

## 芦荟凝集素的分离、纯化和部分性质的研究

高居易, 陈 苒

(福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007)

**摘要:** 新鲜芦荟叶 (*Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berger) 于室温用低浓度 NaCl 溶液提取、离心和透析后, 经 N-乙酰氨基葡萄糖-Sephadex 4B 亲和层析, 分离纯化出芦荟凝集素 (ACL)。用 Sephadex G-100 测表观分子量为 35 kD, SDS-PAGE 出现两条色带: 染色深的宽带和较浅的窄带。亚基分子量分别为 15 kD 和 20 kD。能专一性凝集兔血细胞和人血红细胞的 A 型和 O 型, 不凝集 B 型和 AB 型。D-甘露糖和 N-乙酰氨基葡萄糖能抑制凝血活性。糖蛋白内中性糖含量是 4.8%。

**关键词:** 芦荟; 凝集素; 纯化; 凝集作用

**中图分类号:** Q946.33

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-3395(2000)02-0177-05

## THE ISOLATION AND PURIFICATION OF LECTIN FROM *ALOE VERA* L. VAR. *CHINENSIS* (HAW.) BERGER AND ITS CHARACTERISTICS

GAO Ju-yi, CHEN Ran

(Bioengineering College, Fujian Teachers University, Fuzhou 350007, China)

**Abstract:** Lectin was extracted from leaves of *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berger in a dilute NaCl solution. After centrifugation, the collected supernatant was dialysed. Pure lectin of *Aloe* (ACL) was isolated by N-acetylglucosamine-Sephadex 4B affinity chromatography and purified by Sephadex G-100 gel filtration chromatography. The apparent molecular weight of ACL was 35 kD. It consisted of two subunits, 15 kD and 20 kD. ACL could agglutinate rabbit erythrocytes and the human erythrocytes with groups A and O specifically, except those with groups B and AB. The activity of ACL was inhibited by D-mannose and N-acetylglucosamine. Neutral sugar content in ACL was 4.8%.

**Key words:** *Aloe vera* var. *chinensis*; Lectin; Purification; Agglutination

芦荟是百合科芦荟属植物, 我国仅有芦荟 (*Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berger) 一个种, 主要分布于广东、海南、云南和福建等省的中、南部。芦荟的用途很广, 它的有效成分对人体有特殊保健功能和抗肿瘤作用, 已广泛地应用在保健品、化妆品、食品和药物工业上<sup>[1]</sup>。近年来, 国内已有王蜀秀等人研究芦荟多糖<sup>[2]</sup>和陈文森等人<sup>[3]</sup>的芦荟化学成分研究等。但国内外尚未见到芦荟凝集素方面的报道。

## 1 材料和方法

芦荟从福州市花鸟市场购得, 由本院植物教研室鉴定。兔血由本院动物生理教研室提供, 人血红细胞的各种血型由福州市中心血库提供。

Sepharose 4B 和 Sephadex G-100 均为 Pharmacia 公司产品。N-乙酰氨基葡萄糖为上海试剂二厂产品。低分子量标准蛋白系列为 Pharmacia 公司产品。其余试剂均为分析纯和生化试剂。

N-乙酰氨基葡萄糖-Sepharose 4B 的制备按 Matsumoto 等人<sup>[4]</sup>的方法。

**芦荟凝集素粗提液的制备** 取新鲜芦荟叶 100 g, 加入 pH 7.0 的 0.5 mol/L 磷酸缓冲液和 0.5 mol/L NaCl 混和液, 匀浆后过滤, 取上清液加入适量活性炭吸附脱色, 700 ×g 离心 15 min, 收集上清液, 于蒸馏水中透析 12 h, 即为粗提液。

**N-乙酰氨基葡萄糖-Sepharose 4B 的分离纯化** 取凝集素粗提液, 用 pH 7.0 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液和 0.015 mol/L NaCl 混合液稀释后为样液, 上 N-乙酰氨基葡萄糖-Sepharose 4B 的层析柱 (3 × 12 cm)。先用 pH 7.0 的 0.05 mol/L Tris-HCl 和 0.05 mol/L NaCl 混合液洗脱至洗脱液的  $A_{280\text{nm}} < 0.02$ , 接着换用 pH 7.4 的 0.005 mol/L 磷酸缓冲液和 0.5 mol/L 的 NaCl 混合液洗脱, 流速为 0.5 ml min<sup>-1</sup>, 每管 4 ml 共收集 150 管, 合并凝血活性组分 ( $A_L$ ), 浓缩, 透析脱盐, 冷冻干燥, 即为芦荟凝集素 (简称 ACL)。

**ACL 纯度分析** 聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Peacock 等人的方法<sup>[5]</sup>。在 pH 8.9 的 Tris-glycine 缓冲液中进行, 电泳胶浓度为 7.5%, 考马斯亮蓝染色。

**Sephadex G-100 层析纯化和表观分子量测定** 凝胶层析柱 (2 × 100 cm), 流速 14 ml h<sup>-1</sup>, 每管收集 4 ml。作对照的标准蛋白质有: 大豆胰酶抑制剂 (21.6 kD),  $\gamma$ -球蛋白 (25.0 kD)、原肌球蛋白 (36.0 kD)、卵清蛋白 (43.0 kD) 和血清白蛋白 (68.0 kD)。

