

理化因素对大蒜凝集素生物活性的影响*

刘 超,林 钦,范文菊,万东海

(乐山师范学院 化生学院,峨眉山动植物多样性保护与利用研究所,四川乐山 614004)

摘 要:大蒜(*Allium sativum* L.)鳞茎经浸取、硫酸铵分级沉淀、离子交换柱和凝胶过滤得到凝集素(*Allium sativum* L. Lectin, ASL)样品。ASL 能凝集兔血红血球和鸡血红血球,使鱼血红血球发生溶血,其中对兔血红血球的凝集活性最强。大蒜凝集素在 70℃ 以上的温度加热 10 min 才失活,表明大蒜凝集素有较强的热稳定性。凝集活性最适 pH 为 4.5~6.4,其凝集活性部分依赖于金属离子,且大蒜凝集素的凝集活性能被变性剂所抑制。

关键词:大蒜凝集素;理化因素;凝集活性。

中图分类号:Q513

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2010)04-0138-04

Effect of Physicochemical Factors on the Biological Activity of the Lectin from *Allium sativum* L.

LIU Chao, LIN Qin, FAN Wenju and WAN Donghai

(Institute of Protection and Utilization of Plant and Animal Diversity of Emei Mountain, Leshan Normal University, Leshan Sichuan 614004, China)

Abstract: The *Allium sativum* L. Lectin (ASL) was obtained from the bulbs of the edible *Allium sativum* L. by soaking, purifying through fractional precipitation of ammonium sulfate, ion exchange column and gel filtration, and treated with EDTA, metal ions, various temperatures and pH to investigate their effects on hemagglutinating activity. The results indicated that the hemagglutinating activity of ASL was stable below 70℃ and at pH from 4.5 to 6.4. ASL was also a metal-dependent protein. Hemagglutinating activity could be repressed by the denaturant.

Key words: Lectin of *Allium sativum* L. ; Physicochemical factors; Hemagglutinating activity.

凝集素是一类具有糖专一性、可使细胞凝集的糖蛋白^[1],它能与糖专一性、非共价可逆结合,广泛存在于植物、动物等生物细胞膜上、细胞质内和细胞外基质中,与细胞间的粘着、细菌的感染宿主、受体介导的胞饮、宿主巨噬细胞清除入侵细菌、胚胎发育和机体代谢的调节控制、精子与卵细胞的识别、分子或离子的传递、雌性受粉、共生固氮、植物防御病原体入侵和保护造血干细胞^[2-6]等生理过程密切相关。

大蒜(*Allium sativum* L.)属百合科葱属,为多年生宿根草本植物,具有消毒和杀菌作用。孙

册^[7]从大蒜鳞茎中分离出能够凝集哺乳动物兔等红血球的甘露糖或甘露糖复合物专一性含糖凝集素,由 47.5kD 和 26.5kD 的两个亚基组成,富含 Asp、Glu、Val、Tyr、Leu 等氨基酸,等电点 pI 为 6.0。

本文参照孙册^[7]方法略加改动,采用硫酸铵沉淀、离子交换和分子筛层析分离出大蒜凝集素,并研究物理和化学因素对凝集素生物学活性的影响,为揭示凝集素生物活性与其分子学构象的关系和进一步开发利用大蒜资源提供理论基础。

* 收稿日期:2009-07-25 修回日期:2009-11-20

基金项目:乐山师范学院科研项目资助。

作者简介:刘 超(1967—),男,硕士,副教授,主要从事生物化学教学与相关科学研究。E-mail:machao1967@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

试验用大蒜和动物血液采自四川乐山市农贸市场。DEAE-Sepharose、CM-Sepharose 和 Sephacryl S-200 来自 Sigma 公司国内分装试剂,其余试剂均为分析纯。所用溶剂均为双蒸水配制。

