

海萝凝集素的分离纯化及性质

宋玉娟¹, 崔铁军², 李丹彤², 刘 扬²

(1. 中国药品生物制品检定所 生化药室, 北京 100050; 2. 大连水产学院 养殖系, 辽宁 大连 116023)

摘要:海萝(*Gloiopeltis furcata*)经 PBS 缓冲液抽提, 硫酸铵分级、DEAE-52 纤维素离子交换层析和 Sephadex G-200 分子筛层析, 从中纯化出海萝凝集素(GFL), 在 PAGE 和等电聚焦电泳上各显示单一蛋白染色带, 其等电点为 9.0。用 Sephadex G-200 分子筛层析测得其相对分子质量为 8 318。海萝凝集素除对人血型红细胞无凝集活性外, 对单胞藻及兔、鲤、鲫的红细胞均表现出一定程度的凝集活性, 对兔红细胞的凝集活性最强, 且不被已测试的 D-果糖、D-半乳糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖所抑制, 而被 D-甘露糖、牛甲状腺球蛋白、鸡卵白蛋白、 γ -球蛋白抑制。该凝集素在 pH 4.0–10.2 均有活性, 而在 pH 6.5–9.1 时活性较高。该凝集素在 90 ℃ 加热 1 h, 活力并未减弱, 说明这种凝集素具有很强的耐热性。

关键词:海萝; 凝集素; 纯化; 理化性质

中图分类号: Q946.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)02-0167-06

凝集素是非免疫起源的蛋白质或糖蛋白, 它不仅具有凝集细胞、抑制肿瘤细胞增殖、激活淋巴细胞、抑制血小板凝集等多种生物活性, 而且还可能参与了生物体内胚胎发育和机体代谢的调控等重要的生理和病理过程^[1]。

陆生生物凝集素已被大量纯化并在生物化学和生物医学等方面得到了广泛而深入的研究和应用。海洋生物凝集素的生物活性绝不比陆生生物凝集素逊色, 尤其是海藻凝集素, 它广泛分布于各种海藻中^[2], 但是, 由于其分离纯化困难以及原料采集受地理条件所限制, 从 20 世纪 70 年代才开始对它们进行研究。到 1994 年为止, 仅有 10 种绿藻和 13 种红藻的凝集素被分离纯化^[3], 并且, 其中从 5 种海藻得到的只是部分纯化制品, 作为商品出售的凝集素仅见 2 种^[4]。其比较生物化学及更深层的研究, 如糖链顺序和构造的研究^[2]尚属空白。

经笔者筛选, 大连海域的红藻海萝(*Gloiopeltis furcata*)具有极高的生物凝集活性, 且国内外尚未见对其分离纯化的报道。本研究对其进行分离纯化及性质分析, 以期对海藻凝集素的分离提纯方法作一些探索性研究, 为海洋药物开发及水产经济动物病害防治开拓出一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 海萝(*Gloiopeltis furcata*)采于大连市小平岛, 兔子购于大连医科大学实验动物中心, 鲤、鲫鱼购于大连市长兴市场, 单胞藻取自大连水产学院海养楼藻种间, A、B、O、AB 型人血液由本校健康学生提供。

1.1.2 试剂 Sephadex G-200 (Pharmacia)、蓝葡聚糖(Blue Dextran 2000, 上海伯奥生物科技有限公司)、DEAE-纤维素(DEAE-52, What'man 进口分装)、核糖核酸酶(Pharmacia)、 γ -球蛋白(human, Serva)、Ampholine(pH 3.5–10.0)等其他等电聚焦用品均采用 LKB 成套产品, 牛血清白蛋白(上海浦江生物化学研究所)、卵清蛋白(上海生化所东风技术公司)、生理盐水(锦州制药一厂), 其他试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 海萝凝集素的分离纯化

(1)样品的采集和粗提液的制备 海藻采回后立即用过滤海水洗净, 用纱布及滤纸吸干表面水分, 分装到干净的塑料袋中, 放入冰箱中冷冻, 然后再置于冷冻干燥机中冻干, 将干藻用样品磨粉, 称取藻

