

文章编号:1005-8737(2000)03-0080-05

角叉菜凝集素的分离纯化及其性质

李丹彤,崔铁军,马国庆,汤霞,李熙宜

(大连水产学院 养殖系,辽宁 大连 116023)

摘要:角叉菜(*Chondrus ocellatus*)经磷酸盐缓冲液抽提,20%~75%硫酸铵分级沉淀,牛甲状腺球蛋白—Sephadex 4B亲和层析,可以从红藻角叉菜中纯化出角叉菜凝集素(COL),在PAGE上显示单一蛋白染色带,在等电聚焦电泳上显示单一蛋白染色带,其PI为8.30。纯化后的COL的最大紫外吸收峰在285 nm,用Sephadex G-200分子筛层析测得其分子量为4 252。该凝集素可以凝集人的A、B、AB、O型红细胞,且凝集活性相同,在对人、兔、鲤、鲫的红细胞的凝集作用中,对兔红细胞的凝集作用最强,且不被已测试的D-半乳糖、D-果糖、D-甘露糖、葡萄糖、蔗糖、甘露聚糖、 γ -球蛋白、卵清蛋白所抑制,仅被牛甲状腺球蛋白抑制,最小抑制质量浓度为3.10 mg/ml。

关键词:角叉菜;凝集素;纯化;理化性质

中图分类号:Q946.1

文献标识码:A

凝集素是非免疫起源的蛋白质或糖蛋白,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功能的生物活性。

凝集素被发现已有百余年,但直到20世纪40年代才开始为人们所关注。自70年代后期,海洋生物(海藻、无脊椎动物、鱼类)凝集素不断被提取、纯化。对其性质也逐步有所了解,并发现海洋生物凝集素的生物活性不逊于植物凝集素。目前,已证实多种海藻中存在凝集素,但成功地进行分离纯化的却不多,据堀贯治^[1]报道仅有10种绿藻和13种红藻的凝集素被分离纯化,且从其中5种红藻中得到的只是部分纯化制品。与其它生物凝集素相比,有关海藻凝集素的信息很少,其比较生物化学研究尚属空白。主要是研究条件、提纯方法困难所限^[1]。

经对大连地区一些藻类凝集素进行筛选,发现角叉菜(*Chondrus ocellatus*)生物量较大,且凝集活

性较高,而目前在国内外尚未见到有关角叉菜凝集素(COL)的研究报道,本研究首次成功地采用牛甲状腺球蛋白—Sephadex 4B亲和层析方法对其纯化,并研究其性质,以期海洋药物开发及海产经济动物病害防治开拓一条新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

角叉菜于1997年5月采自大连小平岛耗子洞海岸,兔购于大连医科大学实验动物中心,人的A、B、AB、O型血液由健康学生、教师提供。

牛甲状腺球蛋白,酵母甘露聚糖(Sigma);CN-sepharose 4B, Sephadex G-200, 蓝色葡聚糖(Blue Dextran 2000),核糖核酸酶(Pharmacia); γ -球蛋白(human, Serva);Ampholine pH 3.5~9.5等其它在等电聚焦电泳上均采用LKB产品;牛血清白蛋白(上海浦江应用生物化学研究所);卵清蛋白(上海生化所东风技术公司);生理盐水(辽宁阜新制药厂),其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 牛甲状腺球蛋白—Sephadex 4B的制备

收稿日期:2000-01-26

基金项目:农业部八五—青年基金资助项目(渔85—93—青05)

作者简介:李丹彤(1965—),女,大连水产学院硕士,讲师,从事生物化学专业研究。

按赵永芳等^[2]的方法。

1.2.2 角叉菜凝集素的分离纯化

(1)磷酸盐缓冲液抽提。角叉菜采回后立即用过滤海水洗净,用纱布及滤纸吸去水份。称取 100 g 鲜品放入冰箱中冷冻,然后再置于冷冻干燥机中冻干,将干藻于捣碎机中捣成粉末(27 g),加入 0.15 mol/L NaCl PBS (0.015 mol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.2) 540 ml 浸泡 16 h, 5 000 r/min, 离心(4℃) 55 min 取上清液即为粗提液。

