

西藏黑木耳中1种新的凝集素的分离纯化及鉴定

刘振东¹, 黄悦², 李鹏飞², 李梁¹, 薛蓓^{1*}, 张彦龙^{2*}

1. 西藏农牧学院食品科学学院, 西藏 林芝 860000

2. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080

摘要: 目的 研究西藏黑木耳 *Auricularia auricula* 中1种新的凝集素。方法 采用凝胶柱色谱和离子交换色谱进行分离纯化, 运用基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF/TOF) 测定相对分子质量, 通过 N-末端序列检测与 UniProt 数据库比对得到氨基酸序列。结果 从西藏黑木耳分离得到1种相对分子质量为 18 913.22 的凝集素, 其 N-末端序列为 ITAPTTTSSAATE。含有4条肽段, 其氨基酸序列分别为 QIDAERK、TNHSVVTWNDK、RLNFTAGNPFPR、VRELEQQVDSMTK。结论 在已有的黑木耳蛋白质谱库中未发现该序列的存在, 推断其为黑木耳中的新型蛋白质, 并确定是1种新的凝集素。

关键词: 藏药; 黑木耳; 凝集素; 蛋白质; 基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)20-4785-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.012

Extraction, isolation, and identification of a new lectin from Tibetan medicine *Auricularia auricula*

LIU Zhen-dong¹, HUANG Yue², LI Peng-fei², LI Liang¹, XUE Bei¹, ZHANG Yan-long²

1. College of Food Science, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China

2. College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China

Abstract: **Objective** To extract and isolate the lectin from Tibetan medicine *Auricularia auricula*. **Methods** The lectin from Tibet *A. auricula* was separated by sephadex column chromatography and ion exchange chromatography, and then its relative molecular weight was determined by using matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (5 800 MALDI-TOF/TOF). N-terminal sequential detection results suggested the amino acid sequences by comparing with the UniProt database. **Results** A kind of lectin was obtained from the separation of Tibet *A. auricula* with the molecular weight of 18 913.22, in which the N-terminal amino acid sequence was detected as ITAPTTTSSAATE by the full automatic protein polypeptide sequencing instrument. The amino acid sequences of four peptide fragments were QIDAERK, TNHSVVTWNDK, RLNFTAGNPFPR, and VRELEQQVDSMTK. **Conclusion** These sequences are not found in the existing protein database of *A. auricula*, indicating that the isolated lectin should be a new type protein and it is confirmed as a new kind of lectin.

Key words: Tibetan medicine; *Auricularia auricula* (Hook) Underw; lectin; protein; MALDI-TOF/TOF

凝集素是一种非免疫来源的糖结合蛋白, 它可以与糖特异性地、非共价地可逆性结合, 其具有凝集细胞、沉淀聚糖或糖类复合物的作用^[1]。凝集素在自然界中分布非常广泛, 大到动物、植物, 小到真菌、细菌及病毒中均含有凝集素^[2]。1888年 Stillmark^[3]发现蓖麻子中蛋白质提取物具有凝集红细

胞的功能, 并首次对凝集素进行了描述。而针对凝集素的活性研究早期多集中于凝集活性及促进有丝分裂作用方面, 随着近年来对凝集素研究的深入, 发现凝集素还有众多的生物活性, 在抗肿瘤^[4]、抗病毒^[5]、抑菌及免疫调节^[6-10]等方面均有作用。除此之外凝集素还能够作为预警分子参与某些疾病的过程^[11-12]。

收稿日期: 2017-11-15

基金项目: 西藏自治区 2016 厅校联合基金项目 (2016ZR-NQ-01); 西藏自治区 2016 厅校联合基金 (2016ZR-NZ-03)

