

鳞毛蕨凝集素的分离纯化与性质

余萍¹, 刘艳如², 郑怡²

(1. 福建师范大学高分子研究所, 福建 福州 350007; 2. 福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007)

摘要: 阔鳞鳞毛蕨 (*Dryopteris championi* (Benth.) C. Chr.) 的叶片组织经硫酸铵沉淀、活性炭柱及 DEAE-SepharoseFF 离子交换柱等步骤纯化得到鳞毛蕨凝集素 (*Dryopteris championi* lectin)。纯化的鳞毛蕨凝集素 (DCL) 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示 1 条蛋白质着色带。其中性糖含量高, 氨基酸组成中 Phe (苯丙氨酸) 含量最高, His (组氨酸) 含量最低。对不同动物红细胞及人的不同血型红细胞的凝集有专一性。其凝血活性能被果糖、半乳糖和 N-乙酰半乳糖胺所抑制, 对温度变化较不敏感, Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 在一定浓度范围能激活其为 EDTA- Na_2 所抑制的活性。

关键词: 阔鳞鳞毛蕨; 凝集素; 纯化; 性质

中图分类号: Q946.1; Q949.36 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2003)02-0006-04

Purification, characterization and properties of *Dryopteris championi* lectin YU Ping¹, LIU Yan-ru², ZHENG Yi² (1. Institute of Polymer Sciences, Fujian Teachers University, Fuzhou 350007, China; 2. Bioengineering College, Fujian Teachers University, Fuzhou 350007, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(2): 6-9

Abstract: *Dryopteris championi* lectin was purified from the leaves of *Dryopteris championi* (Benth.) C. Chr. by precipitation with solid ammonium sulfate, decolorizing in active carbon column and further through DEAE-SepharoseFF column. The purified lectin showed a single protein band on PAGE and has a high content of neutral saccharide. In its amino acid composition, Phe has the highest content and His has the lowest content. This lectin showed specific agglutination with different animal and human erythrocytes. The agglutinin activity of this lectin was insensitive to temperature change, but inhibited by three sugars (Fru, Gal and GalNAc). Inhibition of EDTA- Na_2 was activated with the presence of Mn^{2+} and Mg^{2+} at a certain concentration range.

Key words: *Dryopteris championi* (Benth.) C. Chr.; lectin; purification; characterization

凝集素最先在植物体内发现。植物凝集素是非免疫来源的糖蛋白或能结合糖的蛋白质, 多分布于植株最易受攻击的部位, 对于病原真菌、细菌和昆虫有一定抑制作用, 若将凝集素基因用基因工程的方法注入某些植物中, 可以提高植物对外来生物的抵抗能力。多数植物凝集素富含 Gly、Cys 和 Trp 等氨基酸, 作为储存蛋白质, 在胚胎发育阶段提供氨基酸, 对细胞有丝分裂起促进作用, 且 Cys 的存在使凝集素形成二硫键, 具有高度稳定性, 适应较宽的 pH 范围, 并耐热, 植物的许多生理发育阶段中都伴有凝集素的变化^[1,2]。

蕨类植物种类繁多, 分布广, 资源丰富, 容易采集, 其中有些种类的药用历史悠久。近年来对蕨类植物的研究多见于抑菌、杀虫和营养成分分析等方面^[3,4], 而对蕨类凝集素的研究极少, 继 17 种蕨类植物凝集素的筛选研究之后^[5], 本文选择其中凝集素活性高的阔鳞鳞毛蕨为试材, 作进一步纯化和性质

研究。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

阔鳞鳞毛蕨 (*Dryopteris championi* (Benth.) C. Chr.) 采自福建省福州市的鼓山, 采样时间为每年的 3-4 月间, 采回后即取其新鲜叶组织用于提取凝集素。小鼠 (*Mus musculus*) 购自福建医科大学动物房, 兔子 (*Oryctolagus cuniculus domestica*) 新鲜血由福建师范大学生物工程学院提供, 正常人 A、B、O 型新鲜血由福建师范大学校医院提供, 鲫鱼 (*Carassius auratus*)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)、鳖 (*Amyda*

收稿日期: 2002-11-30

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (B0210007)