收稿日期: 2004-05-24; 修订日期: 2004-08-26。

基金项目: 农业部 85-青年基金资助项目(渔 85-93-青 05)。

作者简介: 宋玉娟(1970-), 女, 硕士, 从事生化药的检测与研究。E-mail: lcy@isc.org.cn

粉 20.00 g 加入 400 mL PBS 缓冲液中, 间歇搅拌过夜(4℃), 离心(4℃, 5 000 r/min, 55 min), 得到的上清液即为粗提液。

(2) 硫酸铵分级和透析 硫酸铵分级参考赵永芳的方法^[5]。冰水浴条件下, 在粗提液的低饱和度(30%)和高饱和度(85%)(NH₄)₂SO₄两侧分别做分级实验, 选低饱和度梯度中上清活力最强的饱和度(35%)和高饱和度梯度中上清活力最弱的饱和度(85%), 然后在冰水浴条件下, 向粗提液中加入研磨好的固体硫酸铵至 35% 饱和度, 搅拌过夜(4℃), 离心(4℃, 5 000 r/min, 55 min), 弃沉淀取上清。在冰水浴条件下将研磨好的固体硫酸铵加入上清中至 85% 饱和度, 搅拌过夜(4℃), 离心(4℃, 5 000 r/min, 55 min)。透析参考文献[6], 收集沉淀于透析袋中, 对蒸馏水透析至无 SO₄²⁻ 为止(10%的 BaCl₂ 检验), 然后将样品进行冷冻干燥。

(3) DEAE-离子交换层析 取透析后样品 100.0 mg, 用 2.0 mL 0.01 mol/L 的 Na₂HPO₄ 溶解, 上 DEAE-纤维素柱(1.6 cm × 30 cm), 上样后先用 0.01 mol/L 的 Na₂HPO₄ 平衡一个柱体积, 然后用 NaCl 浓度为 0.1 mol/L 的 pH 由 8.0(0.01 mol/L 的 Na₂HPO₄) 到 4.0(0.5 mol/L 的 NaH₂PO₄) 的连续 pH 梯度洗脱。流速为 30 mL/h, 3 mL/tube, 部分收集器收集, 751 型分光光度计测 A₂₈₀, 洗脱至 A₂₈₀ < 0.01。检测每管的凝集活性, 将有活力峰进行收集合并。

(4) Sephadex-G200 分子筛凝胶层析进行分离提纯及相对分子质量测定^[7] 层析柱为 1.6 cm × 30 cm, 洗脱液为含 10% 叠氮化钠的生理盐水, 流速 20 mL/h, 3 mL/tube, 样品为经过浓缩的离子交换层析得到的活力峰。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测 参照瑞典 LKB 公司多用电泳仪操作手册进行。胶浓度 7.5%, 胶缓冲液 pH 为 8.9, 预电泳 50 mA, 30 min,

前电泳 20 mA, 10 min, 电泳 40 mA, 3 h, 然后用三氯乙酸固定, 考马斯亮蓝 R250 染色, 用冰醋酸-乙醇脱色, 放入保存液(乙醇冰醋酸、冰醋酸、甘油、双蒸水的体积比为 3:1:1:5), 最后制成干板保存。

1.2.3 蛋白质含量测定^[8] 采用 A₂₈₀, 以牛血清白蛋白作对照。

1.2.4 凝集活性的测定 参考李丹彤、崔铁军的方法^[9]。测定凝集素对其他类型血细胞和单胞藻的凝集活性的方法同上, 可借助显微镜和血球计数板进行定量。

1.2.5 等电聚焦电泳测定等电点 等电聚焦电泳按瑞典 LKB 公司多用电泳仪操作手册进行。Ampholine 的 pH 范围为 3.5~10.0, 胶浓度为 4.8%, 胶厚度为 0.5 mm, 采用表面电极测胶板 pH。

