

# 棘托竹荪凝集素的纯化及其生化特性

林玉满<sup>1,①</sup>, 苏爱华<sup>2</sup>

(1. 福建师范大学化学与材料学院, 福建 福州 350007; 2. 福建卫生学校, 福建 福州 350001)

**摘要** 棘托竹荪 (*Dictyophora echinolvata* Zang, Zheng et Hu) 子实体经生理盐水抽提、硫酸铵沉淀、DEAE-Sephadex 和 Sephadex G-100 柱层析纯化得到棘托竹荪凝集素 (DEL)。经 PAGE 显示单一条带, 相对分子质量为 38 000, 其亚基相对分子质量为 18 900; 不含中性糖, IEF-PAGE 测得其等电点为 4.21。该凝集素对供试的 4 种血型人血和 6 种动物血的红细胞具有凝集作用, 也能凝集小鼠淋巴细胞和小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞, 对兔红细胞的凝集作用可被乳糖和果糖所抑制。DEL 含有 15 种氨基酸, 其中天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸和缬氨酸含量较高; N-末端为丙氨酸。DEL 对热不稳定, 经 50℃ 处理 10 min, 活性明显降低; 在 pH 4.00 ~ pH 10.14 范围内较稳定; 其凝集活性依赖于 Mn<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 则无影响。DEL 对小鼠腹腔注射的半致死量为 1 180 mg·kg<sup>-1</sup>。

**关键词:** 凝集素; 棘托竹荪; 分离纯化; 性质

**中图分类号:** Q946.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2004)03-0001-06

**Purification and characterization of the lectin from *Dictyophora echinolvata*** LIN Yu-man<sup>1,①</sup>, SU Aihua<sup>2</sup> (1. College of Chemistry and Materials Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 2. Fujian Health School, Fuzhou 350001, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(3): 1-6

**Abstract:** The lectin DEL from the fruiting bodies of *Dictyophora echinolvata* Zang, Zheng et Hu was isolated and purified by physiological saline extraction, precipitation of 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and DEAE-Sephadex, Sephadex G-100 chromatography purification. It turned out to be a single band in PAGE identification. The relative molecular mass of DEL was 38 000 and the subunit 18 900, its pI was about 4.21. This lectin agglutinated with 4 types of human erythrocytes and 6 types of animal erythrocytes, it also agglutinated with the lymphocyte cells and S<sub>180</sub> tumor cells from mouse. The hemagglutination of the lectin on rabbit erythrocytes was inhibited by lactose and fructose. It contained 15 kinds of amino acid, in which the contents of aspartic acid, glutamic acid, glycine and valine were relatively high. The N-terminal of DEL was alanine. DEL was thermal-unstable, its agglutination activity decreased obviously after being heated 10 min at 50℃, but had high activity within pH 4.00 - pH 10.14. Its activity was depended on Mn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, not on Mg<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. DEL was toxic to mouse by celiac injection with a LD<sub>50</sub> of 1 180 mg·kg<sup>-1</sup>.

**Key words:** lectin; *Dictyophora echinolvata* Zang, Zheng et Hu; isolation and purification; characterization

凝集素广泛存在于动物、植物和微生物中, 在细胞凝集、免疫调节、抑制肿瘤细胞生长、鉴别人类血型和分离纯化某些生物高分子成分等方面都有着重要的作用<sup>[1]</sup>。目前, 凝集素主要来源于高等植物, 而从真菌类蕈菌中筛选、分离和纯化凝集素的研究较少。Pemberton<sup>[2]</sup>曾对 403 种蕈菌测定, 发现约 50% 蕈菌子实体提取物对人血红细胞具有凝集作用, 但迄今为止, 已纯化的蕈菌凝集素尚不多, 已成为商品的蕈菌凝集素, 只有双孢蘑菇凝集素 1 种。

从蕈菌子实体或菌丝体中分离到的许多三萜类和多糖类物质具有调节寄主的免疫活性和抗肿瘤作用, 而凝集素则是蕈菌所含的另一类重要生理活性物质, 部分蕈菌凝集素具有抑制肿瘤细胞生长等药