作者简介: 余萍 (1957-), 女, 福建莆田人, 高级实验师, 主要从事生化及免疫学研究。

sinensis)、鸽(*Columba livia domestica*)、鸡(*Gallus domestica*)和鸭(*Anas domestica*)均购自菜市场。阿拉伯糖、甘露糖、 α -甲基-D-甘露糖苷、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、丙烯酰胺为 Sigma 产品,半乳糖、L-岩藻糖为 Serva 产品, DEAE-SepharoseFF 为 Pharmacia 产品,试验用的其他试剂为国产分析纯。

1.2 鳞毛蕨凝集素(DCL)的纯化

阔鳞鳞毛蕨叶片组织 36 g,洗净剪碎,用磷酸盐缓冲液(PBS, 0.05 mol/L, pH 7.2, 内含 0.14 mol/L NaCl) 4℃浸泡过夜,次日匀浆,4层纱布过滤,滤液 5 000 g 离心 30 min。上清液加入固体硫酸铵达 70%饱和度,4℃过夜,5 000 g 离心 30 min。收集沉淀,依次以流水、蒸馏水和缓冲液透析 2 d 左右至无 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后,置透析袋中风干浓缩即得鳞毛蕨凝集素粗品。样品先经活性炭柱去除植物色素及部分杂蛋白,再加入到 DEAE-SepharoseFF 凝胶层析柱(1.6 cm \times 25 cm)上,以 PBS 液洗脱至 280 nm 吸收值低于 0.02 时,改用 pH 7.2, 0.05 mol/L(内含 0.5 mol/L NaCl)的 PBS 液进行线性离子梯度洗脱,分部收集,流速 40 mL/h, 4 mL/tube。收集有凝血活性的洗脱物置透析袋中,在蒸馏水中透析 1 d,冷冻干燥,得鳞毛蕨凝集素纯品。

1.3 鳞毛蕨凝集素(DCL)的性质测定

1.3.1 纯度分析 用聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度为 7.5%,参照文献[6]的方法在 pH 8.3 Tris-Gly 缓冲液中,电压 80~160 V 下电泳 2 h,考马斯亮蓝染色 1.5 h,再用 7%冰醋酸脱色。

1.3.2 蛋白浓度测定 以 CBB-G250 色素结合法测定样品蛋白浓度。

1.3.3 中性糖含量 以葡萄糖为标准,按 Dubois 等^[7]的酚-硫酸法测定样品的中性糖含量。

1.3.4 氨基酸组成分析 纯化的样品在含有巯基乙醇的盐酸中 105℃水解 24 h,然后在日立 835-50 型氨基酸自动分析仪上进行分析。

1.3.5 供血动物种属专一性 鲫鱼、泥鳅和鳖断头取血;鸽、鸡和鸭静脉取血;小鼠眼眶取血。将收集到的血细胞用生理盐水洗涤 3 次,临用前用生理盐水制成 2%的血细胞悬液。按孙册^[8]的方法,取 25 μL 凝集素溶液(2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与等体积的生理盐水在“V”型血清微量稀释板上进行倍比稀释,再分别加入各种动物血细胞悬液,振荡摇匀后室温下放置 2 h,显微镜下检查凝集结果。空白对照为生理盐水

+ 血细胞悬液。

1.3.6 糖抑制试验 参照文献[9]的方法进行,将样品等体积倍比稀释后,于各孔分别加入 14 种 80 mmol/L 的糖生理盐水溶液,振荡摇匀后放置 5 min,再加入等体积的小鼠血细胞悬液,2 h 后镜检结果。空白对照为:(1)生理盐水+血细胞悬液;(2)生理盐水+样品+血细胞悬液;(3)生理盐水+糖溶液+血细胞悬液。

1.3.7 热稳定性 参照文献[9]的方法进行,分别取 200 μL (2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的样品装入 5 根小直管中,在 40、50、60、70 和 80℃水浴中加热 15 min 后迅速取出,冷却至室温后测定其凝血活性。

