差。另外,半夏总蛋白的 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀中也含有活性半夏蛋白,推测该部分活性很可能与 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀的活性成分一致,但也可能是与之不同的物质,鉴于该步沉淀的 RPTI 活性较低(比活力仅为总蛋白的 0.50 倍),故未作进一步分离分析。

多种半夏蛋白的精氨酸或赖氨酸残基可与胰蛋白酶疏水性口袋底部的天冬氨酸残基结合,可以降低以胰蛋白酶为配体的亲和色谱的特异性和分辨率。鉴于活性半夏蛋白与胰蛋白酶之间的亲和力远远大于其他蛋白底物($K_i \ll K_m$),亲和色谱时先用高浓度的盐溶液(1 mol/L NaCl)洗柱,可以洗掉大部分非特异性结合的杂蛋白,然后用酸水洗脱吸附的活性半夏蛋白组分,能够显著提高以胰蛋白酶为配体的亲和色谱法分离活性半夏蛋白的分辨率。Sephadex G-50 生成的 p1 和 p2 活性峰没有分开,仅 p1 峰前半部分,即 10~12 号试管的合并组分经 SDS-PAGE 检测显示基本均一的条带,将纯化的活性半夏蛋白组分进一步电泳后转膜,剪下主带测序,以保证活性半夏蛋白的纯度。

丝氨酸蛋白酶抑制剂在临床应用中显示了良好前景。但是,以亲和色谱为主从生半夏中分离纯化活性半夏蛋白的方法难以实现产业化生产。课题组将进一步根据活性半夏蛋白的 N 端氨基酸序列设计兼并引物,从鲜品半夏中克隆出其成熟肽的 cDNA 序列,完成活性半夏蛋白基因工程表达生产与更加深入的结构和功能分析。

参考文献:

- [1] Kobayashi K, Gotoh J, Hirashima Y, et al. Inter- α -trypsin inhibitor bound to tumor cells is cleaved into the heavy chains and the light chain on the cell surface [J]. *Bio Chem*, 1996, 217: 11362-11367.
- [2] Yoon J S, Seo J C, Han S W. Pinelliae Rhizoma herbal-acupuncture solution induced apoptosis in human cervical cancer cells, SNU-17 [J]. *Am J Chin Med*, 2006, 34(3): 401-408.
- [3] 李建武, 萧能庚, 余瑞元. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [4] Ausubel F, Brent R, Kingston R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [5] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. *J Biochem*, 1951, 193: 265-275.

一种具有胰蛋白酶抑制活性的半夏蛋白的纯化与N端氨基酸序列分析

作者: [王厚伟](#), [WANG Hou-wei](#)
作者单位: [山东中医药大学药学院, 山东, 济南, 250355](#)
刊名: [中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39(9)

参考文献(5条)

1. [Kobayashi K.](#) [Gotoh J.](#) [Hirashima Y.](#) [Inter- \$\alpha\$ -trypsin inhibitor bound to tumor cells is cleaved into the heavy chains and the light chain on the cell surface](#) 1996
2. [Yoon J S.](#) [Seo J C.](#) [Han S W.](#) [Pinelliae Rhizoma herbal acupuncture solution induced apoptosis in human cervical cancer cells, SNU-17](#) [外文期刊] 2006(03)
3. [李建武.](#) [萧能赓.](#) [余瑞元.](#) [生物化学实验原理和方法](#) 1994
4. [Ausubel F.](#) [Brent R.](#) [Kingston R E.](#) [精编分子生物学实验指南](#) 1995
5. [Lowry O H.](#) [Rosebrough N J.](#) [Farr A L.](#) [Protein measurement with Folin phenol reagent](#) 1951

本文读者也读过(10条)

1. [凌统.](#) [中华倒刺鲃胰蛋白酶的cDNA克隆与序列分析](#) [学位论文] 2006
2. [王厚伟.](#) [田景振.](#) [WANG Hou-wei.](#) [TIAN Jing-zhen.](#) [半夏胰蛋白酶抑制剂的纯化与部分性质研究](#) [期刊论文] - [天然产物研究与开发](#) 2009, 21(5)
3. [王厚伟.](#) [马承严.](#) [一种快速测定家蚕蛾溶茧酶及其水解产物的含量的新方法](#) [会议论文] - 2008
4. [张政.](#) [李玉英.](#) [史晓儒.](#) [王转花.](#) [甜荞胰蛋白酶抑制剂cDNA片段的克隆及序列特征](#) [期刊论文] - [西北植物学报](#) 2005, 25(1)
5. [贺静.](#) [曾成鸣.](#) [Hummel-Dreyer法在生物分子相互作用分析中的应用](#) [期刊论文] - [分析测试学报](#) 2004, 23(6)
6. [刘振宇.](#) [吴祖建.](#) [林奇英.](#) [谢联辉.](#) [LIU Zhenyu.](#) [WU Zujian.](#) [LIN Qiying.](#) [XIE Lianhui.](#) [孔石莼质体蓝素的柱色谱纯化及其N-端氨基酸序列的分析测定](#) [期刊论文] - [色谱](#) 2006, 24(3)
7. [王厚伟.](#) [低温炮制工艺对紫河水溶性蛋白组成及其纤溶活性的影响](#) [会议论文] - 2008
8. [邵彪.](#) [汪少芸.](#) [饶平凡.](#) [Shao Biao.](#) [Wang Shanyun.](#) [Rao Pingfan.](#) [黑豆胰蛋白酶抑制剂的纯化及性质研究](#) [期刊论文] - [中国食品学报](#) 2010, 10(6)
9. [王厚伟.](#) [一种半夏胰蛋白酶抑制剂对大鼠胃功能的影响](#) [会议论文] - 2008
10. [张建业.](#) [姜国良.](#) [王宁.](#) [ZHANG Jian-Ye.](#) [JIANG Guo-Liang.](#) [WANG Ning.](#) [中国对虾胰蛋白酶基因的克隆和结构分析](#) [期刊论文] - [中国海洋大学学报 \(自然科学版\)](#) 2005, 35(6)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200809014.aspx