用功效, 因此, 对蕈菌凝集素的深入研究, 将进一步揭示蕈菌的药物学作用机制, 为更好地开发利用这一宝贵资源提供科学依据。

棘托竹荪 (*Dictyophora echinolvata* Zang, Zheng et Hu) 是食、药兼用蕈菌之一, 从其子实体中已分离纯化具有抑制肿瘤活性的多糖 DE2-2<sup>[3]</sup>, 但其凝集素的研究至今未见报道。本文报道了从新鲜棘托竹

收稿日期: 2004-01-28

基金项目: 福建省教育厅资助项目 (JB00029) 和福建省高校测试基金项目 (CJ-057)

作者简介: 林玉满 (1962-), 男, 福建仙游人, 硕士, 副研究员, 主要从事生物化学研究工作。

① 通信联系人 E-mail: ymlin@fjnu.edu.cn

蒜子实体中分离纯化凝集素的结果及其该凝集素部分性质的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

供试样品采用人工栽培的新鲜棘托竹蒜子实体。小鼠、兔由福建医科大学提供,鸡、鸭、鱼等购自农贸市场。小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞为福建医学科学研究所赠送,人血由福建师范大学医院提供;低分子量标准蛋白质、Sephadex G-100 和 DEAE-Sephrose 为 Pharmacia 公司产品;Ampholine pH 3.5 ~ pH 10 等电聚焦电泳试剂均采用 LKB 公司产品;N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、甘露糖和岩藻糖为 Sigma 公司产品,其他糖为国产分析纯或生化试剂,其余试剂为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 凝集素的分离和纯化** 新鲜棘托竹蒜子实体洗净、剪切后,用带冷却水的高速捣碎机匀浆,加生理盐水抽提,抽提液加固体硫酸铵至 40% 饱和度,4℃ 离心(3 500 g, 20 min),分别收集上清液和沉淀物,经测定沉淀物对兔红细胞具有高的血凝活性,上清液则无活性。沉淀物溶于 PBS I(0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 + 0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.2),并对同一缓冲液透析至外透析液无 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 检出后,取适量透析后的粗品,上 DEAE-Sephrose 柱(1.6 cm × 40 cm),用 PBS II(0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 + 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.2)对 PB(0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液, pH 7.2)进行梯度洗脱,每管 5 mL,分管收集。采用 LKB 柱层析系统自动检测,检测波长为 278 nm,根据检测仪自动记录的各洗脱峰,用兔红细胞检测各峰的血凝活性。经活性测定后,收集活性部分的洗脱液,冷冻干燥浓缩至适当体积,再经 Sephadex G-100 柱(2.6 cm × 60 cm)进一步纯化,洗脱液为 PBS I,每管 5 mL,分管收集,同法检测,活性部分经蒸馏水透析去盐,冷冻干燥,得 DEL 纯品。

**1.2.2 纯度检查** 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定<sup>[4]</sup>。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3),凝胶浓度 7.5%。电泳后凝胶条分别以考马斯亮蓝 R-250 和高碘酸-Schiff 试剂染色。

**1.2.3 血凝活性测定** 人血和兔等动物血血样加入 Alsever 抗凝剂,离心去除血浆,血球用生理盐水洗涤 3~5 次,最后配成 2% 红细胞悬液。

参照文献[1]方法,在“V”型血凝板中每孔加 25 μL PBS I,取 25 μL 凝集素溶液与等量 PBS I 作倍比稀释,然后加 25 μL 2% 兔红细胞,振荡后室温放置 2 h,肉眼或显微镜观察结果。

**1.2.4 热稳定性测定** 按文献[5]方法进行,凝集素初始浓度为 300 μg·mL<sup>-1</sup>,保温时间 10 min。

**1.2.5 酸碱稳定性测定** 凝集素初始浓度为 300 μg·mL<sup>-1</sup>,在 pH 4.00 ~ pH 10.14 缓冲系统中,25℃ 静置 2 h,经倍比稀释后,用兔红细胞测定不同 pH 条件的血凝活性。pH 4.00 ~ pH 6.00: 采用 0.015 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> 缓冲液; pH 6.50 ~ pH 7.50: 采用 0.015 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液; pH 8.00 ~ pH 9.00: 采用 0.015 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液; pH 9.51 ~ pH 10.14: 采用 0.015 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液。

