

建宁莲子糖蛋白的分离、纯化及清除自由基作用^{*}

高居易¹, 陈彦²

(1 福建师范大学生物工程学院, 福州 350007; 2 福建农林大学材料学院, 南平 353001)

摘要: 从红花建莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn. Fujian)的莲子中提取出具有生物活性的糖蛋白(GLP), 并进行清除自由基作用的研究。用60% (NH₄)₂SO₄饱和溶液沉淀蛋白质, 经ConA-Sepharose 4B亲和层析柱分离, Sephadex G-150凝胶层析柱纯化, 得到2个组分的糖蛋白, 分子量分别为25kD的GLP- I和92.5kD的GLP- II, 后者为其主要成分。GLP中蛋白质含量是58.8%, 总糖含量是36.4%。TLC和GC分析结果: GLP- I是由L-鼠李糖, D-木糖, D-甘露糖和D-葡萄糖组成。其中性糖摩尔比: 1.08~0.92~2.54~4.15。GLP- II是由L-鼠李糖, D-木糖, D-甘露糖, L-阿拉伯糖, D-半乳糖, D-葡萄糖和D-葡萄糖醛酸组成, 其中性糖摩尔比: 1.25: 1.03~2.85~0.94~3.16~4.65。药理实验表明: 两种糖蛋白均有清除自由基的作用, 而GLP- II清除能力大于GLP- I。

关键词: 莲; 糖蛋白; 分离; 纯化; 自由基

中图分类号: Q 946

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2003)02-0175-04

Isolation, Purification of Glycoproteins from Seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Fujian and its Effect on Scavenging Free Radicals

GAO Ju-Yi¹, CHEN Yan²

(1. Bioengineering College, Fujian Teachers University, Fuzhou 350007, China;
2. Material College, Fujian Agriculture and Forestry University, Nanping 353001, China)

Abstract: A bioactive glycoprotein (GLP) was isolated and purified from seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Fujian and it plays a role in scavenging free radicals. The glycoprotein was precipitated in 60% saturated solution of (NH₄)₂SO₄ first, was purified by ConA-Sepharose 4B affinity chromatography and by Sephadex G-150 gel filtration chromatography consecutively, and last was obtained two parts of glycoproteins: GLP- I of molecular weight is 25 kD and GLP- II of molecular weight is 92.5 kD. A GLP- II is primary part in GLP. Contents of protein and total sugars of GLP are 58.8% and 36.4% respectively. By TLC and GC analysis resulted that, glycosyls of GLP- I are L-rhamnose, D-arabinose, D-mannose and D-glucose, and its molar ratios of neutral sugars are 1.08~0.92~2.54~4.15 and glycosyls of GLP- II are L-rhamnose, D-arabinose, D-mannose, L-xylose, D-galactose, D-glucose and D-glucuronic acid, and its molar ratio of neutral sugars are 1.25~1.03~2.85~0.94~3.16~4.65. Pharmacological tests showed that, GLP- I and GLP- II both could scavenged free radical and scavenging effect of GLP- II is higher than of GLP- I.

Key words: *Nelumbo nucifera* Gaertn.; Glycoprotein; Isolation; Purification; Free radical

生物细胞的许多功能都与糖蛋白的代谢有关。糖蛋白是一类糖和蛋白质以共价键连接而成的结合

蛋白。糖蛋白在自然界中分布十分广泛。植物方面也有很多报道^[1,2]。目前, 已知大多数药用蛋白亦都

* 收稿日期: 2002-08-02, 修回日期: 2002-12-02。

作者简介: 高居易(1943-), 男, 主要从事蛋白质化学和酶工程方面研究。

是糖蛋白。

中国莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 是我国一种古老的植物, 莲子又是罕见的长寿命种子^[3]。国外有关莲子方面研究资料较少。国内莲子蛋白质方面研究有: 莲子贮存蛋白的研究^[4], 莲子超氧化物歧化酶的分析^[5], 以及莲子萌发时叶绿体蛋白质复合体的研究^[6]等, 而国内外尚未见到有关莲子糖蛋白的研究。

