

木菠萝凝集素的纯化与性质研究*

Purification and Property of Lectins from the Jack Fruit (*Artocarpus heterophyllus*)

周素芳 周德义 张承禄 邓勇 吴耀生
Zhou Sufang Zhou Deyi Zhang Chenglu Deng Yong Wu Yaosheng

(广西医科大学生化教研室 南宁市滨湖路 6号 530021)

(Department of Biochemistry, Guangxi Medical
University, 6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 木菠萝种子经抽提、40%~60%饱和度硫酸铵沉淀和 Gal-Sepharose 6B亲和层析,得到纯化的木菠萝凝集素 (Jacalin)。Jacalin分子量约为 58 200,由分子量分别是 14 000和 15 800的亚基组成,等电聚焦电泳显示多条区带,其 pI 为 5.7~8.65, Schiff's试剂染色证明它是一种糖蛋白, N末端为精氨酸和甘氨酸。Jacalin能凝集除山羊、鸡以外的多种动物和人 A、B、O和 AB血型红细胞,凝集活性受 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc)和半乳糖 (Gal)抑制。在 pH值为 4.5~10, pH改变不影响 Jacalin凝集活性。

关键词 木菠萝凝集素 纯化 性质

Abstract The lectin of Jack Fruit (Jacalin) was isolated and purified from the seeds of the Jack Fruit by precipitate of 40%~60% saturation ammonium sulfate and affinity chromatography on Gal-Sepharose 6B. Jacalin had an apparent molecular weight of about 58 200 and is composed of two kinds of subunits which had molecular weight 14 000 and 15 800, respectively. Isoelectric focusing on polyacrylamide gel showed that Jacalin gave a spread of components with calculated isoelectric point between 5.7 and 8.65. Jacalin is a glycoprotein by assay of Schiff's stain. The two N-terminals are arginine and glycine. Jacalin could agglutinate red blood cells.

Key words lectin of Jack Fruit, purification, property

随着对凝集素的广泛深入研究,凝集素作为一种工具已广泛用于细胞表面糖链结构、免疫学、肿瘤、生殖生理等诸多方面的研究^[1]。自 1979年 Chatterjee等报道木菠萝种子抽提液富含凝集素 (Jacalin)以来,对于 Jacalin的研究国外在近些年已有很多报道^[2~4],但国内这方面报道极少。木菠萝 (*Artocarpus heterophyllus*)属桑科桂木属,为亚热带、热带植物。我们采用 Gal-Sepharose 6B亲和层析法从广西产木菠萝种子中纯化其凝集素,并对它的理化性质进行研究,现报道如下:

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 木菠萝种子:从本地市场购回木菠萝鲜果,取

种子,清水洗净,40℃左右吹干,于-15℃贮存。

1.1.2 人 A、B、O血型红细胞:广西医科大学一附院提供;动物红细胞,广西医科大学动物室提供各种动物,按常规采血制备,以阿氏液 4℃保存。

1.1.3 试剂和仪器: Sepharose 6B Sephadex G100等电点测定的标准蛋白、层析用低分子量标准蛋白均为 Pharmacia产品; SDS电泳用标准蛋白为 Sigma产品;标准氨基酸、丙烯酰胺为 Merck产品,其余均为国产分析纯试剂。日立 835-50氨基酸分析仪、日立 100-40型紫外分光光度计 (日本产品); 721-型分光光度计 (湖南益阳仪表厂产品); BS42型稳流稳压电泳仪 (北京生化仪器厂产品)。

