

苦瓜中植物胰岛素的分离及其氨基酸序列测定

盛清凯¹ 姚惠源¹ 徐华军²

(¹江南大学食品学院, 无锡 214036) (²广西北生药业股份有限公司, 北海市, 536000)

摘 要 采用有机酸、醇提取 Sephadex G-50 筛分、RP-HPLC 色谱分离, 从苦瓜中分离出植物胰岛素, 并报道了植物胰岛素的氨基酸序列。

关键词 苦瓜, 降糖多肽, 氨基酸序列

苦瓜中存在植物胰岛素、皂苷等功能成分, 因此具有降血糖, 增强机体免疫力的功效^[1-4]。

1981 年 Khanna^[2]采用有机酸、醇提取, 薄层层析方法从苦瓜中分离出降糖多肽-P (p-polypeptide), 皮下注射该肽可降低试验型鼠、猴和糖尿病人的高血糖。苦瓜多肽-P 为 166 个氨基酸残基, 分子量约为 11 ku。因提取方式与动物胰岛素相似, 且薄层层析迁移率与动物胰岛素一致, 故多肽-P 又称植物胰岛素 (p-insulin)。薄层层析方法分离度高, 但样品上样量低, 难于大规模制备。作者采用有机酸、醇提取, 凝胶柱层析和反相高效液相色谱技术 (RP-HPLC), 分离出苦瓜植物胰岛素, 为工业化生产提供了可能。文中还首次对植物胰岛素的氨基酸序列进行了报道。

1 试验材料与设备

1.1 材 料

苦瓜: 广西北生药业股份有限公司提供。

1.2 主要设备

Sephadex G-50 瑞典 Pharmacia 公司产品; 7000D 透析袋: 美国 Spectrum 公司; LC-2010 高效液相色谱仪: 日本岛津公司; 835-50 型氨基酸分析仪: 日本日立公司; PPSQ-23 蛋白序列分析仪: 日本岛津公司。

2 苦瓜多肽的提取与纯化

2.1 苦瓜多肽的提取

将苦瓜粉碎, 按 Khanna 方法^[2]采用酸醇提取, 丙酮沉淀, 沉淀物用 7000 ku 透析袋透析 48 h 后冷冻干燥, 得苦瓜多肽粗提物。

2.2 凝胶柱层析

按常规方法将 Sephadex G-50 装柱, 将苦瓜多肽粗提物溶于缓冲液中配成 18 mg/mL 的浓度, 进行凝胶柱分离, 得到 2 个洗脱峰, 收集冻干。由图 1 可知, 收集的 P₁、P₂ 两组分中, P₂ 为主导组分。凝胶层析条件为: 缓冲液为 pH 5.0、0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠, 凝胶柱 80×2 cm, UV 280 nm 检测。每管装液 3.2 mL。

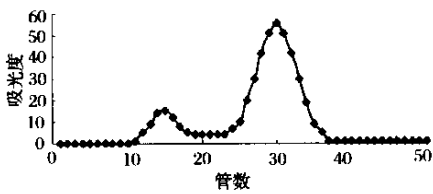


图 1 苦瓜多肽凝胶柱层析图

将组分 P₁、P₂ 冻干粉分别溶于水中, 皮下注射正常小鼠和四氧嘧啶高血糖模型小鼠。试验结果表明 P₁ 无降血糖效果, P₂ 可显著降低正常小鼠、四氧嘧啶高血糖模型小鼠的血糖。

2.3 采用反相高效液相色谱进行纯化

将 P₂ 冻干粉溶于超纯水中, 配成 5 mg/mL 的浓度, 超声波脱气后用 C₁₈ 反相高效液相色谱纯化, 线性梯度洗脱 (见图 2), 收集组分 PA、PB、PC、PD 冻干。实验条件为: 上样量 10 μ L, 流速 0.8 mL/min, 洗脱液为 A 液 (5% 乙腈、0.05% 三氟乙酸) B 液 (80% 乙腈、0.05% 三氟

