

7 种菜用豆中凝集素活性的比较

季建刚¹, 娄在祥², 王洪新^{3*}, 陈倩宜⁴, 王禹¹, 陆仲寅¹

(1. 江苏省苏州市高新区卫生监督所, 江苏苏州215011; 2. 食品科学与安全教育部重点实验室, 江南大学食品学院, 江苏无锡214036; 3. 石河子大学食品学院, 新疆石河子832003; 4. 江苏省苏州市卫生监督所, 江苏苏州215004)

摘要 菜用豆中的豆科凝集素主要存在于豆粒中, 加工不当易引起食用者中毒。通过血凝试验对7种菜用豆中凝集素的活性进行了测定和比较, 确定了凝集素提取液中的凝集素最适检测浓度。结果表明, 7种菜用豆中凝集素的活性各不相同, 刀豆样品中凝集素活性最强, 凝集效价为 2^7 , 蚕豆样品最弱, 为 2^3 。

关键词 菜用豆; 凝集素; 活性

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)15-04620-02

Comparison of the Activity of Phytohemagglutinin in Seven Kinds of Kidney Beans

Ji Jian gang et al (Suzhou New District Health Authority, Suzhou, Jiangsu 215011)

Abstract Kidney beans were rich in nutrition and taste, so that they had become a widespread and pleasant vegetable in many countries. However, they contained some toxic substances such as hemagglutinin and saporin. In this experiment the phytohemagglutinins of 7 kinds of beans were extracted and made to react with the erythrocytes to determine its content and compare their hemagglutinative activities in hopes of providing the scientific methods for their processing and production for food.

Key words Kidney bean; Phytohemagglutinin; Activity

凝集素是一类具有高度特异性糖结合活性的蛋白质^[1], 存在于许多植物的种子和营养器官中, 其中豆科植物种子的含量尤为丰富。到目前为止, 已发现了多种不同的凝集素, 在生理生化及分子生物学方面对其进行了许多研究, 特别是近年来, 克隆了许多植物凝集素基因, 对多种植物凝集素进行了蛋白质结构晶体的研究^[2], 对植物凝集素的生物学功能有了更深的认识^[3]。现在, 凝集素是研究生物体内细胞癌变、受精、分化及分子识别等生命过程极其有用的工具, 而且凝集素在临床医学检验、治疗等方面有重要的地位。

在豆科植物中, 植物凝集素是一种有毒物质^[4]。部分豆类凝集素除凝血作用外, 还具有刺激肠壁、妨碍消化吸收营养物质以及影响小肠黏膜细胞代谢、肠道内细菌生态及免疫功能等不良作用。菜用豆科植物中的凝集素主要在豆粒中, 且较耐热, 在加工过程中温度与时间不足会使凝集素不能被彻底破坏, 从而引起中毒^[5-6]。笔者拟测定7种菜用豆科植物样品中凝集素的活性^[7], 并进行比较, 为确定各种菜用豆的安全加工方法提供依据, 也为研究菜用豆食品的监测和安全控制措施建立基础, 以减少或避免相关中毒事件的发生。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 新鲜豆类。样品: 1 利马豆, 2 红花菜豆, 3 刀豆, 4 宽叶菜豆, 5 豇豆, 6 豌豆, 7 蚕豆(均为苏州市卫生局提供, 产地广东); 新鲜兔血。采于江南大学动物房, 静脉取血; 溶液。PBS 磷酸缓冲液(pH 7.2, 0.02 mol/L, 0.1 mol/L NaCl); 抗凝剂(0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液); 仪器。96孔V型血凝板(南京瑞麦科技公司); 组织捣碎机(上海帅佳电子科技有限公司); TDL4型离心机(上海安亭科学仪器厂); 真空干燥箱(巩义市英峪予仪器厂); 循环水式多用真空泵(郑州郑甫仪器厂)。

