

蛋白核小球藻凝集素的分离纯化及部分性质研究

郑 怡 余 萍 刘艳如

(福建师范大学生物工程学院, 福州 350007)

摘要: 蛋白核小球藻藻粉的 PBS 抽提液经硫酸铵二步分级沉淀, 再经 DEAE Sepharose 和 Sephadex G-100 层析, 从中分离纯化得到蛋白核小球藻凝集素(CPL)。经测定, 该凝集素为单个亚基的蛋白质, 相对亚基分子量为 $1.4 \times 10^4 - 1.5 \times 10^4$, 分子中不含糖。在氨基酸组成中, 苯丙氨酸(Phe)的含量最高, 其次是天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu), 不含组氨酸(His)。CPL 能够凝集兔、绵羊及鸽子红细胞, 其中对兔红细胞的凝集活性最大, 最低浓度为 $6.88 \mu\text{g/mL}$, 对鸡、鸭及人红细胞(A 型、O 型及 B 型)无凝集活性。卵黏蛋白和 7 种单糖对 CPL 的凝集活性具有抑制作用。CPL 具有很好的热稳定性, 在 90°C 处理 10min 不失活。

关键词: 蛋白核小球藻; 凝集素; 纯化; 性质

中图分类号: Q949.29 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)01-0036-05

凝集素是一类能与糖专一结合, 凝集细胞或沉淀含糖的高分子蛋白质或糖蛋白, 由于这些性质使其在分离纯化细胞, 研究细胞表面特征及临床等方面有着广泛的用途^[1]。植物凝集素的研究已有很长的历史并且一直很活跃, 从植物中不断地分离纯化出新的凝集素, 对它们的性质和生物学活性进行了广泛而深入的研究^[2]。但藻类凝集素的研究较少, 主要来自大型海藻方面^[3,4]。微藻种类繁多, 分布广, 与其他植物一样, 也应该含有丰富的凝集素资源。但目前只见 Hori^[5]等对一些海洋微藻中的凝集素进行了初步的筛选。由于凝集素在生物体内担负着许多重要的生理功能, 因此对微藻凝集素的研究也将有助于认识凝集素在微藻生命活动过程中的作用。

本文从淡水微藻—蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* chick)中分离得到一种纯化的凝集素(CPL), 并对它的部分性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 实验藻种为蛋白核小球藻, 引自中国科学院水生生物研究所藻种库, 采用 knop 培养基, 培养温度 $25^\circ\text{C} - 28^\circ\text{C}$, 光强 6000lx, 培养过程不通气, 取对数生长期(培养 8d 后)的培养物, 离心洗涤, 收集藻泥, 冷冻干燥。层析用的 DEAE-Sepharose

(Fast flow)、Sephadex G-100 为 Pharmacia 产品; 丙烯酸酰胺、亚甲基双丙烯酸酰胺为 Sigma 产品; N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、岩藻糖(L-FUC)、十二烷基磺酸钠(SDS)及牛血清白蛋白(BSA)为 Fluka Garantie 产品; 分子量标准蛋白及其他糖类为国产试剂, 兔子购自福建省药品检验所, 由静脉抽血, 绵羊血取自南京军区福州总医院, 人血由本校医院提供。

1.2 蛋白核小球藻凝集素的提取和纯化 取冷冻干燥藻粉 5g, 加磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01mol/L , pH7.2, 内含 $\text{NaCl } 0.14\text{mol/L}$) 4°C 下浸泡过夜后, 其间搅拌数次, 用 300 目的筛绢拧干过滤, 滤液经 5000r/min , 4°C 离心 30min, 弃沉淀, 收集上清液, 加固体硫酸铵达 25% 饱和度, 4°C 放置 12h, 离心收集同前, 再向上清液中加入硫酸铵达 75% 饱和度, 离心同前, 收集沉淀物, 加 PBS 溶解, 透析除盐后, 检测凝血活性, 得到凝集素粗提液, 4°C 保存。

