

Study on Extraction, Isolation, Purification and Physical Chemistry Properties of the Glycoprotein from *Thais clavigera* Kuster

Hejun Cai, Feifei Ge, Bim Yu, Pan Zhao, Youle Qu*

College of Food and Pharmaceutical Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan
Email: youle1960@sina.com

Received: Jul. 11th, 2014; revised: Jul. 26th, 2014; accepted: Aug. 4th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Purpose: This paper studied on extraction, isolation and purification as well as physical chemistry properties of the Glycoprotein from *Thais clavigera* Kuster. **Method:** The crude extract was then fractionated with 3 concentrations of ammonium sulfate solution. LGP-1, LGP-2, LGP-3, LGP-4 were prepared from the crude through DEAE-cellulose. LGP-I, LGP-II, LGP-III, LGP-IV, LGP-V, LGP-VI, LGP-VII were prepared through Sephadex G-100 chromatography. **Result:** The results showed that three glycoprotein components were carried out from 40% grade ammonium sulphate precipitation, named LGP-I, LGP-II, LGP-III. Three peaks appeared for 60%_s, named LGP-IV, LGP-V and LGP-VI. The sugar were 17.86%, 20.00%, 13.14%, 21.57%, and the contents of protein were 56.72%, 62.58%, 71.86%, 60.86%. The IR indicated glycoprotein groups contained -OH, -COO-, -NH, -C-O-C characteristics.

Keywords

Thais Clavigera Kuster, Glycoprotein, Isolation and Purification, Characterization

辣螺糖蛋白的提取、分离纯化及理化性质分析

蔡和君, 葛飞飞, 俞斌, 赵盼, 曲有乐*

浙江海洋学院食品与药学学院, 舟山

*通讯作者。

Email: youle1960@sina.com

收稿日期: 2014年7月11日; 修回日期: 2014年7月26日; 录用日期: 2014年8月4日

摘要

目的: 对辣螺中的糖蛋白进行分离纯化, 并分析其理化性质。方法: 采用缓冲溶液低温提取辣螺中的糖蛋白, 以硫酸铵对糖蛋白粗提液进行梯度分级沉淀, 各级组分经DEAE-52阴离子交换柱分离、纯化, 得到的糖蛋白命名为LGP-1, LGP-2, LGP-3, LGP-4, 再经Sephadex G-100层析纯化, 得到的糖蛋白命名为LGP-I, LGP-II, LGP-III, LGP-IV, LGP-V, LGP-VI, LGP-VII。结果: 40%级硫酸铵沉淀得到3种糖蛋白组分(LGP-I, LGP-II, LGP-III)。60%级硫酸铵沉淀得到3个糖蛋白组分(LGP-IV, LGP-V, LGP-VI)。总糖含量17.86%、20.00%、13.14%、21.57%, 蛋白质含量56.72%、62.58%、71.86%、60.86%。结论: IR分析表明, 各组分均含有多糖的-OH、-COO-、-NH、-C-O-C等特征基团。

关键词

辣螺; 糖蛋白; 分离纯化; 性质

1. 引言

辣螺, 学名疣荔枝螺(*Thais clavigera* Kuster), 含有丰富的糖蛋白, 在我国南北沿岸及舟山各岛屿沿岸均有分布, 为岩相潮间带最习见螺类之一。目前已有研究证实海洋软体动物——海兔、虾夷扇贝和文蛤中的糖蛋白具有明显的抑瘤作用[1]-[3]。关于牡蛎提取液具有抗氧化作用[4] [5], 栉孔扇贝[6]和管角螺[7]等中提取的糖蛋白具有显著的抗肿瘤与增强免疫力的活性之类的研究更是引起了广泛的关注。糖蛋白是指由比较短, 往往带分支的寡糖链上的羟基与多肽某些特殊部位的羟基或酰基形成肽键的一类有侧链的复杂大分子物质, 在自然界广泛存在于动物、植物和某些微生物中, 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[8]-[10]。现在对海洋软体动物中提取糖蛋白的生物活性研究较多, 但对辣螺糖蛋白的研究较少。本研究只要利用阴离子交换柱、凝胶层析柱分析辣螺糖蛋白的组成, 以分离纯化辣螺糖蛋白。