(2)硫酸铵分级。在冰水浴条件下(0℃),向粗提液加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 达 20% 饱和度,过夜(4℃),离心(同上),取上清。冰水浴中向上清液加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 75% 饱和度,过夜(4℃),再离心(同上),收集沉淀溶于蒸馏水中,于蒸馏水中透析至无 SO_4^{2-} ,冻干 5 ml,留做电泳用,其余部分再对 PBS 充分透析。

(3)牛甲状腺球蛋白—Sephrose 4B 亲和层析。取透析后样品 3 ml(含蛋白 70 mg),上亲和层析柱后,流速为 10 ml/h,待样品全部进入层析柱后,静置 30 min,待其充分反应。用 150 ml 0.15 mol/L NaCl PBS 洗脱至 $A_{280} < 0.02$,然后换用 1 mol/L NaCl PBS 解吸附,洗脱与解吸附过程皆分步收集,流速为 15 ml/h,3 ml/管,经 280 nm 紫外测定,并检测各管的凝集活性,将有活性的凝集素溶液合并,透析,冻干得 COL 亲和样品。

1.2.3 蛋白含量测定^[3] 用 $A_{280\text{ nm}}$ 表示,以牛血清白蛋白做对照。

1.2.4 血凝活性测定 离心管用含抗凝剂的生理盐水溶液润洗后,放入新鲜血液,用生理盐水离心洗涤 4 次(4 000 r/min, 10 min),最后用生理盐水配制成 1% 的红细胞悬液。

在 96 孔 V 型血凝板上用 40 μl 凝集素溶液与等量生理盐水系列倍比稀释后,加入 1% 红细胞悬液 40 μl ,室温放置 2 h 后,肉眼观察,无凝集现象时红细胞沉积在 V 型孔底部呈大红点状,有凝集现象时呈网状不下沉,血凝活力以产生凝集现象时的最小凝集素的量或凝集素最大稀释倍数表示。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测 参照 PAGE—2001/2002 a, b 上海华泳公司使用说明,浓缩胶质量分数为 5%,分离胶质量分数为 15%,浓缩胶缓冲液 pH 6.8,分离胶缓冲液 pH 8.8,电流 17 mA,电泳 5 h,10% 三氯乙酸固定后用考马斯亮兰 R250 染色,冰醋酸—乙醇脱色,放入保存液(乙醇:

冰醋酸:甘油:双蒸馏水 = 3:1:1:5),然后制成干板保存。

1.2.6 分子量与紫外吸收光谱测定 采用 Sephadex G-200 分子筛凝胶过滤法^[4]测定分子量。

用 751G 型分光光度计测定 240~320 nm 的光吸收值。

1.2.7 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 3.5~9.5,胶质量分数 4.8%,胶厚度 0.5 mm,采用表面电极测胶板 pH。

1.2.8 糖抑制试验 在 96 孔 V 型血凝板中,加入糖或糖蛋白溶液 40 μl ,用生理盐水进行倍比稀释,然后加入能凝集兔红细胞的最小浓度凝集素,静置 15 min(室温)再加入 1% 兔红细胞振匀,静置 2 h,观察糖抑制兔红细胞凝集的最小浓度。

2 结果

2.1 角叉菜凝集素的分离纯化

COL 硫酸铵分级抽提液,经牛甲状腺球蛋白—Sephrose 4B 亲和层析,得到 1 个对称蛋白峰(图 1),经检测活力峰与蛋白峰一致,COL 的亲和样品,在 PAGE 上为 1 条蛋白染色带(图 2)。纯化结果有关数据见表 1。

