

文章编号 :1009-038X(2000)01-0050-04

水溶性蛋白聚糖 AP-1 的分离纯化和鉴定*

陈石良¹, 谷文英¹, 许正宏¹, 沈爱英¹, 陶文沂¹, 蒋達良², 李 蓁²

(1. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 张家港市微生物研究所, 江苏张家港 215600)

摘 要 利用人工栽培的姬松茸子实体干品,经热水提取,乙醇沉淀,蛋白酶法和 Sevag 法相结合去蛋白, H_2O_2 脱色, DEAE-Sephadex A-25 和 Sephadex G-200 柱纯化,得到姬松茸蛋白聚糖 AP-1。葡聚糖凝胶柱层析分析表明,该蛋白聚糖为均一物质,相对分子质量为 124 000。紫外扫描表明有核酸和蛋白质的特征吸收峰。红外扫描显示有典型的多糖吸收峰。纸层析和气相色谱分析表明,其单糖组成为葡萄糖、甘露糖、半乳糖以及核糖,其物质的量之比(摩尔比)为 1.19:0.56:0.43:0.54。

关键词 :姬松茸;蛋白多糖;分离;纯化

中图分类号 :Q538 文献标识码 : A

Isolation, Purification and Identification of Polysaccharide AP-1

CHEN Shi-liang¹, GU Wen-ying¹, XU Zheng-hong¹, SHENG Ai-ying¹, TAO Wen-yi¹,
JIANG Kui-liang², LI Zhen²

(1. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036;

2. Zhangjiagang Institute of Microorganism, Zhangjiagang 215600)

Abstract : A protein-polysaccharide AP-1 was isolated from the fruit bodies of *Agaricus blazei* Murill. It was further purified by DEAE-Sephadex A-25 and Sephadex G-200, and its homogeneity was verified by gel filtration chromatography. The components of AP-1 were identified by paper and gas chromatography. It was composed of D-Glc, D-Man, D-Gal, D-Rib in the molar ratio of 1.19:0.56:0.43:0.54. Its molecular weight was estimated to be 124 000.

Key words : *Agaricus blazei* Murill; protein-polysaccharide; purification; isolation

姬松茸(*Agaricus blazei* Murill)又名小松菇、巴西蘑菇,是一食药兼用的珍稀食用菌,具有极高的营养价值和药用价值,特别是在防癌、抗癌以及降血糖等方面有奇效,被日本食用菌业和医学界称为“奇迹的蘑菇”、“地球上的最后食品”^[1]。因此,近年来在日本形成食用姬松茸热。我国于 1992 年从

日本引进该菌种,并对其生态学特性、栽培方法、产品加工、营养成分分析等方面进行了大量的比较系统的研究^[2]。现已成功开发人工栽培技术,并在全国许多地区推广培植。据水野卓等^[3]研究报道,姬松茸子实体中含有多种抗肿瘤活性多糖体,其抑瘤率高达 99%,令世人关注。但是,迄今国内尚未见到

* 收稿日期:1999-04-26;修订日期:1999-11-10。

作者简介:陈石良(1969 年 9 月生),男,湖南邵阳人,油脂与植物蛋白工程博士研究生。
万方数据

有关姬松茸多糖的研究报道. 为了深入开发利用这一珍稀食药菌资源, 发挥其潜在的药用价值和经济价值, 作者对姬松茸多糖进行了系列研究, 本文报道其水溶性蛋白聚糖 AP-1 的分离纯化、理化性质及组成分析.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 姬松茸由福建省三明真菌研究所提供.

1.1.2 母种培养基 马铃薯 20 g/dL, 葡萄糖 2 g/dL, 琼脂 2 g/dL.

1.1.3 子实体栽培料 稻草 150 kg, 猪粪 24 kg, 菜饼 9 kg, 清糠 3 kg, 石灰 4.5 kg, 石膏粉 1.5 kg, 过磷酸钙 1.5 kg, 尿素 1.5 kg, 水 300~400 kg.

