

白桦茸凝集素提取工艺的优化

刘鹏举 曹松屹 唐咏* 苏瑛 张少斌

(沈阳农业大学 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 对白桦茸凝集素最佳提取工艺进行了研究。以 2%兔血细胞凝血效价为指标, 确定了最佳提取缓冲液。通过正交试验对料液比、提取时间、提取液 pH 值、NaCl 浓度等因素进行了优化分析并确定了提取工艺的最佳参数组合。结果表明, 以 TBS 和 PBS 为提取缓冲液所得的白桦茸凝集素凝集效价分别为 64、16; 最佳提取工艺: 液料比为 50:1, 提取时间为 20 h, NaCl 浓度为 0 mol/L, 缓冲液 pH 值为 8.0, 按该最佳工艺提取白桦茸凝集素凝血效价为 256。所优化的提取工艺稳定、可行, 为该凝集素进一步在免疫调节方面的开发应用提供一定基础。

关键词: 白桦茸, 凝集素, 提取工艺

Optimization of Extraction Process About Lectin from *Phaeoporus obliquus*(*Pers ex Fr*).*J.Schroet*

LIU Peng-Ju CAO Song-Yi TANG Yong* SU Ying ZHANG Shao-Bin

(Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: This paper described the results of the optimal method for preparation and extraction of lectin from *Phaeoporus obliquus*(*Pers ex Fr*).(*J.Schroet*). We determined the optimal buffer solution using the agglutination test with 2% hare blood cells. The optimal extraction process included the following parameters that were conformed by optimization analysis: material-water ratio, extraction time, concentration of sodium chloride and the pH value. The results are that the agglutination indexes of POL using TBS and PBS extraction buffer were 64 and 16, respectively. The optimal extraction process is that, the material-water ratio was 1:50, the extraction time was 20 h, while the concentration of sodium chloride was 0 mol/L and pH was 8.0. The agglutinability of POL was 256 examined by this method. The optimized extraction process is stable and practicable, which may supply some basis for the application of the lectin from *Phaeoporus obliquus* in immunoregulation.

Keywords: *Phaeoporus obliquus*(*Pers ex Fr*).*J.Schroet*, Lectin, Extraction

凝集素是一类具有糖专一性, 可促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白^[1]。最早的凝集素发现于蓖麻种子, 随后在众多植物种子、动物、微生物中相继发现凝集素。这些凝集素种类繁多, 性质、结构、功

能亦有较大差别。真菌凝集素是凝集素家族中的一员, 其功能除具有凝集诸如血细胞、淋巴细胞等作用外, 还参与生物体内的一些重要生理和病理过程, 如真菌促菌丝体的生成、细胞与细胞间的信号识别

基金项目: 辽宁省重点实验室专项基金(No. 200536)

*通讯作者: Tel: 86-024-88487163; ✉: tang110161@163.com

收稿日期: 2009-01-15; 接受日期: 2009-07-29

等, 因此真菌凝集素在研究生物体内细胞癌变的分子机制、抗癌抗病毒药物的研发、受精、分化及分子识别等生命过程的诸多方面都有广泛的应用^[2-6]。

白桦茸 *Phaeoporus obliquus*(Pers ex Fr).J.Schroet, 又名桦褐孔菌, 是一种生长在寒带的木腐菌, 在北美、芬兰、俄罗斯及我国东北均有发现, 是民间治疗各种癌症的常见药物^[7]。本研究从白桦茸中提取得到凝集素(POL), 并采用正交试验法对其提取工艺进行初步研究, 为进一步纯化该凝集素并研究其功能奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

D-37520 高速冷冻离心机(German Sigma Centrifuge); JA5003A 电子天平(上海精天电子仪器有限公司); PHS-25 数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); 德国艾本德 (Eppendorf)单道移液器; UV-2100 型紫外可见分光光度计(尼龙柯, 上海仪器有限公司); 2003-10 数显恒温磁力搅拌器(国华电器有限公司); 96 孔 V 型血凝板(姜堰市荣飞器械厂)。

1.2 药材和试剂

白桦茸购于黑龙江圣普公司, 其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 凝血效价检测

凝血效价检测参照孙册等人的方法^[8], 取 96 孔 V 型血凝板, 每个孔加入 20 μ L 缓冲液, 然后在第 1 行各孔加入样品液 20 μ L, 每列依次倍比稀释, 每种