1.2.6 糖抑制实验和蛋白抑制实验 参照李丹彤、崔铁军等的方法^[9]。

1.2.7 pH 对血凝活力的影响 参考 Ahmed 和 Chatterjee 的方法^[10] 配制 pH 4.0~10.2 的系列缓冲液, 测定不同 pH 条件下的血凝活力。

pH 4.00~6.00 时采用 0.015 mol/L 的柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液, pH 6.50~7.50 时采用 0.015 mol/L 的磷酸盐缓冲液, pH 8.00~9.00 时采用 0.015 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 9.51~10.14 时采用 0.015 mol/L 的 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液。

1.2.8 热稳定性实验 将浓度为 1.0 mg/mL 凝集素分级后样品分成若干份, 分别在 20~90℃ 的不同条件下温育 10 min、20 min、60 min, 取样, 冷却, 与空白做对照, 测定血凝活性。

2 结果

2.1 海萝凝集素的分离纯化

(1) 冷冻干燥, PBS 抽提, 离心。结果见表 1。

表 1 海萝凝集素的纯化结果

Tab.1 Purification of lectin from *Gloiopeltis furcata*

成分 Fraction	总体积/mL Total volume	总蛋白/mg Total protein	最小活力体积/ μ L Hemagglutinating	总活力/U Total activity	比活力/(U·mg ⁻¹) Specific activity	纯化倍数 Purification times	活力回收率/% Yield
粗提液 Crude Extract	400	2 733.88	10	4.00 × 10 ⁴	14.63	1	100
35% (NH ₄) ₂ SO ₄	391	1 811.60	16	2.44 × 10 ⁴	13.47	1	61
85% (NH ₄) ₂ SO ₄	667	667.00	20	3.33 × 10 ⁴	49.93	3	83
离子交换层析 Ion-exchange chromatography	3.0	63.27	40/2 ^a	3.84 × 10 ⁴	606.92	41	96
分子筛凝胶过滤 Gel filtration	15.0	27.83	40/2 ^c	1.20 × 10 ⁴	431.19	29	30

* 透析干燥后配成 1 mg/mL 的溶液。
1 mg/mL dialysed and dried sample.

(2)硫酸铵分级及透析,选低饱和度梯度中上清活力最强的饱和度 35% 和高饱和度梯度中上清活力最弱的饱和度 85%。有关数据见表 1。

(3)DEAE-纤维素层析,得到一个蛋白峰,只有蛋白峰之后的 58 管有活性,结果见表 1 和图 1。

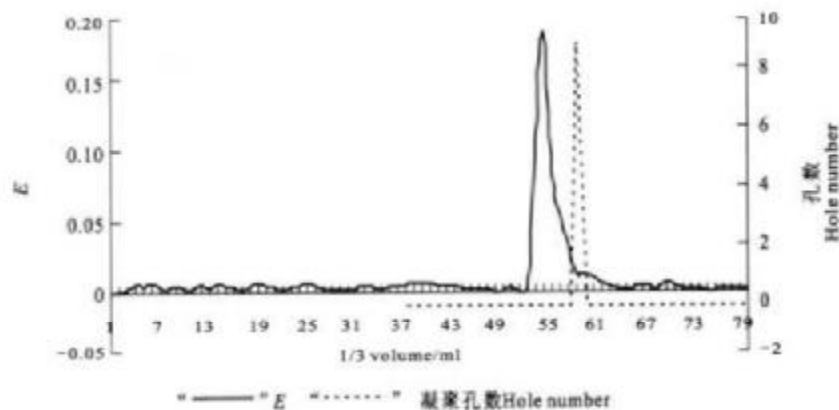


图 1 DEAE-纤维素离子交换层析

Fig.1 Ion-exchange chromatography of lectin from *Gloiopeltis furcata* and from *Gloiopeltis furcata*

(4)SephadexG-200 分子筛层析得一个蛋白峰,为活力峰,结果见表 1。合并有活性部分,透析,冷冻干燥得白色样品。在 PAGE 上显示一条蛋白质染色带,结果见图 2。



图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.2 Polyacrylamide gel electrophoresis pattern
a. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation; b. Purified GFL.