1.1.4 试剂 Dextran 标准品、DEAE-Sephadex A-25、Sephadex G-200 均为 Pharmacia 公司产品, D-核糖为 Sigma 公司产品, D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖 均为上海化学试剂二厂产品, 其余试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 子实体栽培 采用室内床栽法^[4].

1.2.2 多糖的分离纯化 按图 1 所示的流程进行.

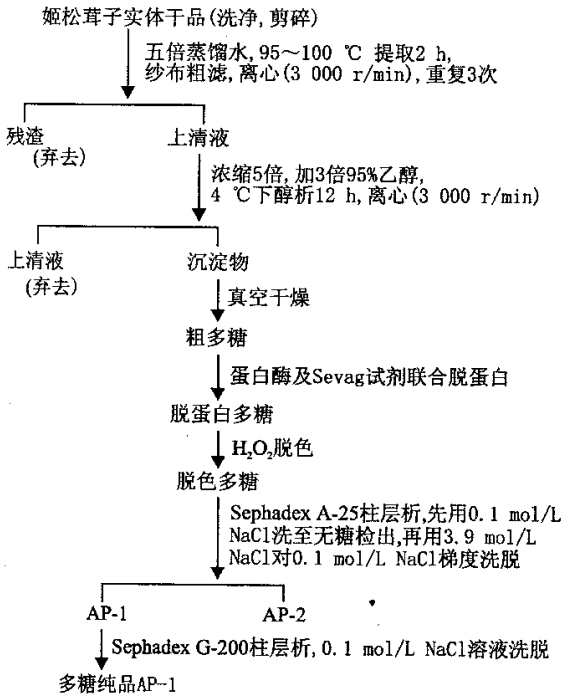


图 1 AP-1 的分离纯化流程图

Fig. 1 Schematic diagram of isolation and purification of AP-1

1.2.3 多糖的糖含量测定 苯酚-浓硫酸法^[5], 以

葡萄糖为标准.

1.2.4 多糖的蛋白质含量测定 凯氏定氮法^[6].

1.2.5 多糖比旋光度测定 采用 WZZ 自动显示旋光仪^[7].

1.2.6 多糖的粘度测定 采用 Rotational Viscometer NDJ-1 粘度计^[7].

1.2.7 多糖的纯度鉴定 采用凝胶过滤法^[8].

1.2.8 多糖相对分子质量测定 取 10 mg 蓝色葡聚糖溶于最小体积的 0.9% NaCl 溶液中, 上柱层析, 层析柱(80 cm×1.7 cm)为 Sephadex G-200 柱, 洗脱液为 0.9% NaCl 溶液, 洗脱速度(体积流量)为 3 mL/h, 测得外水体积, 然后用相对分子质量分别为 10 000, 40 000, 70 000, 90 000 的 Dextran 标准品相继上柱, 分别求出它们的洗脱体积, 再对相对分子质量作图, 得到相对分子质量标准曲线, 最后取 AP-1 样品 10 mg 按上述条件上柱, 测其洗脱体积, 求出多糖 AP-1 的相对分子质量.

1.2.9 多糖的光谱分析 紫外光谱测定: 将多糖配成质量浓度为 500 μg/mL 的溶液, 采用 UV-300 扫描(200~400 nm), 红外光谱测定: 取 2 mg AP-1, 与 KBr 压片, 用 IR-400 扫描. 根据红外光谱和紫外光谱的测定结果进行分析.

1.2.10 多糖组分的纸层析分析 取 AP-1 样品 10 mg 溶于 2 mL 的 1 mol/L 硫酸溶液中, 封管, 100 °C 水解 8 h, 用碳酸钡中和水解液, 过滤, 浓缩, 点样分析. 纸层析采用新华中速层析滤纸, 展开剂为醋酸乙酯-吡啶-水(10:4:3), 显色剂为苯胺-邻苯二甲酸, 显色后, 于 105 °C 加热 10 min, 观察层析结果并与相应的标准品对照.