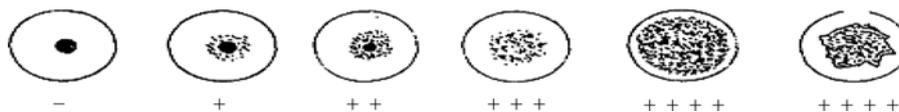


图 1 肉眼观察的 POL 凝集红细胞结果

Fig. 1 Hemagglutinating activity by eyes

注: -: 无凝集; +: 少量凝集; ++: 正常凝集; +++: 大片凝集; +++++: 高度凝集。

Note: -: No agglutination; +: A spot of agglutination; ++: Normal agglutination; +++: A mass of agglutination; +++++: Maximum agglutination.

样品做 3 个重复, 对照为不加样品的生理盐水, 最后各加入 2% 血细胞悬液 20 μ L, 静置 1 h~2 h, 观察结果。孔底有血球沉淀成点状的为无凝集反应, 孔中血球凝集成片悬浮的为有凝集反应(图 1)。

2.2 提取缓冲液的选择

选择相同的条件, 即 2 g 白桦茸干粉、选用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2, NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 含 0.15 mol/L NaCl)、TBS (0.01 mol/L, pH 7.2, Tris-HCl, 含 0.15 mol/L NaCl) 为提取缓冲液, 通过横向比较选用最佳提取缓冲液来提取白桦茸凝集素。两种缓冲液各 40 mL, 10 $^\circ$ C 浸提 16 h, 离心(4 $^\circ$ C, 5000 r/min, 15 min), 上清液进行凝血效价检测。选择凝集效价高的提取液作为本实验的提取缓冲液。

2.3 白桦茸凝集素提取的单因素试验^[9]

分别检测液料比、提取时间、NaCl 浓度、提取缓冲液 pH 值等单因素对桦褐孔菌凝集素凝血效价的影响。

2.4 白桦茸凝集素提取的正交试验设计

通过以上单因素试验结果, 从各单因素中选出提取的最适条件及与最适条件相邻的 2 个水平(共 3 个水平)进行四因素三水平的正交试验^[10]。根据以上单因素试验确定用于正交试验的各单因素水平如表 1 所示。

3 结果与分析

3.1 提取缓冲液的选择

在 PBS 与 TBS 两种提取缓冲液的浸提下, 所得白桦茸凝集素的凝集效价如表 2 所示。凝集效价标准^[8]参照图 1。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factor and level table of orthogonal experiment

水平 Level	A 液料比(mL: g) Material-water ratio	B 时间(h) Time	C pH 值 pH	D NaCl (mol/L) NaCl concentration
1	20:1	8	7.2	0.000
2	40:1	16	8.0	0.125
3	60:1	20	8.8	0.250

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 2 不同提取缓冲液提取白桦茸凝集素凝血效价
Table 2 The agglutinability of POL through different buffer solution

提取缓冲液 Buffer solution	2	4	8	16	32	64	128	256
PBS	++++	+++	++	+	-	-	-	-
TBS	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-

注: +: 有凝集活性; -: 无凝集活性.

Note: +: Agglutination; -: No agglutination.

由表 2 可以看出, 在 PBS 和 TBS 两种缓冲液的浸提下, 所得 POL 对兔血细胞凝集效价分别为 16 和 64, 经 TBS 提取得到的 POL 对兔血的凝集效价明显高于经 PBS 提取得到的 POL, 故本实验选择 TBS 作为提取缓冲液, 后续实验均用 TBS 进行提取。

3.2 各单因素对 POL 提取液凝血效价的影响

3.2.1 不同液料比对 POL 提取液凝血效价的影响: 称取白桦茸干粉 2 g, 按不同液料比加入 TBS 提取缓冲液(pH 7.2, 0.01 mol/L), 10°C 浸提 16 h, NaCl 浓度为 0.25 mol/L, 期间不停搅拌, 离心(5000 r/min, 15 min, 4°C), 上清液进行凝血效价检测。因 2.1 中凝血效价检测时采取倍比稀释的办法, 原始提取液的体积必将影响凝血效价, 故应将得到的不同体积的提取液通过稀释或冷冻浓缩的办法调至同一个体积即 40 mL 后再检测不同液料比对提取液凝血效价的影响。不同液料比对白桦茸凝集素提取液凝血效价的影响结果见图 2。