第一作者: 博士研究生, 助理研究员。

收稿时间: 2004-02-26

乙酸)。线性洗脱梯度为 0→1 min A 液 85 %、B 液 15 % ,1→40 min A 液 50 %、B 液 50 % ,温度 30℃ ,220 nm 检测。

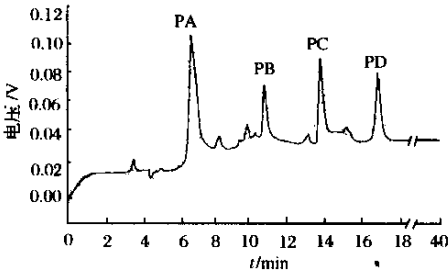


图 2 苦瓜多肽 C18 RP-HPLC 色谱图

将 PA、PB、PC、PD 溶于水 ,与胰岛素溶液一起进行硅胶 G 薄层层析 ,茚三酮溶液显色。展开剂为 V(正丁醇): V(水): V(乙酸)= 12 : 5 : 1。结果显示 PA、PB、PC、PD 的相对迁移率分别为 0.19、0.10、0、0。PA 的相对迁移率与胰岛素迁移率一致。推测 PA 可能为 Khanna 报道的苦瓜多肽-^[2]。

2.4 苦瓜多肽氨基酸组成分析

将 PA 完全水解 ,进行氨基酸组成分析(表 1)。PA 氨基酸组成分析结果与 Khanna^[2]报道

结果一致。根据 PA 的薄层层析和氨基酸组成分析结果判定 ,PA 即为植物胰岛素。

表 1 苦瓜多肽 PA 氨基酸组成分析

氨基酸	μMoles/mg	分子个数
天冬氨酸	0.273	17
苏氨酸	0.138	8.7
丝氨酸	0.195	12
谷氨酸	0.305	19
脯氨酸	0.159	10
甘氨酸	0.225	19
丙氨酸	0.240	15
缬氨酸	0.174	11
1/2 半胱氨酸	0.058	3.6
蛋氨酸	0.031	2
异亮氨酸	0.116	7
亮氨酸	0.207	13
酪氨酸	0.016	1
苯丙氨酸	0.082	5
组氨酸	0.066	4
赖氨酸	0.209	13
精氨酸	0.161	10
氮	0.431	27
总 计		166

3 苦瓜植物胰岛素的氨基酸序列

将 PA 进行 Edman 降解 ,测定其氨基酸序列为：

1	10	20
H-Gly-Cys-Asp-Glu-Ala-Leu-Phe-Lys-Arg-Ser-Thr-Pro-Gly-Val-Ile-Pro-Thr-Arg-His-Met		
21	30	40
-Asp-Asp-Pro-Thr-Gly-Gly-Val-Cys-Leu-Tyr-Glu-Ser-Ile-Arg-Asp-Thr-Ser-Glu-Pro-Gly		
41	50	60
-Ala-Val-Ala-Leu-Arg-Asp-Glu-Gly-Lys-Val-Asp-Glu-Ser-Met-Thr-Asp-Gly-Lys-Asp-Asp		
61	70	80
-Gly-His-Leu-Ala-Glu-Arg-Lys-Pro-Val-Ala-Gly-Asp-Leu-Val-Ala-Glu-Lys-Asp-Phe-Gly		
81	90	100
-Ala-Ser-Gly-Asp-Val-Glu-Cys-Ile-Thr-Pro-Phe-Gly-Asp-Thr-Asp-Glu-Leu-Glu-Pro-Gly		
101	110	120
-Gly-Gly-Gly-Leu-Ile-Val-Ala-Pro-Ser-Thr-Asp-Arg-Lys-Leu-Lys-Ser-Pro-Leu-Phe-Val		
121	130	140
-Ala-Glu-Ser-Ala-Glu-Leu-Lys-His-Ala-Ser-Glu-Val-Lys-Arg-Ser-Ile-His-Glu-Pro-Glu		
141	150	160
-Ala-Leu-Ala-Asp-Ser-Glu-Gly-Arg-Lys-Phe-Leu-Ala-Gly-Glu-Lys-Ala-Ile-Arg-Arg-Lys		
161	166	
-Lys-Val-Ile-Leu-Glu-Ser-(OH)		

