

文章编号:1009-038X(2004)01-0017-04

松口蘑菌丝体糖蛋白 MP 的性质及其结构

刘萍^{1,2}, 陶文沂^{1*}, 敖中华¹

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 中国农业大学 食品学院, 北京 100083)

摘 要: 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳、红外、紫外扫描、气相色谱、氨基酸组成、 β -消除反应等方法研究松口蘑菌丝体糖蛋白 MP 的结构性质, 结果表明, 该糖蛋白的相对分子质量为 57 000, 红外扫描有典型的多糖吸收峰, 糖苷键为 α 型; 单糖组成为葡萄糖和木糖, 摩尔比(r)为 34 : 1, 紫外扫描有蛋白质吸收峰, 蛋白质量分数为 75.5%, 多糖为 24.5%, 多糖与蛋白质为 O-糖肽键连接。

关键词: 松口蘑; 菌丝体; 糖蛋白; 结构性质

中图分类号: Q 513.2

文献标识码: A

Structural Characteristics of Glycoprotein from Mycelium of *Tricholoma Matsutake* Sing.

LIU Ping^{1,2}, TAO Wen-yi^{1*}, AO Zhong-hua¹

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. College of Food Science and Nutritional Engineering, Chinese Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Structural characteristics of the glycoprotein MP from the mycelium of *Tricholoma matsutake* Sing. were determined by SDS-PAGE, infra-red scan, gas chromatography, and β -elimination reaction. The SDS-PAGE electrophoresis results showed that MP was a new glycoprotein. Its molecular weight is 57 000 containing 75.5% protein and 24.5% polysaccharide. The glycoprotein has O- glycoside peptide bond, with Gly and Ser being the major amino-acids. It includes α -type glycosidic linkage, and the glucose and xylose composition (molar) ratio in its reductive sugar is 34 : 1.

Key words: *Tricholoma matsutake* Sing; Glycoprotein MP; structural characteristics

松口蘑(*Tricholoma matsutake* Sing.)是赤松等树木的活体共生菌, 又称松茸、松蕈或松蘑。松口蘑菇体肥厚, 香气宜人, 肉质鲜美, 有很高的营养价值与特殊功效, 抑癌率高达 90% 以上, 列菌类之首, 日本人称之为“菇中之王”^[1]。河村幸雄(1994)将松口蘑子实体经水提取、凝胶过滤、阴离子交换树脂和疏水色谱层析后获得具有抗肿瘤活性的酸性糖蛋白^[2]。作者发现在松口蘑深层发酵菌丝体中存在

着一种糖蛋白, 该物质对体外培养的宫颈癌细胞 HeLa 细胞和动物体内肿瘤细胞 S-180 均具有较强的抑制增殖活性, 是一种潜在的抗肿瘤药物^[3]。本实验采用气相色谱(GC)、红外光谱(IR)、紫外、电泳、氨基酸分析等技术对松口蘑菌丝体糖蛋白 MP 的化学结构进行了初步的探讨。

收稿日期: 2003-04-10; 修回日期: 2003-09-10.

作者简介: 刘萍(1970-), 女(满族), 吉林长春人, 讲师, 工学博士, * 通讯作者。

万方数据

1 材料与方法

1.1 实验材料

松口蘑菌种:购自上海农科院菌种保藏中心.

1.2 松口蘑菌丝体糖蛋白提取

松口蘑菌丝体深层培养方法参见文献[4]. 松口蘑菌丝体匀浆后水提取,上清液加入 70% 饱和度的硫酸铵盐析,蛋白质组分经 DEAE 离子交换柱和 Sepharose CL-6B 柱层析获得菌丝体糖蛋白 MP,经凝胶色谱和电泳证明为相对分子质量分布均一级组分.

1.3 实验方法

1.3.1 相对分子质量测定 将标准相对分子质量蛋白质与 MP 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,以标准蛋白质的迁移率为纵坐标,lgM 为横坐标,绘制相对分子质量曲线. 根据 MP 迁移率得出相对分子质量^[5].

1.3.2 糖含量测定 苯酚-硫酸法,以葡萄糖为标准品^[6].

