

小球藻糖蛋白的分离、纯化和结构分析

李亚娜^{1*} 林永成¹ 余志刚¹ 周利平²

(1. 中山大学化学博士后流动站 广州 510275; 2. 湖南省科技厅 长沙 410000)

摘要 采用柱层析分离纯化小球藻糖蛋白,并对其进行结构分析。结果表明,小球藻糖蛋白为白色粉末,产率为鲜藻的 0.28%,易溶于水,分子量约为 65,000 Da,属 O-连接方式,蛋白质含量为 12.01%,糖链部分含有岩藻糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖。

关键词 小球藻糖蛋白;分离;纯化;结构分析

ISOLATION, PURIFICATION AND STRUCTURE DETERMINATION OF CHLORELLA GLYCOPROTEIN

LI Ya-na^{1*}, LIN Yong-cheng¹, SHE Zhi-gang¹, ZHOU Li-ping²

(1. Chemistry Postdoctor of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Science and Technology Office of Hunan Province, Changsha 410000, China)

Abstract CPG was isolated and purified by column chromatography. Then its structure was studied. The results showed that CPG is the white solid powder and easily dissolved in water. Productivity is 0.28% (wet weight). The molecular weight is 65,000 Da. The linkage between glycan and core protein backbone is O-linkage. The protein content was up to 12.01%. The saccharide chain was composed of fucose, xylose, mannose, glucose, galactose.

Key words CPG isolation; purification; structure determination

糖蛋白 (Glycoprotein) 是一类由糖类同多肽或蛋白质以共价键连接而形成的结合蛋白^[1]。其结合方式主要有两种: 糖和含羟基的氨基酸以糖苷形式结合,称为 O 连接; 糖和天冬酰胺基连接,称为 N 连接。在生物体内它以不同的形式存在而发挥作用,是细胞膜、细胞间基质、血浆、粘液、激素等的重要构成成分^[2]。小球藻为绿藻门 (Chlorophyta) 小球藻属 (*Chlorella*) 普生性单细胞绿藻,该属约 10 种,我国常见的种类有椭圆小球藻、普通小球藻等。小球藻分布广,生长速度快,易于培养。日本、美国等国家将小球藻作为优良食品或饲料添加剂已有三十多年历史^[3]。

目前,小球藻与螺旋藻、盐藻等微藻的开发利用构成了我国食品领域的一个重要分支,具有广阔的

前景^[4]。小球藻粉蛋白质含量颇高,是优良的单细胞蛋白源,其中含有的小球藻糖蛋白大量存在于藻粉蛋白生产的废水之中,若采用适当的手段将其分离提取,将产生显著的经济效益和社会效益。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小球藻:由广东省海南文昌养殖场提供;透析袋:美国 Sigma 公司,分子截量 1000 Da;二乙氨基乙基 (DEAE) 52: Whatman 公司;葡聚糖凝胶 (Sephadex) G100:瑞典 Pharmacia 公司;硼氢化钠:美国 Sigma 公司;其它试剂均为化学纯或分析纯。

1.2 主要仪器与设备

LKB 自动柱层析系统;Beckman 高速冷冻离心机;岛津 UV-120 紫外可见分光光度计;日立 835-50 型氨基酸自动分析仪;岛津 IR-440 型傅立叶红外仪;GC-9A 型气相色谱仪;ZK-82A 真空干燥箱。

收稿日期:2004-04-22 接受日期:2004-05-18

基金项目:国家自然科学基金项目 (30200226)

*通讯作者 E-mail: nayali@sohu.com

1.3 试验方法

1.3.1 小球藻糖蛋白(CPG)的分离纯化^[5-7]

称取一定量的小球藻在 60 ℃ 烘干并粉碎,加适量水浸提 3 次,取其水溶液部分经无水乙醇沉淀,所得沉淀物用适量蒸馏水溶解后,透析 4 d。收集透析内液,离心(4500 rpm) 30 min,取上清液,真空干燥后即得小球藻糖蛋白粗品(淡黄色粉末)。粗品依次经 DEAE-52 柱层析(1.6 cm × 20 cm), 0.05 mol/L、0.1 mol/L、0.5 mol/L 碳酸氢钠溶液阶段洗脱; Sephadex G100 柱层析, 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.2) (1.6 cm × 80 cm) 洗脱,洗脱后经检测得到一陡峭的大峰,收集此峰即得小球藻糖蛋白纯品(白色粉末)。