1.3.8 二价金属离子对其活性的影响 按 Kawagishi^[10]的方法进行,将样品(2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)溶解在生理盐水中对 EDTA- Na_2 溶液充分透析后,再在生理盐水中透析以除去过量的 EDTA- Na_2 后待用。在稀释板上将等体积 10 mmol/L 的 CaCl_2 、 MgCl_2 和 MnCl_2 与生理盐水依次倍比稀释,再向每孔中加入同体积的样品及小鼠血细胞悬液,室温下放置 2 h,显微镜下检查结果。对照为:(1)未经 EDTA- Na_2 处理的样品不加金属离子+血细胞悬液;(2)经 EDTA- Na_2 处理的样品不加金属离子+血细胞悬液。

2 结果与讨论

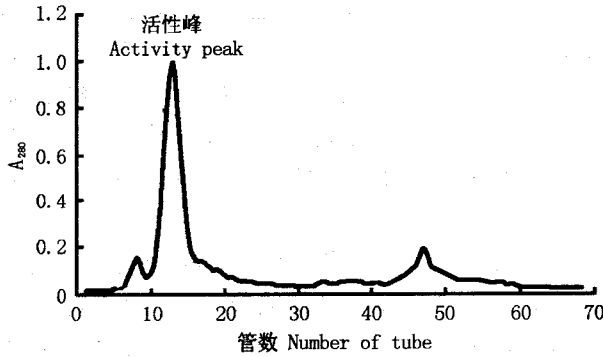
2.1 鳞毛蕨凝集素(DCL)的纯化

经硫酸铵沉淀(饱和度 70%)所得阔鳞鳞毛蕨凝集素粗品采用 CBB-G250 色素结合法测得总蛋白浓度,经计算总蛋白得率为 0.067%。将粗品过活性炭柱收集,经 DEAE-SepharoseFF 离子交换层析后,出现 2 个洗脱峰(如图 1):第 10-20 管为第 I 峰,收集浓缩,得具凝血活性的鳞毛蕨凝集素(DCL),测得活性蛋白得率为 16%。纯化后的样品经 PAGE 显示电泳 1 条蛋白质着色带(如图 2),证明所得物质为均一物质。

2.2 鳞毛蕨凝集素(DCL)的性质

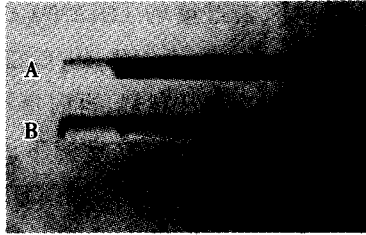
2.2.1 中性糖含量和氨基酸组成 经测定,鳞毛蕨凝集素 DCL 的中性糖含量为 16%。其氨基酸组成分析结果见表 1。当 DCL 浓度为 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,测得其氨基酸组成中 Phe(苯丙氨酸)含量最高,His(组氨酸)含量最低,酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)含

量之和高于碱性氨基酸(赖氨酸、组氨酸和精氨酸), 不含酪氨酸和脯氨酸, 色氨酸未测。



柱 Column: 1.6cm×25cm; 流速 Flow rate: 40 mL/h, 4 mL/tube

图1 鳞毛蕨凝集素在 DEAE-SepharoseFF 柱的层析图
Fig. 1 Ion-exchange chromatography of crude *Dryopteris championi* (Benth.) C. Chr. lectin on DEAE-SepharoseFF column



A. 粗品 crude lectin; B. 纯品 purified lectin (2 000 $\mu\text{g/mL}$)

图2 鳞毛蕨凝集素的 PAGE 图谱
Fig. 2 The pattern of purified *Dryopteris championi* (Benth.) C. Chr. lectin on PAGE

表1 鳞毛蕨凝集素的氨基酸组成和含量
Table 1 Amino acid composition and content of *Dryopteris championi* (Benth.) C. Chr. lectin ($\mu\text{g/mL}$)

氨基酸种类 Amino acid	含量 Content	氨基酸种类 Amino acid	含量 Content	氨基酸种类 Amino acid	含量 Content
Asp	24.84	Cys	17.02	Phe	54.15
Thr	13.78	Val	31.38	Lys	22.26
Ser	10.10	Met	35.15	His	8.70
Glu	31.89	Lie	25.31	Try	-
Gly	12.50	Leu	32.96	Arg	13.69
Ala	13.94	Tyr	0.00	Pro	0.00