1.3.3 蛋白质测定 Folin-酚试剂法,以牛血清白蛋白为标准品^[7].

1.3.4 单糖组成分析 气相色谱法测定单糖组成及摩尔比(r).

称取 10 mg 样品、30 mg 硼氢化钠和 5 mg 内标物肌醇,2 mL 水,振荡后室温下放置 1.5 h,使糖还原成相应的糖醇. 滴入醋酸分解硼氢化钠,至无气泡产生为止. 溶液在 60℃ 下减压浓缩至干,加入体积分数 0.1% 盐酸甲醇溶液 2 mL,振荡后减压蒸发至干,重复 4 次以除去硼酸根. 剩余物在 105℃ 烘箱中加热 15 min 除去水分,加入 0.5 mL 吡啶和 0.5 mL 醋酸酐,封管后在沸水浴中反应 1 h,反应产物直接进行气相色谱分析. 根据气相色谱分析中各峰的面积比计算出 r . 气相色谱分析条件:色谱柱为弹性石英毛细管柱,内径 0.32 mm,长 30 m;担体为 Chromosorb WAW DMCS(80-100 目);固定液为 3% OV-1701;载气 N_2 ,体积流量 1.5 mL/min;氢火焰检测器(FID);气化室温度 260℃;检测温度 250℃;程序升温:180℃(3 min)→240℃(30 min). 根据标准单糖与样品的保留时间比较,确定组成单糖种类,并根据各峰面积计算出 r .

1.3.5 红外光谱分析 取 MP 10 mg 与 KBr 压片,用 IR-440 扫描.

1.3.6 氨基酸组成分析 准确称取 MP 50 mg,以 6 mol/L HCl 溶解,封管,水解 24 h 后定容至 50 mL,取 1 mL 溶液,加 0.02 mol/L HCl 溶解后用氨

基酸自动分析仪分析. 氨基酸自动分析仪为日立-835 型.

1.3.7 紫外光谱分析 将 MP 配成 5 mg/mL 的溶液,采用 UV-3000 在 200~500 nm 之间进行扫描.

1.3.8 MP 中糖苷键连接方式的确定 MP 用 0.2 mol/L NaOH 于 60℃ 处理 30 min;对照样品按同样方法配制,配好后立即放入 4℃ 冰箱,测定其在 220~400 nm 的吸收光谱.

2 结果与分析

2.1 基本物理性质

MP 为白色粉末,易溶于水,不溶于乙醇等有机溶剂. 硫酸-苯酚、硫酸-蒽酮、硫酸-咔唑反应,考马斯亮蓝反应呈阳性;菲林试剂、碘-碘化钾反应呈阴性,表明其中含有多糖、蛋白质、糖醛酸,不含还原糖和淀粉. 糖质量分数为 24.5%,蛋白质质量分数为 75.5%.

2.2 MP 的相对分子质量

经 SDS-PAGE 测得 MP 的亚基相对分子质量为 57 000(见图 1).

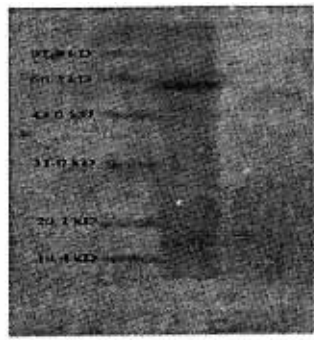
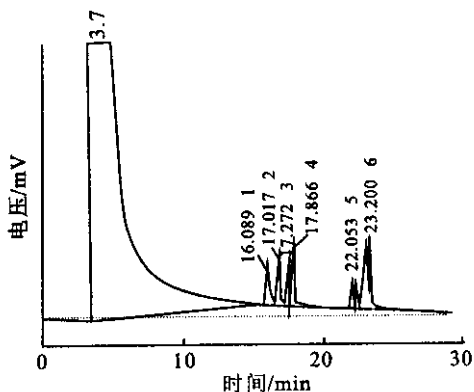


图 1 MP 的 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig. 1 The SDS-PAGE electrophorase of MP

2.3 单糖组成

GC 分析结果见图 2,3.