**1.2.6 糖含量测定** 按 Dubois 的方法进行<sup>[6]</sup>。配制 400 mg·L<sup>-1</sup> 葡萄糖标准溶液,分别取 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 和 1.8 mL,各加 H<sub>2</sub>O 至 2.0 mL,然后加入 6% 苯酚 1.0 mL,浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0 mL,静止 10 min,摇匀,室温放置 20 min,于 490 nm 测定吸光度 A<sub>490</sub>,以糖微克数为横坐标, A<sub>490</sub> 为纵坐标,绘制标准曲线。样品按同法测定,根据标准曲线计算糖含量。

**1.2.7 氨基酸组成分析** 由国家医药管理局福建省微生物研究所测定。凝集素用 6 mol·L<sup>-1</sup> HCl 于 110℃ 水解 24 h,用 HITACH 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。

**1.2.8 亚基相对分子质量测定** 按文献[7]的方法,采用 1% SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳,凝胶浓度 7.5%,内含巯基乙醇;考马斯亮蓝 R-250 染色。所用标准蛋白质为磷酸化酶 b(94 000)、牛血清白蛋白(67 000)、卵清蛋白(43 000)、碳酸酐酶(30 000)、大豆胰蛋白酶抑制剂(20 100)和 α-乳清蛋白(14 400)。根据标准蛋白质和凝集素的迁移率,按 Weber 的方法求得亚基相对分子质量<sup>[8]</sup>。

**1.2.9 相对分子质量测定** 采用 Sephadex G-100 凝胶过滤法。分子量标准蛋白质为:牛血清白蛋白(67 000)、卵清蛋白(43 000)、胰凝乳蛋白酶原(25 000)和核糖核酸酶(13 700)。有效分配系数  $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ , V<sub>0</sub> 为外水体积, V<sub>t</sub> 为凝胶床体积, V<sub>e</sub> 为洗脱体积,根据各分子量标准蛋白质的洗脱体积 V<sub>e</sub>, 求出相应的 K<sub>av</sub>, 而 K<sub>av</sub> 与蛋白质分子

量存在着线性关系,即  $K_{av} = -\lg M + C$ ,以标准蛋白分子量的对数为纵坐标,以  $K_{av}$  为横坐标作图,绘制标准曲线,根据 DEL 的洗脱体积,求出相应的  $K_{av}$  值,从标准曲线求得 DEL 的相对分子质量。

1.2.10 糖抑制实验<sup>[1]</sup> 凝集素的初始浓度为  $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,在“V”型血凝板上,凝集素倍比稀释后,加入  $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  各种糖溶液,混合,1 h 后加入  $25 \mu\text{L}$  2% 兔红细胞,振荡后室温放置 2 h,观察凝集结果。

1.2.11 等电点测定 采用等电聚焦电泳法,测定方法参照 LKB 公司生产的多用电泳仪操作手册,Ampholine 的 pH 范围为 3.5 ~ 10.0,凝胶浓度为 4.8%,采用表面电极测定凝胶板的 pH 值。

1.2.12 金属离子对凝集活性的影响 取 2 ~ 3 mL 凝集素溶液对  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA 溶液(生理盐水配制)充分透析,再用生理盐水充分透析去除多余 EDTA,待用。取已去除金属离子的凝集素溶液  $25 \mu\text{L}$ ,用生理盐水进行倍比稀释后,分别加入  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$   $25 \mu\text{L}$ ,振摇后,分别加入  $25 \mu\text{L}$  兔红细胞悬液,室温放置 2 h,显微镜下检查凝集结果。并以未经 EDTA 处理的凝集素溶液为对照组。

1.2.13 N-末端测定 按照 Chang<sup>[9]</sup> 的方法进行。

1.2.14 对小鼠淋巴细胞和  $S_{180}$  肉瘤细胞凝集活性测定

1.2.14.1 淋巴细胞和  $S_{180}$  肉瘤细胞分离 淋巴细胞的分离:小鼠眼眶放血致死,取小鼠脾脏,研磨分散细胞后,加在淋巴细胞分离液上进行离心分离,分离出的淋巴细胞经生理盐水离心洗涤后,用生理盐水配成 1 mL 含  $1 \times 10^7$  个细胞的悬液。