2.2 海萝凝集素的理化性质

2.2.1 海萝凝集素的相对分子质量 海萝凝集素经 SephadexG-200 分子筛层析,得到一个活性峰。以核糖核酸酶(ribonuclease)(13 700),卵清蛋白(Egg albumin)(45 000),牛血清白蛋白(bovine serum albumin)(67 000), γ -球蛋白(gamma-globulin)(165 000)为标准绘制标准曲线(图 3)。根据海萝凝集素最大活力峰位的 K_{av} 值求得相对分子质量为 8 318。

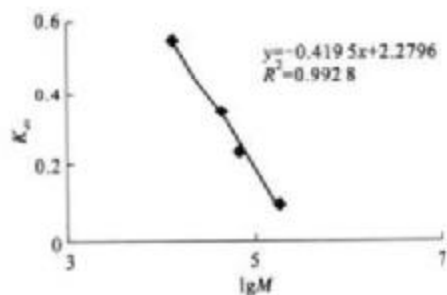


图 3 SephadexG-200 测定相对分子质量的结果

Fig.3 Molecular weight determination of the *Gloiopeltis furcata* lectin on sephadexG-200

2.2.2 海萝凝集素的等电点 纯化后的海萝凝集素用等电聚焦的方法得到单一蛋白染色带,其等电点为 9.0(图 4)。

2.2.3 海萝凝集素的血凝活性及单胞藻的凝集活性 用人的 A、B、O、AB 4 种血型红细胞及鲤(common carp)、鲫(crucian carp)、兔(rabbit)红细胞进行血凝活性实验,用新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)、亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)、叉鞭金藻(*Dicrateria*)和小球藻(*Chlorella* spp.)做单胞藻凝集活性实验,结果见表 2。

2.2.4 海萝凝集素的热稳定性 海萝凝集素的耐热性较高,从 20~90℃ 活性保持稳定。

2.2.5 海萝凝集素的糖抑制实验和蛋白抑制实

验 用兔红细胞进行糖抑制实验,结果显示海萝凝集素只被甘露糖抑制,最小抑制浓度为 0.5 mol/L。以等量生理盐水代替凝集素作为对照,结果发现甘露糖和红细胞发生凝集,蔗糖使红细胞沉降速度变慢,但最终下沉在血凝板 V 型孔底部形成明显红点。实验所用 3 种蛋白在一定浓度下均表现出抑制作用,但浓度升高到一定程度则表现出促凝现象,结果见表 3。

2.2.6 pH 对海萝凝集素的血凝活力的影响 海萝分级透析后的干粉制成 1.0 mg/mL 的溶液,在 pH 4.0~10.2 缓冲系统中室温静置 2 h,用兔红细胞测定其血凝活力。像大多数海藻凝集素一样,海萝凝集素在宽的 pH 范围内表现出凝集活力,在 pH 6.5~9.1 范围内保持稳定,结果见表 4。



图 4 等电聚焦电泳结果
Fig.4 Isoelectrofocusing electrophoretic pattern of purified GFL.

表 2 海萝凝集素的血凝活性及单胞藻凝集活性
Tab.2 Hemagglutinating activity of *Gloiopeltis furcata* lectin

项 目 Item	兔 Rabbit	鲤 Common carp	鲫 Crucian carp	人血型 Human				菱形藻 <i>Nitzschia clontertium</i>	扁 藻 <i>Platymonas nubcordiformis</i>	叉鞭金藻 <i>Dicrateria</i>	小球藻 <i>Chlorella</i> spp.
				A	B	O	AB				
凝集活性 Hemagglutinating activity	2 ³	2 ²	2 ²	2 ⁰	2 ⁰	2 ⁰	2 ⁰	2 ¹	2 ¹	2 ¹	2 ¹

表 3 蛋白对海萝凝集素凝集活性的抑制
Tab.3 Inhibition of hemagglutinating activity of *Gloiopeltis furcata* lectin by proteins

项 目 Item	mg/mL		
	牛甲状腺球蛋白 Bovine throglobulin	鸡卵白蛋白 Egg albumin	γ -球蛋白 Gamma-globulin
最小抑制浓度 Minimum inhibitory concentration	15.20	1.56	0.45
最小促凝浓度 Minimum concentration	61.00	6.25	3.63