在前人研究基础之上, 笔者从福建建宁莲子中分离出糖蛋白, 分别测出其蛋白质和糖的含量。糖蛋白经进一步分离和纯化之后, 测定它是由分子量分别为 25 kD 和 92.5 kD 的两种糖蛋白组成, 进一步测定它们的单糖成分和摩尔的比值。药理实验还表明, 这两种糖蛋白都具有清除自由基的作用。

1 材料和药品

从红花建莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn. Fujian) 品种中, 挑选当年新鲜饱满的莲子, 含水量为 16.5%。莲子由福建建宁县农业局赠送, 福建师范大学生物工程学院植物教研室鉴定。

伴刀豆球蛋白 (ConA) 为 Sigma 公司产品; Sepharose 4B、Sephadex G-150 和牛血清白蛋白 (BSA) 均为 Pharmacia 公司产品; TLC 硅胶板、标准系列单糖和鲁米诺 (Luminol) 均为 Merck 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 糖蛋白的粗提

取红花建莲的莲子 100 g, 磨碎后用石油醚脱脂。取脱脂莲子粉 50 g, 加入内含 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2 的 0.001 mol/L PBS, 置外含有冰块的搅切机绞切 5 min。在 4℃ 下, 10 000 × g 离心 20 min。取上清液, 冰浴下加入 60% 硫酸铵饱和溶液沉淀, 10℃ 下搅拌 1 h 后, 在 4℃, 1 000 × g 离心 20 min, 收集沉淀物经检测为糖蛋白粗品。

2.2 糖蛋白分离和纯化

取糖蛋白粗品 10 g, 溶于 pH 7.2, 1.0 mmol/L 的 PBS 中, 蒸馏水透析 12 h, 4℃ 离心去除少量不溶物。将内透析液上已活化的 ConA-Sepharose 4B 亲和层析柱上 (2.5 cm × 15 cm)。用 pH 7.5, 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液平衡。然后再用含 2.5 mmol/L 的 α-甲基-D-甘露糖和 0.25 mol/L 的 α-D-葡萄糖的 Tris-HCl 缓冲液分步洗脱, 收集洗脱液。再取收集液 0.5 mL 上 Sephadex G-150 凝胶层

析柱 (2.0 cm × 100 cm), 苯酚-硫酸反应检测, 出现 2 个有活性的洗脱峰 (I 和 II), 分别将峰 I 和峰 II 的收集液, 用无离子水透析 18 h 后, 冷冻干燥, 得到两部分纯化了的莲子糖蛋白: GLP-I 和 GLP-II。

2.3 GLP 的蛋白质和多糖含量测定

蛋白质含量用 Lowry 法测定, 以 BSA 为标准蛋白^[7]。总糖含量用改良苯酚-硫酸法测定, 以葡萄糖为参比物。

2.4 GLP 纯度鉴定及分子量测定

纯度测定采用高效液相层析法^[8]。仪器为 HP1100 型高效液相层析仪。色谱柱: Carbohydrote Analysis 柱 (312 mm × 6.5 mm)。流动相: 乙腈-H₂O (80:20)。流速: 2.0 mL/min。柱温: 20℃, 检测: HP1047A 示差折射率检测器。

分子量测定采用粘度法。用鸟氏粘度计分别测出流出时间, 作图。由公式 $[\eta] = KM \eta$, 分别求出 GLP-I 和 GLP-II 分子量。

2.5 GLP 的糖蛋白组分分析和摩尔比测定

2.5.1 GLP 完全酸水解 各取 GLP-I 和 GLP-II 样品 10 mg, 加入 2.0 mol/L 硫酸 1 mL 于安瓿中, 封管, 煮沸 4 h 后, 碳酸钡中和, 离心, 上清液浓缩, 供层析用。

2.5.2 GLP 薄层层析 采用硅胶板上行层析。丙酮-水 (96:4) 为展开剂, 邻苯二甲酸苯胺显色。将完全酸水解后, 各个 GLP 样品与标准单糖进行对照。

2.5.3 GLP 气相层析 将各个 GLP 水解物干燥后, 按文献[9]的方法制成相应的糖腈乙酸酯的衍生物, 进行气相层析。仪器为 GCHF18.3 型气相色谱仪, 氢火焰离子化检测器。分离柱: 内径 3 mm, 长 2 m 的玻璃柱, 固定液: 3% ECNSSM。担体: Chromosorb W AW DMCS (80~100 目)。载气: N₂, 流速: 20 mL/min。柱温: 205℃。检测器温度: 250℃。

