

小麦籽实中蛋白质 - Cd, Pb 结合形态及其稳定性¹⁾

何孟常 杨居荣

(北京师范大学环境科学研究所, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京, 100875)

摘 要

在体外消化酶模拟条件下, 对小麦籽实中 Cd, Pb 蛋白质结合体的稳定性进行了研究. 结果表明: 小麦籽实中存在的表观分子量为 54.5×10^3 和 5.5×10^3 的蛋白质 - Cd, Pb 结合体, 在体外胃蛋白酶和胰蛋白酶消化后, 蛋白质结构发生变化. 特别是分子量为 54.5×10^3 的 Cd, Pb - 蛋白质结合体不稳定, 容易被胰蛋白酶分解, 变成分子量为 5.5×10^3 的稳定的 Cd, Pb - 蛋白质结合体或更小的多肽.

关键词: 小麦籽实, 重金属 - 蛋白质结合形态, 稳定性, 消化酶.

环境中的重金属能够以不同的形态存在, 包括价态、化合态、结构态和结合态, 其中最复杂的是结合态. 食品中的重金属主要以结合形态存在, 已有不少关于这方面的研究报道, 但主要集中在重金属含量较高的海产品和大豆等作物^[1-5]. 关于谷物中重金属的分布和化学形态也有一些报道^[6-8]. 我们曾对稻、麦籽实中 Cd 和 Pb 等有毒元素的分布及其结合形态特征进行了初步研究, 并证实谷物中重金属主要与生物大分子蛋白质相结合^[9]. 另外, 不同结合形态的重金属对人体具有不同的毒性. 由于蛋白质是生物大分子, 环境条件的改变, 如蛋白质变性剂、酶消化会破坏蛋白质的结构, 因此, 与蛋白质相结合的重金属形态也会发生变化^[10,11].

为了正确评价谷物等食品中重金属对人体的毒性, 需要研究其存在形态和它们的稳定性. 本文通过模拟实验, 探讨体外消化酶对蛋白质 - Cd, Pb 结合形态稳定性的影响, 为进一步评价谷物中重金属的毒性提供依据.

1 材料与方 法

1.1 籽实中蛋白质的提取和凝胶层析分离

小麦籽实采自湖北省大冶铜矿区污染农田. 将小麦籽实去颖壳, 研磨, 然后脱去脂肪, 风干后称取适量, 用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris - HCl (pH 7.5) 进行提取, 样品与提取液之比为 1:10. 将提取液样品置于冰箱内 10h 后, 在转速为 20 000g 的高速冷冻离心机中离心 1 h, 取上清液于冰冻干燥箱内浓缩至原体积 1/5; 取浓缩样品 1 ml 用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

1) 国家自然科学基金资助项目 (49771069).

Tris - HCl 溶解, 经 Sephadex G75 柱层析分离 ($2.0 \times 100 \text{ cm}$)。用 $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris - HCl 缓冲液 (pH 值 7.5) 洗脱。用自动部分收集器 (BS2 - 100), 以流速 $4 \text{ ml} \cdot 20 \text{ min}^{-1}$, 按 $4 \text{ ml} \cdot \text{管}^{-1}$ 收集洗脱液。紫外分光光度计 (BECKMAN DU - 8B) 测定洗脱液紫外吸收峰 (225 nm 处), 并同步测定洗脱液中 Cd 和 Pb 浓度。

1.2 胃蛋白酶和胰蛋白酶消化实验

酶溶液配制 胃蛋白酶溶液 ($16 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$): 称取胃蛋白酶 160 mg (Pepsin 1:10000, 539 units $\cdot \text{mg}^{-1}$, 华美生物工程公司), 溶于 10 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris - HCl 溶液。胰蛋白酶溶液 ($30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$): 称取胰蛋白酶 300 mg (Trypsin 1:250, BE2185, 华美生物工程公司), 溶于 10 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris - HCl 溶液。

加酶实验 5 ml 冷冻干燥的小麦蛋白质提取液, 分别溶于 1 ml 胃蛋白酶溶液和 1 ml 胰蛋白酶溶液, 对照组分别加 1 ml 无酶的 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris - HCl 溶液, 37°C 恒温培养 5 h, 然后按步骤 1.2 的方法凝胶层析过柱分离。