**SDS-PAGE 和亚基分子量测定** 按 Weber 等人的方法<sup>[6]</sup>测定蛋白质亚基分子量。对照标准蛋白质有: 细胞色素 c (12.2 kD)、人血红蛋白 (15.5 kD)、马肌红蛋白 (17.5 kD)、大豆胰酶抑制剂 (21.6 kD) 和胰岛素 (24.4 kD)。

**ACL 糖含量的测定** 以葡萄糖为标准, 用酚-硫酸法测定糖含量。

**ACL 凝血活性测定** 按孙册等人的方法<sup>[7]</sup>, 在 V 型微型凝血板上进行。各种糖和糖苷浓度均为 0.2 mol/L, 聚糖和糖蛋白浓度为 0.5%, 起始孔中加入 ACL 样品 20  $\mu$ l, 糖液 20  $\mu$ l, 进行倍比稀释。混匀后放置 0.5 h, 边振荡边在孔中加入 2% 新鲜兔红细胞 20  $\mu$ l, 室温放置 2 h, 肉眼观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲和层析分离纯化凝集素

用 N-乙酰氨基葡萄糖-Sepharose 4B 亲和层析结果如图 1。在第 60-90 管之间出现一个不对称层析峰  $A_L$ , 经凝血活性测定确认  $A_L$  是具有凝集素活性的有效峰。合并  $A_L$  洗脱液作为样液, 经聚丙烯酰胺电泳为单一色带, 证明为均一物质。

### 2.2 ACL 的表观分子量和亚基组成

用 Sephadex G-100 层析纯化 ACL, 并以标准分子量作对照。将洗脱体积  $V_e$  作为横坐标,

LogM(分子量)作为纵座标做图求两者的线性回归关系。图 2 中的相关系数大于 0.996, 由图计算出 ACL 表观分子量 35 kD。图 3 的 SDS-PAGE 图谱可见纯化的 ACL 呈现两条色带, 一条是染色深的宽带, 另一条是染色较浅的窄带。这两条色带证明 ACL 是由两个亚基构成的蛋白质分子, 其亚基分子量为 15 kD 和 20 kD。

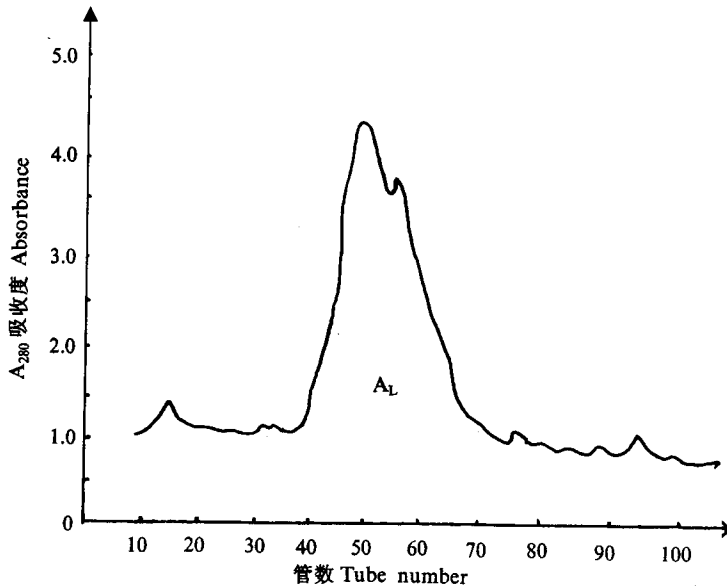


图 1 芦荟凝集素的 N-乙酰氨基葡萄糖-Sepharose 4B 亲和层析曲线

Fig. 1 Affinity chromatography of *Aloe* lectin on N-acetylglucosamine-Sepharose 4B column  
层析柱 Column: 3 × 12 cm; 流速 Flow rate: 0.5 ml min<sup>-1</sup>, 4 ml tube<sup>-1</sup>; 活性部分 Activity peak: A<sub>L</sub>

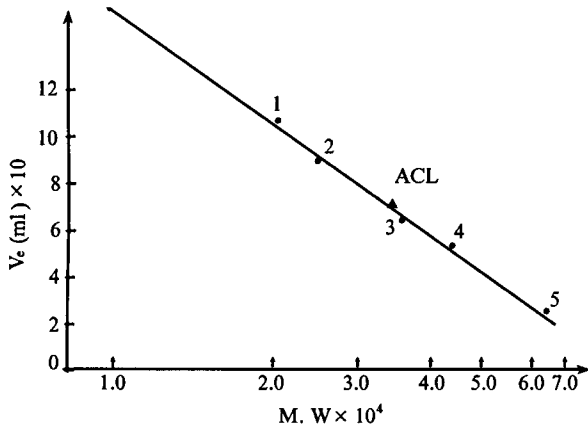


图 2 芦荟凝集素在 Sephadex G-100 凝胶层析柱上作分子量的测定  
Fig. 2 Molecular weight determination of *Aloe* lectin (ACL) on Sephadex G-100 filtration chromatography column

标准蛋白质 Standard proteins: 1:大豆胰酶抑制剂 Soybean trypsin inhibitor 21.6 kD; 2: γ-球蛋白 γ-globulin 25.0 kD; 3:原肌球蛋白 Tropomyosin 36.0 kD; 4:卵清蛋白 Ovalbumin 43.0 kD; 5:血清白蛋白 Serum albumin 68.0 kD; ▲ ACL.