1.2 试验方法 红细胞悬液配制 凝集素提取 检测。

1.2.1 红细胞悬液的制备。选择健康兔子, 静脉采血, 按1(V / V)加入抗凝剂; PBS 洗涤, 3 500 r/min 离心8 min, 重复3次; 将沉淀的红细胞配制成5%的红细胞悬液备用^[8]。现配现用, 不宜保存。

1.2.2 植物凝集素的提取。7种菜用豆分别取种籽部分适量, 分别加入组织捣碎机内捣碎3 min, 各称取1 g, 加入沸程30~50 的石油醚20 ml, 25 水浴回流抽提10 h, 每隔2 h 搅拌1次, 过滤。取滤渣加20 ml 的PBS, 25 水浴搅拌抽提10 h, 过滤, 取滤液于5 000 r/min 离心30 min, 得上清液, 即植物凝集素粗提液, 定容到20 ml, 制成样品溶液, 备用。

1.2.3 凝集素的检测。在96孔V型血凝板中, 用微量移液器向每孔中加入50 μ pH值7.2的血球缓冲液。取某一样品溶液50 μ 加入第1孔, 混匀后取出50 μ 加入第2孔, 混匀后亦取出50 μ 加入第3孔。依此类推, 作倍比稀释, 加至第8孔^[9]。其他待测样品也按上述步骤操作。然后每孔加入50 μ 5%红细胞悬液, 37 恒温0.5 h。

1.2.4 最适稀释度的选择。取备用样品溶液1 ml, 进行倍比稀释, 选择稀释次数分别为1、2、3、4、5次。得到的溶液浓度分别为原来的1/2、1/4、1/8、1/16、1/32。取稀释得到的溶液分别进行实验, 确定合适的稀释倍数, 并测得各个样品中凝集素的凝集效价。

1.2.5 结果判读及效价计算。根据凝集程度以“#、+、+、+、+、-”记录结果。根据结果, 凡是样品稀释度最高而有显著凝集现象(++) (即为产生50%血凝作用时)的孔的凝集效价, 即可判定为该样品的凝集效价。记录为 2^n , 其中n为血凝板上该样品产生凝集现象的最大稀释倍数。

1.2.6 凝集素粗品干燥工艺。分别取7个样品的植物凝集素粗提液, 进行减压浓缩(37), 得稠液, 放入真空干燥机干燥(36 , 6 h)。

2 结果与分析

2.1 最适稀释浓度的确定 取稀释得到的溶液分别进行试验, 结果表明(表1), 当稀释溶液的浓度为原来样品溶液的1/2、1/4时, 凝集素的血凝效果十分明显, 血凝板上各个稀

作者简介 季建刚(1963-), 男, 江苏常熟人, 副主任医师, 从事食品安全与质量控制研究。* 通讯作者, 博士生导师, 教授, E-mail: whx1964@126.com。

收稿日期 2006-12-18

样品的第8孔仍然是全凝集或多半凝集,无法判断出稀释样品的凝集效价。当稀释溶液的浓度为原来样品溶液的1/8时,血凝板上各个稀释样品在适当的孔出现了半凝集,可初步判断出各个稀释样品的凝集效价。当稀释溶液的浓度为原来样品溶液的1/16、1/32时,血凝板上最后1个稀释样品在第1孔出现了半凝集,这样无法判断出它的凝集效价。因此,稀释溶液的浓度为原来样品溶液的1/8是合适的稀释浓度,即选择的稀释次数为3。