1.3 样品中 Cd 和 Pb 的测定方法

将凝胶层析洗脱液样品经硝酸、高氯酸消化后用石墨炉原子吸收分光光度计 (GBC 906, 澳大利亚) 测定其含量, 为了保证分析方法的准确性, 采用了国家标准物质样品进行质量控制。

2 结果与讨论

2.1 小麦籽实中的蛋白质 - Cd, Pb 结合体

小麦籽实脱脂后, 经 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris - HCl 缓冲液提取的可溶性组分, 再通过 Sephadex G75 柱进行层析分离, 测定洗脱液的紫外吸收 (D 值), 然后消化样品, 原子吸收测定洗脱液中 Cd 和 Pb 浓度, 图 1 为洗脱液的紫外吸收值与 Cd 和 Pb 浓度分布。结果表明, 麦粒 Tris - HCl 可溶性组分凝胶层析后分离出 3 个蛋白质紫外吸收峰, 分别在洗脱液第 15 管 (第 1 峰)、27 管 (第 2 峰) 和 44 管处 (第 3 峰), 以第 1 峰的紫外吸收值最高。根据标准蛋白质曲线, 推定 3 个峰的表现分子量依次为 54.5×10^3 , 20.17×10^3 和 5.5×10^3 。

洗脱液中 Cd 和 Pb 的测定结果表明, 在第 1 峰和第 3 峰处洗脱液中 Cd 和 Pb 的浓度也相对较高, 在第 2 峰处也有一定浓度的 Cd 和 Pb 分布, 可以推断小麦籽实中存在的 Cd 和 Pb 主要以表现分子量为 54.5×10^3 和 5.5×10^3 的蛋白质相结合。另外, 在第 3 峰以后的洗脱液没有紫外吸收, 但有少量的 Cd 和 Pb 分布, 其结合形态不清楚, 有可能是一些小分子的肽类, 或者以游离的金属离子存在, 有待进一步研究。

2.2 胃蛋白酶对小麦籽实中蛋白质 - Cd, Pb 结合体的影响

图 2 为胃蛋白酶消化对小麦籽实中蛋白质 - Cd, Pb 结合体的影响。从图中可以看出, 在胃蛋白酶的作用下, 洗脱液的紫外吸收峰与未加酶的对照组稍有不同 (见图 1), 第 1 峰的 D 值降低, 第 2 峰不明显, 而第 3 峰的 D 值相对增加了。根据前面的分析结果, 第 1 峰是分子量为 54.5×10^3 的蛋白质 - Cd, Pb 结合体, 在胃蛋白酶的作用下, 可部分地分解为分子量较小的蛋白质或多肽 (第 3 峰)。洗脱液中 Cd 和 Pb 的浓度分布也

有所不同, 在紫外吸收的第 1 峰处, Cd 的浓度由 $2.018 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 降到 $1.574 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, Pb 的浓度由 $4.269 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 变为 $2.168 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. 第 3 峰处 Cd 和 Pb 的浓度也比对照组低. 并且, 在第 3 峰以后的洗脱液中也有少量 Cd 和 Pb 分布.

