

## 3种海藻凝集素组分及糖抑制作用的初步研究

郑怡<sup>1</sup>, 余萍<sup>2</sup>, 刘燕如<sup>1</sup>

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

**摘要:** 从3种海藻(铁钉菜 *Ishige okamurae* Yenda, 坛紫菜 *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng 和脆江蓠 *Gracilaria bursa-pastoris* Silva)中分离纯化得到铁钉菜凝集素(IOL)、坛紫菜凝集素(PHL)及脆江蓠凝集素(GBL)。经测定,它们分别含有7%、14%和11%的中性糖。氨基酸组成中,苯丙氨酸含量最高,蛋氨酸和精氨酸次之。3种海藻凝集素的凝血活性均可被单糖或双糖所抑制,在所测试的13种糖类中,能够抑制GBL活性的糖类最多,达5种,抑制IOL的糖类最少,仅2种。3种糖蛋白(胃粘蛋白、卵粘蛋白和甲状腺球蛋白)对IOL没有抑制作用,而卵粘蛋白能够抑制PHL和GBL的凝血活性。

**关键词:** 海藻;凝集素;组分;糖

**中图分类号:** Q946; Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2002)04-0019-03

**Preliminary studies on component and sugar inhibition of three marine algal lectins** ZHENG Yi<sup>1</sup>, YU Ping<sup>2</sup>, LIU Yan-ru<sup>1</sup> (1. Bioengineering College, Fujian Teachers University, Fuzhou 350007, China; 2. Institute of Polymer, Fujian Teachers University, Fuzhou 350007, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2002, 11(4): 19-21

**Abstract:** Three kinds of algal lectin (IOL, PHL and GBL) were extracted and purified from three marine algae (*Ishige okamurae* Yenda, *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng and *Gracilaria bursa-pastoris* Silva). They contain 7%, 14% and 11% neutral saccharide, respectively. In their amino acid composition, Phe has the highest content, followed by Arg or Met. Agglutinin activities of these lectins were inhibited with the presence of some mono- or bi-saccharides. In sugar inhibition, there were the most numbers of sugars which inhibited the agglutinin activity of GBL and the fewest numbers of sugars which inhibited the agglutinin activity of IOL. Three kinds of glycoproteins (Mucin, Ovalbumin and Thyroglobulin) did not inhibit the activity of IOL, but Ovalbumin showed inhibition for the activities of PHL and GBL.

**Key words:** marine algae; lectin; component; sugar

凝集素是一类能识别和结合碳水化合物的糖蛋白或蛋白质分子。由于它独特的生物化学性质,使其在医学和生物研究上具有广泛的用途。凝集素存在于各种生物体中,在植物凝集素中,研究最多的是种子植物凝集素<sup>[1]</sup>,而低等的藻类植物凝集素的研究则很少,主要来源于对海藻凝集素的研究<sup>[2,3]</sup>,研究表明它们的某些理化性质和生物学功能与种子植物凝集素不同<sup>[4]</sup>。我国海藻种类繁多,是研究和开发凝集素的重要资源。本文从产于我国的3种海藻(铁钉菜 *Ishige okamurae* Yenda、坛紫菜 *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng 和脆江蓠 *Gracilaria bursa-pastoris* Silva)中,分离提纯了3种凝集素,分别测定了糖和氨基酸含量,并进行了糖和糖蛋白抑制实验,为海藻凝集素的研究和应用提供科学资料。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料与试剂

实验用的坛紫菜(*Porphyra haitanensis* Chang et Zheng)购于农贸市场,另2种海藻于2000年5月采自福建平潭岛,经鉴定为褐藻门的铁钉菜(*Ishige okamurae* Yenda)和红藻门的脆江蓠(*Gracilaria bursa-pastoris* Silva),冰箱内冷冻保存。层析用的填料为Pharmacia产品,乙酰葡萄糖胺和岩藻糖为进口产

收稿日期: 2002-05-31

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(B0110009)