表1 不同稀释浓度对凝集程度的影响

稀释浓度	样品	血凝板孔数							
		1	2	3	4	5	6	7	8
原浓度									
稀释1次 (1/2)	1	#	#	#	#	#	#	#	#
	2	#	#	#	+++	+++	+++	+++	+++
	3	#	#	#	#	#	+++	+++	+++
	4	#	#	#	#	#	+++	+++	+++
	5	#	#	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	6	#	#	#	#	#	#	+++	+++
	7	#	#	#	#	#	#	#	+++
稀释2次 (1/4)	1	#	#	#	#	+++	+++	+++	+++
	2	#	#	#	#	#	#	#	+++
	3	#	#	#	#	#	+++	+++	+++
	4	#	#	#	#	#	+++	+++	+++
	5	#	#	#	#	#	+++	+++	+++
	6	#	#	#	#	+++	+++	+++	+++
	7	#	#	+++	+++	+++	+++	+++	+++
稀释3次 (1/8)	1	#	#	#	++	++	++	++	++
	2	#	#	#	#	+++	++	++	++
	3	+++	+++	+++	#	+++	#	++	++
	4	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
	5	#	#	#	+++	+++	++	++	++
	6	+++	+++	++	++	++	++	++	++
	7	+++	++	++	++	+++	++	++	++
稀释5次 (1/16)	1	+++	+++	++	++	++	++	++	++
	2	#	+++	+++	+++	++	++	++	++
	3	#	+++	+++	+++	+++	++	++	++
	4	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++
	5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
	6	+++	++	++	++	++	++	++	++
	7	++	++	++	++	++	++	++	++

注: # 为全凝集,+++ 为多半凝集,++ 为半凝集,- 为不凝集,下表同。

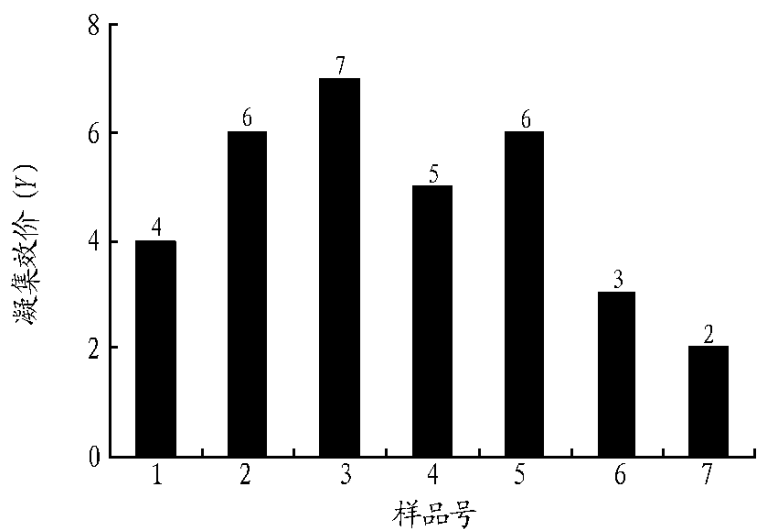


图1 7种菜用豆种籽中凝集素的活性

2.2 7种菜用豆种籽样品中凝集素凝集活力的确定 稀释3次得到合适的稀释浓度,即:稀释溶液的浓度为原样品溶液浓度的1/8。此时,各样品中凝集素的凝集效价见图1。由图1可见,各样品中凝集素的活性各不相同;其中,样品3(刀豆)的凝集素的活性最强,为 2^7 样品7(豌豆)中凝集素的活性最弱,为 2^2 。

各稀释样品中凝集素活性的验证结果表明(表2),验证试验得出的凝集素的凝集效价与前面所测得的结果一致,试验确定的凝集素活性合理。

2.3 凝集素粗品性状 试验表明,7个样品的凝集素粗品均为淡黄色(近乎白色),粉末状,无明显差异;7个样品的凝集素粉末均略带豆香味。经检验,均具有血凝活性。

表2 各稀释样品中凝集素活性的验证结果

样品浓度	血凝板孔数							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1(1/32)	+++	++	++	++	++	++	++	+++
2(1/32)	#	+++	+++	++	++	++	++	++
3(1/32)	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
4(1/32)	+++	+++	++	++	++	++	++	++
5(1/32)	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
6(1/8)	#	+++	++	++	++	++	++	++
7(1/8)	+++	++	++	++	++	++	++	++