2.5.4 GLP 气相层析中单糖摩尔比测定 以肌醇六乙酸酯为内标, 测定各单糖的定量校正因子。再对测定 GLP 各个酸水解物中单糖的摩尔比。

2.6 GLP 红外光谱分析

仪器为 Nicolet-550 型红外光谱仪。KBr 压片。

2.7 GLP 清除自由基作用的测定

按文献[10]的方法, 采用 Pyrogallol-Luminol 发光体系。在弱碱性条件下, 邻苯三酚自氧化体系产生 O₂ 自由基。用各个 GLP 测定清除 O₂ 的能力。

按文献[11]的方法, 采用 Feuton 反应。在 VitC-Cu²⁺-yeast 悬浮液-H₂O₂ 发光体系中产生 OH 自由基。用各个 GLP 测定清除 OH 的能力。

按文献[12]的方法, 略加改进。采用·OH-Luminol-H₂O₂发光体系产生H₂O₂, 用各个GLP测定清除H₂O₂的能力。

测定仪器为SHG-1型生物化学发光测量仪(上海标准局实验工厂产品)。空白对照: pH 7.2, 50 mmol/L PBS, 采用下式计算自由基清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{\text{空白发光强度} - \text{样品发光强度}}{\text{空白发光强度}} \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 GLP 葡聚糖凝胶过滤层析结果

凝胶层析柱经洗脱后, 出现两个糖蛋白活性峰: 峰I和峰II(图1)。图1中表明, 具有活性的莲子糖蛋白(GLP)是由GLP-I和GLP-II两部分组成。其

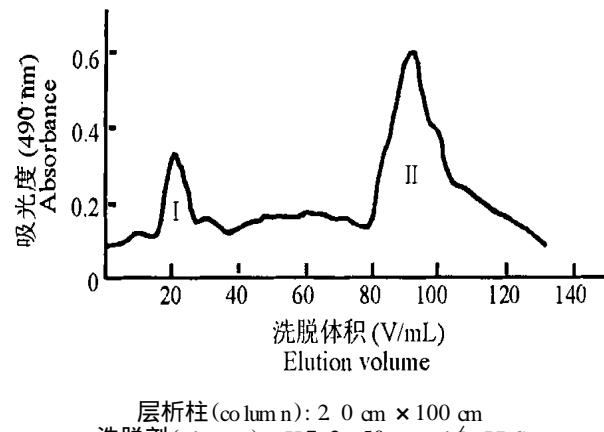


图1 莲子糖蛋白的 Sephadex G-150 凝胶层析曲线

Fig. 1 Chromatography graph of Sephadex G-150 gel filtration of GLP from seed of *N elun bo nucifera* Gaertn

中GLP-II为其主要成分。

3.2 GLP的蛋白质和糖含量测定结果

测定结果表明, GLP中蛋白质含量占58.8%, 总糖含量占36.4%, 蛋白质量大于糖含量。

3.3 高效液相层析和分子量测定结果

高效液相层析结果表明, GLP-I和GLP-II均出现对称的单一峰。粘度法测定分子量结果, GLP-I的分子量为25 kD; GLP-II的分子量为92.5 kD。这个与SDS-PAGE结果相一致。

3.4 GLP薄层层析和气相层析结果

GLP酸水解物的薄层层析和气相层析结果表明, GLP-I是由L-鼠李糖D-木糖D-甘露糖和D-葡萄糖组成, 其中性糖摩尔比为1.08~0.92~2.54~4.15。GLP-II是由L-鼠李糖D-木糖D-甘露糖L-阿拉伯糖D-半乳糖D-葡萄糖和D-葡萄糖醛酸组成, 其中性糖摩尔比为1.25~1.03~2.85~0.91~3.16~4.65。

