

文章编号: 1000- 0615(2005)05- 0654- 05

## 刺参凝集素的分离纯化及其性质

李丹彤, 宋 亮, 钟 莉, 常亚青

(大连水产学院农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为探寻刺参药用价值, 探索其抑制肿瘤细胞增殖, 促进淋巴细胞转化等生物功能。将刺参(*Apotichopus japonicus*) 经磷酸盐缓冲溶液抽提, 20% ~ 75% 硫酸铵分级沉淀, Sephadex G- 200 分子筛层析, 得到刺参凝集素(AJL)。用 Sephadex G-200 分子筛层析测得其分子量为 85 652 Da。AJL 的含糖量为 20.9%。该凝集素可以凝集人的 A、B、AB、O 型红细胞, 且对 A 型红细胞凝集作用最强, 在对兔、鼠、鲤鱼、鸡和人的 A、B、AB、O 红细胞的凝集作用中, 对鸡的凝集作用最强。该凝集素凝集兔红细胞的作用不被 D-果糖、D-甘露糖、 $\gamma$ -球蛋白、葡萄糖、蔗糖、甘露聚糖所抑制, 而被牛甲状腺球蛋白所抑制, 其最小抑制浓度为  $1.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。该凝集素凝集兔红细胞的作用不被二价金属离子  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  及 EDTA 所抑制。该凝集素在 pH 4.0~ 10.14 系列缓冲液中均有活性, 其中在 pH 4.4~ 7.5 范围内血凝活性最高。该凝集活性在 90 °C 加热 30 min 后仍然对红细胞有凝集活性, 显示出较高的热稳定性。

**关键词:** 刺参; 凝集素; 纯化; 性质

中图分类号: S986.2 文献标识码: A

## Isolation, purification and properties of lectin from *Apotichopus japonicus*

LI Dan-tong, SONG Liang, ZHONG Li, CHANG Ya-qing

(Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology Certificated by Ministry of Agriculture,

Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Lectin was purified from *Apotichopus japonicus* Selenka by extraction with PBS, followed by 20% - 75% ammonium sulfate fractionation and molecular sieve chromatography on the Sephadex G-200. The Lectin had a molecular weight of 85 652 Da on Sephadex G-200 and contained saccharide of 20.9%. The lectin was nonspecific in agglutination for any type of human erythrocytes, and the hemagglutinating activity for human(A) was the highest, the agglutination for chicken was the highest, among erythrocytes of humans(A, B, AB, O), rabbits, mouse and common carp. The hemagglutinating activity for rabbit could not be inhibited by D-galactose, glucose, sucrose, mannan, gamma-globulin (human), but inhibited by bovine-thyroglobulin. The minimum inhibitory concentration was  $1.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The hemagglutinating activity was not inhibited by treatment with EDTA and  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ . This lectin had the maximum hemagglutinating activity at pH 4.4- 7.5, with activity at pH 4.0- 10.14. The lectin still showed agglutinating activity after being treated with 90 °C for 30 minutes, indicating that it had a high heat resistance.

**Key words:** *Apotichopus japonicus*; lectin; purification; properties

凝集素(lectin)是一类具有糖专一性,可促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白,其研究历史已有一百多年。早期对凝集素的研究多集中于高等植物。对海洋生物凝集素的研究集中于藻类<sup>[1,2]</sup>、

鱼类、无脊椎动物。无脊椎动物体内的凝集素最初是 1903 年从一种鲎(*Limulus polyphemus*)的体液中检测到<sup>[3]</sup>。2001 年, Yeaton<sup>[4]</sup>在 103 种无脊椎动物体内发现了凝集素的存在,并推断在所有

收稿日期: 2004-10-14

资助项目: 国家自然科学基金资助(30200212)

作者简介: 李丹彤(1965-),女,辽宁营口人,副教授,硕士,从事生物化学研究。Tel: 0411-84762887, E-mail: lidantong@dlfu.edu.cn