3 结论与讨论

凝集素能和含有其结合位点互补的糖基的任何细胞结合,由于所有细胞和许多亚细胞结构都能与之结合,细胞凝集是细胞表面的糖分子结合,在细胞表面形成许多相互交叉的“桥”的结果。影响凝集反应的因素除了植物凝集素的自身性质和细胞表面特征外,外界条件如pH值、离子强度及温度等对其有较大的影响^[1]。该试验用含有0.1 mol/L NaCl的PBS磷酸缓冲液(pH 7.2, 0.02 mol/L)配制红细胞悬液和提取凝集素,从而确保凝集素的血凝活性,便于研究。豆类凝集素在很低浓度时即具有免红细胞凝集能力,为了获得客观的试验结果,该试验首先确定了样品溶液最适稀释浓度。因此在样品浓度较大时,可能由于微量移液器移液嘴外壁上的残留,容易产生误差。

根据血凝结果得出,刀豆样品中凝集素的活性最高,凝集效价为 2^7 ,蚕豆样品的最弱,为 2^2 ,各个样品的凝集素的活性由强到弱依次为:刀豆>红花菜豆>豇豆>宽叶菜豆>利马豆>豌豆>蚕豆。结果表明,不同菜用豆品种种籽中的凝集素的活性不同,且同一品种不同产地的菜用豆中凝集素的活性也不尽相同;这说明不同种籽中凝集素对人体的影响不同,因此对不同种籽中的凝集素应采取不同的处理方式,在加工时对凝集素活性高的菜用豆尤其要注意。

不同品种的菜用豆中凝集素的活性不同,这可能是由于其凝集素的含量不同,也可能是由于其含有的凝集素种类、性质不同。在农业生产中,应该尽量淘汰所含凝集素活性高的品种,筛选培育并扩大种植活性低的品种,以减少对人体健康的影响。对所含凝集素活性高的品种,亦可用以分离制取高纯度的凝集素产品,适应医疗、科研及工农业等领域对其的迫切需要。

参考文献

[1] PEUMANS WJ, BARRE A, QIANG H, et al. A review: Higher plants develop structurally different motifs to recognize foreign glycans[J]. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2000, 12(64): 83-101.

[2] SRINIVAS R, ACHARYA S, RAWAT S, et al. The primary structure of the acidic lectin from winged bean (*Psophocarpus tetragynobus*): insights in carbohydrate recognition, adhesion binding and quaternary association[J]. FEBS Letters, 2001, 474: 76-82.

(上接第4621 页)

- [3] BARRE A, BOURNE Y, VAN DAMME E J M, et al. Mannose binding plant lectins :different structural scaffolds for a common sugar-recognition process[J] . *Biochimie*,2001 ,83 :645 - 651 .
- [4] A 瓦尔基. 糖生物学基础[M] . 北京: 科学出版社,2003:410- 413 .
- [5] 魏伟立. 一起集体性食物中毒的调查分析[J] . *河北医学*,2005 ,11(11) : 1017 - 1018 .
- [6] 汪东风. 食品中有害成分化学[M] . 北京: 化学工业出版社,2006 :28 -

30 .

- [7] 翟朝阳. 生物分子实验教材[M] . 成都: 四川大学出版社,2004:1 - 3 .
- [8] 王凯南, 朱琳云, 曲爱琴, 等. 麦胚凝集素的分离纯化和鉴定[J] . *中国生化药物杂志*,2005 ,26(2) :67 - 69 .
- [9] 刘艳如, 余萍, 郑怡. 3 种食用菌凝集素的纯化和部分生物学活性的比较[J] . *福建师范大学学报: 自然科学版*,2005 ,21(4) :92 - 96 .
- [10] ROGERS DJ ,HORI K. Marine algal lectin :new developments[J] . *Hydrobiologia* ,1993 ,260 :589 - 593 .