

## 龙须藤凝集素的分离纯化和性质

彭建宗, 陈兆平

(华南师范大学生物系, 广东 广州 510631)

**摘要:** 利用酸化处理的 Sepharose 6B 亲和柱从龙须藤 (*Bauhinia championii*) 种子中分离纯化出龙须藤凝集素 (BCL), 其比活性比抽提液提高了 57 倍, 活力回收率达 63.3%。经 Sephadex G-100 测得 BCL 的分子量为 64 000, SDS-PAGE 的结果表明 BCL 由两个相同的亚基组成, 亚基分子量为 32 000。等电聚焦凝胶电泳测得其等电点为 4.70。BCL 是一种糖蛋白, 其中性糖含量为 3.0%。N-乙酰-D-氨基半乳糖能强烈地抑制 BCL 对兔红细胞的凝集作用。

**关键词:** 凝集素; 龙须藤; 分离纯化

中图分类号: Q946.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-3395(2001)02-0159-04

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LECTIN FROM *BAUHINIA CHAMPIONII* BENTH.

PENG Jian-zong, CHEN Zhao-ping

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** *Bauhinia championii* lectin (BCL) was purified from the seeds of *Bauhinia championii* Benth. by affinity chromatography on an acid-treated Sepharose 6B column. Hemagglutinating activity of the purified BCL increased by 57 times and the activity recovery was 63.3%. The molecular weight of BCL is 64 000 consisting of two identical subunits. The subunit molecular weight is 32 000 with isoelectric point of 4.70. BCL is a glycoprotein containing 3.0% of sugar. N-acetyl-D-galactosamine was determined to be a most potent inhibitor of BCL in agglutinating rabbit erythrocytes.

**Key words:** Lectin; *Bauhinia championii*; Isolation and purification

凝集素是一类不同于酶, 也不同于抗体的糖结合蛋白<sup>[1]</sup>。凝集素参与生物体的许多生理和病理过程, 如精卵结合, 共生固氮<sup>[2]</sup>, 对病虫害的防御<sup>[3]</sup>等。正是由于凝集素高度的糖结合专一性, 它已被广泛应用于生物学和医学的研究领域中<sup>[4]</sup>。许多豆科植物的种子中富含凝集素, 因此, 豆科植物是获得凝集素的重要来源。龙须藤 (*Bauhinia championii* Benth.) 为豆科羊蹄甲属植物, 我们首次从龙须藤种子中分离纯化出一种凝集素 (*Bauhinia championii* lectin, BCL), 并对它的一些理化性质进行了研究, 为进一步研究该凝集素提供依据。

### 1 材料和方法

**材料** 龙须藤 (*Bauhinia championii* Benth.) 种子采自粤北山区。SDS-PAGE 低分子量标

准蛋白质为上海丽珠东风生物技术公司产品。N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、N-乙酰氨基半乳糖(GalNAc)、L-岩藻糖(L-Fucose)及Ampholine(pH3-10)为Sigma产品。Sephacrose 6B为Pharmacia产品。

**凝集素的分离纯化** 种子磨粉,生理盐水抽提,离心( $6000\text{ r min}^{-1}$ , 30 min),上清液加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 达90%饱和度进行盐析,沉淀经透析除盐后冻干即得凝集素粗品。Sephacrose 6B的酸化处理按Datta等<sup>[5]</sup>的方法进行。柱平衡液采用pH7.2, 0.05 mol/L phosphate buffer-0.14 mol/L NaCl(PBS)。凝集素粗品上柱后,用平衡液洗去杂蛋白,至 $A_{280\text{ nm}}$ 小于0.02后改用1 mol/L NaCl-0.2 mol/L乳糖解吸附,收集 $A_{280\text{ nm}}$ 大于0.2的各管,将其合并,透析除糖,冻干即得纯品凝集素。

**分子量及亚基分子量的测定** 经Sephadex G-100凝胶过滤测定BCL分子量,SDS-PAGE测定亚基的分子量,均按张龙翔等<sup>[6]</sup>的方法测定。

**等电点的测定** 参照Dryer等<sup>[7]</sup>的方法进行。电极液:阳极5%磷酸,阴极1 mol/L NaOH,两性电解质载体为Ampholine(pH3-10),160 V,电泳3 h。胶条按0.5 cm长切成段,于1 ml蒸馏水中过夜,用酸度计测定各段的pH值,与染色蛋白带比较,得BCL的等电点。