2. 实验部分

2.1. 材料与仪器

2.1.1. 材料与试剂

新鲜辣螺(图 1), 购于舟山市南珍菜市场; 透析袋(34, MW:3000), 天津市纽森科技有限公司; DEAE-52 纤维素, Whatman 公司; Sephadex G-100, Pharmacia 公司; 考马斯亮蓝 R250, 美国 Fluka 公司; 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 硫酸铵, 氯化钠(分析纯), 国药集团化学试剂有限公司。

2.1.2. 仪器

日本日立 CR21G 冷冻离心机; BT1-100 恒流泵, 上海琪特分析仪器有限公司; FD-1000 冷冻干燥机, 上海爱朗仪器有限公司(东京理化器械(株)独资工厂); JJ-2 组织捣碎机, 上海梅香仪器有限公司; 华凌 BCD-199HC, 中国雪櫃實業有限公司; BSA323S 电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; UV-1100



Figure 1. *Thais clavigera* Kuster

图 1. 辣螺

紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; Nicolet-6700 付立叶红外光谱分析仪, 森井电机株式会社(香港); YP-2 固体压片机, 上海山岳科学仪器有限公司; WS70-1 红外线快速干燥器, 上海锦屏仪器有限公司通州分公。

2.2. 实验方法

2.2.1. 辣螺糖蛋白的提取

辣螺螺肉匀浆→冷冻保藏→解冻→加缓冲溶液浸提→4℃离心→过滤→糖蛋白粗提液→硫酸铵分级沉淀, 使浸提液中硫酸铵浓度分别达到 30%, 60%, 100%三个级别→4℃离心→收集清液透析→冷冻干燥→DEAE-52 阴离子交换层析→收集洗脱液冷冻干燥→Sephadex G-100 凝胶过滤层析→收集洗脱液冷冻干燥

2.2.2. 辣螺糖蛋白的分离

DEAE-52 离子交换层析柱, 分别用蒸馏水、0.1 mol/L、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱, 流速为 1.7 mL/min。分管收集, 逐管分别用苯酚-硫酸法和紫外分光光度法检测糖和蛋白的紫外吸收情况。收集单一峰组分(合并糖和蛋白洗脱曲线的重合峰位), 冷冻干燥。

2.2.3. 辣螺糖蛋白的纯化(改法同上)

Sephadex G-100 凝胶过滤层析柱(25 mm × 100 cm), 用蒸馏水洗脱, 流速为 1.7 mL/min, 每管收集 5 ml, 逐管分别用苯酚-硫酸法和紫外分光光度法检测糖和蛋白的紫外吸收情况。收集单一峰组分(合并糖和蛋白洗脱曲线的重合峰位), 冷冻干燥。

2.2.4. 总糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法, 以蒸馏水做空白对照, 以干燥后的葡萄糖在 0~140 μg/ml 范围内作准标准曲线, 测其总糖含量。

2.2.5. 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法, 用抗体作为标准蛋白, 在 20 ug~150 ug/100 ul 之间绘制标准曲线。根据标准曲线计算待测样本的浓度。

2.2.6. 辣螺糖蛋白的红外光谱测定

取样品 1 mg, 用 KBr 压片, 测定红外光谱, 扫描范围 4000~400 cm⁻¹。

3. 结果与分析

3.1. 辣螺糖蛋白的提取分离及其纯化

辣螺匀浆 200 g 经缓冲溶液浸提、硫酸铵分级沉淀、透析、冷冻干燥得到 3 组不同的粗糖蛋白，命分别名为 LGP-a, LGP-b, LGP-c，分别为 15.78 g, 7.83 g, 0.23 g。

3.2. DEAE-52 阴离子交换柱层析分离辣螺糖蛋白

经过翻阅大量的参考文献，本实验选择蒸馏水、0.1 mol/L、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液进行连续梯度洗脱，每个浓度洗脱 30 支试管。将辣螺糖蛋白 LGP-a, LGP-b, LGP-c 按上述方法分别进行洗脱，洗脱结果如图 2~图 4 所示：