1.3.2 小球藻糖蛋白(CPG)的鉴定

1.3.2.1 CPG 的纯度鉴定及分子量的测定^[2,6-8]

小球藻糖蛋白的粗品和纯品同时进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度为 15%,电极缓冲液为 pH = 8.3 的 1.5 mol/L Tris-Gly-SDS 溶液,采用考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色液为 7% 冰乙酸。同时,采用小牛白蛋白、卵蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶原、 β -乳球蛋白和溶菌酶作分子量标准。溴酚蓝为指示剂,其迁移率为 1.0,以各蛋白质相对迁移率对分子量对数作出标准曲线,根据小球藻糖蛋白纯品的相对迁移率可求得其分子量。

1.3.2.2 糖含量的测定:苯酚-硫酸法,以葡萄糖为标准品^[9]

1.3.2.3 蛋白质含量的测定:Folin-酚法,以牛血清白蛋白为标准品^[10]

1.3.2.4 水分和灰分含量的测定:水分用烘干法测定,灰分用灼烧法测定^[10]

1.3.2.5 小球藻糖蛋白的氨基酸组成:日立 835-50 型氨基酸自动分析仪

1.3.2.6 小球藻糖蛋白的单糖组成分析^[11]

取 CPG 10 mg 置于安瓿管中,分别加入 2 mL 2 mol/L 三氟醋酸(CF_3COOH),封管,置于烘箱 120 ℃ 水解 2 h,冷至室温,用玻璃棉滤去残渣,用少量水洗残渣 2 次,合并滤液,减压蒸干,再加少量水 3 次,减压蒸干以除去残存的 CF_3COOH 。取水解物少许在真空干燥箱中 70 ℃ 减压干燥过夜。分别加入约 10 mg 盐酸羟胺及 1 mL 无水吡啶,温热溶解后在 90 ℃ 反应 30 min,冷至室温,加入 1 mL 无水醋酸酐,在 90 ℃ 下继续反应 30 min,冷至室温,加入 1 mL H_2O 搅拌,再用氯仿萃取 3 次,每次 1 mL,合并

氯仿层,减压抽干。置真空干燥箱减压干燥 24 h。同法制备各种标准单糖的糖腈乙酸酯衍生物,分别进行气相色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 小球藻糖蛋白的一般性质

提纯后的小球藻糖蛋白为白色粉末,产率为鲜藻的 0.28%。易溶于水,不溶于乙醇、丙酮、正丁醇等有机溶剂。当溶液浓度为 1.02 g/mL 时, $\text{pH} \approx 5.8$,特征性粘度为 2.96 MPa·s,比旋度 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +45$ ($C = 0.29, \text{H}_2\text{O}$),紫外吸收峰为 280 nm。

2.2 小球藻糖蛋白样品的主要成分

表 1 小球藻糖蛋白粗品、纯品的主要成分含量(%)

Table 1 Content of components of crude CPG and purified CPG(%)

主要成分 Main compositions	粗品 Crude CPG	纯品 Purified CPG
糖 Sugar	54.6	72.9
蛋白质 Protein	10.3	14.8
水分 Water	10.5	6.1
灰分 Ash	5.4	3.2
其它 Others	19.2	3.0

由表 1 可知,小球藻糖蛋白的糖含量和蛋白质含量均高于粗品,分别增加了 18.3%,4.5%,而其它几种成分都有所下降,经过 DEAE-52 纤维素柱层析和 Sephadex G100 柱层析后,色素等其它成分的下降幅度最大。

2.3 DEAE 52 柱层析纯化小球藻糖蛋白

从图 1 可知,在 DEAE 52 纤维素层析柱上,小球藻糖蛋白粗品经 0.05 mol/L、0.1 mol/L、0.5 mol/L 碳酸氢钠溶液阶段洗脱后,可得到 1 个主峰。收集此主峰部分进行透析干燥,得到白色粉末状的

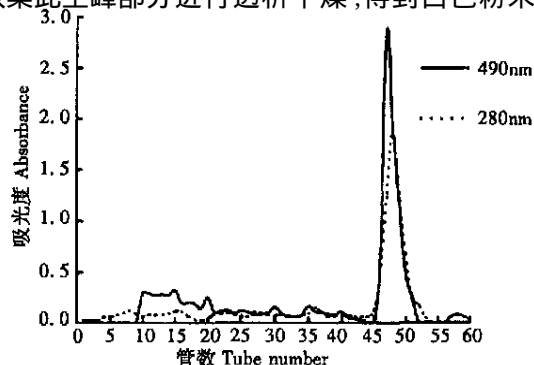


图 1 小球藻糖蛋白在 DEAE 层析柱上的洗脱图

Fig. 1 Elution pattern of CPG on DEAE 52 column

小球藻糖蛋白。

2.4 Sephadex G100 纯化小球藻糖蛋白

将 DEAE 52 柱层析纯化后的小球藻糖蛋白,进一步经 Sephadex G100 柱层析。从图 2 洗脱曲线可知,得到的两个分离主峰中,峰 II 峰值高,峰宽小,分离度好。因此,将所得的峰 II 组分合并,透析后干燥即得到小球藻糖蛋白纯品(白色粉末)。

