一种膜荚黄芪凝集素的分离纯化研究

朱利芬[1], 闫巧娟[2], 江正强[1*], Kumar Narasimha[1], 黄林华[2]
(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘 要: 目的 从膜荚黄芪根中分离纯化一种凝集素。方法 通过硫酸铵分级沉淀和 ConA-Sepharose 4B 亲和色谱从膜荚黄芪根浸提液中分离纯化一种凝集素。结果 经过上述两步纯化得到电泳纯的凝集素, SDS-PAGE 和 Superdex 75 凝胶过滤色谱测定该凝集素的相对分子质量分别为 3.15× 10^4 和 3.35× 10^4, 糖蛋白染色显示其为糖蛋白, 总糖的量为 10.7%。结论 从膜荚黄芪根中分离纯化得到一种凝集素, 该蛋白为单亚基糖蛋白, 具有对兔血红细胞的凝集活性, 凝集活性的比活力为 391.9 U/mg。

关键词: 膜荚黄芪; 凝集素; 纯化; 亲和色谱
中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)05-0714-04

Isolation and purification of a lectin from roots of *Astragalus membranaceus*

ZHU Li-fen[1], YAN Qiao-juan[2], JIANG Zheng-qiang[1], KUMAR Narasimha[1], HUANG Lin-hua[2]
(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective To isolate and purify a lectin from the roots of *Astragalus membranaceus*. **Methods** The protein was purified using a combination of 20%—60% ammonium sulfate fraction and ConA-Sepharose 4B affinity chromatography. **Results** The purified protein appeared as a single band with molecular mass of 3.15 × 10^4 on SDS-PAGE and the relative molecular mass was estimated by gel filtration on a calibrated Superdex 75 column with apparent molecular weight of 3.35× 10^4. This lectin was a glycoprotein with a neutral carbohydrate content of 10.7%. **Conclusion** A lectin is isolated and purified from the roots of *A. membranaceus* for the first time. It is a monomer glycoprotein and its specific activity is 391.9 U/mg.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge; lectin; purification; affinity chromatography

凝集素是一类非免疫源的能凝集细胞或沉淀含糖大分子的蛋白质[1]。其存在比较广泛, 且具有促使细胞(如恶性肿瘤细胞等)凝集、细胞有丝分裂、防御昆虫危害、消除入侵的微生物等外源性作用和机体内的生理功能, 已经引起越来越多的专家学者的重视[2]。目前已分离出多种凝集素[3], 常用的分离方法有离子交换色谱、分子筛色谱、亲和色谱等。其中亲和色谱由于具有纯化工艺简单、纯化时间短、蛋白活性损失小等优点而被广泛应用于凝集素的分离纯化, 而将纯化的凝集素作为配基偶联到色谱介质上制备的亲和色谱是近年来才应用于凝集素分离纯化中的[4,5]。黄芪系豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根, 具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功效[6], 还具有增强免疫功能、增强机体耐缺氧及应激能力、促进机体代谢、改善心功能、调节血糖、抗菌及抑制病毒作用等[7], 其功能性成分的研究主要集中于多糖、皂苷及黄酮等方面, 而蛋白成分的作用和功能研究很少。Yan 等[8] 从蒙古黄芪根分离纯化出一种具有抗真菌活性的凝集素和一个具有核糖核酸酶活性的病程相关蛋白(AmPR-10), 但有关其同属的膜荚黄芪根中蛋白质的研究尚未见报道。本研究利用 ConA-Sepharode 4B 亲和色谱从膜荚黄芪根中分离纯化一种凝集素, 为进一步研究膜荚黄芪凝集素的性质和功能奠定基础。

①收稿日期: 2009-08-19
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20502032); 教育部"新世纪优秀人才支持计划"(NCET-08-0534)
作者简介: 朱利芬(1982—), 女, 山西省左云县人, 硕士研究生, 主要对中草药中的生物活性蛋白进行研究。
Tel: 13426443585 E-mail: lya_zlf.student@sina.com
* 通讯作者 江正强 Tel: (010)62737689 E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