**糖含量的测定** 以葡萄糖作标准糖,用蒽酮比色法测定<sup>[8]</sup>。

**凝集素活性的测定** 测定BCL对兔红细胞的凝集活力<sup>[9]</sup>。

**糖专一性的测定** 按糖的半定量抑制实验<sup>[10]</sup>进行测定。

**氨基酸组分的测定** 酸水解凝集素样品,用日立835-50型高速氨基酸分析仪测定。

**热稳定性的测定**  $0.5\text{ mg ml}^{-1}$  BCL于水浴中保温,每隔5 min升高 $5^\circ\text{C}$ ,直至 $100^\circ\text{C}$ ,每次保温后取样检查凝集活性。

**酸碱稳定性的测定** 所用缓冲液有:NaAc-HAc(pH3.7-5.8), $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH6.2-7.8),Tris-HCl(pH8.23-9.10), $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ (pH9.5-10.83), $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -NaOH(pH11.2-11.9),KCl-NaOH(pH12.2-13.0),BCL在不同pH的缓冲液中于 $25^\circ\text{C}$ 保温30 min,然后测定其凝集活性。

**促有丝分裂活性的测定** 按刘祖洞等<sup>[11]</sup>的方法进行。

## 2 结果和讨论

### 2.1 分离纯化

经90%饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析后,部分杂蛋白被去除,透析除盐后冻干,所得的凝集素粗品的比活性较抽提液提高了3.8倍。凝集素粗品进一步经酸化处理的Sephacrose 6B亲和层析后,获得一个对兔红细胞具强凝集活性的蛋白峰(图1),该组分经SDS-PAGE及等电聚焦凝胶电泳后,均呈现单一的蛋白带(图2, 3),其比活性较抽提液提高了57倍,活力回收率达63.3%(表1),这表明该纯化方法既简便又有效。

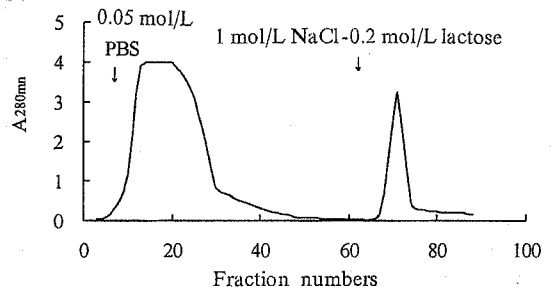


图1 BCL在酸化的Sephacrose 6B亲和柱上的层析  
Fig. 1 Affinity chromatography of BCL on acid-treated Sepharose 6B

Column:  $1.5 \times 30\text{ cm}$ ,  $20\text{ ml h}^{-1}$ ,  $2.5\text{ ml tube}^{-1}$

表1 龙须藤种子凝集素的纯化

Table 1 Purification of lectin from *Bauhinia championii* seeds

组分 Fraction	总蛋白 Total protein from 100 g seeds (mg)	凝集剂量 Minimum hemagglutinating dose ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	总活性 Total activity	比活性 Specific activity (activity $\text{mg}^{-1}$ )	活性回收率 Activity recovery (%)
粗提液 Crude extracts	7455	110.9	67223	9.0	
硫酸铵盐析 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation	1554	28.9	53772	34.6	80.0
亲和层析 Sepharose 6B fraction	83	1.95	42564	512.8	63.3

### 2.2 分子量

BCL 经 SDS-PAGE 后, 从标准分子量曲线求得其亚基分子量为 32000 (图 2)。

BCL 经 Sephadex G-100 凝胶过滤后, 测得其分子量为 64000 (图 4), 因此可推断出 BCL 分子是由两个相同亚基组成的。

### 2.3 等电点

等电聚焦凝胶电泳结果见图 3, 测得 BCL 的等电点为 4.70。

### 2.4 糖含量

蒽酮比色法测得 BCL 中性糖含量为 3.0%。

### 2.5 糖专一性

在所测试的糖中, N-乙酰-D-氨基半乳糖对 BCL 凝集兔红细胞的抑制能力最强, 乳糖、半乳糖的抑制作用次之, 这表明 N-乙酰-D-氨基半乳糖是其专一性结合糖(表 2)。

### 2.6 氨基酸组成

BCL 的氨基酸组成中, 不含 Met, Cys 的含量也较低, 而 Asp 的含量最高, 达 13.4% (表 3)。

表 2 糖和糖蛋白对 BCL 凝集活性的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of sugars on hemagglutination activity of BCL

Sugar (100 mmol/L)	BCL 凝血的最小浓度 Minimum concentration of BCL for agglutination ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
对照 Control	1.95
N-乙酰氨基半乳糖 GalNAc	500
半乳糖 Galactose	125
乳糖 Lactose	125
甘露糖 Mannose	1.95
葡萄糖 Glucose	1.95
N-乙酰氨基葡萄糖 GlcNAc	1.95
L-岩藻糖 L-Fucose	3.90
山梨醇 Sorbitol	1.95

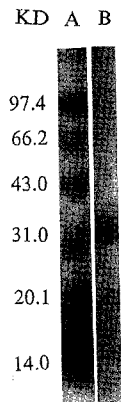


图 2 SDS-PAGE 测定 BCL 的分子量  
Fig. 2 Molecular weight determination of BCL by SDS-PAGE  
A. Affinity sample: BCL (32000);  
B. Calibration proteins.