1.2 方 法

1.2.1 Gal-Sepharose 6B的制备:参考 Matsumoto等方法^[5],用环氧氯丙烷活化 Sepharose 6B,然后加入半乳糖 (Gal),40℃水浴振荡 24 h,完成 Gal与

1995-10-04收稿。

* 国家自然科学基金资助项目 (项目编号 39260023)。

广西科学 1996年 2月 第 3卷第 1期

Sepharose 6B交联,洗涤除去未交联的 Gal 装柱,以 0.01 mol/L的 PBS (pH值 7.2) 充分平衡,于 4°C下贮存备用

1.2.2 凝集活力测定与糖抑制试验:按常规方法在 V型血凝板上操作^[1]。各种糖浓度均为 0.2 mol/L,凝集素蛋白浓度为 0.1 mg/mL

1.2.3 PAGE^[6]:采用 pH值 4.3的凝胶系统,凝胶浓度为 10%,板状电泳

1.2.4 SDS-PAGE 参阅 Sigma Chemical Company 低分子量标准蛋白电泳说明书进行 凝胶浓度 10%。

1.2.5 等电聚胶:在李士鹏等方法^[7]基础上加以改进,以 pH值 3.5~ 9.3的标准蛋白作参考。

1.2.6 Sephadex G100层析:按张龙翔方法^[8]。

1.2.7 糖蛋白染色: Schiff's 染色^[11]。

1.2.8 N末端氨基酸分析: DNS-Cl法^[9]。

1.2.9 氨基酸组成分析:用日立 835氨基酸自动分析仪测定。

1.2.10 pH对凝集活力的影响^[3]。

2 结果

2.1 Jacalin的纯化

木菠萝种子粉用 0.01 mol/L的 PBS(pH值 7.2) 抽提,粗提液经 40%~ 60%饱和度硫酸铵沉淀,少量 PBS溶解沉淀,对 PBS充分透析,上 Gal-Sepharose 6B柱,先用平衡液洗脱直到 A₂₈₀降至 0.0以下后换 0.2 mol/L的 Gal继续洗脱(表 1 图 1) 活力集中在 Gal洗脱峰,凝集素回收率为 71.2%,纯化近 6倍。

2.2 纯度

Jacalin电泳后经考马斯亮兰染色出现一条较粗的主带。在粗带上方有一条很弱的细带。如经 Schiff's 碱染色,这两条带均着红色 说明它们均为糖蛋白(图 2)

表 1 木菠萝凝集素的纯化

Table 1 Purification of *Artocarpus heterophyllus* lectin

成分 Fraction	总蛋白 Total protein (mg)	凝集活力 Hemagglutinating activity (ug)	总活力 Total activity	比活力 Specific activity (Activity /mg Protein)	纯化倍数 Purification fold	回收率 Recovery (%)
粗提液 Crude extract	2880	0.047	6.13 × 10 ⁴	2.13 × 10 ⁴	1	
40%~ 60% (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀液 40%~ 60% (NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitate	806	0.015	5.37 × 10 ⁴	6.67 × 10 ⁴	3.1	87.7
半乳糖洗脱峰 Elution peak of Gal	349	0.008	4.36 × 10 ⁴	1.25 × 10 ⁵	5.9	71.2

* 凝集活力以 50%人红细胞发生凝集所需的凝集素微克数表示 The hemagglutinating activity is expressed as amount in micrograms of lectin required for 50% agglutination of fresh human erythrocyte.

图 1 木菠萝凝集素在 Gal-Sepharose 6B柱上洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of *Artocarpus heterophyllus* lectin on Gal-sepharose 6B column

图 2 a 纯化木菠萝凝集素的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (pH值 4.3)

b 木菠萝凝集素糖蛋白染色图谱

Fig. 2 a. Electrophoretogram of *Artocarpus heterophyllus* lectin on PAGE (pH= 4.3)

b. Photography of *Artocarpus heterophyllus* lectin on stain of glycoprotein

2.3 Jacalin的理化性质

2.3.1 分子量. 将层析用低分子量标准蛋白及 Jacalin分别上 Sephadex G100进行层析, 据其洗脱体积求出分子量为 58 200 在含或不含巯基乙醇条件下进行 SDS-PAGE, 均得到两条蛋白质带 (图 3), 粗带分子量为 14 000, 细带为 15 800, 其中两者比例约为 3:1 推测该 Jacalin 可能是由 3 个分子量为 14 000 的亚基和 1 个分子量为 15 800 的亚基组成的四聚体

细胞发暗变黑, 难以观察结果

表 2 木菠萝凝集素的氨基酸组分分析

Table 2 Amino acid composition of *Artocarpus heterophyllus* lectin (Jacalin)