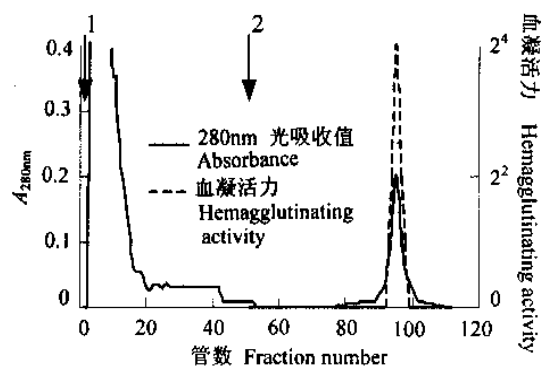


图 1 COL 在牛甲状腺球蛋白—Sephrose 4B 的亲和层析图
Fig.1 Affinity chromatography pattern of COL on bovine thyroglobulin-sepharose 4B column

柱:1.0×10 cm, column. 流速:15 ml/h, 3 ml/管。

1.0.15 mol/L NaCl, 0.015 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.2

2.1.0 mol/L NaCl, 0.015 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.2

2.2 角叉菜凝集素的理化性质

2.2.1 COL 的分子量 COL 的 20%~75% 硫酸铵分级抽提液经过 Sephadex G-200 分子筛层析,得

到1个蛋白峰,并且在蛋白峰部分具有2个活力峰(图3)。用核糖核酸酶(MW 13 700),卵清蛋白(MW 45 000),牛血清白蛋白(MW 67 000), γ -球蛋白(MW 165 000)为标准绘制测标准曲线,根据角叉菜最大活力峰的 K_{av} 求得分子量为4 252。

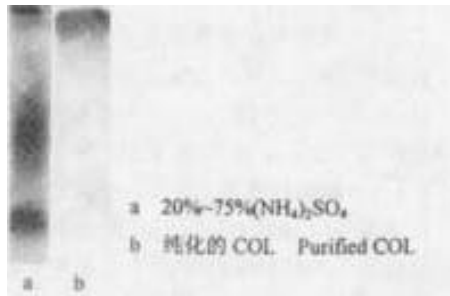


图2 COL 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.2 Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of COL

2.2.2 COL 的紫外吸收光谱 纯化后的 COL 紫外吸收光谱的最大吸收峰在 285 nm(图4)处。

2.2.3 COL 的等电点 纯化后的 COL 在等电聚焦电泳上得到单一蛋白染色带,其 PI 为 8.30。

2.3 角叉菜凝集素的血凝活性及糖对血凝活性的影响

2.3.1 血凝活性 人 A、B、AB、O 型红细胞,以及鲤、鲫、兔红细胞的血凝活性试验结果见表2。

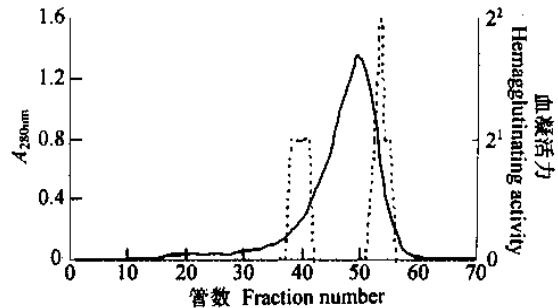


图3 COL 在 Sephadex G-200 柱上的凝胶层析图

Fig.3 Gel filtration pattern of COL on sephadex G-200 column

柱:1.6×90 cm. 流速:18 ml/h, 3 ml/管

—280nm 光吸收值 --- 血凝活力

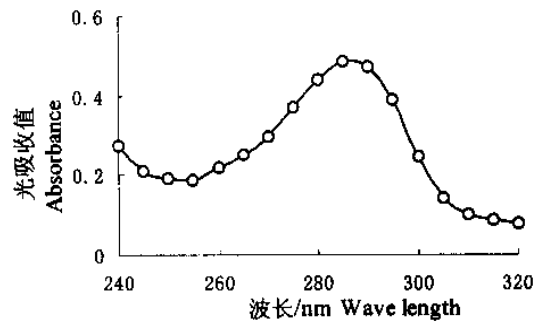


图4 纯化的 COL 的紫外吸收光谱

Fig.4 UV absorption spectra of purified COL

表1 角叉菜凝集素的纯化

Table 1 Purification of lectin from *C. ocellatus*

纯化步骤 Process of purification	总蛋白/mg Total protein	比活力/(U·mg ⁻¹) Specific activity	纯化倍数 Purification folds	回收率/% Yield
粗抽提 Crude extracting	1 823.60	60.61	1	100
20%~75%(NH ₄) ₂ SO ₄ 分级 Fractionation	667.30	134.23	2	81
亲和层析 Affinity chromatography	37.26	2 082.33	34	70

