

文章编号:1000-0615(2007)03-0311-06

绒线藻凝集素的分离纯化及生物活性

李丹彤¹, 张泽虎¹, 赵元凤¹, 钟 莉¹, 张泽宇¹, 王冬梅², 李 伟³

(1.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;

2.大连医科大学基础医学院,辽宁 大连 116027;

3.大连水产学院食品工程系,辽宁 大连 116023)

摘要:将海洋红藻-绒线藻(*Dasya villosa*)经磷酸盐缓冲液抽提,20%~75%硫酸铵分级沉淀, Sephadex G-200 分子筛层析,得到绒线藻凝集素(DVL)。用 Sephadex G-200 分子筛层析测得其分子量为 547 ku。该凝集素凝集兔红细胞的作用不被 D-果糖、D-半乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露聚糖、 γ -球蛋白所抑制,仅被牛甲状腺球蛋白所抑制,最小抑制浓度为 $96.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。2 价金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及 EDTA 对该凝集素凝集活性没有影响。其凝集活性在 25~80 °C 保持不变为 2^8 , 90~100 °C 加热 30 min,活力为 2^7 ,仍保留 50% 的活性,说明其具有较强的耐热性。经 *t*-检验,注射腹水型肝癌 H₂₂ 肿瘤细胞小鼠在 DVL 为低($65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中($130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)高($260 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)剂量时:肝指数、脾指数与生理盐水对照组的均无显著差异;抑瘤率分别为 21%、27%、40%,DVL 的低、中剂量下抑瘤率与生理盐水对照组的均无显著差异;在高剂量下 DVL 具有显著的抑制肿瘤细胞生长的作用($P < 0.05$)。

关键词:绒线藻;凝集素;牛甲状腺球蛋白;抗肿瘤作用

中图分类号:Q 949.29;Q 513+.2 文献标识码:A

Isolation and purification of lectin from *Dasya villosa* and biological activity of DVL

LI Dan-tong¹, ZHANG Ze-hu¹, ZHAO Yuan-feng¹, ZHONG Li¹, ZHANG Ze-yu¹, WANG Dong-mei², LI Wei³

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

Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China;

2. Basic Medical College, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

3. Department of Food Processing, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: *Dasya villosa* lectin (DVL) was purified from marine red algae *Dasya villosa* by extraction with phosphate buffered saline (PBS), followed by 20% - 75% ammonium sulphate fractionation and molecular sieve chromatography on Sephadex G-200. Molecular mass of DVL was estimated as 547 ku by Sephadex G-200. Its hemagglutinating activity of rabbit erythrocyte could not be inhibited by D-galactose, glucose, sucrose, mannan, γ -globulin(human), but it could be inhibited by bovine-thyroglobulin with minimum inhibitory concentration at $96.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The lectin reaction independent on the presence of EDTA, divalent cations Ca^{2+} and Mg^{2+} . The hemagglutinating activity of lectin was 2^8 , which remained stable at 25 - 80 °C. Moreover, the DVL was

收稿日期:2006-05-29

资助项目: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,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

heat-stable, with 50% activity when treated at 90–100 °C for 30 min. The anti-tumor activity of the DVL was determined by using ascitic-type hepatic carcinoma H₂₂ tumor in mouse. No significant differences of hepatic and spleen exponents of mice were observed by *t*-test between the control group injected with 0.9% NaCl and experimental groups injected with DVL at doses of 65 mg·kg⁻¹, 130 mg·kg⁻¹ and 260 mg·kg⁻¹, respectively. The rates of tumor inhibition of three experimental groups were 21%, 27% and 40%, respectively. The 260 mg·kg⁻¹ experimental group showed marked inhibition for tumor formation ($P < 0.05$), however, the 65 mg·kg⁻¹ and 130 mg·kg⁻¹ experimental groups did not show significant differences for tumor inhibition in comparison with control group (*t*-test).