3.5 GLP红外光谱分析结果

各个GLP的红外光谱分析结果见图2。

图2表明, GLP-I和GLP-II都是典型的多糖红外吸收光谱。其中, GLP-I在3410 cm⁻¹(Y_{OH})、3000 cm⁻¹(Y_{C-H})、600 cm⁻¹(Y_{COOH})和1250 cm⁻¹(δ_{C-H})有特征吸收峰。GLP-II在3450 cm⁻¹(Y_{OH})、3400 cm⁻¹(Y_{OH})、2983 cm⁻¹(Y_{C-H})、1720 cm⁻¹(Y_{COOH})、1424 cm⁻¹(Y_{CO})、1250 cm⁻¹(δ_{C-H})和875 cm⁻¹处有特征吸收峰。特别是在875 cm⁻¹有吸收。这说明在GLP-II中有β糖苷键存在形式。

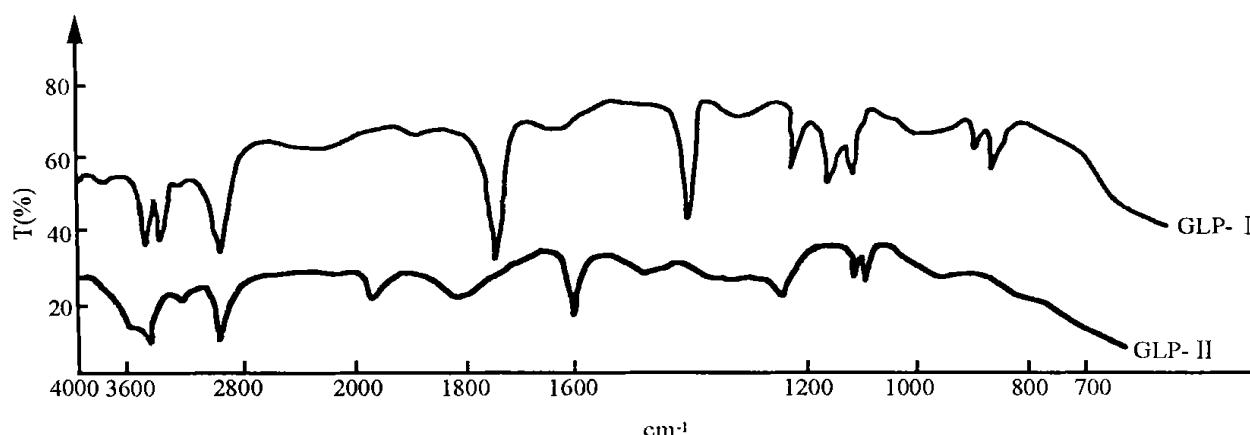


图2 莲子糖蛋白的红外光谱

Fig. 2 IR spectra of GLP from seed of *N elun bo nucifera* Gaertn

3.6 GLP 清除自由基作用结果

GLP 清除自由基作用的测定结果见表 1。

表 1 说明, GLP- I 和 GLP- II 均有清除自由基的作用。GLP- II 清除能力要大于 GLP- I。因此, GLP- II 是莲子糖蛋白中最具有活力的部分。

表 1 莲子糖蛋白清除自由基的作用(均值 \pm S.D., n= 9)
Table 1 Scavenging effects of free radicals by GLP from seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Means \pm S.D., n= 9)

糖蛋白 Glycoprotein (GLP)	自由基清除率(%) Scavenging rate of free radical		
	O_2^- 体系 O_2^- System		
	$\cdot\text{OH}$ 体系 $\cdot\text{OH}$ system	H_2O_2 体系 H_2O_2 system	
GLP- I	45.9 \pm 0.43	14.03 \pm 0.56	9.8 \pm 0.7
GLP- II	87.81 \pm 0.75	56.77 \pm 0.32	56.75 \pm 0.45