作者简介: 刘振东, 男, 讲师, 从事天然产物研究与开发。Tel: (0894)5826471 E-mail: liu304418091@126.com

*通信作者 张彦龙, 男, 教授, 从事天然产物研究与开发。Tel: (0451) 86608001 E-mail: Ylzhanghd@163.com

薛蓓, 女, 副教授, 从事天然产物研究与开发。Tel: (0894)5826471 E-mail: 13658940092@163.com

黑木耳 *Auricularia auricular* (Hook) Underw 入药最早记载于《神农本草经》，医学认为，黑木耳具有补气益肺、活血补血的功效，可用于治疗气虚血亏、肺虚咳嗽、高血压及血管硬化等疾病。黑木耳还能增强人体免疫力，预防多种癌症。近年来随着人们对黑木耳药理作用的逐渐认识和不断深入的研究，发现黑木耳中含有众多有效成分^[13-14]。但关于凝集素方面的研究较少，本实验以西藏林芝产黑木耳为材料，分离得到一种相对分子质量为 18 913.22 的凝集素，N-末端序列为 ITAPTTTSSAATE。含有以下 4 条肽段，其氨基酸序列分别为 QIDAERK、TNHSVVTWNDK、RLNFTAGNPFPR、VRELEQQVDSMTK，推断此为黑木耳中的新型蛋白质。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MQX200 μ Quant 微孔板分光光度计（美国 Bio-Tek instruments inc 公司）；Mini Protean 3 电泳装置（德国 Bio-Rad 公司）；Multifuge X1R 冷冻离心机（美国 Thermo Scientific 公司）；MWCO 10000 超滤离心管（美国 Amicon 公司）；SYG-12010 恒温水浴锅（美国 Crystal Technology 公司）。

1.2 材料

新鲜西藏 7 号黑木耳（X7）^[15]采自西藏米林县帮仲菌类合作社，经西藏农牧学院薛蓓副教授鉴定为木耳属黑木耳种，于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封保存备用。无菌脱纤维羊血（鸿泉生物科技有限公司）；磷酸盐缓冲液（PBS，美国 HyClone 公司）；考马斯亮蓝、1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷（Tris），美国 Amresco 公司；40%、30% 丙烯酰胺-亚甲基双丙烯酰胺溶液（Acr-Bis，武汉盖云天生物技术有限公司）；四甲基乙二胺（美国 Sigma 公司）；10% 十二烷基硫酸钠（SDS）、过硫酸铵（APS），天津市光复精细化工研究所。

2 方法

2.1 黑木耳凝集素的提取

称取新鲜黑木耳 60 g，加入 1.2 L 0.01 mol/L pH 值 7.3~7.5 的 PBS 缓冲溶液，充分捣碎至匀浆，放置在 $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下过夜后再次捣碎。将匀浆 4 000 r/min 冷冻离心 30 min，收集上清液。上清液分为 6 份，分别以 20%~70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行分级沉淀， $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏过夜后以 4 000 r/min 冷冻离心 30 min，得到不同浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 组分的沉淀物。将其分别用 PBS 溶解，在流动蒸馏水下透析过夜后，再用静态蒸馏水 $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 透析 2 d，经冻干得到西藏黑木耳凝集

素不同浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀组分。用 PBS 溶液将各组分冻干样品配制成 1 mg/mL 的溶液，分别进行血凝集反应及蛋白质浓度测定。分别从这 2 个方面对这些组分加以评价，选择血凝集活性好、蛋白浓度高的硫酸铵沉淀组分进一步柱色谱加以纯化。

2.2 凝血活性测定

将凝集素冻干样品用 PBS 配制成 1 mg/mL 的溶液，取 30 μL 在 U 型 96 孔板中进行倍比稀释，每孔滴加 30 μL 2% 红细胞悬浮液，静置 1 h 后观察血凝集反应结果。

2.3 蛋白质浓度的测定

在 96 孔板中，每孔加入 50 μL PBS 溶液，第 1 个孔加入 50 μL 的西藏黑木耳凝集素溶液进行 2 倍稀释，最后 1 个孔作为空白对照。每个凝集素样品设 3 个重复。每孔中加入 50 μL 考马斯亮蓝试剂，在 μ Quant 微孔板扫描分光光度计 595 和 800 nm 下测定吸光度 (A) 后，计算西藏黑木耳凝集素的蛋白质浓度。

2.4 黑木耳凝集素的纯化

2.4.1 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换色谱 选取凝集活性及蛋白浓度高的 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀组分用 20 mmol/L pH 7.6 PBS 溶解，进行 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换色谱，分别用 20 mmol/L PBS、0.3 mol/L NaCl+20 mmol/L PBS、0.6 mol/L NaCl+20 mmol/L PBS、0.9 mol/L NaCl+20 mmol/L PBS 及 1.5 mol/L NaCl+20 mmol/L PBS 洗脱。经过 1 000 r/min 冷冻离心 20 min 分别收集各组分洗脱液，进行超滤浓缩除盐，经冷冻干燥得到不同浓度 NaCl PBS 洗脱组分。将其用 PBS 溶解，配制成 1 mg/mL 的溶液，进行血凝集素反应及蛋白质浓度测定。