透析后的 3 个级别硫酸铵沉淀辣螺粗糖蛋白液经阴离子交换柱 DEAE-52，用蒸馏水(试管号 1-30)、0.1 mol/L(试管号 31~60)、0.5 mol/L(试管号 61~90)的 NaCl 溶液进行连续梯度洗脱，辣螺糖蛋白得到较好的分离。分离的糖蛋白组成结果由图 1~图 3 所示，280 nm 蛋白质吸收峰主要有 5 个，其中 40% 级硫酸铵沉淀粗糖蛋白有 2 个峰，分别是 LGP-1 和 LGP-2；60% 级硫酸铵沉淀粗糖蛋白有 2 个峰，分别是 LGP-3 和 LGP-4, LGP-3 所得量极少；100% 级硫酸铵沉淀粗糖蛋白有 1 个峰，为 LGP-5(该组糖蛋白所得量极少)，用苯酚-硫酸法在 490 nm 下和考马斯亮蓝法在 280 nm 下检测，其总糖含量为 14.74%，蛋白质含量为

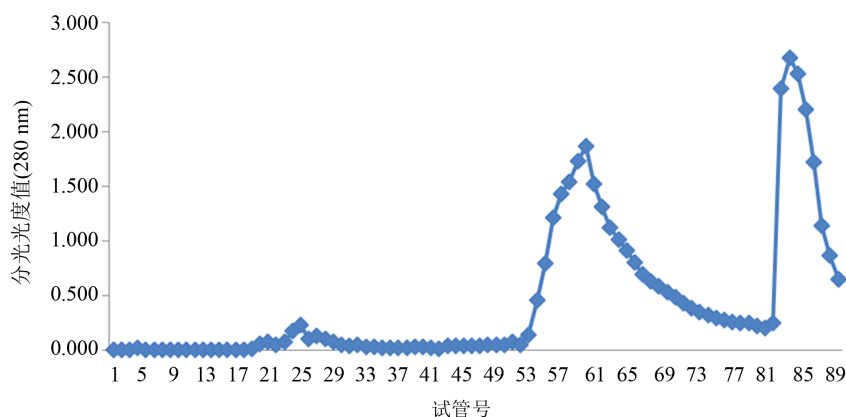


Figure 2. The separated results of LGP-a from *Thais clavigera* Kuster DEAE-52-ceUulose
图2. 辣螺糖蛋白LGP-a在DEAE-52上的洗脱

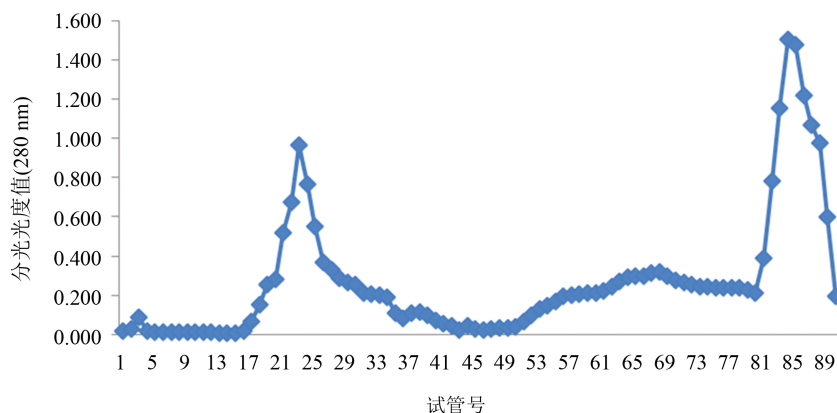


Figure 3. The separated results of LGP-b from *Thais clavigera* Kuster DEAE-52-ceUulose
图3. 辣螺糖LGP-b在DEAE-52上的洗脱