Key words: *Dasya villosa*; lectin; bovine-thyroglobulin; anti-tumor activity

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。发现凝集素已有百余年,但直到20世纪40年代才开始为人们所关注。早期人们对凝集素的研究集中在陆生植物,自60年代后期,人们对不同海域的海藻凝集素进行筛选^[1-3],发现多种海藻中存在凝集素,并发现褐藻凝集素凝集细胞现象只是多酚凝集血细胞的一种假凝集现象^[4]。之后人们对红藻、绿藻中的多种凝集素进行分离纯化、结构性质^[5-7]、生理功能的研究,发现其具有凝集细胞,参与原生质体形成^[8],抑制肿瘤细胞增殖^[9],激活淋巴细胞^[9-10],抑制血小板凝集^[11]等多种功能的生物活性,为海藻凝集素的开发利用奠定理论基础。

国内对海藻凝集素的研究始于20世纪80年代,最早殷丽明等^[12]对青岛地区海藻凝集素进行了筛选,90年代我们对大连沿海绿藻(孔石莼)^[13]、红藻(角叉菜)^[14]凝集素进行分离纯化,并对褐藻(裙带菜、海带)凝集素进行了初步研究,郑怡等^[15]对红藻(脆江蓠)等凝集素进行研究。目前在国内外尚未见到有关绒线藻凝集素(*Dasya villosa* lectin)的报道。我们首次对DVL进行初步分离纯化,并对其分子量等理化性质及抗肿瘤活性进行了研究,以期海洋药物的开发及海洋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

绒线藻(*Dasya villosa*)于2002年4月16日采自大连小平岛海域,兔、昆明种小鼠均由大连医科大学实验动物中心提供。腹水型肝癌H₂₂肿瘤细胞、丝裂霉素均由大连医科大学提供。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出品), γ -球蛋白(人)(Serva出品),酵母甘露聚糖(Sigma出品),牛血清白蛋白(上海浦江生物化学研究所),胰蛋白酶(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

DVL的分离纯化 海藻采回后立即用过滤海水洗净,用纱布及滤纸吸去水分,用剪刀剪成小块分装到干净的塑料袋中,放入-20 °C冰箱中冷冻,然后再置于冷冻干燥机中冻干,将干藻用研钵研磨成粉末(25.68 g),从中称取12.50 g藻粉按1:40比例加入0.15 mol·L⁻¹ NaCl的PBS(0.015 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.2)500 mL。在4 °C浸泡16 h,并间歇搅拌,离心(4 °C, 4 500 r·min⁻¹, 60 min),取上清液即为粗提液。

在冰水浴条件下向粗提液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 °C)。经离心(同上),弃沉淀取上清。在冰水浴条件下向上清液中加入研磨的固体硫酸铵至75%饱和度,过夜(4 °C),再离心(同上),弃上清,收集沉淀溶于适量蒸馏水中,对蒸馏水透析至无SO₄²⁻,冻干0.5 mL,再留1 mL测蛋白含量,其余部分再对PBS充分透析(12 h),得27.5 mL透析液。

取透析后样品2.5 mL(含蛋白73 mg)上柱,层析柱为1.6×70.0 cm,洗脱液为含0.02%叠氮化钠的生理盐水,流速18 mL·h⁻¹,每管3 mL。洗脱至A₂₈₀ nm < 0.02,经280 nm紫外测定,并检测各管活性,收集活性高的部分,合并、透析、冻干备用。

1.3 DVL生物活性的测定

蛋白含量的测定^[16] 以A₂₈₀表示,以牛血

清白蛋白作对照。

血凝活性的测定: 参考文献[13]。

分子量的测定^[17] 采用 Sephadex G-200 分子筛凝胶过滤法。层析柱为 1.6×70.0 cm, 洗脱液为含 0.02% 叠氮化钠的生理盐水, 流速 $18 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 每管 3 mL。