纯化前凝集素粗品经活性炭脱色处理后上 DEAE-Sepharose(Fast flow)层析柱($1.6\text{cm} \times 30\text{cm}$), 用 PBS 液洗脱至 280nm 值小于 0.02 时, 改用 pH7.2, 0.01mol/L (内含 0.5mol/L NaCl) 的 PB 液, 进行线性离子梯度洗脱, 分部收集, 流速 40mL/h , 3mL/管 , 经紫外(280nm)和凝血活性检测, 收集活性峰部分, 再经 Sephadex G-100 层析柱($1.6\text{cm} \times 70\text{cm}$)用 PBS 洗脱、分部收集活性峰部分, 风干浓缩后, 获得纯化样品, 测定

收稿日期: 2002-02-27; 修订日期: 2002-06-06

基金项目: 福建省自然科学基金资助(B0110009)

作者简介: 郑怡(1959—), 男, 福建省福州市人; 硕士, 副教授; 主要从事藻类生物学研究, 余萍在本校高分子研究所工作

蛋白质浓度(采用 CBB-G250 法)。纯化样品用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳^[6] (PAGE) 测定纯度。

1.3 蛋白核小球藻凝集素部分性质的测定 相对分子量测定采用凝胶过滤法(Sephadex G 100); 亚基分子量采用 SDS-PAGE (十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 方法测定^[6]; 糖含量测定采用酚-硫酸法^[7]; 氨基酸组成分析用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。糖和糖蛋白抑制的作用在 V 型血凝板上测定。先将样品作系列倍比稀释后, 往每孔中分别加入 80mmol/L 的糖液或 15g/L 的糖蛋白 25μL, 震荡摇匀后, 每孔加 25μL 兔红细胞悬液, 摇匀后, 放置 1h, 镜检结果。热稳定性实验在 30℃—100℃ 范围内, 每 10℃ 一个温差, 样品在水浴锅内保温 10min 后, 以免红细胞检查活性。

1.4 红细胞凝集实验 收集的各种血样(表 3) 经离心收集红细胞, 加约 10 倍的生理盐水离心洗涤 2 次, 以生理盐水制成 2% 压积红细胞悬液用于凝血活性测定, 测定方法按文献[8] 在 V 型血凝板上进行。以不加样品作为空白对照, 1h 后镜检结果。

2 结果

2.1 蛋白核小球藻凝集素的提取和纯化

藻粉经 PBS 浸提、硫酸铵分级沉淀得到深绿色的凝集素粗提液, 经活性碳处理后, 变成浅绿色, 通过 DEAE-Sephrose 离子交换层析分出 3 个蛋白峰(图 1), 其中 2 峰具凝血活性, 此活性峰部分再经 Sephadex G 100 分子筛层析又分出 2 个蛋白峰(图 2), 2 峰量少, 但具凝血活性, 因此收集 2 峰部分, 经测定在 SDS-PAGE 图谱上显示出一条蛋白色带(图 3), 此部分即为蛋白核小球藻凝集素(CPL) 纯化样品, 用于性质测定。

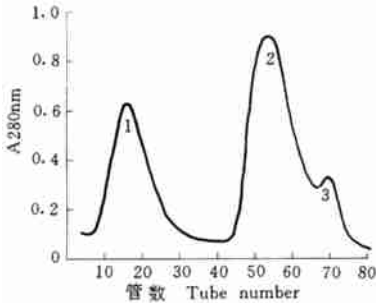


图 1 蛋白核小球藻凝集素在 DEAE Sepharose 柱上的线性离子洗脱

Fig. 1 The plot of linear gradient system for *C. pyrenoidosa* lectin on DEAE Sepharose column

