

刘 主,肖仔君,何智丹,等. 草菇凝集素 VL-2 的分离纯化及其凝血活性研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):273-275.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.091

草菇凝集素 VL-2 的分离纯化及其凝血活性研究

刘 主¹,肖仔君²,何智丹¹,黄绍明¹

(1. 韶关学院英东生命科学学院,广东韶关 512005; 2. 韶关学院英东食品科学与工程学院,广东韶关 512005)

摘要:以草菇子实体为材料,通过 PBS 浸提、硫酸铵沉淀、DEAE-52 纤维素离子交换层析、Sephadex G-75 凝胶过滤层析等步骤,分离获得草菇凝集素单一成分 VL-2。在此基础上,开展了 VL-2 对仓鼠、小白鼠、猪、狗、猫、驴、鸭、鸽子、兔、蛙、蛇、鸡等 12 种动物血红细胞的凝血活性试验,结果发现 VL-2 对上述前 11 种动物凝血活性的效价分别为 1 024、1 024、512、4 096、4 096、1 024、64、64、128、64、2 048 U/mg,而对鸡血红细胞没有凝血活性。

关键词:草菇;凝集素;分离纯化;凝血活性

中图分类号: Q946.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0273-02

凝集素(lectin)是一种非免疫起源、不具有酶活性、可凝集细胞或沉淀糖复合物的蛋白质或糖蛋白,该蛋白可专一识别糖并为之非共价、可逆地结合^[1-2]。它对血细胞、淋巴细胞、恶性细胞均有凝集作用,具有鉴定血型及微生物、抗感染、抗炎症、抗血栓,促进细胞分裂、免疫调节等功效,已成为相关领域的特效工具^[3-4]。

食用菌凝集素是食用菌中重要的药理成分之一,研究显示:食用菌凝集素在大多数食用菌子实体的杀虫活性方面起重要作用,且不受蛋白酶及热的影响,是一种良好的杀虫剂候选材料,有可能成为一种抵抗害虫的基因源^[5]。食用菌凝集素除了具有与植物凝集素相似的功能外,它还在促进菌丝分化、子实体形成等方面具有活性^[6-7]。近几年来,国内外对食用菌凝集素的研究不断升温,食用菌凝集素已成为继食用菌多糖之后的另一活性物质而成为研究热点^[8]。双孢蘑菇凝集素 ABL 对人上皮细胞及恶性结肠细胞具有抗增生作用,且无明显细胞毒性,此特性赋予它作为抗赘生药物的重要治疗潜能^[9],目前双孢蘑菇凝集素已经进入了商业化生产。本试验从草菇子实体中提取凝集素,建立草菇凝集素的分离纯化方法并进行凝血活性试验,旨在为草菇凝集素性质研究和开发应用奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

草菇(*Volvariella volvacea*)购于韶关市一市场。

固体培养基(PDA):新鲜马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,磷酸二氢钾 3 g/L,硫酸镁 1.5 g/L,琼脂 20 g/L。

透析袋(27 mm,3 500 u;Spectrum,美国),2-巯基乙醇(Amresco,美国),聚乙二醇 20000(Sigma,美国),DEAE-52

纤维素(Whatman,英国),Sephadex G-75(GE,美国),丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris 均为进口分装,其他试剂均为国产分析纯。

J₂-MC 微控高速冷冻离心机(Beckman Coulter,美国),Ultrospec 2000 分光光度计(Amersham Pharmacia Bioiech,瑞士),mini VE Complete 微型垂直电泳槽(Amersham Pharmacia Bioiech,瑞士),EPS 3501 电泳仪(Amersham Pharmacia Bioiech,瑞士),ALPHA 1-2LD PLUS 冻干机(Christ,德国)。

1.2 试验方法

1.2.1 草菇凝集素的粗提 所有提取步骤均在 4℃ 下操作,取新鲜的草菇子实体 1 000 g,在 1 000 mL 浓度为 10 mmol/L 的磷酸缓冲液(PBS)(pH 值 8.0,含 0.1% 的 2-巯基乙醇)中匀浆,静置 3 h。匀浆液在 3 500 r/min 下离心 20 min。取上清液并用 90% 的硫酸铵沉淀,10 000 r/min 离心 20 min,沉淀溶于 10 mmol/L 的 PBS(pH 值 8.0)中。透析除盐 36~48 h,聚乙二醇 20000 浓缩得草菇凝集素粗品^[10]。