通讯作者: 常亚青, Tel: 0411-84762695, E-mail: yqchang@dlfu.edu.cn

无脊椎动物体内可能都有凝集素。凝集素除了存在于甲壳动物、软体动物等无脊椎动物的血清中<sup>[5]</sup>,也常常吸附在血细胞的细胞膜上<sup>[6]</sup>。

刺参作为海参纲的一种,其壁厚味美,营养丰富,且有滋补强身和药用功能。据《本草纲目拾遗》记载中列为补益药物,具有“补肾精、益精髓、消痰涎、摄小便、生血、壮阳,治疗溃疡生蛆”的功效。刺参又是中医治疗瘟热病方剂中重要成分。近年有人以刺参治疗某些晚期癌症,病人癌体缩小,体质改善的功效。迄今为止,有关养殖刺参凝集素(AJL)的研究未见报道。本研究采用4种动物的红细胞和人的4种血型红细胞对刺参凝集素的凝集活性进行检测,并进行了分子量、含糖量、最适pH、耐热性等性质的研究,以期探索其药用价值提供科学的依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验用养殖刺参于2003年1月采自山东荣城海域,实验兔、鼠购于大连医科大学实验动物中心;实验鲤购于大连黑石礁市场。

Sephadex G-200(Pharmacia进口分装),蓝葡聚糖(blue dextran 2000)(上海泊奥生物科技有限公司),牛甲状腺球蛋白(Sigma), $\gamma$ -球蛋白( $\gamma$ -globulin, human, serva),甘露聚糖(Sigma),细胞色素C(Sigma),卵清蛋白(上海化学试剂公司),生理盐水(大连德泽制药有限公司),氯化钠为国产优级纯,其它均为国产分析纯或生化试剂。

### 1.2 方 法

**AJL粗提液的制备** 刺参采回后立即用过滤海水洗净,在冰块上进行解剖,取体壁,剪碎,用捣碎机捣碎分装到塑料袋中,放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻,然后将150g置于冷冻干燥机中冻干,研磨后,称重为14.8773g,从中称取14g粉末于 $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl的PBS( $0.015\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (1:20),pH 7.2)280mL浸泡16h,离心( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $4500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 60min),取其上清液206mL,即为粗提液。

**AJL硫酸铵盐析分级范围的判定** 取80mL粗提液平均分成4份,分别放入4个小烧杯中,选择20%~75%、35%~85%、50%、75% 4个硫酸铵分级范围进行盐析,选择纯化倍数最高

的盐析范围作为硫酸铵分级范围。

**AJL 20%~75%硫酸铵分级和透析** 在冰水浴条件下向粗提液(20mL)中加入研磨好的固体硫酸铵达20%饱和度,边加边缓慢搅拌,然后过夜( $4^{\circ}\text{C}$ )。经离心(同上),弃沉淀取上清液。在冰水浴条件下向上清液中加入研磨好的固体硫酸铵至75%饱和度,过夜( $4^{\circ}\text{C}$ ),再离心(同上),弃上清,收集沉淀于适量蒸馏水中,对蒸馏水透析至无 $\text{SO}_4^{2-}$ ,再对PBS充分透析,得透析液5.45mL。

**Sephadex G-200分子筛层析** 层析柱为 $1.6\text{ cm}\times 90.0\text{ cm}$ ,洗脱液为含0.02%叠氮化钠的生理盐水,流速 $19.5\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ ,每管3.5mL。用兔红细胞检测活性, $A_{280\text{nm}}$ 测定蛋白含量。

### 1.3 刺参凝集素(AJL)性质

**蛋白含量的测定** 以 $A_{280\text{nm}}$ 表示,以牛血清白蛋白作对照<sup>[7]</sup>。

**糖含量的测定** 以 $A_{490\text{nm}}$ 表示,以葡萄糖标准液作对照,采用硫酸-酚法<sup>[8]</sup>。

**分子量的测定** 采用Sephadex G-200分子筛层析法<sup>[9]</sup>,层析柱为 $1.6\text{ cm}\times 90.0\text{ cm}$ ,洗脱液为含0.02%叠氮化钠的生理盐水,流速 $19.5\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ ,每管3.5mL。