糖抑制试验 参考文献[14]。

热稳定性试验 将 $3.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DVL 粗提液, 并分成若干份, 每份 1 mL, 分别在 $25 \sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$ 的不同条件下温育, 于 10 min, 30 min 不同时间取样, 冷却后测定血凝活力。

EDTA、二价金属离子对凝集活性的影响 在 96 孔 V 型血凝板中, 加入 $40 \mu\text{L}$ EDTA、 CaCl_2 、 MgCl_2 溶液, 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的凝集素, 静置 15 min(室温), 再加入 $40 \mu\text{L}$ 1% 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。

DVL 对肿瘤细胞生长的抑制效应 取昆明种小鼠, 体重 $22 \sim 24 \text{ g}$, 雌雄各半, 实验当天于小鼠右腋皮下注射腹水型肝癌 H_{22} 肿瘤细胞, 细胞浓度 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 每天 0.2 mL。第 7 天肿瘤长到米粒大小, 将小鼠随即分为 5 组, 丝裂霉素组 ($0.44 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、DVL 低剂量组 ($65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、DVL 中剂量组 ($130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、DVL 高剂量组 ($260 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、生理盐水对照组, 每天注射一次, 小鼠于接种 3 周后称重, 处死后, 称取肿瘤、肝脏、脾脏重量, 计算肝指数、脾指数、抑瘤率。

2 结果

2.1 DVL 的分离纯化

DVL 的纯化分为两个步骤: (1) 冷冻干燥, PBS 浸泡, 离心得玫瑰红色粗提液; (2) 20% ~ 75% 硫酸铵分级得到紫色硫酸铵分级液; (3)

Sephadex G-200 分子筛凝胶层析得到 1 个蛋白峰, 2 个活力峰(图 1), 纯化结果见表 1。

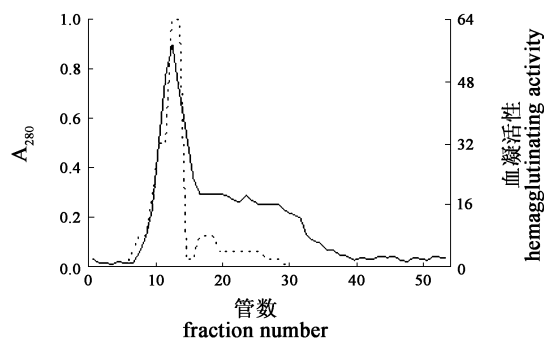


图 1 DVL 在 Sephadex G-200 柱上的凝胶层析图

Fig.1 Gel filtration of DVL on Sephadex G-200

柱: 1.6×70 cm; 流速: $18 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$; 每管 3 mL

column: 1.6×70 cm; flowing rate: $18 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$; tube 3 mL

2.2 DVL 的分子量

DVL 的 20% ~ 75% 硫酸铵分级液经过 Sephadex G-200 分子筛层析, 得到 1 个蛋白峰, 2 个活力峰(图 1), 用胰蛋白酶(MW 24 ku), 牛血清白蛋白(MW 67 ku), γ -球蛋白(MW 165 ku) 为标准绘制标准曲线(图 2), 根据绒线藻最大活力峰的有效分配系数(K_{av})求得分子量为 547 ku。

2.3 糖抑制实验

DVL 凝集素浓度为 $96.91 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 用兔红细胞进行糖抑制实验, 结果显示, 绒线藻凝集素不被所测试的单糖、二糖、多糖及部分糖蛋白所抑制, 仅被牛甲状腺球蛋白所抑制, 最小抑制浓度为 $96.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2)。

2.4 热稳定性

DVL 在 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 30 min 活力不变, 但在 $90 \sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$ 活力下降 50%, 说明 DVL 对热有较高的稳定性(表 3)。