1 材料与仪器

ConA-Sepharose 4B 为瑞典 Pharmacia 公司产品,膜荚黄芪根购于北京时珍中草药技术有限公司,并由本院周成明博士鉴定为 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根。高速万能粉碎机购于天津泰斯特仪器有限公司,万分之一电子天平购于德国 Sartorius 公司。

2 方法与结果

2.1 SDS-PAGE 和蛋白质的测定:SDS-PAGE 按照 Laemmli 的方法进行,分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 4.5%,考马斯亮蓝 R250 染色;蛋白质的测定采用 Lowry 法,以牛血清白蛋白为标准。

2.2 血凝活性的测定:取新鲜兔血,3 000 r/min 下离心 1 min,去上清,将红细胞用生理盐水洗涤 3 次,再用生理盐水配制成 2% 的浓度,加入胰蛋白酶至质量浓度为 1 mg/mL,4 ℃下处理 15 min 后 3 000 r/min 离心 1 min,用生理盐水洗涤 3 次,最后用生理盐水将兔红细胞配制成 2% 的浓度 4 ℃下贮存,备用。在 96 孔 U 型血凝板上用生理盐水 50 μL 对凝集素 50 μL 进行倍比稀释,以生理盐水作空白对照,加入相应的 50 μL 红细胞,在 4 000 r/min 下震荡 5 min,室温静置 2 h 后观察结果。一个单位的凝集活性定义为能使 2% 的兔红细胞产生完全凝集现象所需凝集素样品的最高稀释倍数的倒数[8]。

2.3 膜荚黄芪凝集素的分离纯化步骤

2.3.1 膜荚黄芪粗提液:10 g 膜荚黄芪根经粉碎后加入 60 mL pH 7.2 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(膜荚黄芪根与提取缓冲液的质量体积比为 1∶6),于 4 ℃下搅拌浸提 4 h,用 4 层纱布滤过,滤液在 11 000 r/min 下离心 20 min,上清液即为膜荚黄芪粗提液。

2.3.2 硫酸铵分级沉淀:粗提液进行 20%~60% 饱和度的硫酸铵沉淀,11 000 r/min 下冷冻离心 10 min,沉淀用 10 mL pH 7.4 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解,并用相同缓冲液在 4 ℃下透析过夜后进行 ConA-Sepharose 4B 亲和色谱分离。

2.3.3 ConA-Sepharose 4B 亲和色谱分离:将透析的样品于 11 000 r/min 下冷冻离心 10 min,取上清液,加入 NaCl 使其终浓度达到 1 mol/L,同时加入 $MnCl_2$、$MgCl_2$、$CaCl_2$ 使其终浓度均为 1 mmol/L。过预先用 pH 7.4 20 mmol/L Tris-HCl(含 1 mol/L NaCl、1 mmol/L $MnCl_2$、$MgCl_2$、$CaCl_2$)缓冲液平衡好的 ConA-Sephaose 4B(3 cm × 1 cm)亲和柱,以 0.1 mL/min 的体积流量上样,上样后关闭柱出口,静置 30 min,之后用平衡缓冲液以 0.5 mL/min 的体积流量洗涤未结合部分蛋白,然后用 pH 7.4 20 mmol/L Tris-HCl(含 1 mol/L 葡萄糖)以 0.5 mL/min 的体积流量洗脱目标蛋白,收集洗脱峰,用 20 mmol/L pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液透析即为目标蛋白。

10 g 膜荚黄芪根粉碎后,用 50 mmol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液浸提,浸提液采用硫酸铵分级沉淀,测定凝集活性及蛋白,结果表明 20%~60% 饱和度的硫酸铵沉淀为最佳条件,此时凝集活性的回收率为 86.5%,纯化倍数为 1.7 倍(表 1)。