$S_{180}$  肉瘤细胞的分离:将带瘤的小鼠眼眶放血致死,取长于小鼠腋下的肉瘤,除去结缔组织,剪切成小块,用生理盐水洗去血污,经研磨分散细胞,离心洗涤 2 次后,配成 1 mL 含  $1 \times 10^7$  个小鼠  $S_{180}$  肉瘤细胞的悬液。

1.2.14.2 凝集活性测定 参照文献<sup>[1]</sup> 方法进行。 $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  凝集素溶液与等量的 PBS I 作倍比稀释,分别加入小鼠淋巴细胞和  $S_{180}$  肉瘤细胞,观察凝集结果。

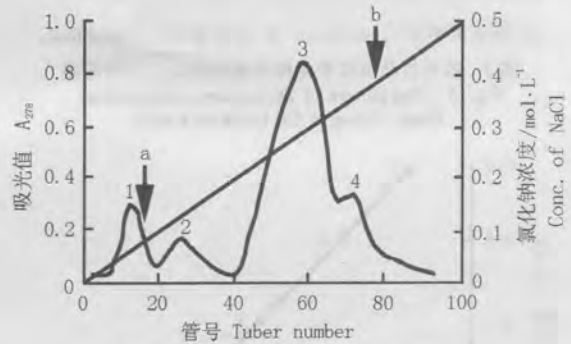
1.2.15 对小鼠的半致死剂量测定 参照夏炳南等<sup>[10]</sup> 方法。选用刚成年的健康小鼠 50 只,每只重约 20 g,随机分成 5 组,每组 10 只;预先确定 DEL 对小鼠的最大全不死量 ( $LD_0$ ) 和最小的全致死量

( $LD_{100}$ ),再确定中间剂量,给小鼠腹腔注射不同剂量的 DEL,注射后观察 3 d,根据各组小鼠的死亡数计算死亡率。采用目测概率单位法,计算出小鼠的半致死剂量。

## 2 结果和分析

### 2.1 棘托竹荪凝集素的分离和纯化

棘托竹荪子实体经捣碎、生理盐水抽提和硫酸铵沉淀得到凝集素粗品。该粗品经 DEAE-Sephrose 柱层析,用 PBS II 对 PB 进行梯度洗脱,得到 4 个洗脱峰(图 1),经血凝活性测定,第 3 个洗脱峰具有高的血凝活性,该活性部分经 Sephadex G-100 柱进一步纯化,得到 2 个洗脱峰(图 2),经血凝活性测定,第 2 峰具有血凝活性,而第 1 峰则无活性。收集第 2 洗脱峰的洗脱液,经透析去盐,冷冻干燥后获得棘托竹荪凝集素纯品 DEL。



a: 洗脱曲线 Elution curve; b: 洗脱剂 Eluant  
图 1 棘托竹荪凝集素的 DEAE-Sephrose 柱层析洗脱曲线  
Fig. 1 The elution curve of DEAE-Sephrose chromatography of *Dictyophora echinovolata* Zang, Zheng et Hu lectin

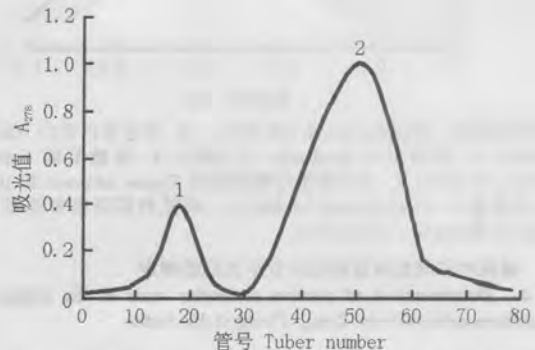


图 2 棘托竹荪凝集素的 Sephadex G-100 柱层析洗脱曲线 (PBSI 洗脱)  
Fig. 2 The elution curve of sephadex G-100 chromatography of *Dictyophora echinovolata* Zang, Zheng et Hu lectin Eluted with PBS I