表 4 海萝凝集素的 pH 稳定性
Tab.4 pH stability of *Gloiopeltis furcata* lectin

pH	4.0	4.5	5.0	5.6	6.0	6.5	6.9	7.2	7.5	8.0	8.6	9.1	9.6	10.2
血凝活力 Hemagglutinating activity	2 ¹	2 ¹	2 ¹	2 ¹	2 ¹	2 ²	2 ²	2 ²	2 ²	2 ²	2 ²	2 ²	2 ¹	2 ¹

3 讨论

实验采用海藻凝集素分离提纯的经典方法,即纤维素离子交换层析和 Sephadex 分子筛层析相结合的方法,DEAE-52 纤维素离子交换层析实验发现,海萝对 NaCl 提供的离子强度改变反应明显。

经过对洗脱液 pH 梯度和 NaCl 浓度的反复调整,本实验得到了较好的纯化效果,即只有一管有活力。海萝经过上述两步层析后,在 (NH₄)₂SO₄ 分级的基础上纯化了 41 倍,其中 DEAE-52 离子交换层析的活力回收率高达 96%。经以上两步纯化得到了较纯的凝集素制品,该制品经 PAGE 及等电聚焦均显

示一条蛋白染色带。但上述方法的缺点是两步层析使凝集素有较多的损失。

用 Sephadex G-200 分子筛层析测得海萝凝集素的相对分子质量为 8 318 与文献[2-3]关于海藻凝集素的相对分子质量较小(4.2~43 kD)的报道相符合。已报道的海藻凝集素最低的相对分子质量为 3.5 kD^[11],这与陆生植物凝集素的相对分子质量多在 10 万左右形成鲜明对照。红翎菜属 3 种凝集素的蛋白质 N-端 AA 排列顺序基本相同,但与陆生植物的迥然不同,所以海藻凝集素的分子构造对研究凝集素分子进化有着特殊意义。

海萝凝集素对单细胞具有凝集活性,这在国内尚属首次报道。它为海洋经济动物病害防治提供了有力的理论和实践基础。此外,海萝凝集素还对兔红细胞表现出极强的凝集活性。

凝集素所显示的种种生物活性,可能都是凝集素和复合糖蛋白的糖链进行特异性结合所引起的。所以研究其识别的糖链结构非常重要。糖抑制实验表明,牛甲状腺球蛋白、鸡卵白蛋白和 γ -球蛋白对海萝凝集素在超过一定浓度时表现促凝作用。笔者推测,促凝作用可能是由于这些蛋白和红细胞膜上凝集素的活性结合位点直接或间接作用引起的。也有文献[3]推测,这是一种异构现象所致。确切的结果尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙 册,朱 政,莫汉庆,等.凝集素[M].北京:科学出版社,1986.1.
- [2] 堀贯治.海藻のレクチン[J].化学と生物,1989,27(4):210-212.
- [3] 堀贯治.海藻のレクチン[J].化学と生物,1989,32(9):586-594.
- [4] Rogers D J.黄方吕节译.海藻凝集素[J].中国海洋药物,1991(2):54-56.
- [5] 赵永芳.生物化学技术原理及其应用[M].武汉:武汉大学出版社,1994.6.
- [6] 北京师范大学生物系生物化学教研室.基础生物化学实验[M].北京:高等教育出版社,1992.17.
- [7] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:人民教育出版社,1982.124-132.
- [8] 北京大学生物系生物化学教研室编.生物化学实验指导[M].北京:人民教育出版社,1980.94-96.
- [9] 李丹彤,崔铁军,马国庆,等.孔石莼凝集素的分离纯化及性质的研究[J].中国生物化学与分子生物学报,2000,16(6):773-778.
- [10] Ahmed H, Chatterjee B P. Further characterization and immunochemical studies on the carbohydrate specificity of Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) lectin[J]. Journal Biological Chemistry, 1989, 264: 9 365-9 372.
- [11] Sampaio A H, Rogers D J, Barwell C J. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. [J]. Botanica Marina, 1998, 41: 427-432.