回收率= 纯化过程中每一步所得到的蛋白的总活力/粗提液总活力

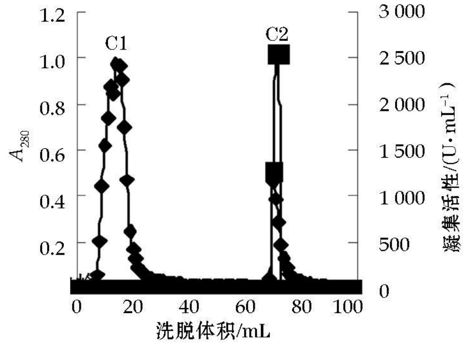
纯化倍数= 纯化过程中每一步所得到的蛋白的比活/粗提液比活

表 1 膜荚黄芪凝集素纯化

Table 1 Purification of a lectin from roots of *A. membranaceus*

纯化步骤	总蛋白/mg	总活力/U	比活/($U\cdot mg^{-1}$)	纯化倍数	回收率/%
粗提液	148.4	5 920	39.9	1.0	100
20%~60% 硫酸铵沉淀	73.8	5 120	69.4	1.7	86.5
ConA-Sepharose 4B	7.8	3 072	391.9	9.8	51.9

将硫酸铵沉淀的活性组分用 10 mL pH 7.4 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解、透析后上 ConA-Sephaose 4B 亲和色谱柱。检测 A_{280} 绘出色谱分离曲线,见图 1。C1 为未吸附蛋白峰,C2 为葡萄糖溶液洗脱峰,活性测定结果表明 C1 峰样品没有凝集活性,凝集活性主要集中在 C2 峰处,经 SDS-PAGE 检测活性峰样品达到电泳纯(图 2)。



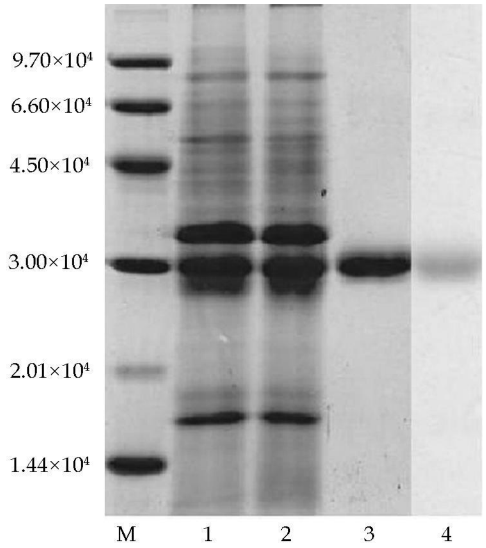
C1-未吸附蛋白峰 C2-1 mol/L 葡萄糖洗脱蛋白峰

C1-unobserved fraction C2-1 mol/L glucose elution fraction

图 1 凝集素的 ConA-Sepharose 4B 色谱图

Fig 1 Chromatogram of lectin on ConA-Sepharose 4B

膜荚黄芪凝集素整个纯化过程的电泳图见图 2,经过硫酸铵沉淀、ConA-Sephaose 4B 亲和色谱后得到电泳单一带凝集素。纯化中活性变化见表 1,



Lane M-标准蛋白　1-膜荚黄芪粗提液　2-20%～60%硫酸铵分级沉淀　3-ConA-Sepharose 4B 亲和色谱产品　4-膜荚黄芪凝集素糖蛋白染色

Lane M-Marker protein　1-crude extraction of *A. membranaceus*　2-20%—60% ammonium sulfate precipitation　3-ConA-Sepharose 4B affinity chromatography　4-glycoprotein staining of lectin *A. membranaceus*

图 2　膜荚黄芪凝集素纯化过程 SDS-PAGE 电泳图

Fig 2　SDS-PAGE Electrophoresis of purification of a lectin from *A. membranaceus*

凝集活性回收率为 51.9%，纯化倍数为 9.8 倍，凝集素的比活性由浸提液的 39.9 U/mg 上升到 391.9 U/mg。

2.4　糖蛋白染色和糖的量：糖蛋白染色参照 Zacharius等[10]的方法采用高碘酸-Schiff 显色。糖的测定参照 Dubois 等[11]的方法，采用苯酚-硫酸法，以葡萄糖做标准曲线，根据标准曲线计算凝集素中总糖的量。结果表明该凝集素为一种糖蛋白（图 2）。苯酚-硫酸法测定其蛋白中总糖的量为 10.7%。