从图 2 可以看出, 液料比是影响 POL 提取的一个主要因素, 当液料比在 20 以上时凝血效价增加较大, 液料比在 40 以上后变化不大, 所以液料比可以选择在 40 左右。

3.2.2 不同提取时间对 POL 提取液凝血效价的影响: 按不同时间, 选择液料比 40:1, 其余条件及处理方法同 3.2.1。结果见图 3。

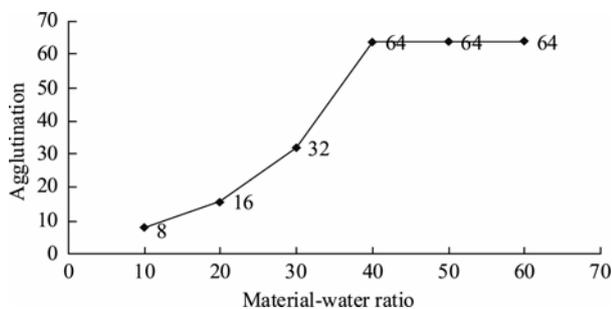


图 2 液料比对 POL 提取液凝血效价的影响
Fig. 2 Effects of different material rate on extraction effect of POL

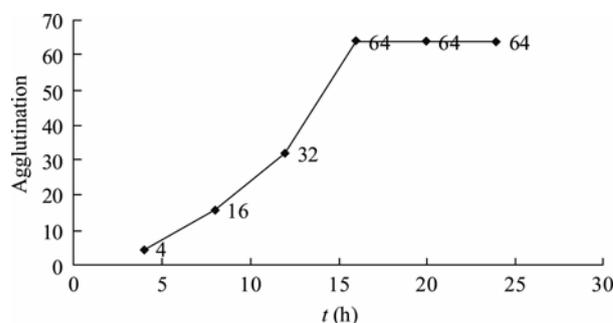


图 3 提取时间对 POL 提取液凝血效价的影响
Fig. 3 Effects of different time on the extraction effect of POL

从图 3 可看出, 提取时间是影响 POL 提取的重要因素, 凝血效价在 8 h~16 h 之间迅速提高, 但在 16 h 后增加不明显, 故提取时间可以选择为 16 h 左右。

3.2.3 提取缓冲液不同 pH 对 POL 提取液凝血效价的影响: 按不同 pH, 选择液料比 40:1, 其余条件及处理方法同 3.2.1。结果见图 4。

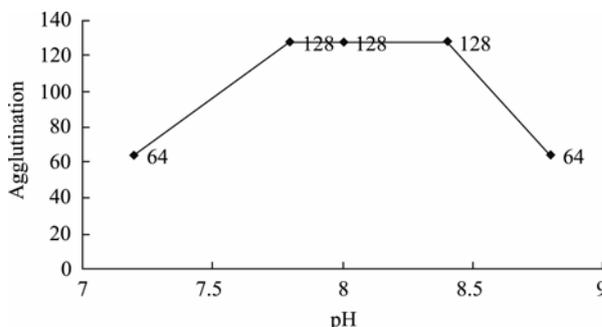


图 4 提取液 pH 对 POL 提取液凝血效价的影响
Fig. 4 Effects of different pH on the extraction effect of POL

从图 4 可以看出, pH 值在 8.0 左右凝血效价较高。

3.2.4 不同 NaCl 浓度对 POL 提取液凝血效价的影响: 按不同 NaCl 浓度, 选择液料比 40:1, 其余条件及处理方法与 3.2.1 相同。结果见图 5。