2.4.2 Toyopearl HW-55 凝胶柱色谱 选取在 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换色谱中凝集活性及蛋白质浓度高的组分用去离子水溶解，过 Toyopearl HW-55 凝胶树脂柱，去离子水洗脱，洗脱体积流量为 9 mL/h，BUCHI 馏分收集器先收集 10 mL 色谱液于试管中，每个色谱管再收集 1.5 mL 色谱液。在每个色谱管中吸取 200 μL ，按色谱管的顺序滴加在 96 孔板上，在 μ Quant 微孔板扫描分光光度计 206、280、800 nm 处测定 A 值，绘制洗脱峰曲线。根据洗脱峰选取色谱管中的色谱液，进行血凝集反应和蛋白质浓度测定，并将具有凝集反应、蛋白浓度高的洗脱峰区间的色谱液合并收集，进行透析冻干得到纯化后的凝集素提取物。

2.5 黑木耳凝集素纯度的鉴定

运用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对提取出的凝集素进行纯度鉴定。称取凝集素各 0.5 mg, 用 100 μL PBS 充分溶解备用。配制 4% 的浓缩胶 (上层胶)

和 10% 的分离胶 (下层胶), 制备方法见表 1。凝集素纯度鉴定具体方法参照分子克隆实验指南, 以考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min 后, 以 10% 醋酸脱色至背景干净。

表 1 SDS-聚丙烯酰胺电泳凝胶制备方法

Table 1 Preparation methods for SDS-PAGE

凝胶	40%、30% Acr-Bis/mL	Tris ($1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)/mL	双蒸水/mL	10% SDS/ μL	TMED/ μL	10% APS/ μL	总体积/mL
4% 浓缩胶	0.5	1.26	3.16	50	5	25	5
10% 分离胶	5.0	5.70	4.00	150	6	150	15

2.6 凝集素结构的鉴定

凝集素相对分子质量测定、蛋白质鉴定及 N-末端序列分析等结构鉴定委托中国科学院上海生命科学院生化所蛋白质组研究分析中心进行检测。

2.6.1 相对分子质量的测定 利用基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱 (5800 MALDI-TOF/TOF) 可精确测定西藏黑木耳凝集素相对分子质量。运用 4000 Series Explorer V3.5 软件进行数据和图谱处理。

2.6.2 蛋白质鉴定 通过 MALDI-TOF/TOF 5800 型质谱仪 (Applied Biosystem) 测定凝集素一级质谱。激光波长为 337 nm, 加速电压为 20 kV, 脉冲宽度 3 ns, 离子延迟提取 2 ns, 采用正离子模式自动获取数据。

2.6.3 N-末端氨基酸序列分析 凝集素先进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 通过电转移槽将凝胶中的蛋白转印到 PVDF 膜上, 染色剪切所需条带, 经 PPSQ-30 Analysis 软件设置, 在 PPSQ-33A 全自动蛋白质多肽测序仪 (Shimadzu) 上进行 N-末端测序。利用 PPSQ-30 DataProcessin 软件导出数据及图谱。

3 结果与分析

3.1 提取分离结果

西藏黑木耳通过浸提和不同浓度硫酸铵分级沉淀, 经透析冻干后得到 20%~70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀组分的质量见图 1, 血凝集反应结果见图 2, 蛋白质测定结果见图 3。由实验结果可知, 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的沉淀组分冻干后得率较高, 凝集活性较好, 蛋白质浓度也高于其他几个组分, 由于凝集素是一种蛋白质或糖蛋白, 因此可选用凝集活性和蛋白质浓度来评价凝集素的纯度, 判定最优组分。

3.2 纯化结果

3.2.1 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换色谱结果 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀组分经过 DEAE-Sepharose

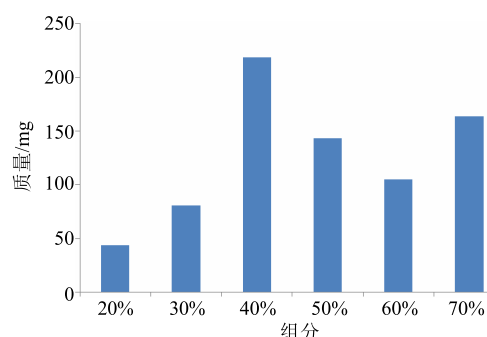


图 1 不同浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀组分的质量

Fig. 1 Weight of precipitation composition with different concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