62.99%。峰 LGP-3 和 LGP-5 为未经洗脱液洗脱而透过的峰，可能为糖蛋白的凝聚体。

3.3. Sephadex G-100 凝胶过滤层析分离辣螺糖蛋白

分别收集糖蛋白 LGP-1 和 LGP-2, LGP-4 的洗脱液, 然后冷冻干燥, 用 Sephadex G-100 凝胶过滤层析柱分离糖蛋白 LGP-1, LGP-2, LGP-4, 以蒸馏水为洗脱液洗脱, 结果如图 5~图 7:

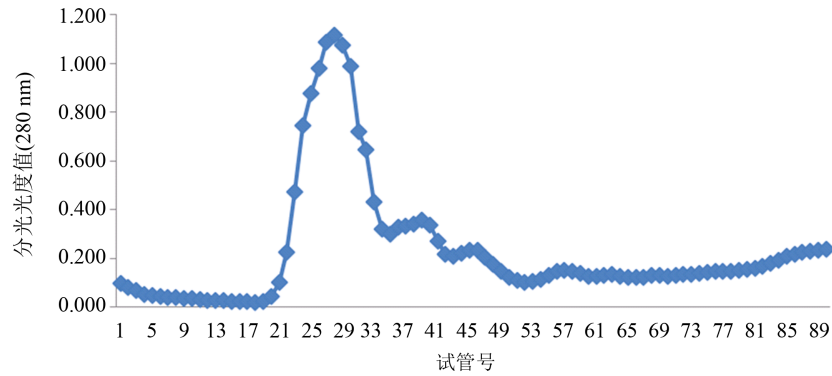


Figure 4. The separated results of LGP-c from *Thais clavigera* Kuster DEAE-52-ccUulose
图4. 辣螺糖LGP-c在DEAE-52上的洗脱

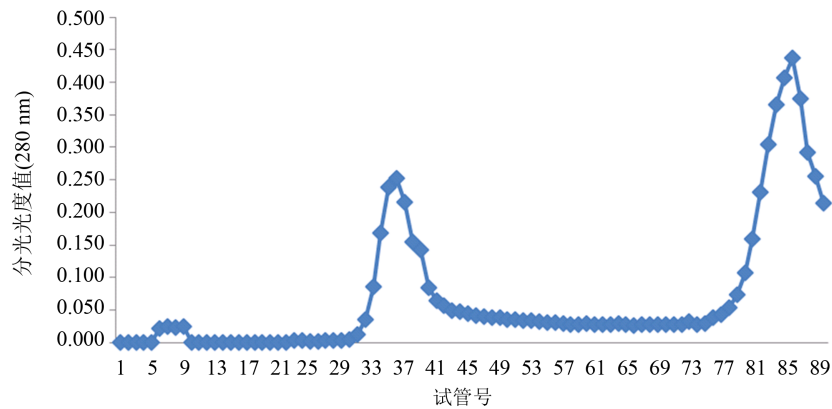


Figure 5. The separated results of LGP-1 on Sephadex G-100 gel
图5. LGP-1在Sephadex G-100上的洗脱

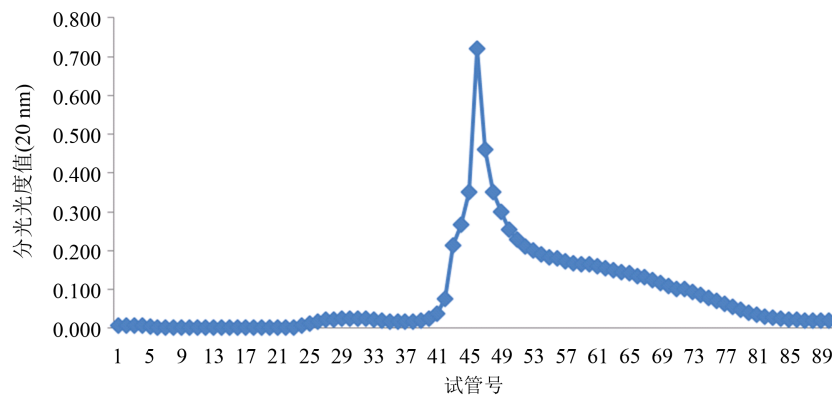


Figure 6. The separated results of LGP-2 on Sephadex G-100 gel
图6. LGP-2在Sephadex G-100上的洗脱

