

文章编号 1000-5013(2003)03-0295-05

麒麟菜粗多糖中多糖与蛋白质结合方式

肖美添¹ 李 锋^④ 唐凤翔^④ 郭养浩^④⁽¹⁾ 华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362011;^④ 福州大学药物生物技术与工程研究所, 福建 福州 350002)

摘要 从海藻麒麟菜中提取的粗多糖含有一定量的蛋白质, 采用 Sevag 法在除麒麟菜粗多糖蛋白质, 则蛋白质与多糖以相同的比例减少. 粗多糖酸解液的 pH 调整为 11.0 后, 经凝胶 Sephadex G-100 层析, 能使蛋白质部分分离, 而酸性条件无法使之分离. 实验结果表明, 粗多糖中蛋白质不是以游离的形式存在, 可能以离子键方式与多糖分子中的硫酸根聚阴离子相结合. 提取麒麟菜多糖和纯化过程中, 控制合适的 pH 条件有利于分离蛋白质.

关键词 麒麟菜, 粗多糖, 蛋白质分离, 结合方式

中图分类号 TQ 460.31 Q 949.29+3.4

文献标识码 A

海藻多糖是海藻的重要组成部分, 主要是高分子碳水化合物. 近年来研究表明, 海藻多糖除了具有传统的工业价值外, 还具有多种生物活性和药用功能, 诸如增强免疫、细胞诱导分化, 以及抗肿瘤和抗病毒的作用等^[1-7]. 本课题是从麒麟菜中提取红藻多糖, 进行衍生化修饰, 并已证实该红藻多糖具有较强的抗流感病毒活性^[8]. 为了从红藻中得到较纯的多糖, 需要对所提取的粗多糖进行除蛋白处理. 因此, 本文将探讨蛋白质与多糖相互作用的方式, 揭示红藻粗多糖中蛋白质的结合或存在形式. 研究为进一步研究红藻多糖的高级结构和抗流感病毒活性, 奠定了理论基础.

1 实验部分

1.1 材料与试剂

耳突麒麟菜(*Eucheuma cottoni*)干品(以下简称麒麟菜, 购自厦门水产研究所), 牛血清白蛋白(购自 Fluka 公司), Sephadex G-100(购自 Pharmacia 公司). 其它试剂均为分析纯.

1.2 分析方法

1.2.1 蛋白质含量的测定 取 100 mg 牛血清白蛋白, 溶于 100 mL 水中, 分别吸取体积(mL)为 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 和 1.8 样品, 用蒸馏水定容至 2.0 mL. 以 2.0 mL 蒸馏水作为空白对照, 用紫外分光光度计(280 nm)测定蛋白含量. 在本实验条件下, 在蛋白质浓

收稿日期 2003-01-24

作者简介 肖美添(1968-), 男, 讲师, 在职博士研究生, E-mail: mt-xiao@hqu.edu.cn

基金项目 福建省教育厅科研基金资助项目(K02014)

©1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度为 $0.03 \sim 0.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 其 OD 值(y)与蛋白质含量(x)成线性关系. 即 $y = 1.573x$, $r^2 = 0.9992$. 将待测多糖样品稀释到一定的倍数, 取 2.0 mL 于试管中, 以 2.0 mL 蒸馏水作为空白对照. 用紫外分光光度计(280 nm)测定其 OD 值, 根据回归方程算出样品的蛋白质含量.

1.2.2 多糖溶液中总糖含量的测定 采用文献 [9] 的苯酚-硫酸法测定.

1.2.3 多糖的总氮含量测定 采用文献 [10] 中测定. 凯氏定氮法(仪器为基尔特克 2300 自动定氮仪).

1.3 实验方法

1.3.1 粗多糖的提取和 Sevag 法除蛋白 称取一定量的麒麟菜, 剪碎并用自来水漂洗干净. 将其放入大烧杯中, 加入 50 倍的热水, 于 95°C 下搅拌加热 3 h . 将多糖粗提液离心 10 min ($5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 收集上清液, 分为两部分. 一部分加入 3 倍该体积, 0.95 的换成质量分数或体积分数乙醇沉淀多糖, 在 4°C 下静置 60 min . 用绢布压榨除去乙醇, 于 60°C 下真空干燥沉淀物, 经研钵磨碎得到麒麟菜粗多糖. 另一部分多糖上清液与 Sevag 试剂按 $5:1$ (体积比) 的比例混合(Sevag 试剂的组成为氯仿和正丁醇按 $5:1$ (体积比) 的比例配制), 剧烈摇震 30 min , 使蛋白质变性成为不溶物. 离心 10 min ($5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 并收集上清液, 重复以上操作 5 次去除蛋白. 每一步除蛋白后, 取样, 测定多糖含量和蛋白质含量. 计算蛋白质占多糖干物质的百分比, 比较每一次除蛋白后该百分数的变化情况.