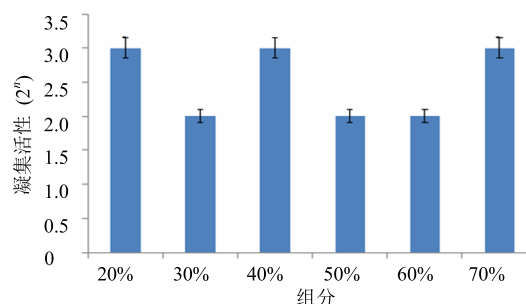


图 2 不同浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀组分的血凝集活性

Fig. 2 Hemagglutinating activity of precipitation composition with different concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

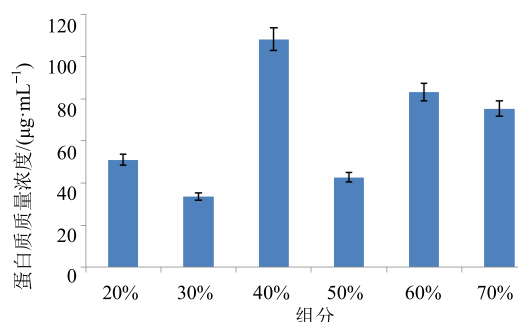


图 3 不同浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀组分蛋白质测定结果

Fig. 3 Determination of protein content of precipitation composition with different concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

CL-6B 离子交换色谱后, 超滤冻干得到不同浓度 NaCl-PBS 洗脱组分的质量见图 4, 血凝集素反应结果见图 5, 蛋白质测定结果见图 6。

对 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换色谱结果进行分析, 得出 0.3 mol/L NaCl 20 mmol/L PBS 洗脱组分和 0.9 mol/L NaCl+20 mmol/L PBS 洗脱组分分离得到的质量较多, 但凝集反应结果显示凝集活性

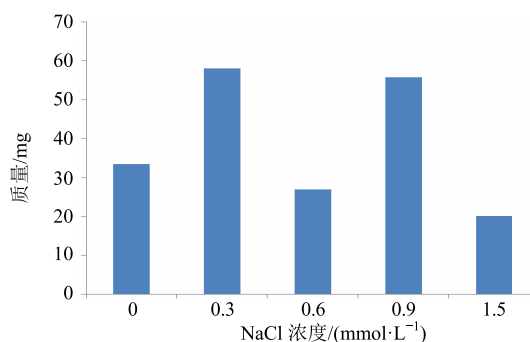


图 4 不同浓度 NaCl-PBS 洗脱组分的质量

Fig. 4 Weight of elution fractions with different concentration of NaCl-PBS

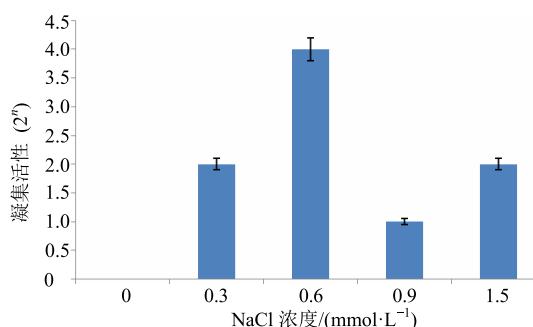


图 5 不同浓度 NaCl-PBS 洗脱组分的血凝集活性

Fig. 5 Hemagglutination of elution fractions with different concentration of NaCl-PBS