1.2.2 草菇凝集素的分离纯化 DEAE-52 纤维素经碱一酸一碱处理,湿法装柱,柱长 2.5 cm×20 cm。洗脱程序为:分别采用 PBS 及含 0.1、0.2、0.3、0.4 mol/L NaCl 的 PBS(10 mmol/L,pH 值 8.0)溶液进行不连续梯度洗脱。洗脱流速 2 mL/min,每 8 mL 收集 1 管,每种洗脱液收集 12 管。对收集的每管溶液分别进行凝血活性测定,并在 280 nm 下测定每管溶液 D 值,作出洗脱曲线。收集具有凝血活性的洗脱峰,透析除盐 36~48 h,聚乙二醇 20000 浓缩得草菇凝集素半纯品。

将 Sephadex G-75 装柱(1.5 cm×100 cm),流速 0.4 mL/min,10 mmol/L PBS(pH 值 8.0)洗脱,3.0 mL 体积分部收集。对收集的每管溶液分别进行凝血活性测定,并在 280 nm 下测定每管溶液 D 值,作出洗脱曲线。收集具有凝血活性的洗脱峰,透析除盐 36~48 h,聚乙二醇 20000 浓缩,真空干燥得到草菇凝集素纯品。

1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法纯度检验 采用不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 3%,点样量为 30 μg,10 mA 预电泳约 30 min,待样品进入分离胶后,调电流至 20~25 mA,待溴酚蓝至凝胶底部边沿 1 cm 时停止电泳。

收稿日期:2014-06-09

基金项目:广东省韶关市科技计划(编号:2013CX/K);韶关学院科研项目(编号:2011-12);韶关学院大学生创新创业训练计划(编号:syxcxy2012-007)。

作者简介:刘 主(1977—),男,湖南宁远人,博士,副教授,主要从事食用菌及分子生物学方面的研究。E-mail:liuzhu77@126.com。

1.2.4 草菇凝集素的凝血活性测定

1.2.4.1 血红细胞悬浮液的制备及凝血活性测定 用 EDTA 作抗凝剂采集小白鼠血液,离心,除去血浆,用 PBS 洗涤 3~5 次,使血红细胞悬浮于 PBS 液中,浓度为 2%。在微量 V 型血凝板上按文献[11]方法进行活力测定:取 50 μL 的草菇凝集素提取液与等体积的 PBS 在 V 型血清微量稀释板上进行倍比稀释,然后加入 50 μL 2% 的小白鼠血红细胞悬液,振荡摇匀后,室温放置 2 h,检查凝集结果,最后以对凝集素最大倍稀释倍数(2ⁿ)来表示凝集效价。即 1 个单位的凝血活性(U)定义为能使 2% 的动物血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^[12]。

1.2.4.2 动物血红细胞凝血试验 分别采集仓鼠、小白鼠、猪、狗、猫、驴、鸭、鸡、鸽子、兔、蛙、蛇的血液,按“1.2.4.1”节方法制备血红细胞悬浮液及进行凝血试验,测定其凝血活性。

2 结果与分析

2.1 草菇凝集素的分离纯化

草菇凝集素粗品经 DEAE-52 纤维素柱层析分离纯化,结果见图 1。由图 1 可知:经 DEAE-52 纤维素柱层析洗脱后,可得 5 个峰,其中峰 1、峰 2、峰 3 分别为 PBS、0.1 mol/L 的 NaCl、0.2 mol/L 的 NaCl 所洗脱,具有凝血活性。其中峰 2 凝集效价最高,而 D_{280 nm} 相对较低,且峰型较好,故收集峰 2。透析除盐,聚乙二醇 20000 浓缩得草菇凝集素半纯品 VL-2。

半纯品 VL-2 经 Sephadex G-75 柱层析纯化,结果见图 2。由图 2 可知:半纯品 VL-2 经 Sephadex G-75 柱层析洗脱有 2 个峰,其中峰 1 具有凝血活性。收集峰 1,透析除盐,聚乙二醇 20000 浓缩,真空干燥得到草菇凝集素纯品 VL-2。