**血凝活性的测定** 先将注射器针头消毒(煮沸法),然后用1%的肝素钠润洗针头,针筒及离心管;兔耳后静脉用75%酒精消毒,抽取兔血,用生理盐水洗涤离心4次( $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10min),最后用生理盐水配成2%的红细胞悬液<sup>[10]</sup>。在96孔V型血凝板上用40 $\mu\text{L}$ 凝集素溶液与等量生理盐水系列倍比稀释后,加入2%红细胞悬液40 $\mu\text{L}$ ,振匀,室温静置2h后,肉眼观察,无凝集现象时红细胞沉积在V型孔底部成大红点状,有凝集现象时成网状不下沉。血凝活性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。

**热稳定性试验** 将浓度为 $23.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 刺参凝集素分成若干份,每份1mL,分别在 $25\sim 90^{\circ}\text{C}$ 的不同条件下温育,于10min、30min不同时间取样,冷却,测定血凝活性。

**pH对血凝活性的影响** 参照Ahmed和Chatterjee<sup>[11]</sup>方法配制pH 4.0~10.14的系列缓冲液,测定不同条件下血凝活性。刺参凝集素浓度为 $23.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,pH 4.0~6.0采用 $0.015\text{ mol}\cdot$

$L^{-1}$ 的柠檬酸- $Na_2HPO_4$ 缓冲液;pH 6.50~7.50采用 $0.015\text{ mol}\cdot L^{-1}$ 磷酸盐缓冲液;pH 8.0~9.0采用 $0.015\text{ mol}\cdot L^{-1}$ 的 $Tris-HCl$ 缓冲液;pH 9.51~10.14采用 $0.015\text{ mol}\cdot L^{-1}$ 的 $Na_2CO_3-NaHCO_3$ 缓冲液。

EDTA及二价金属离子对血凝活性的影响

在96孔V型血凝板中,加入40 $\mu$ L EDTA,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ 溶液,用生理盐水进行倍比稀释,然后加40 $\mu$ L入能凝集兔红细胞的最小浓度2倍的凝集素( $2.98\text{ g}\cdot L^{-1}$ ),静置15 min(室温),再加入40 $\mu$ L 2%兔红细胞振匀,静置2 h,观察EDTA及二价金属离子抑制兔红细胞凝集的最小浓度。

糖抑制试验 在96孔V型血凝板中加入糖或糖蛋白溶液40 $\mu$ L,用生理盐水进行倍比稀释,然后加入40 $\mu$ L能凝集兔红细胞的最小浓度

2倍凝集素( $2.98\text{ g}\cdot L^{-1}$ ),静置15 min(室温),再加入40 $\mu$ L 2%兔红细胞悬液振匀,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 刺参凝集素(AJL)的分离纯化

刺参凝集素硫酸铵盐析分级范围 比较不同硫酸铵饱和度分级透析液的纯化倍数及回收率,确定硫酸铵盐析分级范围为20%~75%(表1)。

AJL的纯化分为3个步骤 (1)冷冻干燥, PBS浸泡,离心得墨绿色粗提液;(2)20%~75%硫酸铵分级沉淀得到黄绿色硫酸铵分级液;(3)经Sephadex G-200凝胶层析,得到活性物质;收集活性最大部分,透析,冷冻干燥得白色样品,纯化结果有关数据见表2。