1. 鼠李糖; 2. 阿拉伯糖; 3. 木糖; 4. 甘露糖; 5. 葡萄糖; 6. 半乳糖

图 2 标准单糖的气相色谱

Fig. 2 GC of Standard Sugars

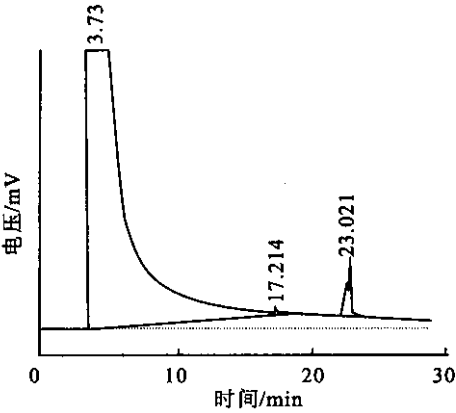


图 3 MP 水解物的气相色谱
Fig. 3 GC of Hydrolysates of MP

从标准单糖和 MP 的单糖组成气相色谱中可以看出,MP 含有葡萄糖和木糖,葡萄糖与木糖摩尔比为 34 : 1.

2.4 红外光谱分析

从图 4 中可以看出,MP 在 1 530,1 630 和 3 420 cm^{-1} 有明显吸收峰. 根据文献,在 3 200 ~ 3 600 cm^{-1} 之间的吸收峰主要是由多糖游离羟基的伸缩振动引起的;在 2 800 ~ 3 000 cm^{-1} 的吸收峰是 C-H 伸缩振动,这一区域的吸收峰是糖类的特征吸收峰. 1 630 cm^{-1} 处的吸收峰是 -CHO 的 C=O 伸缩振动造成的,为肽链上酰胺羰基的吸收峰,在 840 cm^{-1} 处有一明显的吸收峰,这是 α -型 C-H 变角振动的特征吸收峰,表明存在 α -糖苷键. 本品在 1 530 cm^{-1} , 1 630 cm^{-1} , 3 420 cm^{-1} 处明显的吸收峰,表明样品既含蛋白质又含有糖,为糖蛋白^[8].

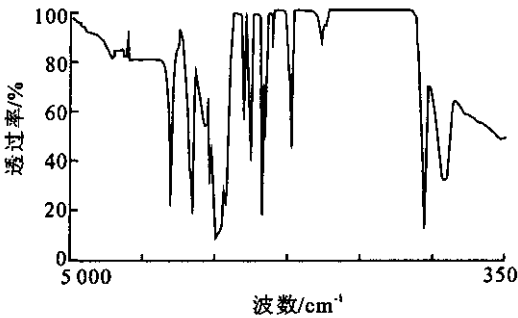


图 4 MP 的红外光谱
Fig. 4 The infrared spectrum of MP from the mycelium of *T. Matsutake*

2.5 氨基酸组成

MP 的氨基酸组成见表 1. 从表中可以看出,MP 以 Gly 和 Ser 含量最高,其次是 Glu, Asp, Val 和 Lys. 万方数据

表 1 MP 糖蛋白氨基酸组成及质量分数
Tab. 1 The amino acid composition and content of glycoprotein MP

氨基酸种类	质量分数/%	氨基酸种类	质量分数/%
Asp	8.363	Ile	2.523
Thr	4.953	Leu	5.832
Ser	11.88	Tyr	0.778
Glu	9.664	Phe	3.844
Gly	29.243	Lys	6.172
Val	8.857	His	1.671
Met	1.656	Arg	4.560

2.6 紫外光谱分析及 β -消除反应

从图 5,6 中可以看出,MP 在 260 nm 处无吸收,在 280 nm 左右有一肩形峰,这是蛋白结合多糖的特征吸收峰. 在植物糖蛋白中,目前主要发现的糖肽键有 2 种类型,一种是 N-型糖肽键,另一种是 O-型糖肽键. 前者对碱稳定;后者极易被碱打开,在糖肽连接处,若为丝氨酸即转变成 α -氨基丙烯酸,若为苏氨酸,则转变为 α -氨基丁烯酸. 这两种不饱和氨基酸,均在 230 ~ 240 nm 处有特征紫外吸收. MP 经碱处理后在 240 nm 处产生明显的特征吸收峰,说明 MP 中的糖肽键为 O-糖肽键^[9].