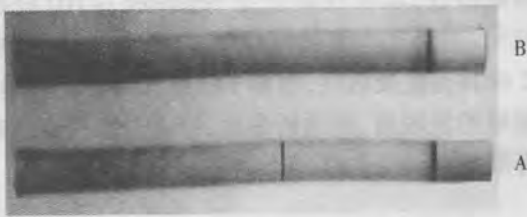


## 2.2 棘托竹荪凝集素纯度鉴定

DEAE-Sepharose 柱层析的第3峰粗品经聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色,呈现2条着色带(图3-A),用 Sephadex G-100 柱进一步纯化,活性峰样品经电泳,考马斯亮蓝染色,呈现出单一着色带(图3-B),但用高碘酸-Schiff 试剂进行糖蛋白染色则不着色。电泳结果显示所得到的凝集素为纯品。

## 2.3 棘托竹荪凝集素相对分子质量和亚基相对分子质量测定

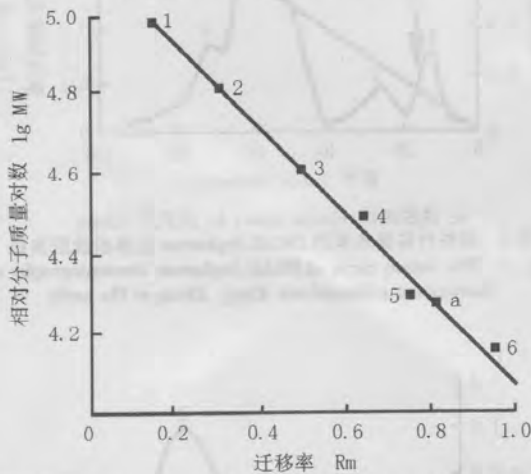
经1% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,按 Weber 方法,根据标准蛋白质分子质量标准曲线求得棘托竹荪凝集素亚基相对分子质量为18 900(图4)。



A: 凝集素粗品 Crude lectin; B: 凝集素纯品 Purified lectin

图3 棘托竹荪凝集素的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 3 The pattern of *Dictyophora echinvolvata* Zang, Zheng et Hu lectin on PAGE



1. 磷酸化酶 b Phosphorylase b (94 000); 2. 牛血清白蛋白 Albumin (67 000); 3. 卵清蛋白 Ovalbumin (43 000); 4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (30 000); 5. 大豆胰蛋白酶抑制剂 Trypsin inhibitor (20 100); 6.  $\alpha$ -乳清蛋白  $\alpha$ -Lactalbumin (14 400); a. 棘托竹荪凝集素亚基 The subunit of *Dictyophora echinvolvata*

图4 棘托竹荪凝集素亚基相对分子质量的测定

Fig. 4 Determination of relative molecular mass of the subunit of *Dictyophora echinvolvata* Zang, Zheng et Hu lectin

DEL 经 Sephadex G-100 凝胶过滤,呈现单一对称的洗脱峰。经测定外水体积  $V_0 = 67.5$  mL,洗脱体积  $V_e = 116.4$  mL,可求得  $K_{av} = 0.33$ 。根据  $K_{av}$

值,即可计算出其相对分子质量为38 000。上述结果表明该凝集素是由相对分子质量相同的2个亚基组成。

## 2.4 氨基酸组成分析和中性糖含量测定

DEL 的氨基酸组成见表1。由于在水解过程中色氨酸全部被破坏,故无法计算。从表1可以看出,该凝集素含有15种氨基酸,且富含天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸和缬氨酸。

经苯酚-硫酸法检测,DEL 不含中性糖。

表1 棘托竹荪凝集素的氨基酸组成和含量<sup>1)</sup>

Table 1 The composition and contents of amino acids of *Dictyophora echinvolvata* Zang, Zheng et Hu lectin<sup>1)</sup>

氨基酸 Amino acid	氨基酸含量/ $g \cdot g^{-1}$ Amino acid content	氨基酸 Amino acid	氨基酸含量/ $g \cdot g^{-1}$ Amino acid content
Asp	0.122 7	Thr	0.077 3
Ser	0.071 3	Glu	0.108 1
Gly	0.095 6	Ala	0.085 5
Cys	/	Val	0.093 1
Ile	0.081 3	Leu	0.063 7
Tyr	0.051 4	Phe	0.036 8
Lys	0.027 8	Arg	0.033 2
Pro	0.025 4	His	0.012 3
Met	/	Trp	ND