由图 4~图 6 所示,糖蛋白 LGP-1, LGP-2 和 LGP-4 在洗脱后得到 5 个峰。LGP-1 在洗脱后得到 2 个峰,分别是 LGP-I 和 LGP-II,其中 LGP-I 所得量极少。LGP-2 在洗脱后得到 1 个峰 LGP-III。LGP-4 在洗脱后得到 2 个峰,分别是 LGP-V 和 LGP-VI。用苯酚-硫酸法在 490 nm 下和考马斯亮蓝法在 280 nm 下检测,其总糖含量和蛋白质含量分别是 13.14%、21.57%、71.86%、60.86%。

3.4. 辣螺糖蛋白的红外光谱分析

分别收集 LGP-I 和 LGP-II, LGP-III, LGP-V 和 LGP-VI 的洗脱液,冷冻干燥,得到不同组分的糖蛋白白色粉末与 LGP-VII 粉末一起进行红外光谱分析,结果如图 8~图 12:

如图 8~图 12 所示,从红外数据分析来看,辣螺糖蛋白 LGP-c、LGP-II、LGP-III、LGP-V 和 LGP-VI 的特征吸收峰: $3500\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ 为糖的 O-H 伸缩振动区域; $3300\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ 区域为糖的 C-H 伸缩振动区域;都含有 -NH (1409.73 cm^{-1} , 1400.01 cm^{-1} , 1402.02 cm^{-1} , 1409.73 cm^{-1})、C-O-C (1068.38 cm^{-1} , 1124.31 cm^{-1} , 1240.02 cm^{-1} , 1105.03 cm^{-1} , 1133.96 cm^{-1}) 等糖链基团。都含有 $1670\sim 1570\text{ cm}^{-1}$ 区域的酰胺键(肽键)的特征吸收峰。同时还都具有明显的糖的特征吸收峰 ($898\sim 1089\text{ cm}^{-1}$)。