1.2 方法

1.2.1 大蒜凝集素样品的制备 参照孙册^[7]方法改动,并参考文献[8]的方法将大蒜鳞茎经匀浆、浸取(0.85%生理盐水)、硫酸铵分级沉淀、阴离子交换层析(DEAE-Sepharose 柱,pH 8.0 磷酸缓冲溶液,0~0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱)、阳离子交换层析(CM-Sepharose,pH 4.6Tris-HCl 缓冲溶液,0~0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱)和 Sephacryl S-200 分子筛层析(pH 7.4 磷酸缓冲溶液洗脱)得到凝集素样品,用生理盐水稀释,4℃保存备用。

1.2.2 血细胞悬液的制作 取动物血样,加少许抗凝剂,用生理盐水混匀离心(2 500 r/min,15 min)洗涤 3 次,去上清液,红细胞沉淀用生理盐水稀释至 2%,4℃保存备用。

1.2.3 大蒜凝集素凝集活性的测定 在 96 孔“V”型血凝板上倍比稀释法^[8]测定,检查凝集活性^[9]。

1.2.4 温度对大蒜凝集素凝集活性的影响 按 10℃温度梯度在 30~100℃范围内,恒温 30 min 后用冰水迅速冷却至室温,倍比稀释测定凝集活性^[10]。

1.2.5 pH 对大蒜凝集素凝集活性的影响 大

蒜凝集素样品在不同的 pH 缓冲液中(pH=2.0,2.5,3.5,4.0,4.5,5.8,6.0,6.4,7.2,8.0)充分透析 2 h 后测定凝集活性^[10]。

1.2.6 金属离子对凝集素凝集活性的影响 用 0.02 mol/L 的 EDTA 对大蒜凝集素进行充分透析,检测其对兔红血细胞的凝集活性;于重蒸水透析去 EDTA 后分别加入 0.01 mol/L 的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} ,再检测凝集活性^[11]。

1.2.7 变性剂对大蒜凝集素凝集活性的影响 用生理盐水配制 1 mol/L 盐酸胍及 0.01 mol/L 的 SDS 溶液。在倍比稀释后的大蒜凝集素中分别加入盐酸胍和 SDS 溶液,静置 4 h 后,检测凝集活性^[12]。

2 结果与分析

2.1 大蒜凝集素对不同种类代表动物血红细胞凝集活性的影响

表 1 表明,大蒜凝集素对不同血红细胞的凝集活性不同,大蒜凝集素对兔等哺乳动物血红细胞的敏感性最高,凝集性最强,与孙册^[7]研究结果一致。而对鸟类鸡血红细胞的凝集活性稍低,鱼血红细胞遇到大蒜凝集素发生溶血现象。细胞凝集是高度复杂的反应,凝集素识别细胞表面的特异性糖基团,选择性地使不同种类的细胞凝集。可能由于兔血红细胞中的受体数量更多或者兔血红细胞表面具有特定的甘露糖结构成分^[8],所以大蒜凝集素对兔血红细胞的凝集活性高于对鸡血红细胞的凝集活性。

表 1 凝集素在不同动物血红细胞中的凝集活性

Table 1 Hemagglutinating activities of lectin samples in different animal erythrocytes

红血球来源 Origin of erythrocyte	大蒜凝集素的质量浓度 /(μg/mL) Concentration of <i>Allium sativum</i> L. lectin											
	500	250	125	62.5	31.5	15.3	7.6	3.8	1.9	0.95	0.48	0.24
兔 Rabbit	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	—	—	—
鸡 Chicken	++	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
鱼 Fish	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

注 Note:“+++”.最强凝集活性 The highest hemagglutinating activity;“++”.强凝集活性 Higher hemagglutinating activity;“+”.凝集活性 Hemagglutinating activity;“—”.不凝集 Without hemagglutinating activity;“H”.溶血 Hemolysis。下同 The same as below.