氨基酸 Amino acid	蛋白百分含量 Protein (g/100 g)	残基数 分子 Residues /Molecule
Asp	10.04	51 (50.77)
Thr	6.97	40 (40.12)
Ser	7.95	53 (53.13)
Glu	8.46	38 (38.13)
Pro	3.60	22 (21.57)
Gly	8.10	83 (82.60)
Ala	2.13	17 (17.44)
Cys	1.19	7 (6.17)
Val	7.19	42 (42.20)
Met	-	-
Ile	6.51	33 (33.48)
Leu	6.45	33 (33.17)
Tyr	9.39	33 (33.49)
Phe	8.69	34 (34.36)
Lys	6.69	30 (30.37)
His	0.54	2 (2.29)
Arg	1.60	6 (5.96)
Trp	1.72	5 (5.38)
NH ₂	2.63	90 (90.03)
Total	100.00	529

* 木菠萝凝集素分子量为 58 200

The molecular weight of Jacalin is 58 200.

- 未检出 Not detected.

3 讨论

目前对凝集素的分离纯化主要采用亲和层析的方法, 制备亲和层析主要通过溴化氰活化和环氧氯丙烷活化的方法。一般认为采用环氧氯丙烷活化的制备的亲和层析更稳定并具有较高亲和力^[10]。Vijayakumar 等^[2]采用环氧氯丙烷活化法制备 GalN Ac-Bio-Gel 亲和层析柱来分离纯化 Jacalin, 凝集素回收率为 75%。由于 GalN Ac 价格昂贵, 一般实验室难以承受 Gal 和 GalN Ac 均是 Jacalin 特异结合的糖, 虽然 Gal 结合力略低于 GalN Ac, 但 Gal 价钱便宜得多, 适合大量制备之用。故我们采用环氧氯丙烷活化的 Gal-

图 3 木菠萝凝集素及标准蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of *Artocarpus heterophyllus* lectin and Calibration Kit

a. 乳清蛋白 (α -lactalbumin, 14 200); b. 胰蛋白酶抑制剂 (Trypsin inhibitor, 20 100); c. 胰蛋白酶原 (Trypsinogen, 24 000); d. 碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase, 29 000); e. 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 000); g. 牛清蛋白 (Bovine albumin, 66 000); f. 卵清蛋白 (Egg albumin, 45 000).

2.3.2 等电聚焦 纯化的 Jacalin 经等电聚焦电泳及考马斯亮兰染色后, 与在相同条件下电泳的标准蛋白比较, 出现 6 条蛋白区带, 在 pH 值 5.7~8.65 之间, 6 条区带相应的 pI 分别是 5.7 6.4 8.0 8.35 8.45 和 8.65

2.3.3 N 末端及氨基酸组成分析 样品经 DNS-Cl 标记后, 于恒沸盐酸中抽真空, 110°C 水解, 蒸干, 用双蒸水溶解后进行聚丙烯酰胺薄膜层析。以同样条件层析 DNS-Cl 标记的标准氨基酸 比较二者, 结果显示 Jacalin 含两个 N 末端: 精氨酸和甘氨酸。氨基酸的组成结果见表 2

2.4 Jacalin 的血凝活性及 pH 的影响

Jacalin 能凝集人 A B O AB 血型及大、小白鼠, 牛, 猪, 鸭等动物红细胞; 而对山羊、鸡的红细胞不发生凝集。表明其有种属专一性。向凝集素溶液中加入 0.2 mol/L 的各种单糖, 测定每种糖对 Jacalin 凝集红细胞的影响, 结果显示 GalN Ac-Gal 较强抑制血凝活性。各种糖抑制作用大小如下: GalN Ac > Gal > 棉子糖 > GlcN Ac-D-木糖、岩藻糖、乳糖和葡萄糖无抑制作用。制备 pH 级差为 0.5 系列的缓冲液, 测定不同 pH 条件下 Jacalin 凝集红细胞的活力。结果提示在 pH 值 > 10 时, 活性明显下降。pH 值 < 4.5 时, 红

Sepharose 6B亲和层析柱,结果显示纯化效果二者相差不多。白桂木、红桂木与木菠萝同属桂木属,红细胞的凝集作用都受 GalNAc和 Gal抑制,我们用 Gal-Sepharose 6B分离纯化白桂木和红桂木,结果也较好。因此 Gal-Sepharose 6B是一种分离纯化 GalNAc和 Gal糖特异性凝集素较好的一种亲和吸附剂。