作者简介: 郑怡(1959-),男,福建福州人,硕士,副教授,主要从事海藻学研究。

品,其他试剂和糖类为国产产品。实验用兔子购自福建省药品检验所,由静脉抽血,离心收集红细胞,加生理盐水离心洗涤 2 遍,以生理盐水配制成 2% 的红细胞悬液。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 海藻凝集素的提纯** 海藻样品解冻后,用蒸馏水洗净,剪碎,置于高速组织捣碎机内,加少量磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.2)捣碎成匀浆,4℃下放置 1 夜后,离心 20 min,收集上清液,加入硫酸铵达 75% 饱和度,4℃冰箱过夜后,5 000 r/min 4℃离心 25 min,收集的沉淀物加入磷酸缓冲液(0.02 mol/L, pH 7.5)溶解,透析除盐,得到凝集素粗品,经 DEAE-Sephrose 离子交换层析和 Sephadex G-100 分子筛层析,收集活性峰部分,得到 3 种纯化的海藻凝集素,蛋白质浓度测定采用 CBB-G250 法<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 海藻凝集素糖含量的测定** 采用酚-硫酸法测定<sup>[6]</sup>,以葡萄糖作标准。

**1.2.3 海藻凝集素氨基酸组成和含量的测定** 按常规方法处理后,用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。

**1.2.4 糖和糖蛋白的抑制实验** 13 种糖类溶液按 80 mmol/L 配制,3 种糖蛋白溶液按 15 g/L 配制。先将每种凝集素样品在 V 型血凝板上作系列倍比稀释后,再分别往每孔中加入 25 μL 的糖或糖蛋白溶液,震荡摇匀后,每孔加入 25 μL 的 2% 兔红细胞悬液,摇匀,放置 1 h 后镜检。

## 2 实验结果

### 2.1 海藻凝集素的提纯

3 种海藻样品经磷酸盐缓冲液提取和硫酸铵沉淀,再经离子交换和分子筛层析,获得纯化的铁钉菜

凝集素(IOL)、脆江蓠凝集素(GBL)及坛紫菜凝集素(PHL),经兔红细胞凝血活性测定,它们的最低凝血浓度分别为 15.72、2.34 和 12.5 μg/L,其中 GBL 对兔红细胞的凝集活性最大。

### 2.2 海藻凝集素的糖含量

经酚-硫酸法测定,铁钉菜凝集素 IOL、脆江蓠凝集素 GBL 及坛紫菜凝集素 PHL 的中性糖含量分别为 7%、11% 及 14%,以 PHL 中糖的含量最高。

### 2.3 海藻凝集素的氨基酸组成和含量

3 种海藻凝集素的氨基酸组成含量见表 1。由表 1 可知,在 3 种海藻凝集素的氨基酸组成中,含量最高的都是苯丙氨酸(Phe),在 IOL 和 PHL 中精氨酸(Arg)的含量次之,而在 GBL 中含量第二的是蛋氨酸(Met)。3 种凝集素中,PHL 的总氨基酸含量最高。IOL 含有所测试的各种氨基酸种类,而 PHL 缺乏酪氨酸(Tyr),GBL 缺少酪氨酸(Tyr)、脯氨酸(Pro)及组氨酸(His)。3 种海藻凝集素的碱性氨基酸(精氨酸 Arg、组氨酸 His 及赖氨酸 Lys)含量超过酸性氨基酸(谷氨酸 Glu 和天门冬氨酸 Asp)含量。

### 2.4 糖和糖蛋白的抑制作用

在 3 种海藻凝集素中,能够抑制 GBL 凝血活性的糖类最多,达 5 种(见表 2),即 GBL 可结合的糖类最多,包括单糖和双糖,其中阿拉伯糖(Ara)和麦芽糖(Mal)的抑制作用最强,葡萄糖(Glc)的抑制作用最弱。能够抑制 PHL 的糖类有 4 种,包括 3 种单糖(Ara, Gal, Xyl)和 1 种双糖(Mal),其中麦芽糖(Mal)的抑制作用最强。而能够抑制 IOL 凝血活性的糖类最少,只有麦芽糖和 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNac)2 种,即 IOL 结合的糖类最少。