2.2.2 供血动物种属专一性 鳞毛蕨凝集素(DCL)与不同动物来源的新鲜血细胞悬液作用结果见表2。表中以凝血滴度 2^1 来表示凝集活性,依次类推。DCL的起始浓度为2 000 $\mu\text{g/mL}$ 。表2的结果表明,DCL具有动物种属专一性与人血型专一性:其中对鲫鱼血细胞作用最强,能凝集的最低浓度为3.9 $\mu\text{g/mL}$,而对泥鳅和鳖的血细胞无凝集活性;对

人的B型血具凝集活性,而对A型和O型血无凝集活性。对照组无凝集活性。

表2 鳞毛蕨凝集素血凝试验结果¹⁾
Table 2 The hemagglutination of *Dryopteris championi* (Benth.) C. Chr. lectin¹⁾

血细胞来源 Source of erythrocyte	凝集滴度 Activity titer	血细胞来源 Source of erythrocyte	凝集滴度 Activity titer
泥鳅 Loach	-	兔 Rabbit	2^7
鳖 Turtle	-	小鼠 Mice	2^7
鲫鱼 Crucian	2^9	人 Human	
鸽 Pigeon	2^3	A	-
鸡 Chicken	2^4	B	2^2
鸭 Duck	2^4	O	-

¹⁾ -: 无凝集活性 no agglutinic activity.

2.2.3 糖抑制试验 14种糖类对阔鳞鳞毛蕨凝集素DCL的抑制作用见表3。由表3可以看出,DCL具有单糖结合专一性,被果糖部分抑制,最高浓度为250 $\mu\text{g/mL}$;被半乳糖和N-乙酰半乳糖胺抑制的最高浓度均为31.3 $\mu\text{g/mL}$ 。而对照(1)、(3)无凝集活性,对照(2)凝集活性正常。

表3 糖对鳞毛蕨凝集素的抑制作用¹⁾
Table 3 Inhibition of agglutination of *Dryopteris championi* (Benth.) C. Chr. lectin by sugars¹⁾

糖 Sugar	抑制作用 ²⁾ Inhibition ²⁾
甘露糖 D-Man	+
木糖 L-Xyl	+
葡萄糖 D-Glc	+
半乳糖 D-Gal	-(15.6~31.3)
果糖 D-Fru	-(125~250)
山梨糖 L-Sor	+
阿拉伯糖 D-Ara	+
岩藻糖 L-Fuc	+
麦芽糖 Mal	+
蔗糖 Suc	+
乳糖 Lac	+
N-乙酰半乳糖胺 GalNAc	-(15.6~31.3)
N-乙酰葡萄糖 GlcNAc	+
α -甲基甘露糖苷 α -MeMan	+

¹⁾ +: 凝集 hemagglutination; -: 不凝集 non-hemagglutination; 糖的浓度为80 mmol/L Sugar concentration 80 mmol/L; ²⁾数字表示凝集素被抑制最低浓度 The data present minimum inhibition concentration of lectin ($\mu\text{g/mL}$).

2.2.4 热稳定性 不同温度对鳞毛蕨凝集素DCL血凝活性的影响结果见表4。结果表明,DCL的血凝活性在40℃以下稳定,在50~70℃活性部分丧失,80℃失去大部分活性,90℃完全失活,因此,DCL具有一定的热稳定性。

2.2.5 金属离子对凝血活性的影响 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 3种金属离子对经 EDTA-Na_2 处理的鳞毛蕨凝集素 DCL 的凝血活性的影响见表 5。结果表明,二价金属 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的浓度为 0.312 5 ~ 10 mmol/L 均能激活 DCL 凝血活性,而 DCL 对 Ca^{2+} 的激活无反应。可见 DCL 活性依赖于一定浓度的 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 。

表 4 温度对鳞毛蕨凝集素的 DCL 活性的影响¹⁾

Table 4 The effect of temperature on activity of *Dryopteris championii* (Benth.) C. Chr. lectin¹⁾