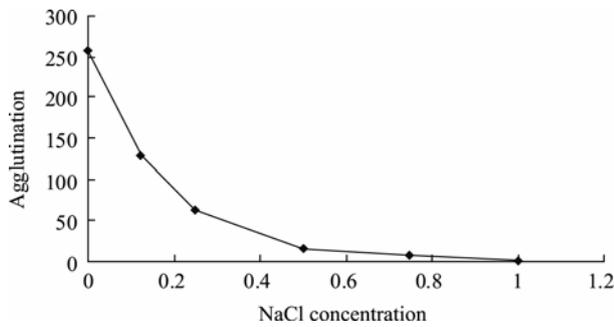


图5 NaCl浓度对POL提取液凝血效价的影响

Fig. 5 Effects of different concentration of sodium chrol on the extraction effect of POL

从图5可以看出NaCl是POL提取液凝血效价的负面影响因素,且在NaCl浓度大于0.25 mol/L后,POL的凝血效价下降剧烈。因此,NaCl浓度选择应低于0.25 mol/L。

3.3 正交试验结果分析

正交试验结果分析如表3所示。

由SPSS13.0软件^[10]分析得出如表4所示结果。

正交试验极差(R)结果表明,影响因素: $D(\text{NaCl}$ 浓度) $>B(\text{时间})>A(\text{料液比})>C(\text{pH值})$,以NaCl浓度影响最大。表4方差分析表明,料液比、提取时间、NaCl浓度及缓冲液pH值均具有显著影响。最佳提取条件为: $A_3B_3C_2D_1$,即液料比为50:1,提取时间为20 h,提取缓冲液pH值为8.0,NaCl浓度为0 mol/L。

4 讨论

大量的研究表明许多蘑菇具有预防或治疗癌症、病毒性疾病、高胆甾醇病和高血压的作用^[14,15],发挥功能的多为其中的多糖类及糖蛋白类分子。一些具有免疫调节、抑制肿瘤、抗真菌及降血压活性的蘑菇蛋白亦被纯化出来^[11-16],例如类泛素蛋白酶、蛋白聚糖、核糖体钝化蛋白、抗真菌蛋白和凝集素等。目前已纯化的真菌凝集素有糙皮侧耳、茶树菇、水粉杯伞、灵芝、牛肝菌、香菇、双孢蘑菇、蜜环菌等凝集素^[11-21],主要集中于担子菌纲的伞菌科、

表3 正交试验结果
Table 3 Results of orthogonal experiment

试验号码 Number	A	B	C	D	凝血效价 Agglutination	
					重复1 Repeat 1	重复2 Repeat 2
					1	
2	1	2	2	2	64	64
3	1	3	3	3	32	32
4	2	1	2	3	32	32
5	2	2	3	1	128	128
6	2	3	1	2	128	64
7	3	1	3	2	64	32
8	3	2	1	3	64	64
9	3	3	2	1	256	256
K1	320	288	448	896		
K2	512	512	704	416		
K3	736	768	416	256		
R	416	480	288	640		

表4 方差分析结果
Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment

方差来源 Variance origin	平方和(SS) Sum of squares	自由度(V) Freedom	均方(MS) Mean square	统计量(F) Statistics	显著性因子(P) P-value	显著性 Significance
A	14450	2	7225	25.4	0.0002	有
B	19228	2	9614	33.8	0.0001	有
C	8306	2	4153	14.6	0.0015	有
D	36978	2	18489	65	0.0000	有
Error	2560	9	284.4			

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

多孔菌科等, 这些真菌凝集素除表现出单糖结合特异性外, 在结构性质功能上差异也较大, 有的是单体蛋白, 有的是二聚体蛋白; 有的对酸碱及温度的耐受性较差, 而有的则表现出较强的耐酸碱及抗高温能力; 除个别供试凝集素表现出对人类的负作用(如引起肾脏血栓)之外, 其余很多均表现出具有抗肿瘤、免疫调节、抑制病毒、促有丝分裂、杀虫等积极的作用。虽然这些真菌凝集素的免疫调节机理有待于进一步研究, 但是这些具有肿瘤杀伤能力的真菌凝集素的进一步研发及在肿瘤临床治疗上的应用, 将为人类攻克癌症治疗的难关提供一些可借鉴的信息, 同时也具有广阔的市场前景。