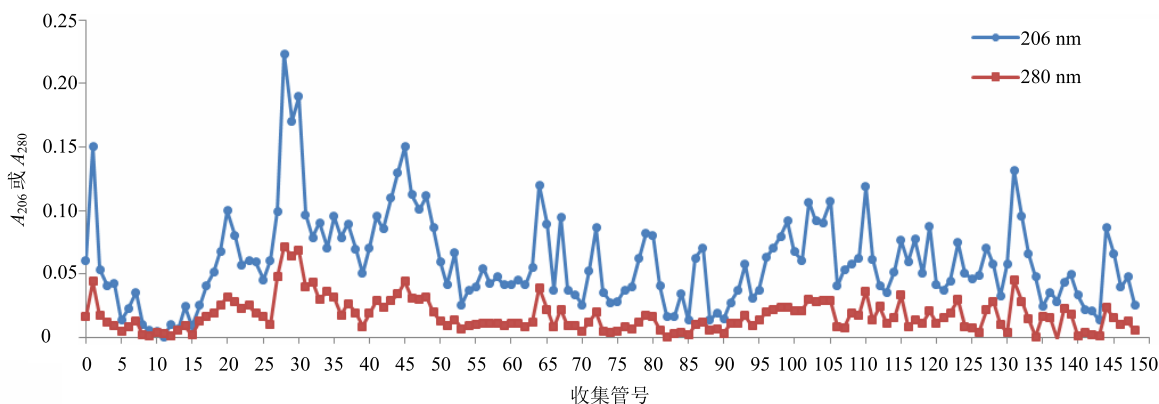


图 7 0.6 mol·L⁻¹ 组分经 Toyopearl HW-55 色谱柱用去离子水洗脱曲线

Fig. 7 Elution profile of 0.6 mol·L⁻¹ fraction eluted with deionized-water by Toyopearl HW-55

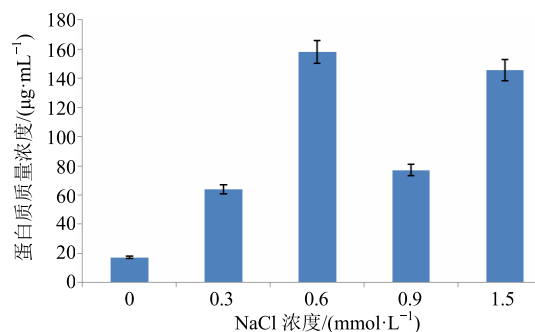


图 6 不同浓度 NaCl-PBS 洗脱组分蛋白质测定结果

Fig. 6 Determination of protein contents of elution fractions with different concentration of NaCl-PBS

并不高, 蛋白质浓度也较低。因此推测该组分杂质较多, 纯度不高, 而 0.6 mol/L NaCl+20 mmol/L PBS 洗脱组分的质量虽低于上述 2 个组分, 但凝集活性和蛋白质浓度在众多组分中最高, 相比其他几个组分纯度较高, 因此选择 0.6 mol/L+NaCl 20 mmol/L PBS 洗脱组分进一步分离提纯西藏黑木耳凝集素。

3.2.2 Toyopearl HW-55 凝胶柱色谱结果 将 0.6 mol/L+NaCl 20 mmol/L PBS 洗脱组分 (简称 0.6 mol/L 组分) 用 PBS 溶解, 过 Toyopearl HW-55 凝胶树脂柱, 去离子水洗脱, 洗脱峰见图 7。根据洗脱峰选取色谱液进行血凝集反应和蛋白质测定, 并将具有凝集反应、蛋白浓度高的洗脱峰区间的色谱液合并收集, 进行透析冻干, 27~38 管得到纯化后的凝集素冻干粉, 命名为 1HW55 (27~38)。16~26 管及 39~50 管虽然凝集活性较低, 但也得到冻干粉, 推测为西藏黑木耳中其他蛋白质成分。

3.3 凝集素的纯度鉴定结果

通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 检测提取得到的西藏黑木耳凝集素的纯度, 同时也对其相对分子

质量进行了初步测定, 经过配胶、上样、电泳、考马斯亮蓝染色及脱色, 结果见图 8。

根据 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果, 可以看出所得条带为清晰的单一条带, 可以推测出分离纯化的凝集素可能为单亚基蛋白, 相对分子质量初步推测为 20 000。

3.4 凝集素的结构鉴定结果

3.4.1 相对分子质量的测定结果 运用基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱, 经过点样、校准测试、测试样品及质谱数据处理, 最终测定凝集素相对分子质量为 18 913.22, 测定结果见图 9。

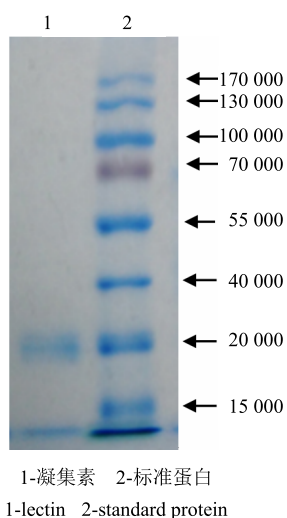


图 8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳纯度鉴定结果
Fig. 8 Purity identification result by SDS-PAGE