<sup>1)</sup> ND: 未测 Not determination

## 2.5 糖抑制实验

棘托竹荪子实体凝集素的糖抑制实验结果见表2。从表2可知,该凝集素的凝集活性可被乳糖和果糖所抑制。

表2 糖对棘托竹荪凝集素凝集活性的抑制作用<sup>1)</sup>

Table 2 Inhibition to agglutination activity of *Dictyophora echinvolvata* Zang, Zheng et Hu lectin by sugars<sup>1)</sup>

糖 Sugar	倍比稀释的凝集素的凝集活性 Agglutination activity of serial 2-fold dilution of lectin				
	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>
半乳糖 Gal	+	+	+	+	+
甘露糖 Man	+	+	+	+	+
岩藻糖 Fuc	+	+	+	+	+
阿拉伯糖 Ara	+	+	+	+	+
果糖 Fru	-	-	-	-	-
木糖 Xyl	+	+	+	+	+
鼠李糖 Rha	+	+	+	+	+
N-乙酰葡萄糖胺 GlcNAc	+	+	+	+	+
N-乙酰半乳糖胺 GalNA	+	+	+	+	+
蔗糖 Suc	+	+	+	+	+
葡萄糖 Glc	+	+	+	+	+
乳糖 Lac	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup> +: 凝集 Hemagglutination; -: 不凝集 Non-hemagglutination

2.6 棘托竹荪凝集素对红细胞的凝血活性

棘托竹荪凝集素初始浓度为  $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 经倍比稀释后, 对不同种属红细胞凝集作用见表3。结果表明, DEL 对所测试的各种血细胞均有凝集作用, 但凝集强度有很大差异。对兔红细胞的凝集活性最高, 最低凝集浓度为  $0.30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 对鳖红细胞的凝集活性最低, 最低凝集浓度为  $37.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而对不同血型人红细胞的凝集活性则相差无几, 最低凝集浓度为  $4.36 \sim 9.38 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7 棘托竹荪凝集素对小鼠淋巴细胞和 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞的凝集作用

DEL 对小鼠淋巴细胞和小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞均有凝集作用, 但强度差异较大(见表4)。对小鼠淋巴细胞最低凝集浓度为  $18.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而对小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞最低凝集浓度为  $2.35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.8 棘托竹荪凝集素等电点和 N-末端测定

经等电聚焦电泳显示棘托竹荪凝集素 pI 为

表3 棘托竹荪凝集素的凝血活性<sup>1)</sup>  
Table 3 Agglutinating activity of *Dictyophora echinovolva* Zang, Zheng et Hu lectin<sup>1)</sup>

红细胞 Red cell	倍比稀释的凝集素的凝血活性 Agglutinating activity of serial 2-fold dilution of lectin										
	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>	2 <sup>-7</sup>	2 <sup>-8</sup>	2 <sup>-9</sup>	2 <sup>-10</sup>	2 <sup>-11</sup>
人 Human											
A 型 type A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B 型 type B	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AB 型 type AB	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
O 型 type O	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
兔 Rabbit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
小牛 Calf	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
鸭 Duck	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
鸡 Chicken	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
鲫鱼 Crucian	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
鳖 Turtle	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup> + : 凝集 Hemagglutination; - : 不凝集 Non-hemagglutination

表4 棘托竹荪凝集素对小鼠淋巴细胞和 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞的凝集活性<sup>1)</sup>  
Table 4 The agglutination activity of *Dictyophora echinovolva* Zang, Zheng et Hu lectin to lymphocyte and S<sub>180</sub> tumor cell of mouse<sup>1)</sup>

细胞种类 Cell	倍比稀释的凝集素的凝集活性 Agglutination activity of serial 2-fold dilution of lectin									
	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>	2 <sup>-7</sup>	2 <sup>-8</sup>	2 <sup>-9</sup>	2 <sup>-10</sup>
淋巴细胞 Lymphocyte	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S <sub>180</sub> 肉瘤细胞 S <sub>180</sub> tumor cell	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