2.5　凝集素相对分子质量的测定：膜荚黄芪凝集素相对分子质量的测定采用 SDS-PAGE 和 Superdex 75 凝胶过滤色谱法。SDS-PAGE 中分离胶浓度为 12.5%，浓缩胶浓度为 4.5%。低相对分子质量标准蛋白为：磷酸化酶（9.70×10^4）、牛血清蛋白（6.60×10^4）、鸡卵清蛋白（4.50×10^4）、碳酸酐酶（3.00×10^4）、大豆胰蛋白酶抑制剂（2.00×10^4）、牛乳清蛋白（1.44×10^4）。以标准蛋白相对分子质量的常用对数为纵坐标，迁移率为横坐标作图，得出线性方程后根据目标蛋白的迁移率计算出其相对分子质量。

凝集素活性状态下的相对分子质量的测定采用 Superdex-75 凝胶过滤法（40 cm × 1.0 cm）测定。凝胶柱先用 pH 7.2 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液（含 0.1 mol/L NaCl）平衡，然后分别将 2 mg/mL 标准蛋白和膜荚黄芪凝集素以 0.35 mL/min 的流速过凝胶柱，以洗脱体积为横坐标，标准蛋白相对分子质量的常用对数为纵坐标作图，得出线性方程后根据待测样品的洗脱体积计算其相对分子质量。标准蛋白分别为牛血清白蛋白（6.80×10^4）、卵清蛋白（4.50×10^4）、胰凝乳蛋白酶原 A（2.57×10^4）和细胞色素 C（1.23×10^4）。

SDS-PAGE 法测定膜荚黄芪凝集素的相对分子质量时，以标准蛋白相对分子质量的常用对数为纵坐标，迁移率为横坐标作图，得出线性方程 $Y=-0.9519X+2.0164$（Y：lg$M$r；X：相对迁移率），通过计算表明该凝集素的相对分子质量为 3.15×10^4。Superdex 75 凝胶过滤色谱法测定膜荚黄芪凝集素相对分子质量时，以洗脱体积为横坐标，标准蛋白相对分子质量的常用对数为纵坐标作图，得出线性方程 $Y=-0.1781X+8.8891$（Y：lg$M$r；X：洗脱体积），计算其相对分子质量为 3.35×10^4。因此，该凝集素为单亚基蛋白。

3　讨论

ConA-Sepharose 4B 亲和色谱常用于分离纯化糖蛋白，其中一些含糖基的凝集素也是利用该亲和介质分离纯化的，如 Absar 等[4]和 Absar 等[5]分别从桑葚种子和凹鼻鲀鱼中用 ConA-Sepharose 4B 分离纯化出甘露糖特异结合的凝集素，本研究也采用了这种以凝集素作为配体进行特异性吸附的亲和色谱法进行纯化，经过一步亲和色谱从膜荚黄芪根中获得了一种活性蛋白-凝集素。经过纯化该凝集素的凝集活性回收率达到 51.9%，纯化倍数为 9.8 倍，凝集素的比活性由浸提液的 39.9 U/mg 上升到 391.9 U/mg。与本研究采用的一步亲和色谱法相比，Yan 等[8]研究的蒙古黄芪凝集素经过一步硫酸铵沉淀和三步离子交换色谱分离纯化，其回收率只有 16%。可见本实验采用的一步亲和色谱是一种高效的纯化方法。

将 SDS-PAGE 和 Superdex 75 测定的膜荚黄芪凝集素的相对分子质量的结果进行比较（SDS-PAGE 法测定其相对分子质量为 3.15×10^4，Superdex 75 凝胶过滤色谱法测定其为 3.35×10^4），结果表明该凝集素为一个单亚基蛋白，与大多报道的凝集素多为多亚基或双亚基蛋白的凝集素如板栗树种子[12]及蒙古黄芪凝集素[8]存在差异。在凝集素类中，有些凝集素是不含糖基的，如伴刀豆凝集素（ConA），而有些是含糖的，如蒙古黄芪凝集素[8]的

总糖量分别为19.6%,本研究中纯化的凝集素也是一种糖蛋白,总糖的量在10.7%,与其他凝集素存在一定的相似性。该凝集素的生物学活性(如抗菌及抗肿瘤活性等)仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 孙 册,朱 政,莫汉庆. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986.