2.3.2 糖抑制实验 角叉菜凝集素质量浓度为 186.25 μ g/ml, 用兔红细胞进行糖抑制实验结果显示,角叉菜凝集素不被所测试的单糖、二糖、聚糖及

部分糖蛋白所抑制,仅被牛甲状腺球蛋白所抑制,最小抑制质量浓度为 3.10 mg/ml,见表3。

表2 角叉菜凝集素的血凝活力

Table 2 Hemagglutinating activity of COL

红细胞来源 Source of erythrocytes	兔 Rabbit	鲤 Common carp	鲫 Crucian carp	人 血 型 Human			
				A	B	AB	O
血凝活力 Hemagglutinating activity	2 ⁵	2 ³	2 ³	2 ³	2 ³	2 ³	2 ³

表 3 糖和糖蛋白对 COL 血凝活性的抑制

Table 3 Inhibition of hemagglutinating activity of COL by sugars and glycoproteins

糖和糖蛋白 Sugar and glycoprotein	起始浓度 Initial concentration	最小抑制浓度 Minimum inhibitory concentration
D-甘露糖 D-Mannose	500 mmol/L	—
D-半乳糖 D-Galactose	500 mmol/L	—
D-果糖 D-Fructose	10 mmol/L	—
葡萄糖 Glucose	10 mmol/L	—
蔗糖 Sucrose	10 mmol/L	—
酵母甘露聚糖 Mannan	46.5 mg/ml	—
牛甲状腺球蛋白 Bovine thyroglobulin	24.8 mg/ml	3.10 mg/ml
卵清蛋白 Egg albumin	43.0 mg/ml	—
γ -球蛋白 Gamma-globulin	80 mg/ml	—

“—”表示无抑制作用。Indicating absence of inhibition.

3 讨论

(1)糖抑制实验发现, COL 不被所测试的单糖、寡糖、聚糖及 2 种糖蛋白所抑制, 仅被牛甲状腺球蛋白抑制。利用牛甲状腺球蛋白-Sepharose 4B 亲和层析进行纯化, 得到的 COL 亲和样品经 PAGE 显示为单一的蛋白染色带, 经 PAGE 等电聚焦电泳显示单一蛋白染色带, 测得其 PI 为 8.30, 实验结果表明 COL 经上述步骤纯化, 可以获得 COL 的单一样品。采用亲和层析法进行纯化, 其分辨率比凝胶过滤层析法高, 并且操作步骤少, 活力不易丧失, 该法的难点是要分离纯化一种物质必须找到适宜的配基, 并将其制成固相载体。因此用亲和层析进行纯化虽然难度大, 但纯化效果好。在研究角叉菜凝集素的同时又对绿藻孔石莼进行了研究(待发表), 发现其凝集素也可以用牛甲状腺球蛋白-Sepharose 4B 进行纯化, 推测牛甲状腺球蛋白-Sepharose 4B 层析可能成为纯化海藻凝集素的通用方法。

(2)COL 分子量的测定用 Sephadex G-200 分子筛层析测得其分子量为 4 252。该凝集素的分子量低。这与已报道的来自于 *Bryothamnion seaforthii* 和 *B. triquetrum* 分子量分别为 4 500 和 3 500^[5] 比较相似。堀 贯治^[6]经过系统研究后, 认为海藻凝集素是一种低分子量凝集素。