1.3.2 酸解液的凝胶柱层析 将麒麟菜粗多糖配成质量分数为 0.01 的溶液, 用 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸调节其 pH 值至 2.0 , 并于 100°C 下酸解 30 min . 取两份酸解液, 一份维持 pH 不变, 另一份用 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调节 pH 值至 11.0 . 各取两种酸解液 2.0 mL 上样, 进行凝胶柱层析. 凝胶柱层析条件为 Sephadex G-100($1.6 \text{ cm} \times 90 \text{ cm}$), 磷酸盐(PBS)缓冲液洗脱, 分部收集器收集, 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 每 10 min 收集一管. 其后来用硫酸-苯酚法测定多糖含量, 采用紫外检测法测蛋白质的含量.

1.3.3 不同方法提取的麒麟菜多糖中蛋白质含量测定 按上述方法得到的水提液多糖, 以及经一次醇析的多糖和经两次醇析的多糖, 分别用凯氏定氮仪和紫外检测法测定其蛋白质的含量. 碱处理法是指将一定量的麒麟菜干品浸泡在质量分数为 0.20 的 NaOH 溶液中, 一定时间后倾去碱液, 用自来水反复冲洗藻体, 直至 pH 为中性. 然后, 按照上述方法提取多糖, 并用凯氏定氮仪和紫外检测法测定其蛋白质含量.

2 结果与讨论

2.1 粗多糖的提取和 Sevag 法除蛋白

表 1 为 Sevag 法除蛋白后, 蛋白质与多糖含量的测量值. 表中上清液中多糖含量为 C_1 、干

表 1 Sevag 法除蛋白后多糖与蛋白质含量变化

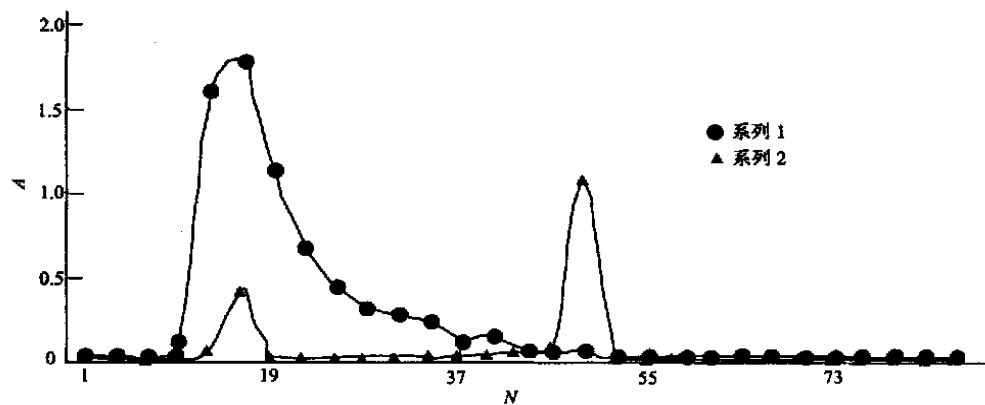
| 项 目 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| $C_1/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 5.76 | 4.34 | 3.69 | 3.40 | 2.69 | 2.39 |
| $C_2/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 17.02 | 14.80 | 12.19 | 11.4 | 8.90 | 7.70 |
| $C_3/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 1.39 | 1.20 | 0.97 | 0.91 | 0.70 | 0.61 |
| w | 0.0810 | 0.0812 | 0.0795 | 0.0804 | 0.0787 | 0.0795 |