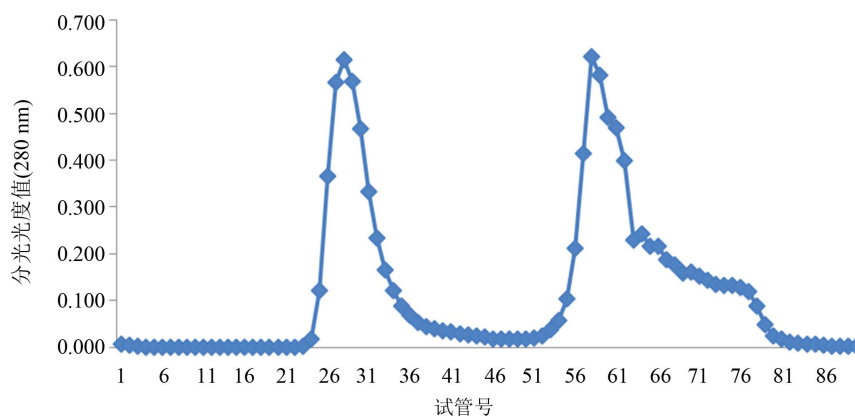


Figure 7. The separated results of LGP-4 on Sephadex G-100 gel

图7. LGP-4在Sephadex G-100上的洗脱

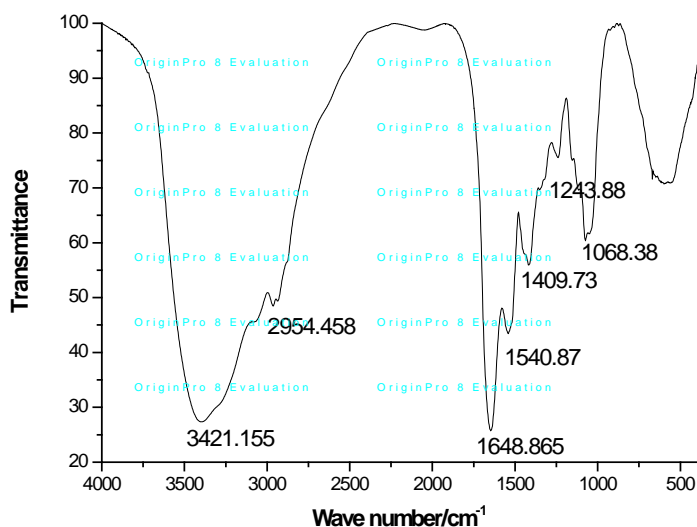


Figure 8. Infrared absorption spectra of LGP-VII in F22

图8. LGP-VII的红外光谱

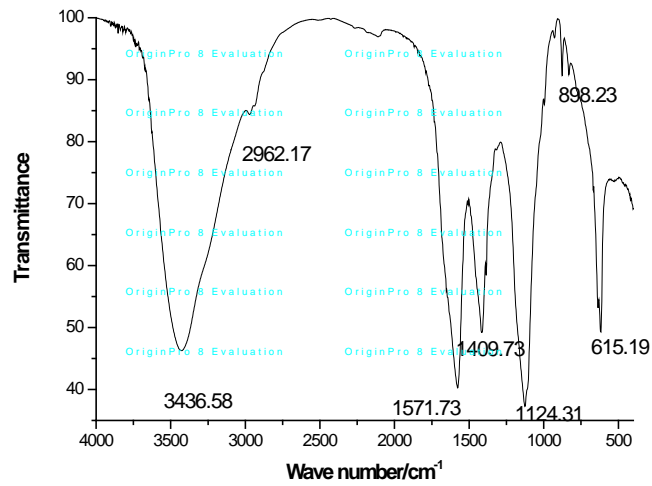


Figure 9. Infrared absorption spectra of LGP- II in F22
图9. LGP- II 的红外光谱

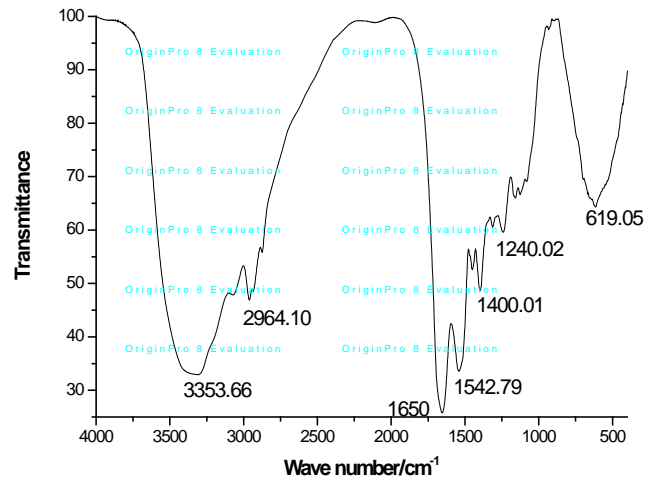


Figure 10. Infrared absorption spectra of LGP- III in F22
图10. LGP- III 的红外光谱

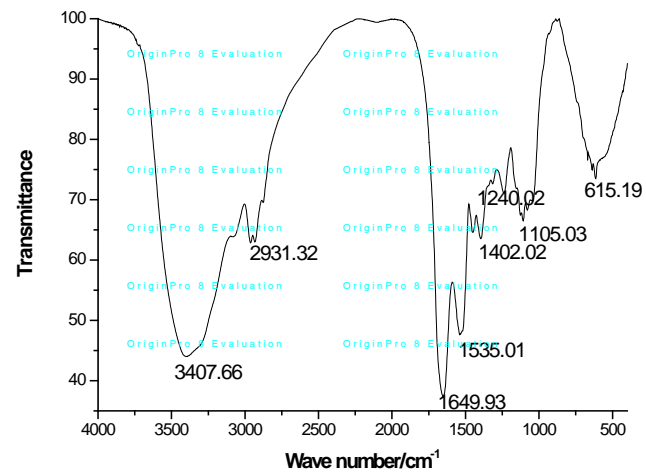


Figure 11. Infrared absorption spectra of LGP- V in F22
图11. LGP- V 的红外光谱

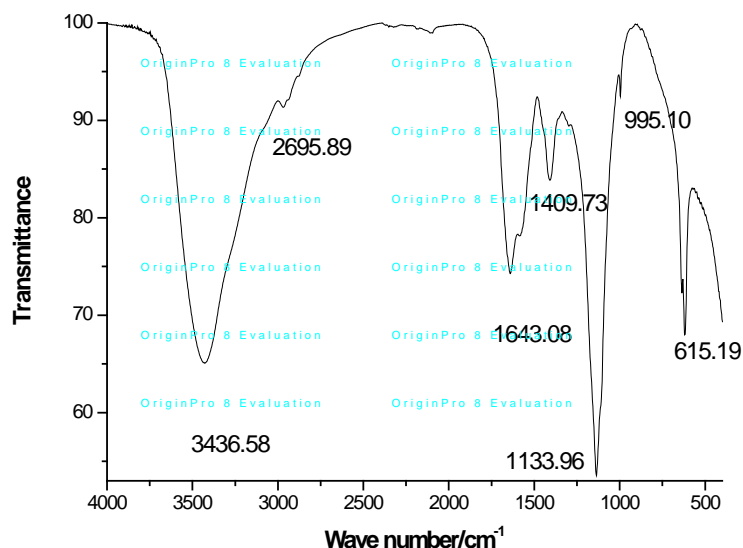


Figure 12. Infrared absorption spectra of LGP-VI in F22
图12. LGP-VI的红外光谱

4. 结论

本实验将辣螺糖蛋白经硫酸铵分级沉淀, DEAE-52 阴离子交换层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤层析分离纯化得到 5 个糖蛋白组分, 分别是 LGP- I, LGP- II, LGP-III, LGP-IV, LGP- V, LGP- VI, LGP- VII。其中 LGP- VII, LGP- I, LGP- IV 所获得的量极少。其他组分的总糖含量分别是 17.86%、20.00%、13.14%、21.57%, 蛋白质含量分别是 56.72%、62.58%、71.86%、60.86%。各组分蛋白都含有酰胺键, 糖的 O-H, C-H 伸缩振动的特征吸收峰及-NH、C-O-C 等糖链基团。

参考文献 (References)

- [1] Kamjya, H. and Muramoto, K. (1988) Studies on bioactive marine metabolites—Characterization of the antibacterial and antineoplastic glycoprotein in a sea hare *Aplysia juliana*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 737-777.