由表 3 可知,3 种糖蛋白对 IOL 的凝血活性均无抑制作用,但卵粘蛋白可抑制 PHL 和 GBL 的凝血活性,表明卵粘蛋白上有被它们识别的糖链。

表 1 3 种海藻凝集素的氨基酸组成  
Table 1 Amino acid composition of three marine algal lectins

凝集素 <sup>1)</sup> Lectin <sup>1)</sup>	氨基酸含量 Content of amino acid (μg/L)																总量 Total	
	Aap	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg		Pro
PHL	12.41	6.58	7.37	19.44	8.92	9.51	18.79	12.62	25.18	12.48	13.89	9.75	30.52	14.88	3.86	25.74	11.83	243.76
IOL	8.75	5.27	5.89	8.07	4.99	7.18	27.92	11.16	41.99	10.05	7.55	0.00	45.72	12.30	0.00	35.52	0.00	232.37
GBL	19.54	8.01	8.97	20.94	9.93	14.42	24.80	15.70	30.68	13.47	15.98	0.00	48.51	19.31	5.92	40.53	5.44	303.31

<sup>1)</sup> PHL: 坛紫菜凝集素 Lectin of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng; IOL: 铁钉菜凝集素 Lectin of *Ishige okamurae* Yenda; GBL: 脆江蓠凝集素 Lectin of *Gracilaria bursa-pastoris* Silva

表2 糖对3种海藻凝集素凝血活性的抑制作用

Table 2 Inhibition of agglutination of three marine algal lectins by sugars

凝集素 <sup>1)</sup> Lectin <sup>1)</sup>	抑制作用 <sup>2)</sup> Inhibition <sup>2)</sup>													
	阿拉伯糖 Ara	果糖 Fru	岩藻糖 Fuc	半乳糖 Gal	葡萄糖 Glc	乳糖 Lac	麦芽糖 Mal	甘露糖 Man	山梨糖 Sor	木糖 Xyl	N-乙酰葡萄糖胺 GlcNAc	$\alpha$ -甲基葡萄糖苷 $\alpha$ -MeGlc	$\alpha$ -甲基甘露糖苷 $\alpha$ -MeMan	对照 CK
IOL	+	+	+	+	+	+	15.6	+	+	+	7.8	+	+	+
PHL	12.5	+	+	12.5	+	+	50.0	+	+	12.5	+	+	+	+
GBL	75.0	+	+	+	4.68	9.37	75.0	+	+	9.37	+	+	+	+

<sup>1)</sup> IOL: 铁钉菜凝集素 Lectin of *Ishige okamurai* Yenda; PHL: 坛紫菜凝集素 Lectin of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng; GBL: 脆江藻凝集素 Lectin of *Gracilaria bursa-pastoris* Silva. <sup>2)</sup> 数字表示糖抑制的最大凝集素浓度 The data present the maximum concentration of lectin under sugar inhibition ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); +: 凝集 agglutination; 糖的浓度为 80 mmol/L sugar concentration 80 mmol/L

表3 糖蛋白对3种海藻凝集素凝血活性的抑制作用

Table 3 Inhibition of agglutination of three marine algal lectins by glycoproteins

凝集素 <sup>1)</sup> Lectin <sup>1)</sup>	抑制作用 <sup>2)</sup> Inhibition <sup>2)</sup>		
	胃粘蛋白 Mucin	卵粘蛋白 Ovalbumin	甲状腺球蛋白 Thyroglobulin
IOL	+	+	+
PHL	+	400	+
GBL	+	300	+