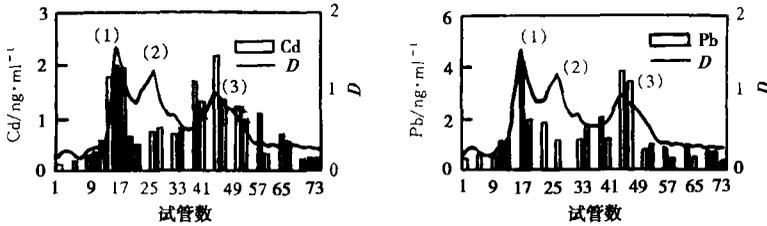


图 1 小麦籽实的 Tris-HCl 提取液的凝胶柱层析结果

Fig. 1 Sephadex G-75 column chromatography of wheat seed extracts with Tris-HCl

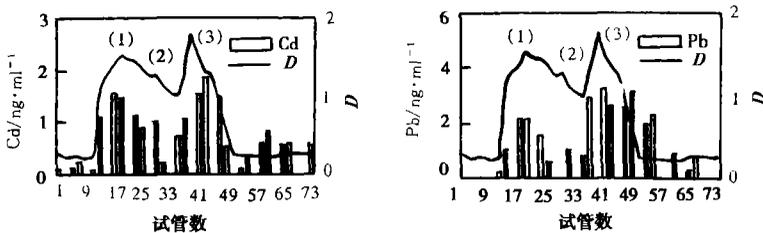


图 2 胃蛋白酶消化对小麦籽实中蛋白质-Cd, Pb 结合体的影响

Fig. 2 Effect of pepsin digestion on protein-binding Cd and Pb in wheat seed

2.3 胰蛋白酶对小麦籽实中蛋白质-Cd, Pb 结合体的影响

图 3 为胰蛋白酶消化对小麦籽实中蛋白质-Cd, Pb 结合体的影响结果. 从图中可以看出, 洗脱液的紫外吸收峰有较大的变化, 第 1 峰变得很小, 第 2 峰的 D 值也有所降低, 而第 3 峰的 D 值大幅度增加. 洗脱液中 Cd 和 Pb 的浓度分布也有较大的变化, 第 1 紫外吸收峰处 Cd 和 Pb 的浓度比对照组降低很多, 在第 3 峰处 Cd 的浓度增加, 而 Pb 的浓度稍微降低, 但是, 在第 3 峰以后无紫外吸收的洗脱液中也出现了较高浓度 Cd 和 Pb 分布. 上述结果说明, 胰蛋白酶能够分解分子量为 54.5×10^3 的蛋白质-Cd, Pb 结合体, 变成小的蛋白质分子.

根据已有的研究报道^[12], 动物及人体消化道内的胃蛋白酶水解芳香族或其它疏水氨基酸的羧基或氨基形成的肽键. 胰蛋白酶只专一性地水解赖、精氨酸的羧基形成的肽键. 通过对上述胃蛋白酶和胰蛋白酶消化结果的分析可以看出, 以分子量为 54.5×10^3 的蛋白质 Cd 和 Pb 结合体不太稳定, 容易被胃蛋白酶和胰蛋白酶分解, 变成相对稳定分子量为 5.5×10^3 的蛋白质分子. 并且, 与蛋白质结合的 Cd, Pb 部分地被释放出来. 但是, 对于这种小分子的 Cd 和 Pb 结合体, 它们对动物和人体的毒性是增强或减弱, 还缺乏毒理学实验数据, 有待进一步研究. 需要指出的是本研究是在体外模拟条件下研究消化酶对重金属-蛋白质结合体的影响, 可能与动物和人体内的酶消化状况有所差异. 另

外, 模拟实验是在中性环境下进行的, 与体内的酸性环境不同, 两者的水解、消化结果可能也存在一定地差异. 但是, 本研究结果可以说明胃蛋白酶和胰蛋白酶对蛋白质 - 重金属结合体产生破坏作用.

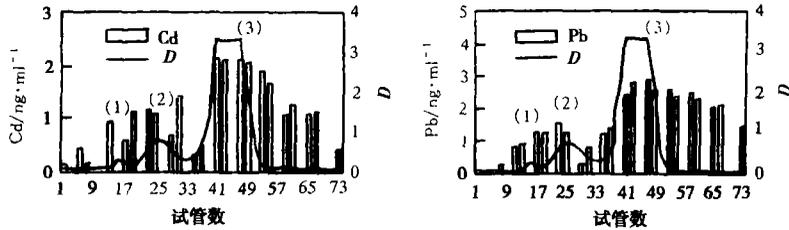


图3 胰蛋白酶消化对小麦籽实中蛋白质 - Cd, Pb 结合体的影响

Fig. 3 Effect of trypsin digestion on protein - binding Cd and Pb in wheat seed

3 小结

小麦籽实中存在的表观分子量为 54.5×10^3 和 5.5×10^3 的蛋白质 - Cd, Pb 结合体, 在体外胃蛋白酶和胰蛋白酶消化后, 蛋白质结构发生变化. 特别是分子量为 54.5×10^3 的 Cd, Pb - 蛋白质结合体不稳定, 容易被胰蛋白酶分解, 变成分子量为 5.5×10^3 的稳定的 Cd, Pb - 蛋白质结合体或更小的多肽.