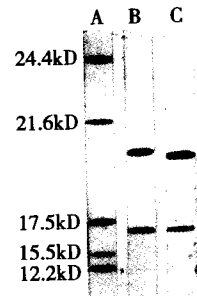


图 3 芦荟凝集素的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of *Aloe* lectin in a 7.5% SDS-polyacrylamide gel

A: 标准蛋白质 Standard proteins, 细胞色素 C Cytochrome C 12.2 kD, 人血红蛋白 Human hemoglobin 15.5 kD, 马肌红蛋白 Horse myoglobin 17.5 kD, 大豆胰酶抑制剂 Soybean trypsin inhibitor 21.6 kD, 胰岛素 Insulin 24.4 kD; B: ACL 亲和层析液 Affinity solution of ACL; C: ACL 凝胶层析纯化液 Filtration solution of ACL

### 2.3 凝血活性

ACL 的凝血活性结果见表 1。不论是凝集素粗提液还是层析后的凝集素，都能专一性对兔血红细胞有凝集作用，而对人血红细胞的 A 型和 O 型有凝集作用，对 B 型和 AB 型几乎没有凝集作用。经凝胶层析后凝集素对兔血红细胞的凝血活性要比粗提液凝血活性高出 16 倍。

表 1 芦荟凝集素对红细胞的凝集作用(血清效价)

Table 1 Agglutination activity (serum titer) of *Aloe Letin* (ACL) against rabbit and human erythrocytes

芦荟凝集素 Samples	兔血红细胞 Rabbit erythrocyte	人血红细胞 Human erythrocyte			
		A型 Group A	B型 Group B	O型 Group O	AB型 Group AB
		粗提液 Crude extract	16	8	ND
亲和层析液 Affinity solution	128	32	ND	128	ND
凝胶层析纯化液 Filtration solution	260	64	ND	120	ND

ND—未发现 Not detectable

表 2 糖类对芦荟凝集素的凝血活性的影响

Table 2 Effects of different sugars on egglutination activity of *Aloe lectin*

糖 Sugars	粗提液 Crude extract	亲和层析液 Affinity solution	凝胶层析纯化液 Filtration solution
对照 Control	40	10	128
蔗糖 Sucrose	60	74	80
果糖 Fructose	34	56	76
乳糖 Lactose	80	130	140
D-葡萄糖 D-glucose	54	128	256
D-氨基葡萄糖 D-glucosamine	65	80	134
D-岩藻糖 D-fucose	43	65	104
D-甘露糖 D-mannose	7	8	14
D-半乳糖 D-galactose	25	54	98
壳多糖 Chitin	43	78	124
糖原 Glucogen	26	56	88
肝素钠 Sodium heparan	42	67	108
N-乙酰氨基葡萄糖 N-acetyl-D-glucosamine	5	15	15

单位: 血清效价 Unit: Serum titer

芦荟凝集素是一种糖蛋白，含糖量达 4.8%。进一步利用外源的不同糖类研究其对 ACL 凝血活性的影响表明(表 2)，不论是粗提液中或是经层析纯化的 ACL 的凝血活性均能被 D-甘露糖和 N-乙酰氨基葡萄糖所抑制。

### 参考文献

- [1] 李伟芳, 樊立军. 芦荟醇提取物及芦荟苦素的抗肿瘤作用 [J]. 中国中药杂志, 1991, 16(11):688-689.
- [2] 王蜀秀, 温远新, 王雷, 等. 芦荟多糖的研究 [J]. 植物学报, 1989, 31(5):389-391.
- [3] 陈文森, 何其敏, 朱亮锋. 芦荟化学成分研究(I) [A]. 中国科学院华南植物研究所集刊[C], 第7集. 北京: 科学出版社, 1991, 122-123.

- [4] Matsumoto I, Haruko K, Yumiko A, et al. Derivatization of epoxy-activated agarose with various carbohydrates for the preparation of stable and high-capacity affinity at sorbents: Their use for affinity chromatography of carbohydratebinding proteins [J]. *Anal Biochem*, 1981, 116(1):103-110.
- [5] Peacock A C, Bunting S L, Qureen K G. Serum protein electrophoresis in acrylamide gel; pattens from normal human subjects [J]. *Science*, 1965, 147(3664):1451-1453.
- [6] Weber K, Osborn M. Reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylade-gel electrophoresis [J]. *J Biol Chem*, 1969, 244(16):4406-4412.
- [7] 孙册, 朱政, 莫文汉. 凝集素 [M]. 北京: 科学出版社, 1986, 9-10.