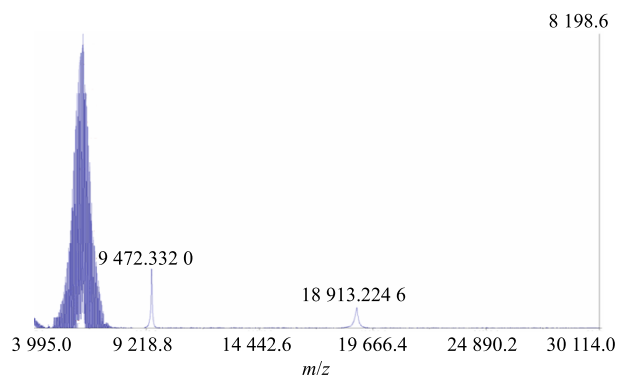


图 9 凝集素相对分子质量检测

Fig. 9 Test result of relative molecular weight by MALDI-TOF/TOF

凝集素相对分子质量测试质谱显示, 这 3 个峰由于质荷比成倍数关系, 判定均为凝集素, 第 1 个峰为三电荷电离质荷比为 6 303.536 1, 第 2 个峰为双电荷下电离质荷比为 9 472.332 0, 第 3 个峰为单电荷下电离质荷比为 18 913.224 6, 第 1 个峰下面的质荷比推测为高分子聚合物、后期包装材料的残渣 (如 EP 管残留物) 等物质, 并非测试样品凝集素, 这是由于基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱非常灵敏, 能够检测到样品中细小的杂质造成的。因此确定凝集素相对分子质量为 18 913.22。

3.4.2 蛋白质鉴定结果 凝集素通过质谱仪进行蛋白质鉴定, 一级质谱见图 10。经过 UniProt 数据库

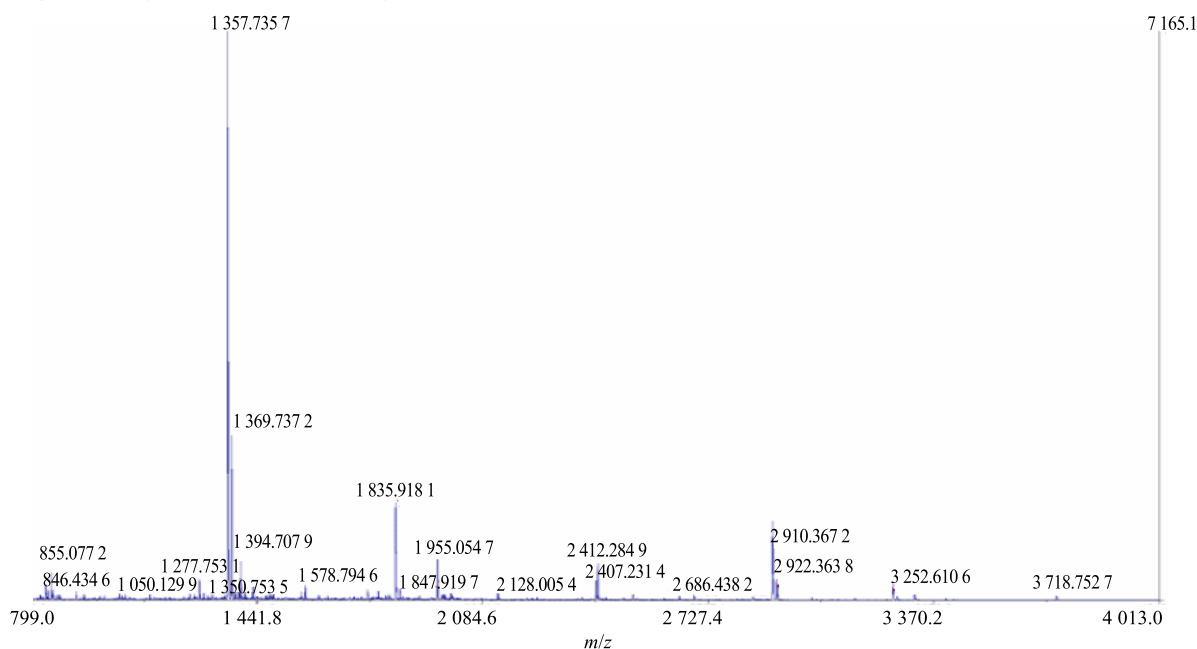


图 10 凝集素一级质谱

Fig. 10 First order mass spectra of lectin

比对, 分析得出该凝集素可能含有以下4条肽段, 其氨基酸序列分别为 QIDAERK、TNHSVVTWNDK、RLNFTAGNPFPR、VRELEQQVDSMTK。在已有的黑木耳蛋白质质谱库中未发现该序列的存在, 推断此为黑木耳中的新型蛋白质, 并确定是1种新的凝集素。

