

人参多肽的提纯与氨基酸序列测定*

张 今 杜文媛 张红婴 吴小侠 丁忠田

(吉林大学酶工程实验室, 长春)

Ando 等^[1]在研究人参治疗糖尿病的有效成分中, 发现人参中含有抗脂肪分解的 14 肽。由于人参中该肽含量甚低, 分离提纯很困难, 制剂中又往往含人参皂甙等杂质, 难以供序列分析用, 所以至今未报道氨基酸序列。我们在工作中发现人参多肽具有疏水性和耐热性, 据此提出一种简便的分离提纯方法, 制剂可直接用于氨基酸序列测定。我们用 DABITC/PITC 双偶合微量手工液相顺序法测定该 14 肽的氨基酸顺序为 E-T-V-E-I-I-D-S-E-G-G-G-D-A。

一、材料和方法

1. 材料和试剂 鲜人参根系吉林省集安参场提供。冷冻干燥人参根自行制备, 磨粉成 60 目。标准氨基酸、DABITC、PITC 和三氟醋酸均系 Merck-Schuchart 产品。聚酰胺薄膜和醋酸纤维素膜系浙江黄岩化学实验厂产品。其它有机溶剂均系重蒸。

2. 标准 DABTH-氨基酸的制备 按 Chang^[2,3] 所描述的方法进行, 略加修改。

3. 肽的纯化 取冷冻干燥人参根粉 1kg, 加 65% 乙醇溶液 (1:18, W/W), 用氨水调至 pH9, 室温搅拌浸提 24h, 离心 (7000rpm) 除沉淀。上清液冷冻干燥, 冻干粉用 100ml 去离子水溶解, 100℃ 加热 1min, 离心 (10000rpm) 除沉淀, 清液上 Sephadex G-25 柱 (4×90cm), 然后用去离子水洗脱, 每管收集 10ml, 洗脱图谱在 230nm 用紫外检测器检测, 收集洗脱峰, 冷冻干燥, 得人参多肽粉约 10mg。

4. 肽的氨基酸组成分析 按文献 [4] 进行。

5. 肽的氨基酸序列测定 按 DABITC/PITC 双偶合微量手工液相顺序法进行 (Ile 重复裂解 2 次), 以标准 DABTH-氨基酸做对照, 用 TLC 鉴定。

聚酰胺薄膜层析展开剂: A. I 向为 33% 乙酸; II 向为甲苯: n-己烷: 乙酸 (2:1:1, V/V)。B. 鉴定 Ile, Leu^[5], 膜 7.5 × 4cm, 展开剂: 10% 甲酸: 乙醇 (10:9, V/V)。

6. 抗脂解活性的测定 按文献 [6] 法进行, 以形成游离脂肪量作为生物活性指标。

二、结果与讨论

1. 人参多肽的纯化 由于人参根中淀粉、果胶质、皂甙等含量多, 蛋白质含量占 6% 以上, 而人参多肽含量又很低, 因而将微量的人参多肽从大量的杂质中分离出来是很困难的工作。根据人参多肽具有疏水性, 耐热 (100℃ 经 10min 活性不变 (见表 4)), 从而提出一种简便的提纯方法。最终纯化产物经肽的指纹技术, HPLC 和等速电泳鉴定 (见图 1—3) 证明是纯一的。它可直接用于测定氨基酸序列。纯品活性与文献 [1] 比较见表 1。