1.2.11 多糖的气相色谱分析 取多糖 10 mg, 按上述方法进行水解, 中和, 过滤, 浓缩, 然后将其制成还原乙酰化衍生物, 进行气相色谱分析. 气相层析采用 5% OV-225, Chromosorb WAW-DMCS(80~100 目), 岛津 GC-RIA 气相色谱仪, 柱温 210 °C, 载气 N₂ 40 mL/min, 氢火焰检测器. 根据标准单糖与样品的保留时间的比较, 确定组成单糖种类, 并根据各峰面积计算出其物质的量之比(摩尔比).

2 结果与分析

2.1 物理性质

姬松茸多糖纯品 AP-1 为淡黄色粉末, 易溶于水, 不溶于高浓度的乙醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂, 水溶液呈淡黄色透明, 10% 水溶液 pH 为 6.2, 2% 溶液比旋光度为 $[\alpha]_D^{20} = +55^\circ$, 2% 溶液粘度为 2 400 cPa. 采用凝胶过滤色谱法, 测得 AP-1 的

相对分子质量为 124 000.

2.2 化学定性反应

姬松茸多糖与硫酸-苯酚反应显阳性,与茚三酮和双缩脲试剂反应均呈阳性,表明其含有糖和蛋白质.

2.3 纯度鉴定

经 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离(图 2),得两种多糖组分 AP-1 和 AP-2. 多糖 AP-1 经 Sephadex G-200 柱层析纯化后(图 3),洗脱峰为单一对称峰,糖峰和蛋白峰出现的位置重叠,表明多糖 AP-1 是单一均匀的蛋白多糖. 苯酚-硫酸法和凯氏定氮法分别测得 AP-1 的糖质量分数为 84.6%,蛋白质质量分数为 12.5%.

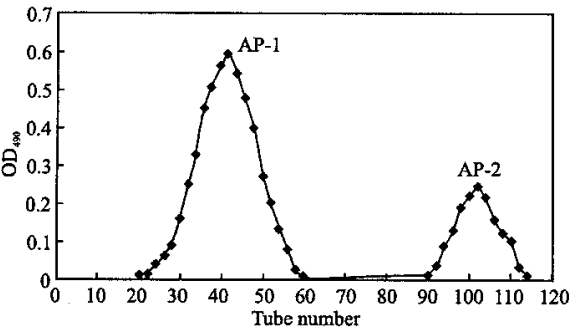


图 2 AP-1 的 DEAE-Sephadex A-25 柱层析

Fig.2 Chromatogram of AP-1 on DEAE-Sephadex A-25

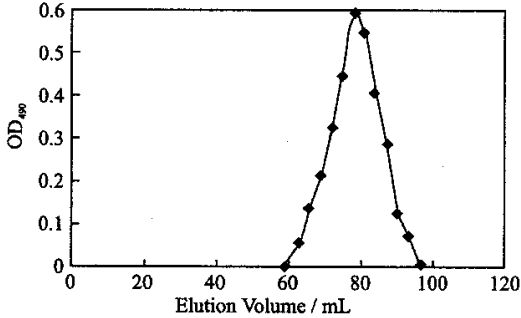


图 3 AP-1 的 Sephadex G-200 柱层析

Fig.3 Chromatogram of AP-1 on Sephadex G-200

2.4 光谱分析

将 AP-1 溶解后作紫外光谱分析,测定结果显示(图 4),在 200 nm 和 280 nm 处有特征吸收峰,表明含蛋白质和核酸类物质. 红外光谱测定结果如图 5 所示,在 $2\,930\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,400\text{ cm}^{-1}$ 以及 $1\,247\text{ cm}^{-1}$ 处有 3 个特征峰,它们分别代表了糖类 C—H 的伸缩振动与变角振动,因而进一步确定了 AP-1 是糖类化合物. $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,050\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别代表了 O—H 的伸缩振动和变角振动. 在 898 cm^{-1} 的吸收峰则代表了吡喃环 β -基端差向异构的

C—H 变角振动,证明了 AP-1 有吡喃糖的 β -糖苷键结构,而目前已发现的具有显著抑瘤活性的多糖糖苷键构型大多为 β -型^[9]. 位于 $1\,640\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,540\text{ cm}^{-1}$ 处的两个吸收峰是 N—H 变角振动所引起的,说明 AP-1 含有氨基.