2.2 不同温度对大蒜凝集素凝集活性的影响

试验结果表明(图 1),在 30~80℃这一梯度内,随着温度的上升,大蒜凝集素的凝集活性下降,当温度上升到 70℃、80℃时,凝集素完全失活。表明大蒜凝集素和其他凝集素^[11-13]一样具有较强的热稳定性。当高温加热的凝集素进行检测

时还有大量的红细胞沉淀,此时所表现的不是凝集活性,而是表现出大量蛋白质变性,而产生的沉降,空间结构的改变使原有的蛋白失去活性。

2.3 不同 pH 对大蒜凝集素凝集活性的影响

表 2 表明,当 pH 在 4.0~7.2 范围内时,大蒜凝集素均有一定的凝集活性,其中在 pH 为 5.8

2.5 变性剂对大蒜凝集素凝集活性的影响

从表 3 可以看出,盐酸胍与 SDS 能使大蒜凝集素的活性几乎完全丧失,说明大蒜凝集素对变性剂的稳定性较差,不如其他凝集素,如黄精凝集素^[11] 只有当盐酸胍浓度达到 6 mol/L 时才会失去活性。

3 结 论

大蒜凝集素 ASL 能凝集哺乳动物兔等血红血球。凝集素在 70℃ 以下具有凝集活性,表明大蒜凝集素有较强的热稳定性。凝集活性最适 pH 为 4.5~6.4,其凝集活性部分依赖于金属离子,对变性剂的稳定性较差。

参考文献:

[1] Sharon N, Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugarspecific proteins[J]. Science, 1972(177): 949-959.

[2] Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules[J]. Glyco-biology, 2004, 14 (11): 53-62.

[3] Rhodes L L, Haywood A J, Fountain D W. FITC-conjugated lectins as a tool for differentiating between toxic and nontoxic marine dinoflagellates[J]. Oceanographic Literature Review, 1996, 43 (6): 578-579.

[4] Maliarik M I, Goldstein I J . Photoaffinity Labeling of the Adenine Binding Site of the Lectins from Lima Beans, *Phaseolus lunatus* , and the Kidney Bean, *Phaseolus vulgaris* [J]. J Biol Chem, 1988(263): 1124- 1127.

[5] Liao W R, Lin J Y, Shieh W Y, *et al.* Antibiotic activity of

lectins from marine algae against marine vibrios[J]. Journal of industrial microbiology biotechnology, 2003, 30(7): 433-439.

[6] Xu Xiao-Chao, Zhong Shao-Dong, Kai Fan, *et al.* Preparation and Characterization of a Novel Recombinant Human Parathyroid Hormone (1-34) Analog (Gly1-Gln26-rhPTH (1-34)) with Enhanced Biological Activity [J]. Protein and Peptide Letters, 2008, 15(8): 854-860.

[7] 孙 册, 莫汉庆, 于丽萍, 等. 大蒜凝集素的分离纯化及性质研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1987, 19 (3): 189-194.

[8] 熊川男, 赵小明, 尹 恒, 等. 菊芋凝集素的分离鉴定及菊芋蛋白促进家兔离体回肠蠕动的研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4): 137-142.

[9] 陈毓荃, 王春梅, 张文激. 水飞蓟综合利用基础研究: 水飞蓟凝集素[J]. 西北农业学报, 1998, 7(2): 88-90.

[10] Chao Liu, Xi Zhao, Xiao-Chao Xu, *et al.* Hemagglutinating activity and conformation of a lactose-binding lectin from mushroom *Agrocybe cylindracea* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 42 (2): 138-144.

[11] 孙 慧, 赵辰光, 齐义鹏, 等. 一种新杨树菇凝集素的纯化及生化特性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19 (1): 96-102.

[12] 鲍锦库, 曾仲奎, 周 红. 黄精凝集素 II 分子稳定性与生物学活性研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1996, 12 (6): 748-752.

[13] 常丽青, 吴传芳, 吕鸿周, 等. 红花石蒜球茎凝集素的纯化及性质研究[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11 (2): 164-167.

[14] 陈奖励, 何昭阳, 赵 文. 水产微生物学[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 338-339.