表1 刺参凝集素盐析分级范围的确定

Tab.1 Determination of the fractional range on salting out of AJL

实验步骤 fractionation	总蛋白(mg) mg total protein	血凝活力( $\mu$ g) hemagglutinating activity	总活力(U) total activity	比活力( $U\cdot mg^{-1}$ ) specific activity	纯化倍数 purification fold	回收率% yield
粗抽提 crude extract	476.2	59.51	$8.00\times 10^3$	16.80	1	100
20%~75% $(NH_4)_2SO_4$	154.89	17.76	$8.72\times 10^3$	56.29	3.35	109
35%~85% $(NH_4)_2SO_4$	181.58	20.19	$9.01\times 10^3$	49.53	2.95	113
50% $(NH_4)_2SO_4$	63.14	17.42	$1.10\times 10^3$	17.42	1.04	13.7
75% $(NH_4)_2SO_4$	115.23	103.25	$1.12\times 10^3$	9.09	0.58	14

表2 刺参凝集素的纯化

Tab.2 Purification of the lectin from *A. japonicus*

实验步骤 fractionation	总糖(% , w/w) total saccharide	总蛋白(mg) total protein	血凝活力( $\mu$ g) hemagglutinating activity	总活力(U) total activity	比活力( $U\cdot mg^{-1}$ ) specific activity	纯化倍数 purification fold	回收率(% ) yield
粗抽提 crude extract	2.34	476.2	59.51	$8.00\times 10^3$	16.80	1	100
	20%~75% $(NH_4)_2SO_4$	154.89	17.76	$8.72\times 10^3$	56.29	3	109
sephadexG-200	20.9	1.859	2.66	$6.99\times 10^2$	375.94	22	9

### 2.2 AJL的分子量

刺参凝集素的20%~75%硫酸铵分级抽提液经SephadexG-200凝胶层析,得到一个蛋白峰,经血凝活性检测,得到两个活力峰(图1)。用细胞色素C(MW12384D),卵清蛋白(MW45000D), $\gamma$ -球蛋白(MW165000D)为标准绘制标准曲线

(图2)。根据AJL最大活力峰的 $K_{av}$ 求得分子量为85652 Da。

### 2.3 糖含量测定

用硫酸-酚法测得粗提液糖含量为2.34%,层析液中糖含量为20.9%(表2)。

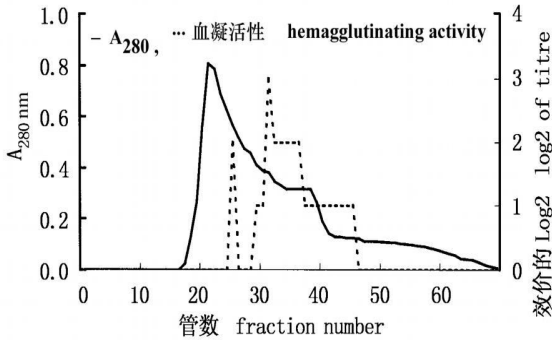


图1 AJL 在 SephadexG-200 柱上的凝胶层析图

Fig.1 Gel filtration pattern of AJL on SephadexG-200

柱: 1.6 cm × 90 cm, 流速: 19.5 mL·h<sup>-1</sup>, 每管 3.5 mL  
column: 1.6 cm × 90 cm, flowing rate: 19.5 mL·h<sup>-1</sup>, 3.5 mL per tube  
—A<sub>280</sub>, ...血凝活性 hemagglutinating activity

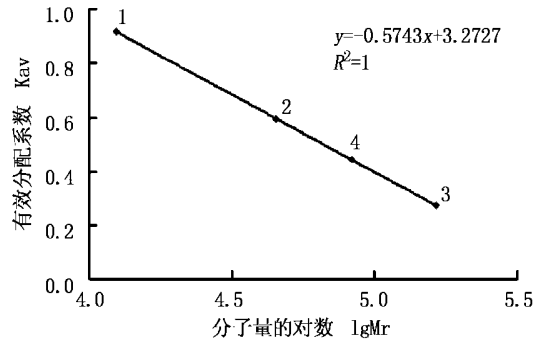


图2 AJL 在 SephadexG-200 柱上的分子量测定

Fig.2 Molecular weight determination of AJL on SephadexG-200

1. 细胞色素 C, 2. 卵清蛋白, 3. γ-球蛋白, 4. 刺参凝集素  
1. cytochrome C (MW 12 384 Da), 2. egg albumin (4 5000 Da),  
3. gamma-globulin (human) (MW 165 000 Da), 4. AJL