Note: $P < 0.01$

4 讨论

(1) 糖蛋白是生物细胞的重要组成部分。它在植物代谢中起着一种独特的作用。糖蛋白在植物的原生质中可以自由移动, 并可以穿越细胞膜。因此, 人们推测糖蛋白与细胞膜的功能有密切相关。再者, 植物体代谢中一些重要的酶类, 受体以及受体中间体本身就是糖蛋白。糖蛋白也是细胞膜的重要组成部分。所以, 植物体糖蛋白的研究越来越被人们所重视。

(2) 植物体是与人们生活密切相关的。它不仅提供人体所需要的丰富营养物质, 而且在治病、防癌和抗衰老上有着不可估量的作用。天然植物体内存在有多种抗氧化的物质。这些物质正被人们所研究和开发。现已确认: 植物体内的抗氧化蛋白和抗氧化酶在抗衰老上起着很大的作用, 同时也发现植物一些多糖具有抗氧化的功能, 但在糖蛋白方面研究甚少。笔者对莲子糖蛋白及其功能进行了研究和探讨, 证实了它们具有清除自由基的作用。

(3) 莲子糖蛋白是分子量较大, 糖基较多的一类复杂的糖蛋白。要更进一步地研究这些糖蛋白的结构和功能, 诸如研究糖基的空间结构, 糖与糖之间连接方式以及糖与蛋白质的连接方式, 氨基酸排列的顺序和蛋白质的高级结构等, 还需要借助于核磁共振, 气-质联谱和氨基酸分析仪等现代技术进行全面

面探讨。国内唐佩华等人也曾对莲子贮存蛋白进行了全面研究。莲子蛋白质和糖蛋白研究工作还有待于进一步深入。

参考文献

- [1] Xu H P, Tsao T H. Detection and immuno localization of glycoproteins of the plasma membrane of maize sperm cells [J]. *Protoplasma*, 1997, **198**: 125—129.
- [2] 高居易, 陈苒. 芦荟凝集素的分离、纯化和部分性质的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2000, **8**(2): 177—181.
- [3] Shen Miller J, Mandiggett M B, Schopf J W, et al. Exceptional seed longevity and robust growth: ancient sacred lotus from China [J]. *Amer Bot*, 1995, **82**(11): 1367—1380.
- [4] 唐佩华, 姜华, 李群英, 等. 莲子储存蛋白的主要亚基及积累模式 [J]. 植物学报, 1999, **41**(2): 176—180.
- [5] 黄上志, 汤学贵, 芦春斌, 等. 莲子超氧化物歧化酶特性分析 [J]. 植物生理学报, 2000, **26**(6): 492—496.
- [6] Tang C-Q, Zuo B-Y, Li G-Q, et al. Changes of chlorophyll-protein complexes and photosynthetic activities of chloroplasts from (*Nelumbo nucifera*) seeds germinating in light [J]. *Acta Bot Sin*, 1999, **41**(6): 608—612.
- [7] Lowry O H, Rosbrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265—276.
- [8] Heukeshoven J, Dernick R. Reverse-phase high-performance liquid chromatography of virus proteins and other hydrophobic proteins [J]. *Chromatography*, 1984, **19**: 95—100.
- [9] 李铁林, 吴昌贤, 张燕霞. 糖和糖蛋白的气相色谱分析研究 II. 糖腈乙酰酯衍生物分析的改进 [J]. 分析化学, 1982, **10**(5): 272—276.
- [10] 郭蔼光, 王振镒. 邻苯三酚自氧化-化学发光法测定 SOD 活性 [J]. 植物生理学通讯, 1989(3): 54—57.
- [11] 陈季武, 胡天喜. 测定 $\cdot\text{OH}$ 产生与清除的化学发光体系 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, **19**(2): 136—139.
- [12] 胡天喜. 测定活性氧、自由基及脂质过氧化物的化学发光技术 [A]. 见: 郑荣梁主编. 自由基生命科学进展 (第 5 集) [C]. 北京: 原子能出版社, 1997. 70.