表 1 绒线藻凝集素的纯化

Tab.1 Purification of the lectin from *Dasya villosa*

实验步骤 fractionation	总蛋白(mg) total protein	血凝活力(μg) hemagglutinating activity	总活力(U) total activity	比活力($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) specific activity	纯化倍数 purification fold	回收率(%) yield
crude extract	9675.9	3.88	2.5×10^6	257.73	1	100
20% ~ 75% (NH_4) ₂ SO ₄	858.98	1.16	7.48×10^5	862.10	3	30
SephadexG-200	90.63	0.40	2.27×10^5	2500.00	10	9

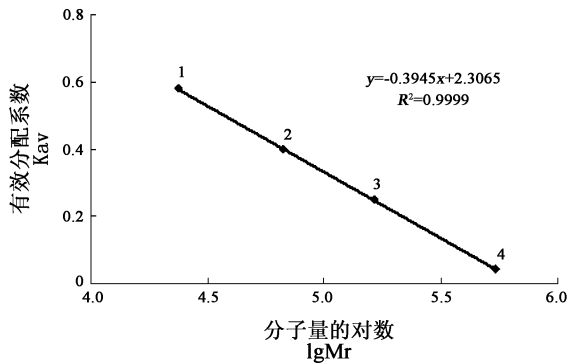


图2 DVL在Sephadex G-200上分子量的测定

Fig.2 Molecular weight determination of the DVL on Sephadex G-200

1.胰蛋白酶(MW 24 ku);2.牛血清白蛋白(MW 67 ku);3.γ-球蛋白(人)(MW 165 ku);4.绒线藻凝集素

1. trypsin;2. bovine serum albumin;3. γ-globulin;4. DVL

表2 糖和糖蛋白对DVL血凝活性的抑制作用

Tab.2 Inhibition of hemagglutinating activity of DVL by sugars and glycoproteins

糖 & 糖蛋白 sugars & glycoproteins	起始浓度 initial concentration	最小抑制浓度 minimum inhibitory concentration
D-半乳糖 D-Galactose	500 mmol·L ⁻¹	-
D-果糖 D-Fructose	10 mmol·L ⁻¹	-
葡萄糖 glucose	10 mmol·L ⁻¹	-
蔗糖 sucrose	10 mmol·L ⁻¹	-
甘露聚糖 mannan	46.5 mg·L ⁻¹	-
γ-球蛋白 γ-globulin	80 mg·L ⁻¹	-
牛甲状腺球蛋白 bovine thyroglobulin	24.8 mg·L ⁻¹	96.88 mg·L ⁻¹

注：“-”表示无抑制作用

Notes：“-”indicate absence of inhibition

表5 DVL对小鼠肝癌H₂₂肿瘤抑制作用及对肝、脾指数的影响

Tab.5 The inhibition of DVL for ascitic-type hepatic carcinoma H₂₂ tumor and effects of DVL on hepatic, spleen exponents of mice

组别 groups	样本数 sample	剂量(mg·kg ⁻¹) dose	体重(g) body weight	瘤重(g) tumor weight	脾指数(0.1 mg·g ⁻¹) spleen exponent	肝指数(0.1 mg·g ⁻¹) hepatic exponent	抑瘤率(%) inhibitory rate
0.9% NaCl	12	-	22.93 ± 2.39	2.17 ± 1.19	93.48 ± 27.04	592.38 ± 118.17	
丝裂霉素 mitomycin	14	0.44	23.00 ± 2.66	0.81 ± 0.38 * *	60.14 ± 13.68	590.05 ± 40.70	63
DVL	13	65	24.50 ± 2.44	1.71 ± 0.66	112.12 ± 27.89	643.81 ± 108.37	21
	8	130	24.38 ± 3.07	1.58 ± 0.55	107.51 ± 25.95	594.22 ± 64.75	27
	12	260	24.92 ± 2.23	1.30 ± 0.78 *	107.04 ± 28.41	596.95 ± 102.91	40

* * P < 0.01 vs 0.9% NaCl; * P < 0.05 vs 0.9% NaCl

表3 绒线藻凝集素的热稳定性

Tab.3 Heat stability of the DVL

温度(℃) temperature	25	30	35	40	50	60	70	80	90	100
血凝活性 hemagglutination activity	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷

2.5 EDTA及金属离子对DVL凝集活性的影响

DVL凝集素浓度为96.91 mg·L⁻¹,用浓度为100 mmol·L⁻¹的EDTA、CaCl₂、MgCl₂,做抑制实验,结果DVL对兔红细胞的凝集活性保持不变,并未发生凝集抑制现象(表4)。

表4 EDTA及金属离子对DVL血凝活性的抑制作用

Tab.4 Inhibition of hemagglutinating activity of the DVL by EDTA and metal ions

试剂 reagent	起始浓度(mmol·L ⁻¹) initial concentration	相对活性(%) relative activity
EDTA	100	100
CaCl ₂	100	100
MgCl ₂	100	100

2.6 DVL对肿瘤细胞生长的抑制效应

经t-检验,注射腹水型肝癌H₂₂肿瘤细胞小鼠在DVL为低(65 mg·kg⁻¹)、中(130 mg·kg⁻¹)、高(260 mg·kg⁻¹)剂量时:肝指数、脾指数与生理盐水对照组的均无显著差异;抑瘤率分别为21%、27%、40%,DVL的低、中剂量下抑瘤率与生理盐水对照组的均无显著差异;在高剂量下DVL具有显著的抑制肿瘤细胞生长的作用(P < 0.05)(表5)。

3 讨论

绒线藻凝集素(DVL)粗提液经硫酸铵分级, Sephadex G-200 凝胶层析进行纯化,以 0.9% NaCl 洗脱得到 1 个蛋白峰值,经血凝活性检测得到 2 个活力峰。用 Sephadex G-200 凝胶层析只是纯化过程其中的一步,要得到纯化的绒线藻凝集素尚需进一步实验。

凝集素分子量的测定采用 Sephadex G-200 分子筛层析测得 DVL 的分子量为 547 ku,这与普遍认为海藻凝集素的分子量较低不同,在已报道的海藻凝集素分子量较高者中,有仙菜目的花凋毛藻(*Griffithsia flosculosa*)凝集素,其分子量为 300 ku,羽毛翼藻(*Ptilota Plumosa*)凝集素,其分子量为 170 ku^[18]。Kakita 等从英国江蓐(*Gracilaria verrucosa*)中提取出一种分子量为 480 ku 的大分子凝集素^[19],DVL 是迄今为止发现的分子量最大的海藻凝集素。

经糖抑制实验证明,DVL 不被所测试的单糖抑制,说明该凝集素不识别这些单糖:D-半乳糖、D-果糖、葡萄糖,这与几乎所有的海藻凝集素均不被 D-葡萄糖、D-半乳糖等单糖抑制一致^[18]。DVL 不被蔗糖抑制,说明其不识别 Glc($\alpha 1 \leftarrow \rightarrow \beta 2$)Fru。DVL 不被酵母甘露聚糖、人的 γ -球蛋白抑制,而被牛甲状腺球蛋白抑制,从这三种物质的糖链结构分析:牛甲状腺球蛋白糖链中只有 Man α (1-4)Man 这一结构,在酵母甘露聚糖、人的 γ -球蛋白的糖链中都没有,因此推测该凝集素所识别的特定糖苷键可能为 Man α (1-4)Man。这与孔石莼^[13]、角叉菜^[14]凝集素的糖抑制结果一致。

豆科植物凝集素需要有 2 价金属离子的存在才显示活性^[18],无脊椎动物凝集素在进行凝集过程中,常需要一些二价金属离子的参与^[20]。1994 年堀贯治报道^[18]海藻凝集素,除 *Ptilota* 属 2 种海藻凝集素外,均不显示对金属离子的需求性。1998 年 Sampaio^[5]、Benevides^[21]报道的石莼、迪尤对枝藻(*Enantiocladia duperreyi*)显示对金属离子的依赖性。同大多数海藻凝集素一样,EDTA 及 2 价金属离子 Ca²⁺、Mg²⁺ 对 DVL 的活性无影响。