参 考 文 献

1 Lesile Taylor. Herbal secrets of the rainforest (2nd edition) [R]. Austin (USA) : Sage Press Inc. 2002. 4

2 Khanna Pushpa , Jain S C , Panagariya A et al. Hypo-glycemic activity of polypeptide from a plant source [J]. J Nat Prod , 1981 44 (6) : 648 ~ 655

3 王先远 金 宏 许志勤等 苦瓜皂甙降血糖作用及其机制初探 [J]. 氨基酸和生物资源 2001 23 (3) : 42 ~ 45

4 Khanna Pushpa. Protein / polypeptide-k obtained from Momordica charantia and a process for the extraction thereof [P]. WO 00/61619 , 2000 October , 19

Isolation and Amino Acid Sequencing of Plant Insulin
from *Momordica charantia*

Sheng Qingkai¹ Yao Huiyuan¹ Xu Huajun²

(¹ School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036)
(² Guangxi Beisheng Pharmaceutical Co. Ltd , 536000 , Beihai)

ABSTRACT Plant insulin was extracted with organic acid and ethanol , purified with Sephadex G-50 gel filtration and RP-HPLC from *Momordica charantia* . Amino acid sequence of the plant insulin was reported in this paper.

Key words *Momordica charantia* , plant insulin , amino acid sequence

韩国对从我国进口调味品、辣椒及辣椒面有新要求

政策、法规、标准

日前 ,据韩国驻华大使馆通报 ,韩方决定加强对中国出口韩国调味品(干、湿泡菜调味料)、辣椒及辣椒面的入境检查。

为避免中国调味品、辣椒及辣椒面对韩出口贸易受阻 ,检验检疫部门提醒相关生产出口企业 :一是出口韩国的调味品使用食品添加剂辣椒红和红曲红 ,必须在产品标识上予以标注。二是出口企业在向检验检疫部门报检时要如实 ,申报出口韩国的调味品、辣椒及辣椒面中食品添加剂使用情况 ,如未如实申报而导致被韩方通报违规的 ,暂停报检并及时整改。三是要严格按照韩方的规定进行产品加工 ,确保出口韩国的产品符合其要求。

日本推崇特保茶饮料

信息窗

目前 ,日本的茶饮料市场规模近 70 亿美元 2003 年度增长了 3.4% ,继续保持上升趋势。在饮料市场中 ,茶饮料所占比率为 31%。

目前 ,在日本茶饮料市场 ,茶与功能性水将呈持续上升趋势 ;强化儿茶素的绿茶作为功能性茶饮料将成为热销产品 ;功能性茶饮料与重视香气、滋味的茶饮料将呈两极分化 ;茶以外的植物多酚、单宁等成分将受到关注。

在日本市场上 ,众多厂家把目光集中在特保饮料上。1997 年添加有降低血压作用的“Lacto Tri Peptide”的含乳饮料是首次畅销的特保饮料 ;1998 年添加对糖的吸收有抑制作用的“蕃石榴多酚”的茶饮料是在日本首例畅销的特保茶饮料 2003 年强化添加茶多酚的特保绿茶饮料十分畅销 ,其原因在于瘦身意识 ,大众熟知绿茶和饮用后效果明显。

针对市场的变化 ,日本各饮料生产厂家着力开发特保饮料 ,不断开发新的植物功能性成分 ,不仅追求功能性 ,还寻求独特的香气、滋味 ,同时对提取液、粉体原料等的使用进行深入研究。