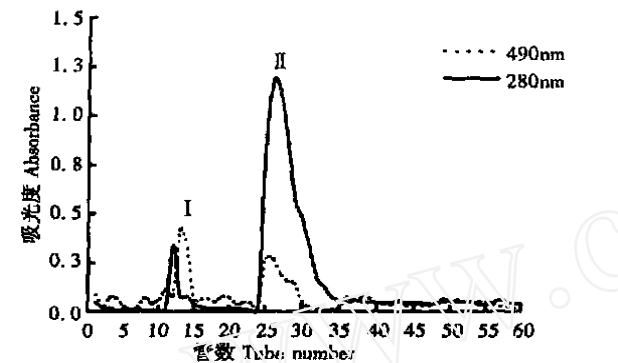


图 2 小球藻糖蛋白在 Sephadex G100 层析柱上的洗脱图
Fig.2 Elution pattern of CPG on Sephadex G100 column

2.5 小球藻糖蛋白分子量的凝胶电泳测定

由图 3 可见,小球藻糖蛋白纯品经 SDS-聚丙烯

酰胺凝胶电泳后,只有唯一的一条染色带,表明小球藻糖蛋白纯品已经得到纯化,其纯度可供生物和理化性质研究。此外,根据小球藻糖蛋白纯品的相对迁移率(MR),可求得分子量,约为 65,000 Da。

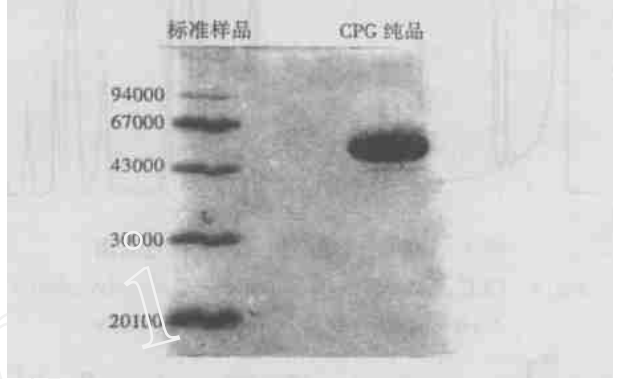


图 3 小球藻糖蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图
Fig.3 The SDS-PAGE photograph of CPG

2.6 小球藻糖蛋白的氨基酸组成分析

将小球藻糖蛋白在 0.1 mol/L 氢氧化钠-1.0 mol/L 硼氢化钠 β -消除反应前后分别经盐酸充分水解后,由氨基酸自动分析仪测定其组分,比较各氨基酸相对含量及其变化,以判断糖蛋白中糖肽键的连接方式,结果如表 2 所示:

表 2 小球藻糖蛋白经 β -消除反应前后的氨基酸组成比较(mg/g)
Table 2 CPG amino acid composition of post and before β -eliminate reaction

氨基酸 Amino acid	消除反应前 Before	消除反应后 Post	氨基酸 Amino acid	消除反应前 Before	消除反应后 Post
天冬氨酸(Aspartic acid)	13.64	13.28	蛋氨酸(Methionine)	1.23	1.38
苏氨酸(Threomine)	8.15	7.93	亮氨酸(Leucine)	7.80	7.38
丝氨酸(Serine)	8.60	5.92	酪氨酸(Tyrosine)	3.61	3.35
谷氨酸(Glutamic acid)	13.59	13.33	苯丙氨酸(Phenylalanine)	3.21	3.38
脯氨酸(Proline)	7.49	6.87	组氨酸(Histidine)	2.36	2.97
甘氨酸(Glycine)	6.96	6.65	赖氨酸(Lysine)	6.39	6.82
丙氨酸(Alanine)	5.44	6.84	精氨酸(Arginine)	5.64	5.83
缬氨酸(Valine)	6.03	6.19	羟脯氨酸(Hydroxylysine)	12.13	12.30
胱氨酸(Cysteine)	0.49	0.58	总氨基酸量(Whole amino acid)	116.73	111.32
异亮氨酸(Isoleucine)	3.97	4.06	蛋白质含量(Content of protein)	120.01	

从表 2 可知,小球藻糖蛋白中蛋白质含量为 12.01%,经 β -消除反应前后氨基酸含量发生了变化,每克小球藻糖蛋白中,丝氨酸含量由 8.60 mg 下降为 5.92 mg,而丙氨酸含量由 5.44 mg 上升为 6.84 mg。这种变化表明,糖蛋白中存在糖-O-丝氨酸的连接方式。因为与羟基氨基酸连接的 O-糖苷键,在温和的碱性条件下,很容易被 β -消除反应解离,丝氨酸转化为 2-氨基丙烯酸,同时糖链被释放。