2.4 AJL 血凝活性及环境因素对 AJL 血凝活性的影响

**血凝活性** 刺参凝集素对 8 种红细胞进行血凝活性试验 (表 3)。

**热稳定性** 将刺参凝集素进行热稳定性试验, 结果表明: 在 90 °C 30 min 热处理后仍然对兔红细胞显示出血凝活性, 活性下降 50%。在 25~ 70 °C 保温 30 min, 活性均未见改变 (表 4)。

表 3 刺参凝集素血凝活性

Tab.3 Hemagglutinating activity of *A. japonicus* lectin

	兔 rabbit	鲤 common carp	鸡 chicken	鼠 mouse	人 human			
	A	B	O	AB	A	B	O	AB
血凝活性 hemagglutinating activity	2 <sup>4</sup>	2 <sup>0</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>

表 4 刺参凝集素的热稳定性

Tab.4 Thermal stability of the *A. japonicus* lectin

温度 (°C) temperature	25	30	35	40	50	60	70	80	90
	血凝活性 hemagglutination activity	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>

**pH 对 AJL 血凝活性的影响** 刺参凝集素在 pH 4.0~ 10.14 缓冲系统中, 25 °C 静置 2 h, 用兔红细胞测定其血凝活性, 当 4.0 < pH < 7.5 时, 活性为 2<sup>4</sup>, 当 pH ≥ 8.0 或 pH ≤ 4.0 时, 活性为 2<sup>3</sup>,

下降了 50%。

**EDTA 及金属离子对 AJL 血凝活性的抑制作用** AJL 浓度为 2.98 g·L<sup>-1</sup>, 用浓度为 100 mmol·L<sup>-1</sup> 的 EDTA, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 做抑制实验, 结果 AJL 对兔红细胞的凝集活性保持不变, 并未发生凝集抑制现象。

**糖抑制试验** AJL 浓度为 2.98 g·L<sup>-1</sup>, 用兔红细胞进行糖抑制试验, 结果表明 AJL 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抑制, 最小抑制浓度为 1.55 mg·mL<sup>-1</sup> (表 5)。

表 5 糖和糖蛋白对 AJL 血凝活性的抑制作用

Tab.5 Inhibition of hemagglutinating activity of the AJL by sugars and glycoproteins

	起始浓度 initial concentration	最小抑制浓度 minimum inhibitory concentration
糖 sugars		
D-galactose	500 mmol·L <sup>-1</sup>	-
D-fructose	10 mmol·L <sup>-1</sup>	-
glucose	10 mmol·L <sup>-1</sup>	-
sucrose	10 mmol·L <sup>-1</sup>	-
mannan	46.5 mg·mL <sup>-1</sup>	-
糖蛋白 glycoproteins		
γ-globulin	80 mg·mL <sup>-1</sup>	-
bovine thyroglobulin	24.8 mg·mL <sup>-1</sup>	1.55 mg·mL <sup>-1</sup>

注: - 表示无抑制作用

Notes - indicates absence of inhibition

### 3 讨论

用 20% ~ 75% 饱和度的硫酸铵分级沉淀, 得到的分级液提纯倍数为粗提液的 3 倍, 总活力回收率为 109%, 超过 100%, 其原因可能是粗提液中含有抑制剂, 如多聚糖, 它可以抑制凝集素的活性或阻碍凝集素与红细胞的结合, 甚至抢占红细胞膜上凝集素的结合位点。

用 Sephadex G-200 凝胶层析进行纯化, 以 0.9% NaCl 洗脱得到一个蛋白峰值, 经血凝活性检测得到两个活力峰。用 Sephadex G-200 凝胶层析只是纯化过程其中的一步, 要得到纯化的刺参凝集素尚需进一步实验。