我国的药用真菌资源丰富, 研究历史悠久。经戴玉成和杨祝良整理的药用真菌就有 473 种之多^[22], 这些真菌的药用功能是否由凝集素引起也有待于进一步探查。目前我国已经纯化的真菌凝集素只有茶树菇、糙皮侧耳、金顶侧耳、红菇、灵芝、银耳、金针菇、香菇、猴头菌、口蘑和黄绿蜜环菌等, 尚有许多真菌凝集素未被发现, 而且有些真菌中凝集素的含量及效价都较低, 如何通过优化提取方法为纯化凝集素并进一步研究其功能做好准备成为开发功能凝集素研究内容的重要部分。本文通过优化白桦茸凝集素提取方法为白桦茸凝集素的纯化利用做了一定的铺垫; 其他相关的凝集素提取及纯化方法中添加 NaCl 是有利因素, 本研究发现 NaCl 的添加是负面因素, 其原因有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 李丹彤, 周晓茹, 钟 莉, 等. 从绿藻礁膜(*Monostroma nitidum* Wittr) 分离半乳糖专一的凝集素. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, **24**(3): 257–263.
- [2] 梅 丹, 鲁玉晓, 高 磊, 等. 我国常见食(药)用真菌凝集素研究现状. 中国食用菌, 2008, **27**(4): 8, 16.
- [3] 王风玲, 崔淑香. 凝集素在肿瘤进展\迁移及预后研究中的应用. 齐鲁药事, 2008, **27**(1): 35–38.
- [4] 朱 月. 凝集素的作用与应用. 水产科学, 2005, **24**(12): 48.
- [5] 赵寅生. 凝集素生物学功能及应用. 安徽农业大学学报, 2001, **28**(4): 445.
- [6] 陈 培, 康晓楠, 孙 璐, 等. 凝集素芯片检测肿瘤标志物糖蛋白 N-聚糖及其在诊断中的意义. 中国癌症杂志, 2008, **18**(12): 881–887.
- [7] 陈体强, 吴锦忠. 珍惜药用菌—桦褐孔菌的研究进展. 海峡药学, 2005, **17**(2): 1–3.
- [8] 孙 册. 凝集素. 北京: 科学出版社, 1981.
- [9] 查 果, 曾群辉, 索朗斯珠, 等. 山茱萸凝集素的测定及其提取方法的比较. 中国兽药杂志, 2004, **38**(8): 17.
- [10] 张 力. SPSS13.0 在生物统计中的应用. 厦门: 厦门大学出版社, 2006.
- [11] Wang HX, Ng TB, Liu WK, *et al.* Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1995, **46**: 508–513.
- [12] Wang HX, Liu WK, Ng TB, *et al.* The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from *Tricholoma mongolicum*. *Immunopharmacology*, 1996, **31**: 205–210.
- [13] Wang HX, Ng TB, Ooi VEC, *et al.* A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Tricholoma mongolicum* with immunoenhancing and antitumor activities. *Biochemistry and Cell Biology*, 1996, **74**: 95–100.
- [14] Breene WM. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Food Prot*, 1990, **53**: 883–894.
- [15] Tong SC, Birmingham IM, Pai SH. Immunomodulatory substances of fungal origin. *J Immunol Immunopharmacol*, 1991, **11**: 115–122.
- [16] Lam SK, Ng TB. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeiji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *ArchBiochem-Biophys*, 2001a, **393**: 271–280.
- [17] Yuka Kobayashi, Hiroko Nakamura, Takehiko Sekiguchi, *et al.* Analysis of the carbohydrate binding specificity of the mushroom *Pleurotus ostreatus* lectin by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, 2005, **336**: 87–93.
- [18] Na Yang, Xin Tong, Ye Xiang, *et al.* Crystallization and preliminary crystallographic studies of the recombinant antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1751**: 209–212.
- [19] Jure Pohleven, Nataša Obermajer, Jerica Sabotič, *et al.* Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, **1790**: 173–181.
- [20] Zhao JK, WangHX, NgTB. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom. *Inocybe umbrinellaToxicon*, 2009, **53**: 360–366.
- [21] Elena P Vetchinkina, Natalia N Pozdnyakova, Valentina ENikitina. Laccase and lectin activities of intracellular proteins produced in a submerged culture of the xylophilic basidiomycete *Lentinus edodes*. *Curr Microbiol*, 2008, **57**: 381–385.
- [22] 戴玉成, 杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修改. 菌物学报, 2008, **27**(6): 801–824.