当有硼氢化钠存在时进行碱处理,2-氨基丙烯酸转化为 DL-丙氨酸的消旋混合物。

2.7 小球藻糖蛋白的单糖组成分析

气相色谱条件:OV-225 玻璃毛细管柱(0.29 mm $\times$ 25 m);柱温 235 $^{\circ}$ C; N_2 为载气,流速 46 mL/min。

通过与标准谱图比较可知,小球藻糖蛋白中的单糖成分包括:1 岩藻糖、2 阿拉伯糖、3 甘露糖、4 葡

葡萄糖、5-半乳糖。此外,还可检测到痕量的鼠李糖和木糖。

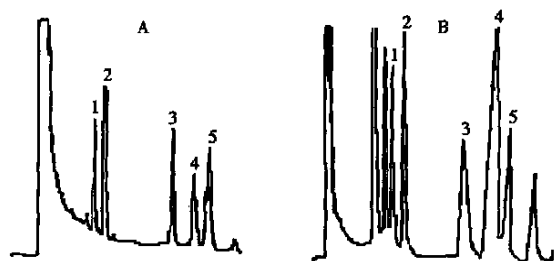


图4 糖醇乙酸酯衍生物的气相色谱图

Fig. 4 GLC of alditol acetate derivatives of carbohydrates

A: Hydrolyzate of CPG B: Standard sample

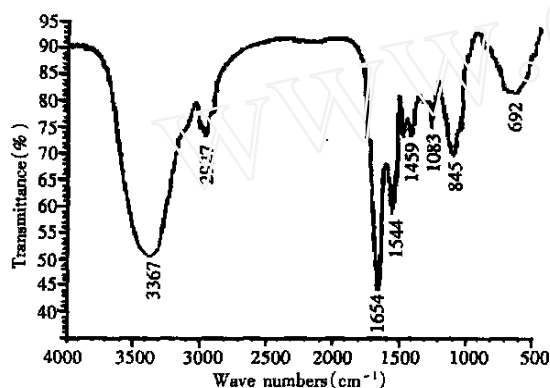


图5 小球藻糖蛋白的红外光谱

Fig. 5 The infrared spectra of CPG

2.8 小球藻糖蛋白的红外(IR)光谱

从图5可知,小球藻糖蛋白的特征吸收峰(IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$)分别为:3367(-OH),2927、2958(-N-H),1654,1544,1459(-C-C),1083(-C-O),845,692(-C=C-H)。其中,1654,1544为肽链上酰胺羰基的吸收峰,3367(-OH)和1083(-C-O)是多糖分子的特征吸收峰,845 cm^{-1} 附近的振动吸收表明小球藻糖蛋白中含有 β -糖苷键,由1083 cm^{-1} 附近的吸收峰可推知小球藻糖蛋白的糖苷类型主要为吡喃型。

3 结论

本文研究结果表明,小球藻糖蛋白分子量约为65,000 Da,属O-连接方式。此外,经红外光谱分析,发现含有 β -糖苷键和典型酰胺羰基结构。成分分析发现小球藻糖蛋白含蛋白质12.01%,糖链部分主要单糖有岩藻糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖。

参考文献

- 1 孙册,莫汉庆.糖蛋白与蛋白聚糖结构、功能和代谢.北京:科学出版社,1998
- 2 孙志贤.现代生物化学理论与研究技术.北京:军事医学出版社,1995
- 3 李师翁,李虎乾.植物单细胞蛋白资源—小球藻开发利用研究的现状.生物技术,1997,7(3):45-48
- 4 杨鹭生,李国平,陈林水.蛋白核小球藻粉的蛋白质、氨基酸含量及营养价值评价.亚热带植物科学,2003,32(1):36-38
- 5 阎磊.甘薯糖蛋白及其增强免疫调节功能的研究.西南农业大学硕士论文,1999
- 6 张惟杰.糖复合物生化研究技术.浙江:浙江大学出版社,1994.16-17
- 7 田庚元,王晨.枸杞子糖蛋白分离纯化、物化性质及糖肽键特征.生物化学与生物物理学报,1995,27(2):201-205
- 8 王翎.虫花菌胞外糖蛋白的分离、纯化及其性质研究.真菌学报,1996,15(1):48-52
- 9 张翼伸.有关糖复合物的分级纯化、结构确定、生物活性的几个问题.生命的化学,1994,14(6):43
- 10 胡明方,王光慈.食品分析.重庆:西南师范大学出版社,1992
- 11 李志孝,黄成钢,陈谦.天门冬半乳糖聚糖的化学结构及其抑瘤活性的研究.兰州大学学报(自然科学版),2000,(35):78-80