图 3 BCL 的等电聚焦凝胶电泳  
Fig. 3 Isoelectric focusing gel electrophoresis of BCL

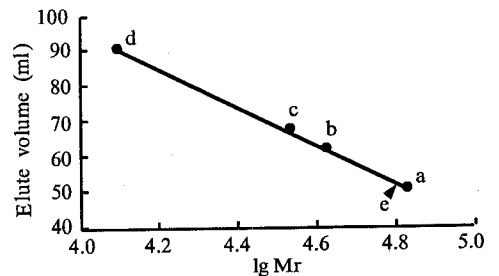


图 4 Sephadex G-100 凝胶过滤测定 BCL 的分子量  
Fig. 4 Molecular weight determination of BCL by  
Sephadex G-100  
a. Bovine serum albumin (67000); b. Egg albumin(43000);  
c. Pepsin (35000); d. Cyt.C (12400); e. BCL (64000)

## 2.7 稳定性

当温度在 30–70 °C 的范围内处理 BCL 后, BCL 仍保持强的凝集活性, 但当温度升至 75 °C 并保温 5 min 后, BCL 的凝集活性迅速下降, 至 80 °C 后失去凝集活性。BCL 在 pH 5.0–12.5 的各缓冲液中 25 °C 保温 30 min 后仍保持较强的凝集活性, 但超过该 pH 范围均使其失去凝集活性。某些凝集素被认为是植物防止动物食用的一种防御蛋白<sup>[3]</sup>, 而 BCL 对温度、酸碱度的变化表现出了一定的稳定性, 这对于它执行防御功能是很有意义的。

## 2.8 促有丝分裂活性

BCL 对人的外周血淋巴细胞转化率为 78.6%, 细胞有丝分裂率为 9.3% (表 4), 因而 BCL 可作为一种促有丝分裂原。

表 4 BCL 的促有丝分裂活性

Table 4 Mitogenetic activity of BCL

总细胞 Total cells	转化细胞 Transformed cells	有丝分裂细胞 Cells in division	转化率 (%) Transformation rate	有丝分裂率 Division rate (%)
832	654	77	78.6	9.3

## 参考文献:

- [1] Liener I E. Phytohemagglutinins (Phytolectins) [J]. *Ann Rev Physiol*, 1997, 27:291–319.
- [2] Bohloul B B, Schmidt F L. Lectin: A possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis [J]. *Science*, 1974, 185:269–271.
- [3] Peumans W J, Van Damme E J M. Lectins as plant defense proteins [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109:347–352.
- [4] Bayard S, Kerchaert J P. Characterization and isolation of nine rat alpha-fetoprotein variants by gel electrophoresis and lectin affinity chromatography [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, 77:489.
- [5] Datta T K, Basu P S. Identification, isolation and some properties of lectin from the seeds of India coral tree [*Erythrina variegata* (Linn.) var. *orientalis* (Linn.) Merrill] [J]. *Biochem J*, 1981, 197:751–753.
- [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1982, 112.
- [7] Dryer R L, Lata G F. *Experimental Biochemistry* [M]. New York: Oxford University Press, 1989, 381–383.
- [8] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1990, 160.
- [9] 孙册, 朱政, 莫庆汉. 凝集素 [M]. 北京: 科学出版社, 1986, 20.
- [10] 孙册, 朱政, 莫庆汉. 凝集素 [M]. 北京: 科学出版社, 1986, 51.
- [11] 刘祖洞, 江绍慧. 遗传学实验 [M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1987, 150–157.

表 3 BCL 的氨基酸组成 (%)

Table 3 Amino acid composition in BCL

氨基酸 Amino acid	含量 Content (%)	氨基酸 Amino acid	含量 Content (%)
天冬氨酸 Asp	13.40	甲硫氨酸 Met	0
苏氨酸 Thr	7.66	异亮氨酸 Ile	5.60
丝氨酸 Ser	6.66	亮氨酸 Leu	8.46
谷氨酸 Glu	6.58	酪氨酸 Tyr	7.13
脯氨酸 Pro	4.56	苯丙氨酸 Phe	7.41
甘氨酸 Gly	5.55	赖氨酸 Lys	5.89
丙氨酸 Ala	5.74	氨 NH <sub>3</sub>	1.36
半胱氨酸 Cys	0.22	组氨酸 His	1.56
缬氨酸 Val	6.33	精氨酸 Arg	4.49