DVL 在 25 ~ 30 °C 血凝活力不变,在 90 ~ 100 °C 血凝活力有所下降,血凝活力保留 50%,说明具有较高的热稳定性,这与江蓐在 100 °C 加热 30 min 活力不变^[19]研究基本一致。而与迪尤对枝藻中

提取的凝集素在 70 °C 加热 10 min 活力完全丧失的结果^[21]不同。相比较而言,江蓐凝集素的糖含量占 98.5%,迪尤对枝藻凝集素的糖含量占 6.5%,推测可能是迪尤对枝藻凝集素中的蛋白质在受热情况下空间构象发生改变掩盖了糖链的活性位点,使其失去活性,因此推测 DVL 中糖含量较高。

很多海藻凝集素表现出各种各样的生物活性。同样,DVL 的剂量为 260 mg·kg⁻¹时,对小鼠肝癌 H₂₂ 肿瘤具有显著的抑制作用,但 DVL 在所测的剂量下对肝指数、脾指数都无显著影响,推测 DVL 的免疫增强剂作用不明显。至于 DVL 的抑瘤作用与它对小鼠自身免疫系统生物反应调节作用的关系,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Boyd W C, Almodovac L R, Boyd L C. Agglutinins in marine algae for human erythrocytes [J]. *Transfusion*, 1966, 6:82 - 83.
- [2] Blunden G, Rogers D J, Farnhan W F. Survey of British seaweeds for hemagglutinins [J]. *Lloydia*, 1975, 38:162 - 168.
- [3] Hori K, Miyazawa K, Ito K. Hemagglutinins in marine algae [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1981, 47(6):793 - 798.
- [4] Rogers D J, Loveless R W. Haemagglutinins of the phaeophyceae and non-specific aggregation phenomena by polyphenols [J]. *Botanica Marina*, 1985, 28(3):133 - 137.
- [5] 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.
- [6] Hori K, Matsubara K, Miyazawa K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1474:226 - 236.
- [7] Lima M E P, Carneiro M E, Nascimento A E. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(16):6414 - 6419.
- [8] Kim G H, Klochkova T A, Yoon K. Purification and characterization of a lectin, Bryohelion, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 2006, 42(1):86 - 95.

- [9] Hori K, Ikisuke S, Miyazawa K, *et al.* Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from the red alga *Solieria robusta*[J]. *Phytochemistry*, 1988,27(7):2063 - 2067.
- [10] Okamoto R, Hori K, Miyazawa K, *et al.* Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria buras-pastoris*[J]. *Experientia*, 1990, 46:975 - 977.
- [11] Matsubara K, Sumi H, Hori K. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins[J]. *Experientia*, 1996, 52:540 - 543.
- [12] 殷丽明,丁伟,魏云莉. 青岛地区部分海藻凝集素的筛选初报[J]. *海洋药物*, 1987, 3:135 - 136.
- [13] 李丹彤,崔铁军,吕欧,等. 孔石莼(*Ulva pertusa*)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):774 - 778.
- [14] 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.
- [15] 郑怡,余萍,刘艳茹. 脆江蓠凝集素的部分性质及细胞凝集作用[J]. *应用与环境生物学报*, 2002, 8(1):66 - 70.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 堀贯治. 海藻のレクチン[J]. *化学と生物*, 1994, 32(9):586 - 594.
- [19] Kakita H, Fukuoka S, Obika H. *et al.* Purification and properties of a high molecular weight hemagglutinin from the red alga, *Gracilaria verrucosa*[J]. *Botanica Marina*, 1997, 40(3):241 - 247.
- [20] 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.
- [21] Benevides N M B, Holanda M L, Melo F R, *et al.* Purification and partial characterisation of the lectin from the marine red alga *Enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Falkenberg[J]. *Botanica Marina*, 1998(5), 41:521 - 525.