物质含量为 C_2 及蛋白质含量为 C_3 , 则可计算干物质中蛋白质的质量分数. Sevag 法是分离纯

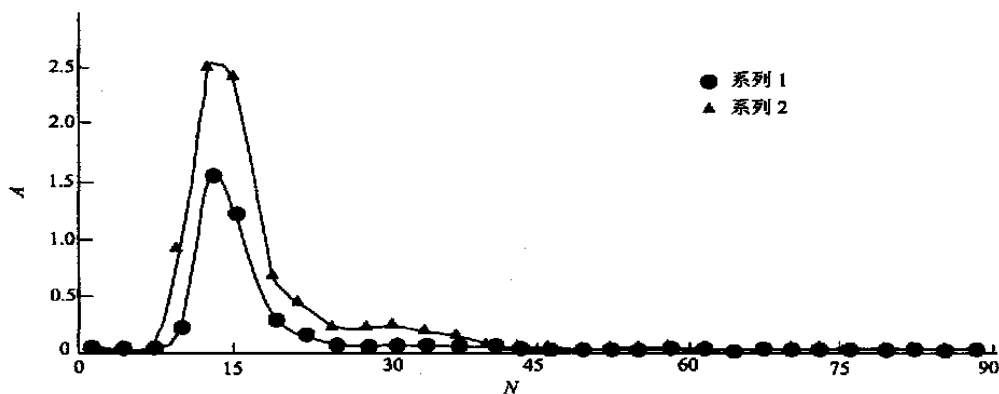
化多糖中除蛋白的经典方法,能有效地去除多糖中游离的蛋白质.本文按照常规的 Sevag 方法进行了除蛋白实验.从表中的结果可以看出,每一次除蛋白质后,上清液中多糖、干物质及蛋白质含量都逐渐减少,但蛋白质与干物质的比例变化不大.即每经过一次 Sevag 法除蛋白,多糖和蛋白质均以相近的比例被除掉.如果麒麟菜多糖中蛋白质是以游离形式存在的话,那么经过一次 Sevag 法除蛋白后,干物质中蛋白质的比例都会有所减少.由此可知,耳突麒麟菜中蛋白质并不是以游离的形式存在,而可能是与多糖以某种方式结合存在.

2.2 酸解液凝胶柱层析

天然海藻多糖是高分子化合物,分子量很大,有几十万到几百万不等.这就需要选择合适的降解方法,方可得到规定的小分子量多糖,提高其生物活性.本研究用稀硫酸降解多糖,并采用凝胶柱层析的方法对酸解液进行分离.为了进一步考察多糖中蛋白质的存在方式,将酸解液分为两部分,一部分 pH 值调为 11.0,另一部分维持 pH 为 2.0 时,分别进行 Sephadex G-100 凝胶柱层析,层析图如图 1(a),(b) 所示.柱层析条件为上样 2.0 mL, PBS 缓冲液(pH=7.0),流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,每 10 min 收集一管(管号 N).其中系列 1 的吸光值(A)为 280 nm,反映



(a) pH= 11.0



(b) pH= 2.0

图 1 多糖酸解液 G-100 凝胶柱层析

的是蛋白质浓度变化;系列 2 的吸光值为 490 nm,反映的是多糖的浓度变化情况.蛋白质的等

电点一般在 pH 值为 4.0~5.0, 当将溶液的 pH 值调到 2.0 时, 蛋白质带正电荷. 由于麒麟菜多糖为含硫酸根的聚阴离子多糖, 此时蛋白质与多糖通过离子键静电结合. 当将 pH 值调到 11.0 时, 高于蛋白质的等电点, 蛋白质带负电荷. 此时, 从大分子整体上来讲, 蛋白质不会与多糖静电结合, 而是以游离的形式存在. 但从局部来讲, 一些氨基酸残基中游离的 $-NH_3^+$ 仍然会与多糖中带负电荷的硫酸基结合. 凝胶柱层析的原理是利用分子筛效应, 在其有效的分子量分离范围内, 分子量大的物质先被洗脱出来, 而分子量越小的物质越后被洗脱出来. 故从进行凝胶柱层析的效果来看, 当 pH 值为 2.0 时, 蛋白质与多糖通过离子键紧密结合, 二者被同时洗脱下来, 达不到分离的效果. 当 pH 值为中性时, 凝胶层析效果与 pH 值为 2.0 时颇为相似(未列出); 而当 pH 值为 11.0 时, 大部分蛋白质是以游离的形式存在, 小部分蛋白质仍然与多糖结合在一起. 小部分的蛋白质与多糖结合在一起, 分子量大于游离下来的蛋白质, 所以这一部分先洗脱出来. 另外的蛋白质由于是以游离的形式存在, 分子量较小, 则被单独洗脱出来. 故采用这种方法能达到部分分离的效果.

2.3 不同方法提取的麒麟菜多糖中蛋白质含量测定

采用不同方法提取的麒麟菜多糖中蛋白质含量, 如表 2 所示. 水提液多糖指的是没有经过

表 2 不同方法提取的多糖中蛋白质含量对比

| 项 目 | 水提液多糖 | 一次醇析多糖 (粗多糖) | 二次醇析多糖 | 粗多糖经 24 h NaOH 处理 | 粗多糖经 48 h NaOH 处理 |
|-----------------|-------|-----------------|--------|----------------------|----------------------|
| $N_{总}^a$ / (%) | 1.31 | 1.20 | 0.83 | 0.70 | 0.48 |
| P^a / (%) | 8.15 | 7.47 | 5.19 | 4.39 | 3.02 |
| P^b / (%) | 8.10 | 7.2 | 5.50 | 4.25 | 3.40 |