该分子量测定用 Sephadex G-200 凝胶层析, 测得 AJL 的分子量为 86 397 Da, 与文献<sup>[12]</sup>报道的中国鲎凝集素的分子量 92 000 Da 较相似。而中国鲎凝集素 M1 部分用 SDS-PAGE 测定得到两个亚基单位, 因此, 推测 AJL 可能含有亚基单位, 结果有待证实。

从纯化的 AJL 的糖含量与蛋白质含量测定结果看, AJL 可能是一种糖蛋白。实验证明, 刺参凝集素, 可以凝集多种脊椎动物的红细胞。AJL 对 3 种动物及 4 种人红细胞均具有凝集活性, 但不凝集鲤鱼红细胞。这是由凝集素的多价构型及对特定细胞多糖的亲合力所决定的<sup>[3]</sup>。其凝集结果为: 鸡 > 人 (A) > 鼠 = 兔 = 人 (B = O = AB)。有关动物和人的红细胞对凝集素的敏感程度, 随凝集素的不同而不同, 兔红细胞通常比较敏感<sup>[10]</sup>, 可作为凝集素筛选的首选红细胞据已有的报道。但本实验结果表明, 鸡的红细胞较兔敏感, 与牟海津等<sup>[13]</sup>研究结果一致。

该凝集素在 25~ 70 °C 活力不变, 在 70~ 90 °C 处理 30 min 后仍保留 50% 血凝活性, 表现出强的热稳定性。AJL 具有广泛的 pH 作用范围。

EDTA 及二价金属离子  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对 AJL 的血凝活性无影响。这一实验结果与“无脊椎动物凝集素在进行凝集活动时, 常常需要一些二价

金属离子参与”<sup>[3]</sup>不同。糖抑制实验表明, AJL 不被所测试的单糖、二糖、聚糖、 $\gamma$ -球蛋白所抑制, 而仅被牛甲状腺球蛋白抑制, 最小抑制浓度是  $1.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。推测可能该凝集素所识别的特定糖苷键为  $\text{Man} \alpha(1-4) \text{Man}$ , 此推测尚需进一步试验证明。

### 参考文献:

- [1] Sampaio A H, Rogers D J, Barwell C J. Isolation and characterization of green marine alga *Ulva lactuca* L [J]. *Botanica Marina*, 1998, 41: 427- 433.
- [2] Kanji H, Kiminori M, Keisuke M. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1474: 226- 236.
- [3] 陈皓文, 孙丕喜, 宋庆云. 外源凝集素—水产动物御敌的有力武器 [J]. *黄渤海海洋*, 1995, 13(3): 61- 70.
- [4] Yeaton R W. Invertebrate lectins. I. Occurrence [J]. *Dev Comp Immunol*, 1981, 5: 391- 402.
- [5] Tamplin M I, Fisher W S. Occurrence and characteristics of agglutination of vibrio cholerae by serum from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* [J]. *Appl Environ Microb*, 1989, 55 (11): 2882- 2887.
- [6] Vasta G R. A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte [J]. *Invertebr Pathol*, 1982, 40: 367- 377.
- [7] 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.
- [8] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28: 350- 356.
- [9] 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.
- [10] 李丹彤, 崔铁军, 马国庆, 等. 角叉菜凝集素的分离纯化及其性质 [J]. *中国水产科学*, 2000, 7(3): 80- 84.
- [11] Ahmed H, Chatterjee B P. Further characterization and immunochemical studies on the carbohydrate specificity of jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) lectin [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 9365- 9372.
- [12] 杨 瑞, 王正新, 张龙翔. 中国鲎凝集素的纯化及性质的研究 [J]. *生物化学杂志*, 1990, 12, 505- 510.
- [13] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 双壳贝类血清中凝集素性能初步研究—对脊椎动物红细胞的凝集作用 [J]. *青岛海洋大学学报*, 1999, 29(2): 249- 254.