

# 建宁莲子糖蛋白的分离、纯化及清除自由基作用<sup>\*</sup>

高居易<sup>1</sup>, 陈彦<sup>2</sup>

(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% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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-Yi<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>2</sup>

(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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 scavenge 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<sup>[1,2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。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<sup>[4]</sup>,莲子超氧化物歧化酶的分析<sup>[5]</sup>,以及莲子萌发时叶绿体蛋白质复合体的研究<sup>[6]</sup>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(Lumino)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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。仪器为HP1100型高效液相层析仪。色谱柱:Carbohydrate Analysis柱(312 mm × 6.5 mm)。流动相:乙腈-H<sub>2</sub>O (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。用乌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% ECN 55-M。担体:Chromosorb W AW DMCS(80~100目)。载气:N<sub>2</sub>,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。再对比测定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-Lumino发光体系。在弱碱性条件下,邻苯三酚自氧化体系产生O<sub>2</sub>·自由基。用各个GLP测定清除O<sub>2</sub>·的能力。

按文献[11]的方法,采用Feuton反应。在VitC-Cu<sup>2+</sup>-yeast悬浮液-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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 $\cdot\text{OH} + \text{Lu-m inol} + \text{H}_2\text{O}_2$ 发光体系产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ , 用各个 GLP 测定清除 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的能力。

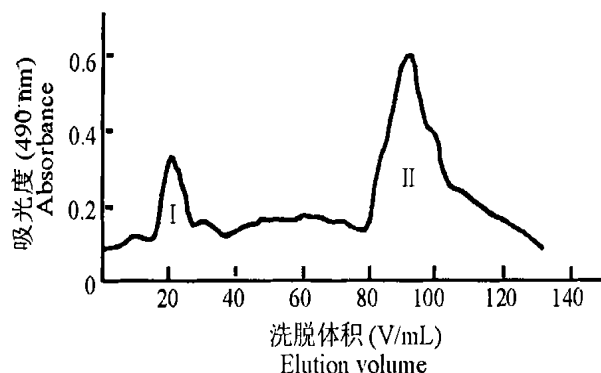
测定仪器为 SHG-1 型生物化学发光测量仪(上海标准局实验工厂产品)。空白对照: pH 7.2, 50 mmol/L PBS, 采用下式计算自由基清除率。

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

### 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



层析柱(column): 2.0 cm × 100 cm  
洗脱剂(eluent): pH 7.2, 50 mmol/L PBS  
流速(flow rate): 30 mL/min

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 *Nelumbo nucifera* Gaertn.

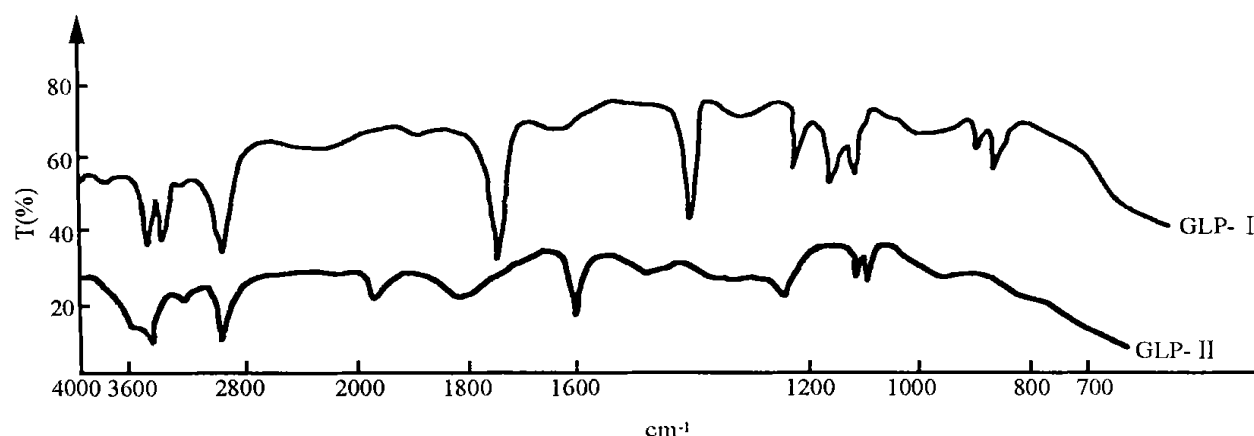


图 2 莲子糖蛋白的红外光谱  
Fig. 2 IR spectra of GLP from seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn.

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  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{OH}}$ )、3000  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ )、600  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{COOH}}$ ) 和 1250  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{H}}$ ) 有特征吸收峰。GLP-II 在 3450  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{OH}}$ )、3400  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{OH}}$ )、2983  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ )、1720  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{COOH}}$ )、1424  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-O}}$ )、1250  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{H}}$ ) 和 875  $\text{cm}^{-1}$  处有特征吸收峰。特别是在 875  $\text{cm}^{-1}$  有吸收。这说明在 GLP-II 中有  $\beta$  糖苷键存在形式。

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±S D, n= 9)  
Table 1 Scavenging effects of free radicals by GLP from seed of *N elum bo nucifera* Gaertn. (Means±S D, n= 9)

糖蛋白 Glycoprotein (GLP)	自由基清除率(%) Scavenging rate of free radical		
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 体系 O <sub>2</sub> System	·OH 体系 ·OH system	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 体系 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> system
GLP- I	45.9±0.43	14.03±0.56	9.8±0.7
GLP- II	87.81±0.75	56.77±0.32	56.75±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。要更深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 immunolocalization 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, Mndggett M B, Schopt J W, et al. Exceptional seed longevity and robust growth: an ancient sacred lotus from China[J]. *Am J 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 (*N elum bo nucifera*) seeds germinating in light[J]. *Acta Botanica Sinica*, 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]. *Chromatographia*, 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. 糖腈乙酰胺衍生物分析的改进[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·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.