3.4.3 N-末端氨基酸序列分析结果 经全自动蛋白质多肽测序仪测定, 西藏黑木耳凝集素的N-末端13个氨基酸序列为 ITAPTTTSSAATE, 4条肽段氨基酸序列分别为 QIDAERK、TNHSVVTWNDK、RLNFTAGNPFPR、VRELEQQVDSMTK。

4 讨论

从西藏林芝人工栽培新鲜黑木耳 X7 中分离得到1种新的黑木耳凝集素, 其相对分子质量为18 913.22。N-末端序列检测为 ITAPTTTSSAATE, 4条肽段氨基酸序列分别为 QIDAERK、TNHSVVTWNDK、RLNFTAGNPFPR、VRELEQQVDSMTK。在分离纯化得到这种结构初步清晰的西藏黑木耳凝集素的基础上, 将有利于在抗肿瘤、抗病毒、抑菌及免疫调节等方面对西藏黑木耳凝集素开展基础理论研究, 为西藏黑木耳的药用及保健开发奠定基础。

参考文献

- [1] 盘赛昆, 汤 坚, 顾小红, 等. 鳙鲢凝集素的分离纯化及理化性质的研究 [J]. 水产科学, 2009, 28(12): 745-751.
- [2] Liener I E, Sharon N, Goldstein I J. *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine* [M]. Orlando: Academic Press, 1986.
- [3] Stillmark H. Ricin, a toxic enzyme from seeds of *Ricinus communis* L. and some other Euphorbiaceae [D]. Estonia: Medical School of Dorpat, 1888.
- [4] Liu Z, Luo Y, Zhou T T, *et al.* Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? [J]. *Cell Proliferat*, 2013, 46(5): 509-515.
- [5] Woodrum B W, Maxwell J D, Ashini B, *et al.* The antiviral lectin cyanovirin-N: Probing multivalency and glycan recognition through experimental and computational approaches [J]. *Biochem Soc T*, 2013, 41(5): 1170-1176.
- [6] Sun Y Y, Liu L, Li J. Three novel B-type mannose-specific lectins of *Cynoglossus semilaevis* possess varied antibacterial activities against Gram-negative and Gram-positive bacteria [J]. *Dev Comp Immunol*, 2015, 55(2): 194-202.
- [7] Singh R S, Kaur H P, Singh J. Purification and characterization of a mycelial mucin specific lectin from *Aspergillus panamensis* with potent mitogenic and antibacterial activity [J]. *Process Biochem*, 2015, 50(12): 2251-2258.
- [8] Ulrich-lynge S L, Dalgaard T S, Norup L R, *et al.* Chicken mannose-binding lectin function in relation to antibacterial activity towards *Salmonella enterica* [J]. *Immunobiology*, 2015, 220(5): 555-563.
- [9] Koscielska K K, Bartoszek D, Myszk M, *et al.* The complement cascade and renal disease [J]. *Arch Immunol Ther Ex*, 2013, 62(1): 47-57.
- [10] Souza M A, Carvalho F C, Ruas L P, *et al.* The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on Artin M properties [J]. *Glycoconj J*, 2013, 30(7): 641-657.
- [11] Dan X L, Ng T B. Lectins in human cancer: Both a devil and an angel [J]. *Curr Protein Pept Sc*, 2013, 14(6): 481-491.
- [12] Takeo I, Kozui K. Predictors of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2014, 20(2): 138-145.
- [13] 林端宜, 徐筱杰, 杨淑静, 等. 中药数据优化处理探讨 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(19): 2291-2293.
- [14] 周国华. 黑木耳多糖抗衰老及降血脂生物功效的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2005.
- [15] 刘振东, 薛 蓓, 王泽敏, 等. 林芝地区两株优良黑木耳菌株的 ITS 序列验证 [J]. 北方园艺, 2015(10): 98-103.