- [2] Kisugi, J., Ohye, H. and Kamjya, H. (1989) Biopolymers from marine invertebrates. X. mode of action of an antibacterial glycoprotein, aplysianin E, from eggs of a sea hare, *Aplysia kurodai*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **37**, 3050-3053.
- [3] Takuma, S., Noriko, A. and Hiroyoki, U. (1985) Antitumor activity of aqueous extracts of marine animals. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, **8**, 996-974.
- [4] Tapieroh, H. and Tew, K.D. (1996) Increased *glutathione* expression in cells induced by *Crassostera gigas* extract (JCOE). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **50**, 149-153.
- [5] Yoshikawat, T., Naito, Y., Masui, K., et al. (1997) Free radical-scavenging activity of *Crassostera gigas* extract (JCOE). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **51**, 328-332.
- [6] 顾谦群, 方玉春, 辛现良, 等 (2001) 栉孔扇贝糖蛋白的肿瘤抑制活性和对免疫功能的影响. *营养学报*, **23**, 200-202.
- [7] 傅余强, 顾谦群, 刘睿, 等 (2002) 管角螺肌肉中性糖蛋白的化学组成及抗肿瘤活性研究. *中国海洋药物*, **6**, 20-24.
- [8] Matsui, M., Kakuta M. and Misaki, A. (1996) Fine Structural features of oyster glycogen: Mode of multiple branching. *Carbohydrate Polymers*, **31**, 227-235.
- [9] 孙册, 莫汉庆 (1998) 糖蛋白与蛋白聚糖结构、功能和代谢. 科学出版社, 北京.
- [10] 武金霞, 赵晓瑜 (1993) 糖蛋白的结构、功能及分析方法. *中国生化药物杂志*, **1**, 31-34.