2.5 糖组成分析

多糖纯品经水解后纸层析,以醋酸乙酯-吡啶-水(10:4:3)为展开剂,与相应的标准品对照,结果表明姬松茸多糖 AP-1 水解物中含有 4 种单糖(图 6),它们是葡萄糖、半乳糖、甘露糖和核糖,若以半乳糖的 R_f 值为 1,则它们的相对 R_f 值之比为:Gal:Glc:Man:Rib = 1:1.29:1.45:1.65. 多糖纯品水解物经气相色谱分析(图 7),进一步证实了它含有葡萄糖、甘露糖、半乳糖和核糖,其物质的量之比(摩尔比)为 Glc:Gal:Man:Rib = 1.19:0.56:0.43:0.54.

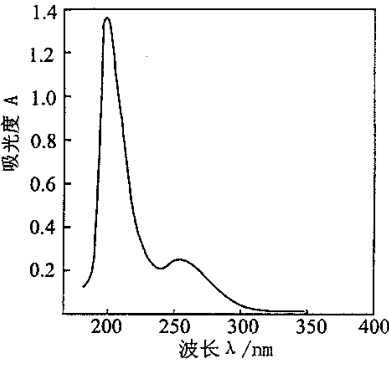


图 4 AP-1 的紫外吸收光谱

Fig.4 UV Spectrum of AP-1

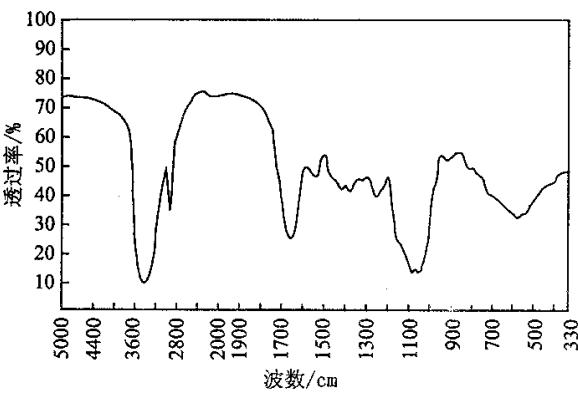


图 5 AP-1 的红外吸收光谱

Fig.5 IR Spectrum of AP-1

3 讨 论

1) 姬松茸水溶多糖至少含有两种组分 AP-1 和 AP-2. 从图 2 可知 AP-1 为其主要组分且纯度比

AP-2 更高 因此先对 AP-1 组分的理化性质及单糖组成进行分析 ,另一组分 AP-2 的性质与结构将另作报道.