Ahmed等^[3]报道 Jacalin分子量为42 000,由4个相同的分子量为11 400的亚基组成的四聚体。而 Aucouturier等^[4]报道 Jacalin分子量为54 000,由3个分子量为12 000的亚基和1个分子量为15 000的亚基组成的四聚体。我们的结果与前者有一定差异,而和 Aucouturier报道的相似。这种差异可能是由于木菠萝产地不同,品种差异致使凝集素的组成有差异之故。PAGE显示纯化的凝集素主要为一区带,但等电聚焦电泳 Jacalin确实出现6条区带,显示出不均一性。可能的原因是:其一,该凝集素由两种不同的亚基构成,在组成四聚体时可能有多种组合,但由于亚基分子量相差不多,从总的分子量反映不出它们的差异;其二,可能存在同工凝集素。故在PAGE上还不能显示但在分辨率高的等电聚焦电泳就显示出来了。氨基酸组分分析表明 Jacalin不含 Met, Cys含量极低, SDS-PAGE中,加或不加巯基乙醇均可使凝集素亚基解离,这表明各亚基之间以非共价键结合的。

凝集素在临床医学上有很大应用潜力。通过对木菠萝凝集素纯化及性质的研究,可为对其作进一步研究提供基础资料。

参考文献

1 孙册,朱政,莫庆汉等主编.凝集素.北京:科学出版

社,1988. 117~133

- 2 Vijayakumar T, Forrester T A. Purification and physico-chemical properties of lectins from the Jack Fruit (*Artocarpus integrifolia*). *Biologia Plantarum* (PRAHA), 1986, 28 (5): 370~374
- 3 Ahmed H, Chatterjee B P. Further Characterization and immunochemical studies on the carbohydrate specificity of Jack Fruit (*Artocarpus integrifolia*) lectin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989, 264 (16): 9365~9371.
- 4 Aucouturier P, Mihaesco E, Mihaesco C et al. Characterization of Jacalin, the human IgA and IgD binding lectin from Jack Fruit. *Molecular Immunology*. 1987, 24 (5): 503~511.
- 5 Matsumoto I, Mizuno Y, Seno N. Activation of sepharose with epichlorohydrin and subsequent immobilization of ligand for affinity adsorbent *J Biochem*. 1979, 85 1091~1098.
- 6 何忠效,张树政主编.电泳.北京:科学出版社,1990. 20~38.
- 7 李士鹏,王锦兰,胡幼秋.一种简便的薄层等电聚焦分析电泳装置. *生物化学与生物物理进展*, 1984, (2): 72~74.
- 8 张龙翔主编.生物化学实验技术.北京:人民教育出版社,1988. 124~132
- 9 徐秀璋主编.蛋白质顺序分析技术.北京:科学出版社,1988. 95~97.
- 10 Matsumoto I, Kitagaki H, Akaiy et al. Derivatization of epoxy-activated agarose with various carbohydrates for the preparation of stable and high-capacity affinity adsorbents. Their use for affinity chromatography of carbohydrate-binding proteins. *Anal Biochem*. 1981, 116 103~110.

(责任编辑 蒋汉明 邓大玉)

(上接第8页 Continue from page 8)

- 4 Chen Zong-xuan, Gao Shi-an. The complex oscillation theory of certain non-homogeneous linear differential equations with transcendental entire coefficients, *J. Math Anal App*, 1993, 179 (2): 403~416.
- 5 Chen Zong-xuan, Gao Shi-an, On the complex oscillation of non-homogeneous linear differential equations with meromorphic coefficients. *Kodai Math J*, 1992, 15, (1): 65~78.
- 6 Gao Shi-an, On the complex oscillation of solutions of non-homogeneous linear differential equations with poly-

nomial coefficients. *Comment Math Univ St Paul*, 1989, 38 (1): 11~20.

- 7 Gao Shi-an, Two theorems on the complex oscillation theory of non-homogeneous linear differential equations. *J Math Anal App*, 1991, 162 (2): 381~391.
- 8 Hayman W. Meromorphic functions. Amen House, London E. C. 4 Oxford University Press, 1964. 21~24.
- 9 Hille E. John Wiley & Sons, Inc. 1976.
- 10 庄圻泰,杨重骏.亚纯函数的不动点与分解论.北京:北京大学出版社,1988. 52.

(责任编辑 蒋汉明)