<sup>1)</sup> PHL: 坛紫菜凝集素 Lectin of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng; IOL: 铁钉菜凝集素 Lectin of *Ishige okamurai* Yenda; GBL: 脆江藻凝集素 Lectin of *Gracilaria bursa-pastoris* Silva. <sup>2)</sup> 数字表示糖蛋白抑制的最大凝集素浓度 The data present the maximum concentration of lectin under glycoprotein inhibition ( $\text{g}/\text{L}$ ); +: 凝集 agglutination; 糖蛋白的浓度为 15  $\text{g}/\text{L}$  glycoprotein concentration 15  $\text{g}/\text{L}$

### 3 讨论

植物凝集素的组分随种类而异。大多数植物凝集素分子中含有糖,属于糖蛋白。但也有少数为单纯的蛋白质,如麦胚凝集素(WGA)、花生凝集素(PNA)等<sup>[7]</sup>。本文纯化的3种海藻凝集素均含有糖分子,属于糖蛋白,其中PHL中糖含量最高。

凝集素的氨基酸组成复杂,各种氨基酸的含量不同,与凝集素的某些性质如热稳定和变性等有关。多数植物凝集素含有较高的天门冬氨酸、丝氨酸及苏氨酸<sup>[7]</sup>,但这3种氨基酸在IOL、PHL及GBL中含量都不高,3种海藻凝集素则以苯丙氨酸、精氨酸或蛋氨酸的含量最高,因此,海藻凝集素在氨基酸组成和含量上可能有别与陆生种子植物凝集素。

糖和糖蛋白由于能与凝集素分子结合,阻止其与细胞表面糖分子的结合,从而抑制凝集素的凝集活性,因此通过抑制实验可知某种凝集素能与哪些糖类专一性结合,这是凝集素的重要特征之一,同时也可作为凝集素的分类依据<sup>[1]</sup>。根据IOL、PHL和

GBL结合的糖类,它们分别属于N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖及葡萄糖类凝集素。它们既可与双糖结合,也可与单糖结合,但大多数海藻凝集素只能与双糖结合,只有少数可与单糖结合<sup>[8,9]</sup>。Rogers等<sup>[3]</sup>认为海藻凝集素是否与单糖或双糖结合可能与分子量大小有关。

在采用亲和柱层析纯化凝集素时,需要选择糖蛋白与Sepharose偶联。本实验表明卵粘蛋白有PHL和GBL识别和结合的糖链,因此亲和层析PHL和GBL,可选择卵粘蛋白与Sepharose偶联进行纯化。

#### 参考文献:

- [1] 张德颐,朱治平. 植物分子生物学与生物工程[M]. 北京:科学出版社,1991. 145-158.
- [2] Kakita H, Fukuoka S, Obika H, et al. Purification and properties of a high molecular weight hemagglutinin from the red alga, *Gracilaria verrucosa*[J]. Bot Mar, 1997, 40: 241-247.
- [3] Rogers D J, Hori K. Marine algal lectin: New developments[J]. Hydrobiologia, 1993, 260/261: 589-593.
- [4] Hori K, Miyazawa K, Ito K. Some common properties of lectins from marine algae [J]. Hydrobiologia, 1990, 203/205: 561-566.
- [5] Alexander R R, Griffiths J M, Wilkinson M L. Basic Biochemical Methods[M]. New York: John Wiley & Sons, 1985. 18-19.
- [6] 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.
- [7] 孙册,朱政,莫汉庆. 凝集素[M]. 北京:科学出版社,1986. 65-66.
- [8] Rogers D J, Fish B C, Brwell C J. Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Phumaria elegans* and *Pilota serrata* [A]. Kocourek J, Freed D. Lectin [M]. St Louis MO, USA: Sigma Chemical Company, 1990. 49-52.
- [9] Alvarez-Hernandez S, Lara-Isassi G, Arreyuin-Espinoza R. Isolation and partial characterization of griffin, a lectin from the Mexican endemic alga *Codium giraffa* Silva[J]. Bot Mar, 1999, 42: 573-580.