2) 初步研究表明 ,AP-1 为一含有葡萄糖、甘露糖、半乳糖和核糖等 5 种单糖的杂多糖 ,具有多糖和蛋白质的特征吸收峰 ,并具 β -型糖苷键. 这与

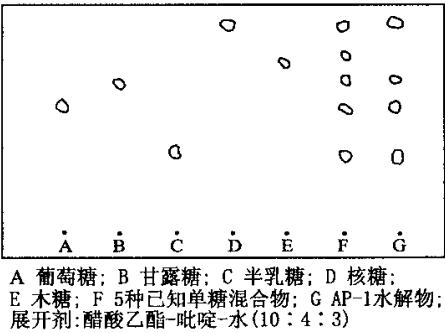


图 6 AP-1 的水解物纸层析图谱

Fig.6 Paper chromatogram of hydrolysates of AP-1

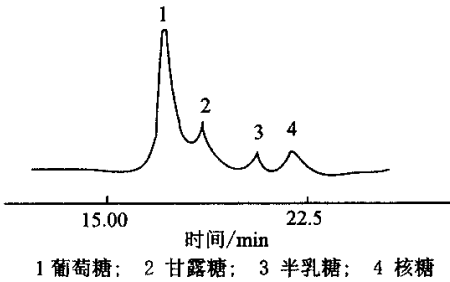


图 7 AP-1 水解物气相色谱图

Fig.7 GC chromatogram of hydrolysates of AP-1

Mizuno ,Takashi 等^[10]报道的同类多糖基本相似. 但他们分离得到的水溶性多糖主要由葡萄糖和半乳糖组成 ,其物质的量之比(摩尔比)为 Glc:Gal = 100 :17 ,并含有少量甘露糖、木糖、岩藻糖和核糖 ,这可能是由于采用的菌种和栽培基质不同 ,故得到的子实体多糖的组分有一定差异.

3) 提取真菌多糖的方法主要有水提或稀盐、稀碱提取 ,为防止糖苷键断裂 ,应尽量避免酸性条件下提取. 作者采取热水浸提 ,以便提取分离到水溶性多糖. 水提之后的残渣可进一步进行盐提和碱提. 有关盐溶性和碱溶性多糖 ,正在研究之中.

4) 初次得到的多糖粗品一般都混有蛋白质、色素等杂质. Sevag 法^[11]去除蛋白质 ,在避免多糖降解上有较好的效果. 但要达到除尽游离蛋白质的目的 ,需反复多次处理. 作者选用蛋白酶与 Sevag 试剂联合脱蛋白 ,有利于降低多糖折损 ,减少脱蛋白操作次数 ,提高分离效率. 色素的去除常采用活性炭吸附法 ,但多糖也同时被吸附 ,难以洗脱分离 ,多糖损失大^[12]. 故此 ,采用 H₂O₂ ,40 ℃ 氧化脱色 ,取得了理想的效果. 经过脱蛋白、脱色等步骤后得到的多糖通常是多糖的混合物 ,其进一步纯化可采取分级沉淀、离子交换色谱法、凝胶过滤色谱法或凝胶电泳法等. 作者先用 DEAE-纤维素柱层析 ,将酸、中性多糖分离 ;然后再经 Sephadex G-200 柱层析 ,分离分子大小不同的多糖组分. 结果表明 ,通过这两步处理完全可以得到组分均一的纯多糖.

5) 水溶性多糖 AP-1 的抗肿瘤作用及免疫促进作用有待于进一步研究.

参考文献

[1] IWADE T , ITO H. Miracle Himematsutake[M]. Tokyo :Chiku-sha ,1982. 1~152
[2] 史刚荣. 姬松茸研究的现状与展望[J]. 江苏食用菌 ,1995 ,16(3) 22~23
[3] 水野 卓 ,川合正允. きのての化学[M]. 东京 :学会出版ニタ - ,1992. 223~228
[4] 李蓁 蒋達良. 姬松茸引种栽培试验[J]. 食用菌 ,1997 6 :14~15
[5] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海 :上海科技出版社 ,1987.
[6] 李建武编. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京 :北京大学出版社 ,1994.
[7] 李兆兰. 裂褶菌胞内多糖的分离纯化鉴定及其性质[J]. 真菌学报 ,1994 ,13(4) 267~272
[8] 林卓坤主编. 色谱法(一) [M]. 北京 :科学出版社 ,1982.
[9] 陈国良. 灵芝有效成分研究综述[J]. 中国食用菌 ,1996(4) :7~8
[10] MIZUNO TAKASHI. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from Himematsutake ,the fruiting body of Ablzei Muril[J]. Agric Biol Chem ,1990 ,54(11) 2889~2896
[11] STAUB A M. Removal of proteins Sevag Method Method[J]. Methods in Carbohydr Chem ,1965(5) 5~6
[12] 张翼伸. 云芝多糖的分离与鉴定[J]. 吉林师范大学学报 ,1979(2) :108~115