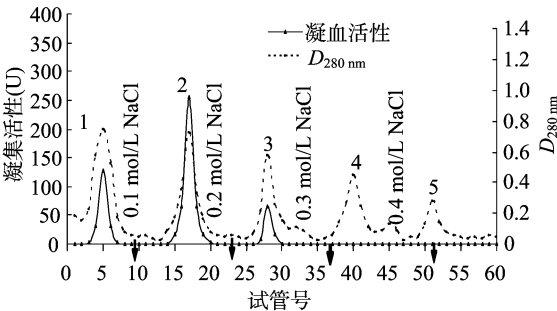


图1 凝集素的 DEAE-52 纤维素层析洗脱曲线

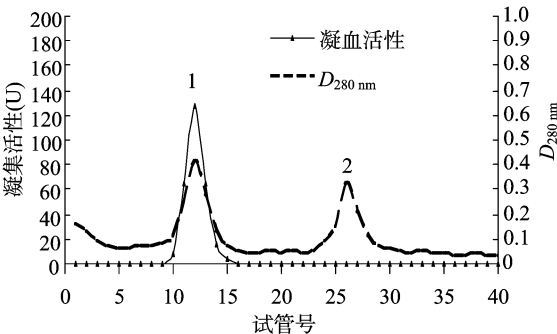


图2 凝集素的 Sephadex G-75 层析洗脱曲线

2.2 草菇凝集素 VL-2 纯度

将纯品 VL-2 经不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检验纯度,结果见图 3。泳道 1、2、3 均为单一条带(箭头所指条

带,泳道 1、2、3 上样均为纯品 VL-2),说明纯品 VL-2 已经得到了纯化。

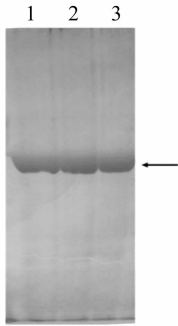


图3 凝集素的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

2.3 草菇凝集素 VL-2 的凝血试验

分别采集仓鼠、小白鼠、猪、狗、猫、驴、鸭、鸡、鸽子、兔、蛙、蛇的血液,测定草菇凝集素 VL-2 对这些动物血红细胞的凝血活性(表 1)。

从表 1 中可以看出,凝集素 VL-2 对 12 种动物血液凝血作用存在明显差异,其中对狗和猫血红细胞的凝集效价最高,均为 4 096 U/mg;对鸭、鸽子、蛙的血红细胞的凝集效价较低,均为 64 U/mg,而对鸡血红细胞没有凝血活性。

表 1 凝集素对 12 种动物的凝血试验

动物名称	凝集效价 (U/mg)	动物名称	凝集效价 (U/mg)
仓鼠	1 024	鸭	64
小白鼠	1 024	鸡	0
猪	512	鸽子	64
狗	4 096	兔	2 048
猫	4 096	蛙	64
驴	1 024	蛇	128

3 讨论与结论

食用菌凝集素分布广泛,具有许多潜在功能,且稳定、专一^[13],具有良好的开发与应用前景。近年来,虽然有关食用菌凝集素的研究越来越多、越来越深入,但是目前已被研究人员分离纯化和进行性质研究的并不多,能进入商业化生产的食用菌凝集素更是寥寥无几。因此,仍有很多食用菌凝集素有待进一步研究和开发利用。

通过 PBS 浸提、硫酸铵沉淀、离子交换层析、凝胶过滤层析等步骤,从草菇子实体中分离得到草菇凝集素纯品 VL-2。VL-2 对仓鼠、小白鼠、猪、狗、猫、驴、鸭、鸽子、兔、蛙、蛇等 11 种动物的血红细胞的凝集效价分别为 1 024、1 024、512、4 096、4 096、1 024、64、64、128、64、2 048 U/mg,而对鸡血红细胞没有凝血活性。草菇生长迅速、产量高,本试验从草菇子实体中提取凝集素,并建立了草菇凝集素 VL-2 的分离纯化方法,并对一些动物血红细胞进行凝血活性试验,为草菇凝集素特性研究及开发利用奠定了基础。

参考文献:

[1] Goldstein I J, Hughes R C, Monsigny M, et al. What should be called a lectin[J]. Nature, 1980, 285 (8) : 66.

孙来玉,钱 坤,杨金田,等. 免疫芯片法追溯检测克伦特罗用药史研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):275-279.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.092

免疫芯片法追溯检测克伦特罗用药史研究

孙来玉,钱 坤,杨金田,邵朝纲,尹 莉

(湖州师范学院生命科学学院,浙江湖州 313000)

摘要:以雄性皖浙花猪毛发、尿液为检测材料,以免疫芯片为检测手段,考察克伦特罗残留规律。结果表明,免疫芯片法检测动物毛发样品的检测限和定量限分别为 0.15、0.50 ng/g,回归方程为: $y = -0.391x^3 + 12.576x^2 - 141.88x + 867.84$, $r^2 = 0.9994$,线性范围为 0.5 ~ 16.0 ng/g,回收率为 65.2% ~ 81.4%,休药期 42 d 仍能检测出毛发中克伦特罗残留。免疫芯片法检测动物尿液样品的检测限和定量限分别为 0.20、0.60 ng/mL,回归方程为: $y = -0.1071x^3 + 6.1795x^2 - 110.33x + 839.37$, $r^2 = 0.9923$,线性范围为 0.6 ~ 16.0 ng/mL,回收率为 61.5% ~ 72.2%,休药期 7 d 基本不能检测出克伦特罗残留。免疫芯片法检测动物毛发克伦特罗残留快速、简单、准确,适合规模化检测,可用于克伦特罗用药史追溯性检测。

