

# 蒜头果蛋白的提取及凝血活性测定

袁燕<sup>1</sup>,袁再美<sup>2</sup>,郭丽红<sup>3</sup>,程霞<sup>3</sup>,戴建辉<sup>1</sup>

(1. 云南民族大学 民族药资源化学国家民委—教育部重点实验室, 云南 昆明 650031;

2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201;

3. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214)

**摘要:**从云南、广西濒危植物蒜头果中分离、纯化出一种新的蛋白质—蒜头果蛋白,并分别用鸡、兔的红细胞悬液检测其凝血活性.结果表明,蒜头果蛋白对鸡、兔的红血球都具有凝集作用,是一种凝集素,有开发利用价值.

**关键词:**蒜头果蛋白;凝集素;凝血活性

**中图分类号:**Q502 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2012)03-0041-02

## Purification and Hemagglutination Activity Determination of Malanin

YUAN Yan<sup>1</sup>, YUAN Zai-mei<sup>2</sup>, GUO Li-hong<sup>3</sup>, CHENG Xia<sup>3</sup>, DAI Jian-hui<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, School of Chemistry and Biotechnology, Yunnan University of Nationalities, Yunnan Kunming 650031, China;

2. College of Animal Science & Technology, Yunnan Agriculture University, Yunnan Kunming 650201, China;

3. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China)

**Abstract:** A novel protein, designated as malanin, was isolated and purified from *Malania oleifera*, an endemic plant in Yunnan and Guangxi provinces. It was respectively measured hemagglutination activity for chicken and rabbit erythrocytes. The results show that malanin has hemagglutination activity for chicken and rabbit erythrocytes and malanin is a lectin which gives the utilizing value on developing it as a lectin.

**Key words:** Malanin; lectin; hemagglutination activity

植物凝集素是来源于植物的一类能凝集细胞和沉淀单糖或多糖复合物的非免疫来源的非酶蛋白质,广泛存在于大戟科、百合科、石蒜科、豆科、茄科和禾本科等植物中,具有与抗病毒、抗真菌、凝集细胞、自噬、免疫反应及诱导细胞凋亡等多种生物学活性<sup>[1]</sup>.目前,植物凝集素在生命科学、医学及农业等方面均有较高的研究价值和广阔的应用前景.

蒜头果(*Malania oleifera* Chun et S. Lee)属于铁青树科蒜头果属,仅分布在广西西部和云南东南部的狭窄地带,是我国特有的单种属濒危植物,属于国家二级保护树种,广西重点保护的野生植物<sup>[2-3]</sup>.蒜头果蛋白是从蒜头果中分离出的一种新的植物蛋白质<sup>[4]</sup>,是一种糖蛋白,中性糖质量分数为3.75%<sup>[5]</sup>.本文从蒜头果种仁中提取蒜头果蛋白并测定其凝血活性,期望能为蒜头果蛋白作为凝集素的开发利用奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

蒜头果种子(购于云南省文山州广南县);红血球分别从鸡血和兔血中提取.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蒜头果蛋白分离

捣碎蒜头果种仁,4℃抽提过液,纱布过滤,离心(8000 r/min, 30 min, 4℃),上清液用30%~100%(质量分数)硫酸铵沉淀,离心(同上),沉淀用20 mmol/L PBS pH7.2(含2.5 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)的缓冲液溶解,过滤后上蛋白质纯化系统(Amersham ÄKTA explorer 100),层析柱为疏水预装柱 Hiprep™ phenyl FF(High sub, 20 mL),并用 ddH<sub>2</sub>O(去离子水)按0%~100%线性梯度洗脱,紫外检测器在280 nm处检测,按峰收集<sup>[6-7]</sup>.

#### 1.2.2 血红细胞悬液制备

分别采集新鲜的鸡血、兔血,以3.8%(质量分

收稿日期:2012-02-07

基金项目:云南省应用基础研究面上资助项目(2009CD154);云南省教育厅重点资助项目(2011Z047);民族药资源化学国家民委—教育部重点实验室开放基金资助项目(MZY100101);云南民族大学青年资助项目(11QN03);大学生创新性实验资助项目(2011HX20)

作者简介:袁燕(1975—),女,江西分宜人,副教授,博士,硕士研究生导师,主要从事生物有机化学研究.

数)的柠檬酸钠作抗凝剂,比例为: $V(\text{血}):V(\text{抗凝剂})=1:1$ ,用0.9% (质量分数,下同)NaCl溶液洗涤,离心(1500 r/min,10 min),重复用0.9% NaCl溶液洗涤2~3次,直至上清液透明,弃上清,用0.9% NaCl溶液配成2% (体积分数)的红细胞悬液,置于4℃冰箱中暂存<sup>[8-9]</sup>.

### 1.2.3 凝血活性测定

将蒜头果蛋白配成质量浓度为2 mg/mL的溶液,0.22 μm滤膜过滤后与鸡、兔的红细胞悬液分别以1:1等体积混合,用微量进样器吸50 μL加入凹面载玻片上,盖上盖玻片,静置15~30 min后,在低倍显微镜(10×)下观察其凝集现象,同时以0.9% NaCl溶液作为空白对照<sup>[10]</sup>.