醇析的多糖, 而一次醇析多糖(粗多糖)和二次醇析多糖, 是指水提液多糖用乙醇醇析一次和两次所得到的多糖. 本文采用碱处理一段时间(24 h 或 48 h)后, 再热水提取多糖. 与传统的碱法提取多糖不同, 其目的是使蛋白质在一定碱性条件下解离, 但必须使多糖所含的硫酸根不流失或少流失. 表中, $N_{总}^a$, P^a 分别表示用凯氏定氮法测得的总氮含量及计算得到的蛋白质含量, P^b 表示用 OD₂₈₀ 比色法所测得的蛋白质含量. 从表中的结果可以看出, 用凯氏定氮法和用 OD₂₈₀ 比色法所测得的蛋白质含量大致相当. 经过乙醇醇析和碱液处理都能降低多糖中蛋白质的含量, 特别是经过碱处理能大幅度地降低蛋白质的含量. 这也说明了在碱性条件下, pH 值高于蛋白质的等电点. 这使得蛋白质带负电荷, 与多糖中的硫酸根阴离子不能通过离子键结合而分离. 它证实了在麒麟菜粗多糖中, 蛋白质与多糖之间的作用是一种静电作用.

3 结束语

运用 Sevag 法除蛋白处理, 每一次除蛋白后, 溶液中多糖与蛋白质含量都保持着一定的比例. 这说明麒麟菜粗多糖中, 蛋白质不是以游离的形式存在, 可能以离子键方式与多糖分子中的硫酸根聚阴离子相结合. 酸解液 pH 值调整为 11.0 时, 经凝胶柱层析能分离大部分蛋白质. 在提取麒麟菜多糖和除蛋白过程中, 控制合适的 pH 条件(碱性)有利于分离蛋白质.

参 考 文 献

1 徐明芳, 高孔荣, 刘婉乔等. 海藻多糖及其生物活性[J]. 水产科学, 1996, 15(6): 8~10

- 2 管华诗, 耿美玉, 王长云等. 21 世纪中国的海洋药物[J]. 中国海洋药物, 2000, 76(4): 44 ~ 47
- 3 Witvrouw M, Dederq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs [J]. Gen. Pharmacol., 1997, (29): 497 ~ 511
- 4 Carlucci M J, Ciancia M, Arena A, et al. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structure types[J]. Antiviral Research, 1999, 43(2): 93 ~ 102
- 5 Caceres P J, Carlucci M J, Damonte E B, et al. Carrageenan from Chilean samples of stenogramme interrupta (Phyllophoraceae): Structure analysis and biological activity[J]. Phytochemistry, 2000, 53(1): 81 ~ 86
- 6 Haslin C, Lahaye M, Pellegrini M et al. In vitro anti-HIV activity of sulfated cell-wall polysaccharides from Gametic, carposporitic and tetrasporic stages of the Mediterranean red alga *Asparagopsis armata*[J]. Planta Med., 2001, 67(4): 301 ~ 305
- 7 Yamada T, Ogamo A, Merionde T, et al. Preparation of O-acylated low-molecular-weight carrageenans with potent anti-HIV activity and low anticoagulant effect[J]. Carbohydrate Polymers. 2000, 41: 115 ~ 120
- 8 李 锋, 唐风翔, 肖美添等. 耳突麒麟菜多糖的提取、制备及表征[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2003, 31(1): 106 ~ 110
- 9 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 223 ~ 224
- 10 卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典: 第 2 部[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 附录 50

The Mode of Binding Polysaccharide and Protein Together in Crude Polysaccharide of *Eucheume Cottoni*

Xiao Meitian¹ Li Feng^④ Tang Fengxiang^④ Guo Yanghao^④

(¹ College of Mater. Sci. & Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou, China;

④ Inst. of Pharma. Biotech. & Eng., Fuzhou Univ., 350001, Fuzhou, China)

Abstract Certain amount of proteins are contained in the crude polysaccharide extracting from the seaweed *Eucheume cottoni*. In removing proteins from crude polysaccharide of *Eucheume cottoni* by adopting Sevag method, both proteins and polysaccharide reduce in same proportion. The crude polysaccharide liquid of acidolysis is passed through gel Sephadex G 100 chromatography after the value its pH is adjusted to 11.0, partial separation of proteins can be occurred but separation of protein can not be occurred in acid medium. As shown by experimental result, protein does not exist freely in crude polysaccharide; proteins may bind in the form of ionic bonds to polyanion of sulfate radicals in polysaccharide molecule. During extracting and purifying polysaccharide from *Eucheume cottoni*, controlling suitable pH condition is advantageous to the separation of protein.

Keywords *Eucheume cottoni*, crude polysaccharide, separation of protein, the mode of binding