凝集素浓度 Lectin concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)					
	40	50	60	70	80	90
1 000.0	+	+	+	+	+	-
500.0	+	+	+	+	+	-
250.0	+	+	+	+	-	-
125.0	+	+	+	+	-	-
62.5	+	+	+	+	-	-
31.3	+	+	+	-	-	-
15.6	+	-	-	-	-	-
7.8	-	-	-	-	-	-
3.9	-	-	-	-	-	-

¹⁾ +: 凝集 hemagglutination; -: 不凝集 non-hemagglutination

表 5 金属离子处理对 DCL 活性的影响¹⁾

Table 5 The effect of metal ion on the activity of *Dryopteris championii* (Benth.) C. Chr. lectin¹⁾

处理组 ²⁾ Treatment ²⁾	金属离子浓度 Concentration of metal ion (mmol/mL)							
	10.000	5.000	2.500	1.250	0.625	0.312	0.156	0.078
CK1	+	+	+	+	+	+	+	-
CK2	-	-	-	-	-	-	-	-
Mg^{2+}	+	+	+	+	+	+	-	-
Ca^{2+}	-	-	-	-	-	-	-	-
Mn^{2+}	+	+	+	+	+	+	-	-

¹⁾ +: 凝集 hemagglutination; -: 不凝集 non-hemagglutination;

²⁾ CK1: 凝集素未经 EDTA-Na_2 处理 lectin without EDTA-Na_2 treatment; CK2: 凝集素经 EDTA-Na_2 处理 lectin treated with EDTA-Na_2 without metal ion.

3 结 论

凝集素的血凝作用是凝集素分子的亚基与血细胞的凝集素专一识别的糖基结合从而通过“架桥”作

用导致血球凝集。具有凝血专一性的凝集素是其糖结合部位识别血型抗原决定簇并与其结合的结果。本研究发现在各种测试的血细胞类型中,以鲫鱼血红细胞最敏感,表明鲫鱼血细胞表面可能存在较多的能与鳞毛蕨凝集素 DCL 结合的糖分子,并且 DCL 的凝血活性具有动物种属专一性及人血型专一性。糖抑制实验表明,DCL 在一定浓度范围内被果糖、半乳糖和 N-乙酰半乳糖胺所抑制,表明在鳞毛蕨凝集素的亚基上有这 3 类糖的结合受体,因此可利用此性质来抑制依赖这 3 类糖生长的细菌病原菌和真菌病原菌的生长。DCL 的性质较稳定,对温度不敏感,且可由 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 来重新激活被 EDTA-Na_2 抑制的活性。对于 DCL 的其他一些性质,包括对其他类型细胞的凝集活性,对细菌和真菌的凝集活性及对植物病原菌的抑制作用等研究尚在进行中。

参考文献:

- [1] 李向东. 植物凝集素及其防卫作用[J]. 世界农业, 1996, 11: 27-28.
- [2] 路子显, 常团结, 朱 楨. 植物外源凝集素及其在植物基因工程中的应用[J]. 生物工程进展, 2002, 22(2): 3-9.
- [3] 庄惠如, 吴文珊, 卢海声, 等. 福建福州 25 种蕨类植物抑菌活性筛选研究[J]. 亚热带植物通讯, 2000, 29(1): 5-8.
- [4] 程桂兰, 马纯艳. 辽宁地区药用蕨类植物研究[J]. 沈阳师范学院学报(自然科学版), 2000, 18(3): 54-56.
- [5] 郑 怡, 卢海声, 余 萍. 17 种蕨类植物凝集素的筛选研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2001, 17(4): 74-78.
- [6] 吴鹤龄, 林锦湖. 遗传学实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1983. 260-263.
- [7] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substance[J]. Anal Chem, 1957, 28: 350-356.
- [8] 孙 册, 朱 政, 莫汉庆. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986. 20-21.
- [9] 施佳军, 赵呈裕, 曾仲奎. 鸡枞凝集素的分离纯化与性质研究[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 10(1): 20-24.
- [10] Kawagishi H, Nomura A, Mizuno T, et al. Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies[J]. Biochem Biophys Acta, 1990, 1034: 247-252.