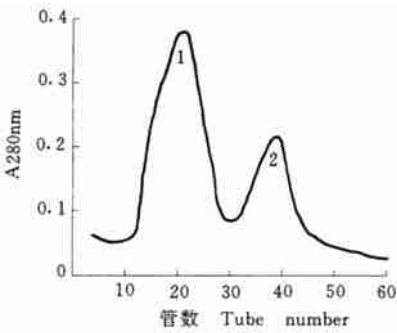


图 2 蛋白核小球藻凝集素在 Sephadex G 100 柱上的层析

Fig. 2 Chromatography of *C. pyrenoidosa* lectin on Sephadex G 100 column

2.2 蛋白核小球藻凝集素的部分性质

2.2.1 分子量和亚基分子量 经 SDS-PAGE 测定, CPL 在图谱上显示一条蛋白色带, 通过与标准蛋白的相对迁移率(R_f) 比较(图 3), 得出 CPL 的亚基分子量为 14000, 而凝胶过滤法测得的表观分子量为 15000, 表明该凝集素分子只有一个亚基。

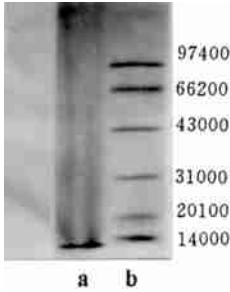


图 3 蛋白核小球藻凝集素的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳
a 纯化的样品; b 标准蛋白

Fig. 3 SDS Polyacrylamide gel electrophoreses of *C. pyrenoidosa* lectin
a. Purified lectin; b. Standard protein

2.2.2 CPL 糖含量 经酚-硫酸法测得 CPL 分子不含中性糖, 因此 GBL 可能是一类蛋白质凝集素。

2.2.3 CPL 氨基酸组成 测定结果(表 1) 表明, CPL 分子中苯丙氨酸(Phe) 含量最高, 其次是天冬氨酸(Asp) 和谷氨酸(Glu), 蛋氨酸(Met) 含量最少, 组氨酸(His) 缺乏。

2.2.4 糖和糖蛋白的抑制作用 在 12 种糖类中, 有 7 种(表 2) 单糖对 CPL 的凝血活性具有抑制作用, 且都是在 CPL 浓度为 13.75μg/mL 时, 表明这些糖类的抑制效果相当。3 种糖蛋白中只有卵黏蛋白具有抑制作用, 其余 2 种无抑制作用。

表 1 蛋白核小球藻凝集素(CPL)的氨基酸组成
Tab.1 Amino acid composition of *C. pyrenoidosa* lectin (μg/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	41.01	Cys	18.80	Phe	44.70
Thr	26.94	Val	29.71	Lys	28.73
Ser	21.64	Met	11.93	His	0.00
Glu	41.06	Ile	21.62	Try	—
Gly	24.10	Leu	27.71	Arg	32.42
Ala	27.40	Tyr	14.00	Pro	22.90

表 2 糖和糖蛋白对蛋白核小球藻凝集素(CPL)凝血活性的抑制作用
Tab.2 Inhibition of agglutination of *C. pyrenoidosa* lectin by sugars and glycoproteins

糖类 Sugars(80mmol/L)	凝集素浓度 Lectin concentration(μg/mL)									
	432	216	108	54	27.5	13.75	6.88	3.44	1.72	0.58
阿拉伯糖 Ara	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
岩藻糖 Fuc	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
半乳糖 Gal	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
甘露糖 Man	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
山梨糖 Sor	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
木糖 Xyl	+	+	+	+	+	—	—	—		
α-甲基葡萄糖苷 α-MeGlc	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
糖蛋白 Glycoproteins(15g/L)										
胃黏蛋白 Mucin	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
卵黏蛋白 Ovalbumin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
甲状腺球蛋白 Thyroglobulin	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
CK	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—

注: + 凝集 Positive agglutination; — 不凝集 Negative agglutination (下同 The same below)

表 3 蛋白核小球藻凝集素(CPL)对不同红细胞的凝集作用
Tab.3 Agglutination of various erythrocytes by *C. pyrenoidosa* lectin

红细胞 Erythrocytes	凝集素浓度 Lectin concentration(μg/mL)									
	432	216	108	54	27.5	13.75	6.88	3.44	1.72	
兔 Rabbit	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
绵羊 Sheep	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
鸡 Chicken	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
鸭 Duck	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
鸽 Pigeon	+	+	+	+	—	—	—	—	—	
人红细胞 Human red cell										
A 型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
O 型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
B 型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