<sup>1)</sup> + : 凝集 Hemagglutination; - : 不凝集 Non-hemagglutination

4.21。其 N-末端为丙氨酸。

2.9 棘托竹荪凝集素的热稳定性

温度对棘托竹荪凝集素凝集活性的影响见表5。结果表明, 该凝集素经 50℃ 处理 10 min, 其凝集活性降低较为明显; 60 ~ 100℃ 处理后, 活性则完全消失, 说明该凝集素对热不稳定性。

表5 不同温度对棘托竹荪凝集素活性的影响<sup>1)</sup>  
Table 5 Effect of temperature on agglutination activity of *Dictyophora echinovolva* Zang, Zheng et Hu lectin<sup>1)</sup>

温度/℃ Temperature	倍比稀释的凝集素的凝集活性 Agglutination activity of serial 2-fold dilution of lectin									
	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>	2 <sup>-7</sup>	2 <sup>-8</sup>	2 <sup>-9</sup>	2 <sup>-10</sup>
20	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
30	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
40	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
50	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70, 80, 90, 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup> + : 凝集 Hemagglutination; - : 不凝集 Non-hemagglutination

2.10 棘托竹荪凝集素的酸碱稳定性

不同 pH 值对棘托竹荪凝集素凝集活性的影响见表6。结果表明, 在 pH 4.00 ~ pH 10.14 之间, 凝集活性高; 当 pH 为 4.00 或 10.14 时, 其活性略有下降。这说明该凝集素对酸碱具有较高的稳定性。

表6 pH 值对棘托竹荪凝集素凝集活性的影响<sup>1)</sup>  
Table 6 Effect of pH on agglutination activity of *Dictyophora echinovolva* Zang, Zheng et Hu lectin<sup>1)</sup>

pH	倍比稀释的凝集素的凝集活性 Agglutination activity of serial 2-fold dilution of lectin						
	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>	2 <sup>-7</sup>
4.00	+	+	+	+	+	-	-
4.50	+	+	+	+	+	+	-
5.00	+	+	+	+	+	+	-
6.00	+	+	+	+	+	+	-
6.50	+	+	+	+	+	+	-
7.00	+	+	+	+	+	+	-
7.50	+	+	+	+	+	+	-
8.00	+	+	+	+	+	+	-
8.50	+	+	+	+	+	+	-
8.90	+	+	+	+	+	+	-
9.51	+	+	+	+	+	+	-
10.14	+	+	+	+	-	-	-

<sup>1)</sup> + : 凝集 Hemagglutination; - : 不凝集 Non-hemagglutination

2.11 金属离子对棘托竹荪凝集素凝集活性的影响

金属离子对棘托竹荪凝集素凝集活性的影响见表7。该凝集素对兔红细胞的凝集活性与金属离子

有关。DEL 经 EDTA 去除金属离子后,其活性消失;而  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  可使该凝集素的活性完全恢复,  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  对其活性则无影响。

表 7 金属离子对棘托竹荪凝集素凝集活性的影响<sup>1)</sup>  
Table 7 Influence of metal ions on agglutination activity of *Dictyophora echinovolvata* Zang, Zheng et Hu lectin<sup>1)</sup>

处理 Treatment	不同浓度凝集素的凝集活性 Agglutination activity of different concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$						
	300.0	150.0	75.0	37.5	18.75	9.38	4.69
Non-EDTA	+	+	+	+	+	+	+
EDTA	-	-	-	-	-	-	-
$\text{Mg}^{2+}$	-	-	-	-	-	-	-
$\text{Ca}^{2+}$	+	+	+	+	+	+	+
$\text{Zn}^{2+}$	-	-	-	-	-	-	-
$\text{Mn}^{2+}$	+	+	+	+	+	+	+

1) +: 凝集 Hemagglutination; -: 不凝集 Non-hemagglutination; Non-EDTA: 未经 DETA 处理的凝集素(对照) Lectin without treatment with DETA (contrast); EDTA: 经 EDTA 处理的凝集素(不含金属离子) Lectin treated with EDTA (without metal ion)