[2] 朱 月. 凝集素的作用与应用[J]. 水产科学, 2005, 24(12): 48-49.

[3] Rameshwaram N R, Nadimpalli S K. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab* [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 861: 209-217.

[4] Absar N, Yeasmin T, Raza M S, *et al*. Single step purification, characterization and N-terminal sequences of a mannose specific lectin from mulberry seeds [J]. *Protein J*, 2005, 24(6): 369-377.

[5] Absar N, Hasan S, Arisaka F. Purification, characterization and N-terminal sequences alignment of a mannose specific protein purified from Potca fish, *Tetraodon patoca* [J]. *Protein J*, 2008, 27: 97-104.

[6] 白焱晶,王智颖,杜新刚. 黄芪药材的HPLC-UV指纹图谱研究[J]. 中草药, 2008, 39(7): 9801-2901.

[7] 刘玉莲,杨丛忠. 黄芪药理作用概述[J]. 中国药业, 2004, 13: 79.

[8] Yan Q J, Jiang Z J, Yang S Q, *et al*. A novel homodemeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity [J]. *Arch Biochem Biophy*, 2005, 442: 72-81.

[9] Yan Q J, Qi X W, Jiang Z Q, *et al*. Characterization of a pathogenesis-related class 10 protein (PR-10) from *Astragalus mongholicus* with ribonuclease activity [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46: 93-99.

[10] Zacharius R M, Zell T E, Morrison J H, *et al*. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1969, 30: 148-152.

[11] Dubios M, Gillis K A, Hamiltom J K, *et al*. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28: 350-356.

[12] Ng T B, Yu Y L, Chu K T. Isolation a novel legumin-like lectin weth potent hemagglutinating activity from seeds of the Chinese chestnut *Castanea mollisima* [J]. *Comp Biochem Physiol Part C*, 2002, 133: 453-460.

亚临界水提取槐角中总异黄酮的研究

丛艳波,张永忠*,刘 潇

(东北农业大学理学院 应用化学系,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:目的 考察了亚临界水提取槐角总异黄酮的最佳实验条件。方法 通过单因素和正交试验,以染料木苷为对照、总异黄酮的得率为指标,优选出槐角异黄酮的提取工艺参数。结果 当提取时间为45 min、提取温度为130 ℃、液固比为12.5 mL/g时槐角总异黄酮的得率为23.3%。结论 与传统的提取方法相比,亚临界水提取技术是新发展起来的一种新型提取技术,具有提取时间短、效率高、环境友好等优点。

关键词:槐角;总异黄酮;亚临界水提取

中图分类号:R284.2;R286.02 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)05-0717-04

Study on total isoflavones from *Fructus Sophorae* by subcritical water extraction

CONG Yan-bo, ZHANG Yong-zhong, LIU Xiao

(College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Objective To optimize the extracting condition of total isoflavones from *Fructus Sophorae* by subcritical water extraction. **Methods** Taking isoflavones yield as index and genistin as control, the technology parameter of subcritical water extraction of *Fructus Sophorae* isoflavones was optimized by single factor and orthogonal experiment. **Results** The yield of *Fructus Sophorae* total isoflavones in the extracts was 23.3% at 130 ℃ for 45 min with the liquid-solid ratio of 12.5 mL/g. **Conclusion** Compared with traditional extracting methods, subcritical water extraction is a new developing technology in recent years. Its advantage is fast, good-selective.

Key words: *Fructus Sophorae*; total isoflavones; subcritical water extraction

①收稿日期:2009-09-14

基金项目:国家863课题(2008AA10Z331)

作者简介:丛艳波(1985—),女,黑龙江绥化兰西人,在读硕士研究生,2004—2008年考入东北农业大学食品分析与检验专业,2008年保送到东北农业大学研究生学院攻读应用化学硕士,主要研究天然活性物质的分离纯化及其应用。
Tel: 13624612968 E-mail: cyb_happy_love@126.com

* 通讯作者 张永忠 E-mail: zyz1953@sohu.com