2.2.5 CPL的热稳定性 实验表明 CPL 在40℃—60℃范围内仍具有凝血活性,但随着温度升高, CPL

的活力逐步降低,当处理温度达 100℃时, CPL 的凝血活性才完全丧失。

2.3 CPL 对不同类型红细胞的凝集活性

从表 3 结果可知, CPL 能够凝集兔、绵羊及鸽子红细胞, 产生凝集作用的最低浓度分别为 6.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、13.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 54 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对鸡、鸭、红细胞及人 A、O 或 B 型血红细胞没有凝集作用。

3 讨论

凝集素在植物的生命活动过程中担负着多种重要的生理功能, 如细胞之间、细胞和机体或组织器官间的相互识别、物质代谢及胚胎细胞的分化等。已经知道在豆科植物与根瘤菌的专一识别以及植物对病原体的防御体系中, 植物凝集素发挥了重要作用。在微藻, 特别是单细胞藻类的生命活动中, 细胞之间的相互作用尤其常见, 其中是否有凝集素的参与, 目前还不得而知, 要弄清此问题, 首先要确定微藻细胞表面是否存在凝集素分子受体, 其次是微藻细胞中是否含有凝集素。Hori 等首次应用高等植物和大型海藻凝集素, 通过细胞的凝集作用证实了某些海洋微藻细胞表面存在凝集素分子受体, 并从它们的 PBS 粗提液中检测到了凝血活性。据此 Hori 等人认为海洋微藻凝集素的生理功能可能与微藻附着于大型海藻表面、与海洋无脊椎动物或其他藻类共生以及对细菌、病毒吞噬作用的细胞识别过程有关。本文从蛋白核小球藻中分离纯化到了一种凝集素(CPL), 证实了淡水微藻细胞中含有凝集素。这些研究结果对深入探讨微藻凝集素的生理功能具有重要意义。

不同来源的凝集素, 它们的性质可能存在较大的差异^[10]。大型海藻凝集素性质的研究结果表明^[11], 它们中大多数与陆生植物凝集素不同, 通常分子量较低(15000—29000), 且多为单个亚基, 凝血活性不被单糖所抑制, 只有少数分子量较大, 可与单糖或其衍生物结合^[4]。本文结果表明, CPL 也是一种低分子量(14000 左右)、单个亚基的凝集素, 这些性质与大多数海藻凝集素相似, 但 CPL 的凝血活性被多种单糖抑制。CPL 能与卵黏蛋白专一结合, 表明其上有被 CPL 识别的糖链, 在采用亲和柱纯化时, 可与 Sepharose 偶联。

多数植物凝集素的热稳定性在 60℃—80℃ 左右^[12], 而 CPL 的热稳定性更高, 可达 90℃, 这种高耐热性在大型海藻凝集素中也有报道^[13, 14]。凝集素的热稳定性通常认为与分子中半胱氨酸的含量有关, 它可形成分子内的二硫键, 构成稳定的结构。

大多数凝集素是一种糖蛋白, 含有共价结合的糖

分子, 只有少数凝集素如伴刀凝集素(ConA)、花生凝集素(PNA)等是单纯的蛋白质^[10]。在本实验, CPL 分子中没有测到糖, 因此它可能也是一种蛋白质凝集素。

参考文献:

- [1] Liener I E. Phytohemagglutinins (Phygolectins) [J]. *Ann Rev Physiol*, 1997, **27**: 291—319
- [2] Zhang D Y, Zhu Z P. Plant Molecular Biology and Biotechnology [M]. Beijing: Science Press, 1991, 145—158. [张德颐, 朱治平, 植物分子生物学与生物工程. 北京: 科学出版社, 1991, 145—158]
- [3] Rogers D J, Hori K. Marine algal lectin: new developments [J]. *Hydrobiologia*. 1993, **260/261**: 589—593
- [4] Alvarez Hernandez S, Lara Isassi G, Arreyuir 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
- [5] Hori K, Ogata T, Kamiga H, et al. Lectin-like compounds and lectin receptors in marine microalgae: hemagglutination and reactivity with purified lectins [J]. *J. Phycol.* 1996, **32**: 819—825
- [6] Zhao Y F. Principle and Application of Biochemical Technique [M]. Hubei: Wuhan Univ. Press, 1994, 287—295. [赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 湖北: 武汉大学出版社, 1994, 287—295]
- [7] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substance [J]. *Anal Chem*, 1957, **28**: 350—356
- [8] Zeng Z K, Wu Q Q, Bao J K. Purification and characterization of cotton lectin [J]. *Acta Bot Sin*, 1995, **37**(3): 204—211. [曾仲奎, 吴洽庆, 鲍锦库. 棉花凝集素的纯化及性质研究, 植物学报, 1995, **37**(3): 204—211]
- [9] Zeng Z K, Wu Q Q. The physiological role of plant lectin in plant [J]. *Natural product. research and development*. 1993, **5**(3): 69—76. [曾仲奎, 吴洽庆. 植物凝集素在植物体内的生理作用. 天然产物研究与开发, 1993, **5**(3): 69—76]
- [10] Suen C, Zhu Z, Mo HQ. Lectin [M]. Beijing: Science Press, 1986, 65—66. [孙册, 朱政, 莫汉庆. 凝集素. 北京: 科学出版社, 1986, 65—66]
- [11] Hori K, Miyazawa K, Ito K. Some common properties of lectins from marine algae [J]. *Hydrobiologia*. 1990, **203/205**: 561—566
- [12] Hou X W, Wu B L, Zeng Z K. Purification and characterization of a lectin from *Alocasia euallata* [J]. 1998, **19**(2): 106—111. [侯学文, 吴伯良, 曾仲奎, 等. 尖尾芋凝集素的纯化及性质研究 [J]. 华南农业大学学报, 1998, **19**(2): 106—111]
- [13] Kakita H, Gukuoka S, Obika G, et al. Purification and properties of a high molecular weight hemagglutinin from the red alga, *Gracilaria verucosa* [J]. *Bot mar*. 1997, **40**: 241—247
- [14] Zheng Y, Yu P, Liu Y R. Partial properties and cell agglutination of *Gracilaria bursapastoris* lectin [J]. 2002, **8**(1): 66—70. [郑怡, 余萍, 刘燕如. 脆江藻凝集素的部分性质及细胞凝集作用. 应用与环境生物学报, 2002, **8**(1): 66—70]

PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF *CHLORELLA PYRENOIDOSA* LECTIN

ZHENG Yi, YU Ping and LIU Yarru

(Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007)

Abstract: The freeze-drying powder of a fresh microalga, *Chlorella pyrenoidosa*, was extracted overnight by PBS at 4 °C and a two-step precipitate with solid ammonium sulfate (25% and 75%) was performed for the supernatant after centrifugation. The crude protein obtained was purified by DEAE-Sephadex ion exchange, followed by Sephadex G-100 filtration. The activity of the lectin was tested with fresh rabbit erythrocyte in each step of above procedure and protein concentration was determined using Coomassie Brilliant G250. This purified lectin (CPL) does not contain neutral saccharide but is a monomeric protein with a relative molecular weight of 14,000—15,000, estimated by SDS-PAGE and Sephadex G-100 filtration. In its amino acid composition, Phe has the highest content, followed by Asp and Glu, but there is a lack of His. Assays for sugar or glycoprotein inhibition and erythrocyte agglutination were done in microtiter plates. The result indicated that CPL could agglutinate erythrocytes from rabbit, sheep and pigeon but not from duck, chicken and human A, B or O blood cell groups and the highest activity was found in the agglutination with rabbit erythrocytes at 6.88 µg/mL. The agglutinin activity of CPL was inhibited by seven types of monosaccharides when its concentration was at 13.75 µg/mL and by ovalbumin at a range of 6.88—432 µg/mL. CPL was tolerant of high temperature and its activity could be maintained even when the lectin solution was heated to 90 °C for 10 min.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; Lectin; Purification; Characterization