### 2.13 棘托竹荪凝集素对小鼠的急性毒性

棘托竹荪凝集素对小鼠的急性毒性实验结果见表 8。根据各组死亡率,计算出该凝集素对小鼠的  $\text{LD}_{50}$  为  $1\ 180\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,表明经腹腔注射,棘托竹荪凝集素对小鼠具有中等毒性。

表 8 棘托竹荪凝集素对小鼠的毒性  
Table 8 Toxic activity of *Dictyophora echinovolvata* Zang, Zheng et Hu lectin to mouse

剂量 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Dose	对数剂量 Logarithm of dose	总小鼠数 Total number of mice	死亡数 Dead number of mice	死亡率/% Dead ratio	概率单位 Probability unit
850	2.929	10	0	0	-
1 091	3.038	10	2	20	4.16
1 399	3.146	10	6	60	5.25
1 795	3.254	10	9	90	6.28
2 300	3.362	10	10	100	-

## 3 讨 论

棘托竹荪凝集素经聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色,呈现出单一着色带,高碘酸-Schiff 试剂染色则不着色,苯酚-硫酸法测定不含中性糖,推测 DEL 不含糖,可能是 1 种简单蛋白质。氨基酸分析表明其含有 15 种氨基酸,特别是富含天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸和缬氨酸,这可能与其空间结构的特异性密切相关。因未进行碱水解氨基酸分析,该凝集

素是否含有色氨酸需做进一步测定。

乳糖和果糖能抑制 DEL 凝集活性,可能与 DEL 结合细胞受体的糖结合专一性有关。由于糖结合特异性是凝集素的最重要特征之一,继续研究 DEL 的糖结合特性,对 DEL 的生理活性等研究有着重要意义。DEL 对小鼠淋巴细胞和  $\text{S}_{180}$  肉瘤细胞均有凝集作用,说明其凝集作用无选择性;对不同血型人红细胞和不同动物的红细胞均具有凝集作用,说明其凝集作用不具种属专一性。

有关蕈菌凝集素对小鼠的急性毒性的研究报道不多,草菇凝集素<sup>[11]</sup>对小鼠的半致死剂量  $\text{LD}_{50}$  为  $17.5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,杨树菇凝集素<sup>[12]</sup>对小鼠的半致死剂量  $\text{LD}_{50}$  为  $15.85\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,而 DEL 对小鼠的半致死剂量  $\text{LD}_{50}$  为  $1\ 180\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,毒性明显低于前两者。

### 参考文献:

- [1] 孙 册,朱 政,莫汉庆. 凝集素[M]. 北京:科学出版社, 1986. 1-136.
- [2] Pemberton R T. Agglutinins (lectin) from some British higher fungi [J]. Mycol Res, 1994, 98(3): 277-290.
- [3] 林玉满,余 萍,刘艳如. 棘托竹荪子实体水溶性多糖 DE2-2 的分离纯化和鉴定[J]. 食用菌学报,2001,8(1):15-18.
- [4] 吴鹤龄,林锦湖. 遗传学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,1984. 260-263.
- [5] 余 萍,黄德棋,林玉满. 韭菜凝集素的纯化及部分性质[J]. 福建师范大学学报,1995,11(3): 71-75.
- [6] 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.
- [7] Laemml U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [8] Weber K, Osborn M. Reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [J]. J Biol Chem 1969, 244(16): 4406-4412.
- [9] Chang J Y. Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4N,N-dimethylamino benzene 4'-isothio-cyanate/phenylisothiocyanate double coupling method [J]. FEBS Lett, 1978,93(2): 205-211.
- [10] 夏炳南,孙瑞元,张家铨. 药理学实验教程[M]. 贵阳:贵州人民出版社,1986. 56-75.
- [11] Lin J Y, Chou T B. Isolation and characterization of a lectin from edible mushroom, *Volvariella volvacea* [J]. J Biochem, 1984, 96(1): 35-40.
- [12] 孙 慧,赵辰光,全 鑫,等. 一种新杨树菇(*Agrocybe aegerita*) 凝集素的纯化及生化特性[J]. 中国生物化学与分子生物学学报,2003,19(1):96-102.