本文 1987 年 3 月 16 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

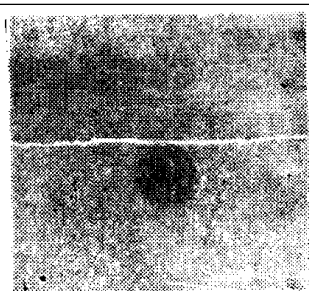


图1 人参多肽的指纹技术鉴定图谱

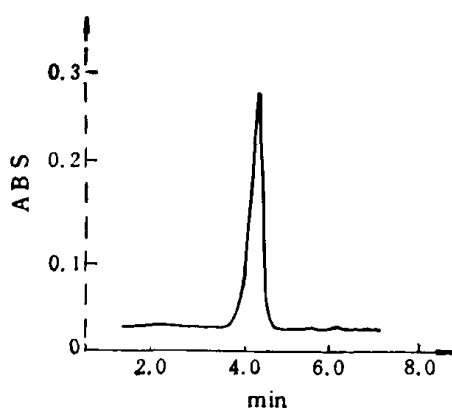


图2 人参多肽的HPLC鉴定图谱

柱: μ -Bondapak C18; 移动相: 30% 甲醇,
流速 1.0ml/min

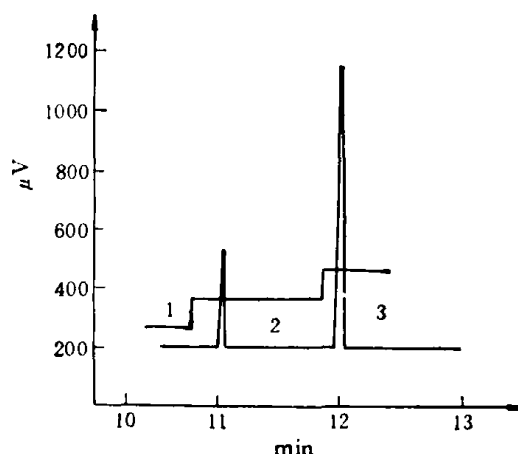


图3 人参多肽的毛细管等速电泳鉴定图谱

峰3是末端电解质峰, 1和2之间的峰是人参多肽

表1 不同方法提取的人参多肽的抗脂解活性的比较*

方 法	比 活 性 (U/mg)	收 率 (%)
本 法	701	0.15
文献[6]法	920	0.32

* 数据为三次实验结果的平均值。

由表1可见,按文献[1]法提取的人参多肽比活性和收率均比本法为高。经检验,前者含有多糖和皂甙。皂甙亦有抗脂解活性。这可能是两种方法区别之处。

2. 人参多肽的结构测定 人参多肽的氨基酸组成分析结果见表2。与文献[1]的不同

表2 人参多肽的氨基酸组成(摩尔比)

氨 基 酸	氨 基 酸 分 析	顺 序 测 定
Asp	2.1	2
Thr	1.1	1
Ser	1.0	1
Glu	3.3	3
Gly	3.2	3
Ala	1.1	1
Val	1.2	1
Ile	2.2	2

表3 人参多肽对肾上腺素,生长激素在脂肪细胞中诱使脂肪分解作用的影响*

激素 (μg)	人 参 肽 (mg)	生成游离脂肪酸量/克脂肪细胞 (μg)	拮 抗 率 (%)
肾上腺素 1	—	9.0	—
肾上腺素 1	0.1	4.16	53.7
生长激素 50	—	0.80	—
生长激素 50	0.1	0.25	68

* 数据为三次实验结果的平均值。

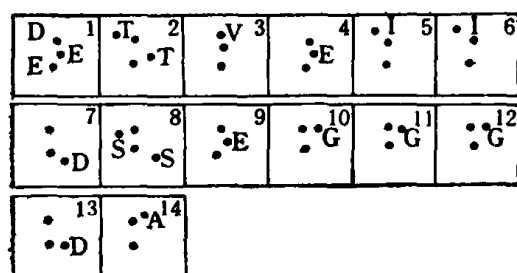
表4 人参多肽耐热和抗酶解作用*

肾上腺素 ($1\mu\text{g}$)	人 参 肽 (0.1mg)	处 理		生成游离脂肪酸量 (μg)/克脂肪细胞	拮抗率 (%)
		酶	热		
+	—	—	—	7.5	0.0
+	+	—	—	3.1	58.7
+	+	—	+	2.7	64.0
+	+	胰蛋白酶 ($400\mu\text{g}$)	+	3.5	53.0
+	+	糜蛋白酶 ($400\mu\text{g}$)	+	3.2	57.3

* 100°C 加热 10min; 数据为三次实验结果的平均值。

之处是: 文献报道含 Leu, 而我们分析的结果表明含 Ile, 其它氨基酸同文献。文献上至今未报道氨基酸序列。我们用 DABIC/PITC 双偶合微量手工液相顺序法测定氨基酸序列, 结果见图 4, 与我们的氨基酸组成分析相符。

3. 抗脂解活性的测定 将不同的激素和人参多肽加入到大鼠睾丸组织游离出的脂肪细胞中, 以形成游离脂肪酸量作为生物活性指标。人参多肽对肾上腺素等激素的作用显示有拮抗效果(表 3)。胰岛素也有显著对抗肾上腺素对脂肪的分解作用。人参多肽的作用模式和深入的药理研究正在进行中。



E-T-V-E-I-I-D-S-E-G-G-G-D-A

图4 人参多肽氨基酸顺序在聚酰胺薄膜上的双相层析图谱

图中上下标记的D和E分别代表 DABTC-二乙胺, DABTC-乙醇胺。图下边是人参多肽的氨基酸顺序

致谢: 本工作曾得到吉林省中医中药研究院王本祥同志和长春生物制品研究所鲁卓卿同志的帮助, 马林同志代做毛细管等速电泳, 一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Ando, T. et al., *Planta Medica*, 38(1980), 18.
- [2] Chang, J. Y. et al., *Biochem. J.*, 153(1976), 607.
- [3] Michael, W. et al., *Science*, 226(1984), 304.
- [4] 张今等, 高等学校化学学报, 6(1985), 4: 376.
- [5] Chang, J. Y., *Anal. Biochem.*, 102(1980), 384.
- [6] Dole, V. P., *J. Clin. Invest.*, 35(1965), 150.