关键词:免疫芯片;克伦特罗;高通量监测技术;毛发;尿液;黑鬃;白鬃;猪

中图分类号: TS201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0275-05

盐酸克伦特罗 (clenbuterol hydrochloride, CL-H) 别称“瘦肉精”,在药理学上属人工合成的 β_2 受体激动剂,可用于治疗支气管哮喘^[1]。克伦特罗 (CL) 易在动物可食组织中残留蓄积,引发食品安全事件。2002 年 12 月 24 日中华人民共和国农业部第 235 号公告明确规定动物性食品中不得检出克伦特罗。国内外报道 CL 残留检测的文献颇多,其分析测试方法主要包括化学分析法^[2]、色谱法^[3-7]、毛细管电泳法^[8-9]、免疫学分析法^[10-13]、电化学分析法^[14]、生物传感器法^[15-16]等。免疫芯片法检测药物残留具有规模化检测的优点,现已成为高通量检测药物残留技术的一种。克伦特罗具有促进动物生长、提高瘦肉率、减少脂肪等效果,因此市场上

经常出现添加克伦特罗饲养后休药一段时间再出售猪,致使猪屠宰前尿检不能检出克伦特罗的情况;因此建立克伦特罗用药史追溯检测方法具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试验动物:雄性皖浙花猪。试药:免疫芯片,辣根过氧化物酶 (HRP, CanAg Co., Ltd); 98.5% 盐酸克伦特罗 (美国 Sigma 公司);辣根过氧化物酶标记的克伦特罗 (CL-HRP, 用经典的过碘酸反应制得);化学发光 AB 检测液 (Luminol - H_2O_2 , Pierce); 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 值为 6.9); 10 倍洗液 (8.5 g NaCl, 12.1 g Tris, 7 mL HCl, 1 mL Tween-20, 稀释至 1 000 mL, pH 值为 7.6); 双蒸水 (自制);其他试剂均为分析纯试剂。仪器:HK-2001A 芯片阅读仪 (上海数康生物科技有限公司);HZ-9310 摇床 (江苏太仓华利达实验设备有限公司);PHS-3C pH 计 (上海虹益仪器仪表有限公司);SK7200H 超声清洗器 (上海科导超声仪器有限公司);

收稿日期:2015-01-20

基金项目:浙江省公益性应用研究计划 (分析测试) (编号:2012C37027)。

作者简介:孙来玉 (1974—),男,安徽无为,人,实验师,研究方向为生物医药与食品安全。E-mail: sunly@hutc.zj.cn。

[2] Sharon N H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules[J]. Glycobiology, 2004, 14(11): 53.

[3] 张国庆,陈青君,赵 爽,等. 红菇属两种凝集素的分离纯化与比较研究[J]. 菌物学报, 2012, 31(1): 110-118.

[4] Ngai P H, Ng T B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes and antiproliferative activity toward tumor cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 314(4): 988-993.

[5] Peumans W J, van Damme E J M. Lectins as plant defense proteins[J]. Plant Physiology, 1995, 109(2): 347-352.

[6] 孙 慧,赵辰光,全 鑫,等. 杨树菇凝集素 AAVP 具有抗病毒和促进菌丝分化功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(2): 210-214.

[7] Wang H X, Ng T B, Liu Q H. Isolation of a new heterodimeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe*

eylindracea [J]. Life Sciences, 2002, 70(8): 877-885.

[8] 吴恩奇,图力古尔. 蘑菇凝集素及其研究进展[J]. 菌物研究, 2006, 4(4): 69-76.

[9] Yu L, Fernig D G, Smith J A, et al. Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin[J]. Cancer Research, 1993, 53(19): 4627-4632.

[10] 陈珺霞,刘 主. 草菇凝集素提取研究[J]. 韶关学院学报, 2013, 34(4): 46-49.

[11] 孙 册,朱 政,莫汉庆. 凝集素[M]. 北京:科学出版社,1986: 1-136.

[12] 朱利芬,闫巧娟,江正强,等. 一种膜荚黄芪凝集素的分离纯化研究[J]. 中草药, 2010, 41(5): 714-717.

[13] 何晓佳. 榆黄菇凝集素的分离纯化及部分性质研究[D]. 成都:四川大学, 2006: 70.