(3)COL 对人的 A、B、AB、O 型红细胞都具有凝

集活力且凝集活力相同, 该凝集素对已测试的兔、鲤、鲫及人红细胞的凝集活力中以兔红细胞的凝集活力最高, 所以在提纯和性质研究中一般用兔红细胞来检测凝集活力。

(4)经糖抑制实验证明, COL 血凝活力只被牛甲状腺球蛋白抑制, 最小抑制质量浓度为 3.10 mg/ml。该凝集素不被所测试的其它糖及糖蛋白等所抑制, 推测可能该凝集素所识别的特定糖苷键为 Man α (1-4)Man。此推测尚需进一步试验证明。

致谢: 本文承日本广岛大学堀 贯治教授、本校刘焕亮教授指导, 许庆陵、宋良国老师给予很大帮助, 在此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] 堀 贯治. 海藻のシクチン[J]. 化学と生物, 1994, 32(9): 586-594.
- [2] 赵永芳, 祝 兵. ConA-sepharose 亲和吸附剂的制备及其纯化某些蛋白质的性能[J]. 生物化学与生物物理进展, 1984, (3): 67-71.
- [3] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京: 人民教育出版社, 1980, 94-96.
- [4] 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.
- [5] Ainouz I L, Sampeio A H, Freitas A L P, et al. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* [J]. R Bras Fisiol Veg, 1995, 7: 15-19.
- [6] 堀 贯治. 海藻のシクチン[J]. 化学と生物, 1989, 27(4): 210-212.

Isolation and purification of lectin from *Chondrus ocellatus* and the lectin properties

LI Dan-tong, CUI Tie-jun, MA Guo-qing, TANG Xia, LI Xi-yi

(Department of Aquaculture, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: The lectin from red algae *Chondrus ocellatus* (COL) was purified by extraction with PBS, followed by 20% ~ 75% ammonium sulfate fractionation and an affinity chromatography on the Bovine-thyroglobulin-Sepharose 4B column. One single band appeared on both PAGE and isoelectrofocusing electrophoretogram of the lectin. Its isoelectric point was 8.30, with peak absorption at 285 nm. Its molecular weight was 4 252 on sephadexG-200. The COL was nonspecific in agglutination for any type of human erythrocytes, and the hemagglutinating activities were all at the same level. The agglutination for rabbit was the highest among erythrocytes of human (A, B, AB, O), rabbit, common carp and crucian carp. The hemagglutinating activity for rabbit could not be inhibited by D-fructose, D-mannose, D-galactose, glucose, sucrose, mannan, gamma-globulin(human) and egg albumin, but inhibited by bovine-thyroglobulin, and the minimum inhibitory concentration was 3.10 mg/ml.

Key words: *Chondrus ocellatus*; lectin; purification; physico-chemical properties

欢迎订阅 2001 年《水利渔业》

《水利渔业》是由水利部中国科学院水库渔业研究所主办的水产技术刊物,主要栏目包括:研究与探索、名特优新、增殖养殖、营养与饲料、病害防治、捕捞加工、资源与环境、水产综述、渔业经验、水产信息等。本刊以实用技术为主,技术与经济并重,兼顾信息交流,对水产科研、渔业开发、技术推广、知识更新、渔业致富有实用价值。适合广大从事科研、技术推广、教学、生产和管理的水产工作者阅读。

《水利渔业》系中国水产核心期刊,湖北省一级优秀期刊,水利部优秀期刊,全国水产系统优秀期刊,中国自然科学核心期刊,《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》全文收录,《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊全文收录。本刊已连续三年被评为湖北省优秀期刊。本刊为双月刊,大16开,每期56页,国内外发行,国际刊号:ISSN1003-1278,国内统一刊号:CN42-1247/S,欢迎广大新老朋友到邮局订阅。邮发代号:38-76。每期定价5.00元,全年6期30元。

本刊欢迎读者直接汇款到编辑部邮购。

汇款地址:武汉市武昌雄楚大街578号《水利渔业》编辑部 邮政编码:430079 联系电话:027-87803555