Isolation, purification and characterization of lectin from *Gloiopeltis furcata*

SONG Yu-juan¹, CUI Tie-jun², LI Dan-tong², LIU Yang²

(1. Department of Biochemistry, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. Department of Aquaculture, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: Lectins are proteins or glycoproteins. They show specific in agglutination for many kinds of cells. They behave important regularization function and some other activation in organism, such as inhibiting the increment of tumor cell, activating lymphocyte and inhibiting the agglutination of blood platelet, and they are also concerned with the process of fetation and metabolism. Lectins from terrestrial plants and animals have been isolated, characterized and exploited extensively in many aspects of biochemistry and biomedicine. There has not been a comparable utilization of lectins from marine algae, mainly due to difficulties in their isolation and obtaining sufficient material for study. The real study of marine algal lectins began in the 1970s, and by the end of 1994, only 10 kinds of green marine algae and 13 kinds of red marine algae were purified. In addition, 5 of the marine algae were partly purified, while only 2 of them were sold as purified commodity, relatively few algal lectins have been purified and characterized in detail. We screened out red marine algae *Gloiopeltis furcata* in the sea near to Dalian, which showed more potentiality than some

other marine algae in hemagglutinating activity. There hadn't been any report about the isolation, purification and characterization of lectin from *Gloiopeltis furcata* (GFL) before. We purified it and examined part of its characterization in order to explore the method of purifying marine algae lectins for the purpose of development of marine medicine and the approach of prevention and cure of diseases in marine culture animals.

GFL was purified by extraction with PBS, followed by 35% - 85% ammonium sulfate fraction, dialysis against distilled water and a combination of ion-exchange chromatography on DEAE-52 cellulose and gel filtration on sephadex G-200. The columns of 1.6 cm × 30 cm are suitable for both. One single band appeared on both PAGE and isoelectrofocusing electrophoretogram of the lectin. Its isoelectric point was 9.0, and its relative molecular weight was 8 318 on sephadex G-200. GFL displayed some agglutination activity with *Chlamydomonas*, erythrocytes of rabbit, common carp and crucian carp, but not any with erythrocytes of human (A, B, AB, O). The hemagglutinating activity followed the order as erythrocytes of rabbit (2^3) > erythrocytes of common carp (2^2) = erythrocytes of crucian carp (2^2) > *Chlamydomonas* (2^1). The agglutination for erythrocytes of rabbit was the highest and the activity could not be inhibited by D-fructose, D-galactose, glucose, sucrose, lactose, but could be inhibited by D-mannose, bovine-thyroglobulin, egg albumin and gamma-globulin, and the minimum inhibitory concentration were respectively 0.5 mol/L by D-mannose, 15.20 mg/mL by bovine-thyroglobulin, 1.56 mg/mL by egg albumin and 0.45 mg/mL by gamma-globulin. Like most lectins from marine algae, GFL was found to be active over a wide range of pH. The hemagglutinating activity of the lectin appeared at pH 4.0 - 10.2, and more active at pH 6.5 - 9.1. The hemagglutinating activity was not affected by heating for 60 min at 90 °C, so it was shown that the lectin had higher heat resistance.

Key words: *Gloiopeltis furcata*; lectin; purification; characterization

征 订 启 示

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家自然科学核心期刊, 获得第三届“百种国家杰出学术期刊”奖。本刊主要报道水产生物学基础研究、水产生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及渔船、渔业机械与仪器等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。主要服务对象是科研、教学、科技管理人员以及大专院校师生。是反映水产科研创新成果的窗口和培养人才的园地。

本刊为双月刊, A4开本, 单月出版, 国内外公开发行。国内定价 14 元/期, 全年 84 元(含邮费)。邮发代号: 18—250, 国内统一刊号: CN11—3446/S, 国际标准刊号: ISSN1005—8737, 国外代号 4639Q。全国各地邮电局(所)办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期刊, 请直接向编辑部订阅。

编辑部地址: 北京市丰台区青塔村 150 号, 邮政编码: 100039

联系电话: 010-68673921, 传真: 010-68673931

E-mail: jfishok@publica.bj.cninfo.net

网址: www.cnfs.ac.cn