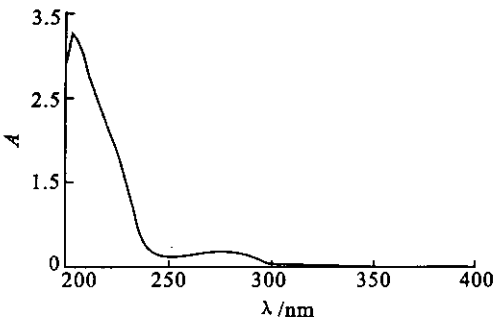


图 5 MP 的紫外光谱
Fig. 5 UV Spectrum of MP

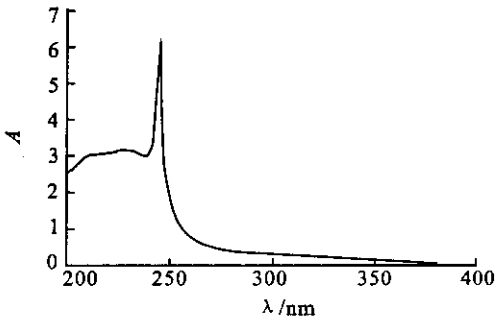


图 6 MP 经 β -消除反应后的紫外光谱
Fig. 6 UV Spectrum of MP after β -reaction

3 结 论

本实验对松口蘑菌丝体抗肿瘤活性物质 MP 的理化性质与结构进行了初步研究,发现 MP 为白色粉末,含蛋白质与多糖,相对分子质量约为 57 000,含有蛋白质质量分数 75.5%,多糖质量分

数 24.5%.综合红外光谱、紫外光谱、 β -消除反应、氨基酸组成等的检定结果表明,MP 为含有 O-糖肽键的糖蛋白,多糖主要由葡萄糖和木糖组成,摩尔比为 34 : 1,含糖基类型为 α -型,氨基酸组成以 Gly 和 Ser 为主要氨基酸.

参考文献:

[1] 王伯徽. 食用及药用菇系列报道(十):松茸[J]. 食品工业,1991,23(1):42—46.

[2] 河村幸雄. 新規抗肿瘤蛋白質とその製造法および該蛋白質を有効成分として含有する抗肿瘤剤[P]. 公开特许公报, JP6 80699[4 260532](Cl C 07K 15/10),1994-03-22.

[3] 刘萍,陶文沂,孙志浩,等. 松茸菌丝体糖蛋白 MTSGS1 抗癌活性及作用机理的研究[J]. 药物生物技术, 2001,8(5):284—287.

[4] 刘萍,陶文沂,孙志浩,等. 松口蘑菌丝体深层发酵工艺研究[J]. 微生物学通报, 2002,29(5):5—9.

[5] 柯丽霞,杨晓彤. 金针菇菌丝体糖蛋白(FMGP)的提取及其理化特征[J]. 中国食用菌,1997,17(4):40—42.

[6] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.

[7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976,72:248.

[8] 王晨,田庚元. 糖蛋白中糖链的结构研究[J]. 化学通报,1994,(5):7—11.

[9] Plantner J J, Carlson D M. Studies of mucin-type glycoproteins olefinic amino acids, products of the β -elimination reaction [J]. Anal Biochem,1975,65:153—163.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 16 页)

[3] 刘道宏. 果蔬采后生理[M]. 北京:农业出版社,1995. 14—15.

[4] 张兰,郑永华. 酸处理对蚕豆保鲜的效果[J]. 食品工业科技,2003,24(4):76—77.

[5] 刘玲. 香菇保鲜技术[J]. 植物杂志,2001,(5):28.

[6] 苏云中,蓝枫. 香菇保鲜技术研究及应用[J]. 食用菌,1997,19(3):38—39.

[7] Yiping-Gong, Ueda-Y, Abe-K,*et al.* Study of phenol oxidases on browning of shiitake (*Lentinus edodes* Sing.) mushroom [J]. J Food Sci Technol,1995,(6):1143—1146.

(责任编辑:杨 勇)