致谢: 北京市理化分析测试中心的宋薇同志协助样品中 Cd, Pb 的原子吸收测定, 本所的张平老师在紫外测定和实验工作中提供了帮助, 谨致谢意.

参 考 文 献

- [1] High K, Characterization of Metallothionein - Like Proteins from Zebra Mussels. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, **16** (6): 1111—1118
- [2] Casterline J, Yip G, The Distribution and Binding of Cadmium in Oyster, Soybean, and Rat Liver and Kidney. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1995, **3**: 319—329
- [3] Yoshida S, Isolation and Partial Characterization of Cadmium - Binding Protein in Soybeans from A Cadmium - Polluted Field. *Agric. Biol. Chem.*, 1986, **50** (9): 2273—2278
- [4] Yoshida S, Tanaka R, Kashimoto, Gel Filtration Profiles of Cadmium in Soybeans from A Cadmium - Polluted Field. *J. Food Hyg. Soc. Japan.*, 1986, **27** (1): 64—69
- [5] Lange - Hesse K, Dunemann L, Schwedt G, Properties and Binding Forms of Cadmium and Nickel in Protein Extracts from Bean Seeds (*Phaseolus Vulgaris L.*). *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994, **349**: 460—464
- [6] 皆川兴荣, カドミウム汚染米中の重金属の化学形态. 日本公卫志, 1978, **25** (2): 97—102
- [7] Minagawa K, TakiZawa Y, Studies On Quantitative Distribution and Removal of Heavy Metals in Rice. *J. Food Hyg. Soc. Japan.*, 1977, **18** (1): 13—19
- [8] Suzuki K, Binding of Endogenous and Exogenous Cadmium to Glutelin in Rice Grains as Studied by HPLC/ICP - MS with Use of A Stable Isotope. *J. Trace Elements Med Biol.*, 1997, **11**: 71—76
- [9] 杨居荣, 查燕, 刘虹, 污染稻、麦籽实中 Cd, Cu, Pb 的分布及其存在形态初探. 中国环境科学, 1999, **19** (6): 500—504

- [10] Matsui H, Wada O, Ono T, Changes in Zinc in Milk during Enzymatic Digestion. *Japanese Journal of Hygiene*. 1983, 38 (4) :791—796
- [11] Yoshida S, Tanaka R, Kashimoto T, Effects of Sodium Dodecyl Sulfate, 2 - Mercaptoethanol and EDTA on The Chemical Forms of Copper and Zinc in A Soybean Protein Fraction. *J. Food Hyg. Soc. Japan.*, 1986, 27 (1) :70—74
- [12] 沈同, 王镜岩, 赵邦悌主编, 生物化学 (下册). 北京: 人民教育出版社, 1980, 258—260

2000年5月15日收到.

THE PROTEIN - BINDING FORMS OF CADMIUM AND LEAD IN POLLUTED WHEAT SEED AND ITS STABILITY

He Mengchang Yang Jurong

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control,
Institute of Environmental Sciences, Beijing Normal University, Beijing, 100875)

ABSTRACT

The stability of protein - binding forms of Cd and Pb in polluted wheat seed was evaluated using the treatment of gastrointestinal enzyme digestion. The results showed that after the treatment of pepsin and trypsin enzyme digestion, the protein - binding forms of Cd and Pb with molecular weight of 54.5×10^3 and 5.5×10^3 in wheat seed was decomposed. Especially, the protein - binding forms of Cd and Pb with the apparent molecular weight of 54.5×10^3 were easily decomposed by the trypsin and changed into the low molecular weight protein - binding forms (5.5×10^3) or tiny peptide chain.

Keywords: wheat seed, protein - binding forms of heavy metals, stability, digestive enzyme.