## 2 结果与分析

### 2.1 蒜头果蛋白的纯化

以洗脱体积为横坐标,280 nm下光吸收值(A)为纵坐标,得到4个蛋白质峰,按峰收集后做SDS-PAGE电泳检测.结果表明,在280 nm紫外检测下,吸收值最大的峰IV即为蒜头果蛋白溶液,如图1所示.纯化后的蒜头果蛋白的得率为25.93%.

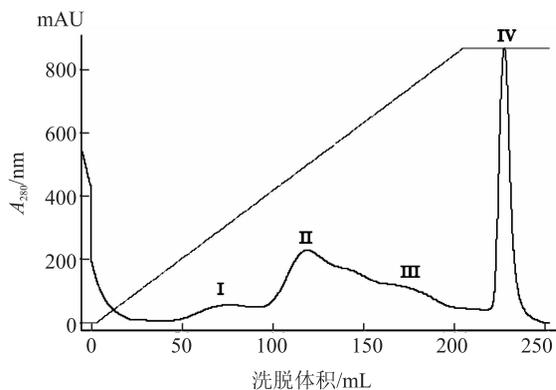


图1 蒜头果蛋白分离纯化色谱图

### 2.2 血凝效果测定

从图2、图3可以看出,蒜头果蛋白对鸡、兔的红细胞的都具有非常好的凝集效果,说明蒜头果蛋白是一种凝集素.

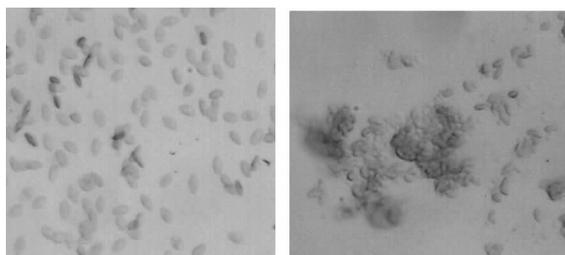


图2 蒜头果蛋白对鸡红血球的凝集活性

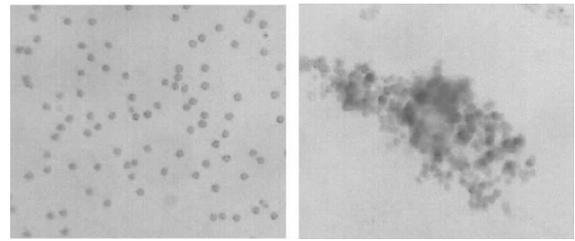


图3 蒜头果蛋白对兔红血球的凝集活性

## 3 结论

植物凝集素作为一种重要的天然产物,种类繁多,随着生命科学、医学及农业等方面的发展,以及对其理化性质、生物学活性和作用机制的深入研究,植物凝集素将会在细胞生物学、免疫学、肿瘤、生殖生理等方面提供新的研究手段和技术<sup>[11]</sup>.

结果证实,研究从蒜头果种仁中提取的蒜头果蛋白对鸡、兔的红血球都具有凝集作用,是一种植物凝集素,为蒜头果蛋白作为凝集素的开发利用提供了科学依据.而蒜头果蛋白作为一种植物凝集素的生物学活性及作用机制尚需进一步探究.

### [参考文献]

- [1]侯玉芳,李继昌,张德显,等.凝集素的提取纯化及其在兽医临床上的应用[J].中国兽医杂志,2010,46(2):62-64.
- [2]丘华兴,林有润.中国植物志:第二十四卷[M].北京:科学出版社,1988.
- [3]广西林业局保护站.广西壮族自治区重点保护野生植物资源调查报[R].南宁:广西壮族自治区林业局,2001.
- [4]袁燕,戴晓畅,段玲燕,等.蒜头果中一种新的植物蛋白(malanin)的分离纯化[J].云南大学学报:自然科学版,2009,31(4):428-432.
- [5]袁燕,戴晓畅,郭丽红,等.蒜头果蛋白性质的鉴定及其中性糖含量的测定[J].安徽农业科学,2009,37(31):15097-15098.
- [6]YAN Yuan, DAI Xiao-chang, WANG De-bin, et al. Purification, characterization and cytotoxicity of malanin, a novel plant toxin from the seeds of *Malania oleifera*[J]. Toxicon, 2009, 54: 121-127.
- [7]袁燕,袁再美,岑晓江,等.蒜头果凝集素的提取及血凝效果研究[J].中国农学通报,2011,27(21):144-146.
- [8]王庆忠,张鹭,吴耘红,等.14种蔬菜中凝集素的提取和生物活性研究[J].中国热带医学,2008,5(8):749-757.
- [9]王昌梅,张丽芬,杨明洁,等.大白芸豆凝集素毒性研究[J].安徽农业科学,2009,37(28):13639-13640.
- [10]赵则海,肖小琼,邱卓荣,等.四棱豆叶中凝集素的提取及其凝集活性研究[J].现代食品科技,2010,26(12):1341-1344.
- [11]舒晓燕,阮期平,侯大斌.植物凝集素的研究进展[J].现代中药研究与实践,2006,20(6):53-56.