

海蜇头糖蛋白分离纯化及免疫活性研究

任国艳, 梁旺春, 詹永献, 郭金英, 樊金玲, 陈树兴

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要: 以海蜇头为原料, 通过乙醇分级沉淀、柱层析等分离纯化方法, 获得 3 种组分均一的糖蛋白 JGP- II、JGP- III、JGP- IV。检测 3 种糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞增殖作用和转化能力的影响, 研究其免疫活性。结果表明: 3 种糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞均有增殖作用; 对脾淋巴细胞转化能力具有促进作用。

关键词: 海蜇头; 糖蛋白; 分离纯化; 免疫活性

Purification and Immune Activity of Glycoprotein Isolated from Jellyfish Oral Arms

REN Guo-yan, LIANG Wang-chun, ZHAN Yong-xian, GUO Jin-ying, FAN Jin-ling, CHEN Shu-xing

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Three kinds of homogeneous glycoprotein (JGP-II, JGP-III and JGP-IV) were isolated from jellyfish oral arms, and their immune activity was studied. The results showed that the three kinds of glycoprotein could improve the proliferation and transformation of mouse spleen lymphocytes.

Key words: jellyfish oral arms; glycoprotein; isolation and purification; immune activity

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0147-04

海蜇(*Rhopilema esculentum*)是我国主要海产品之一, 因其具有较高的营养价值和药用价值而深受消费者青睐。近年来, 关于海蜇生物活性物质研究已取得一定的进展, 如海蜇触手蛋白粗提液具有清除自由基的作用^[1]、伞盖胶原蛋白具有免疫和护肤活性^[2]、海蜇毒素具有抗氧化、溶血^[3-4]活性; 海蜇多肽具有降血压活性^[5]; 海蜇糖胺聚糖具有降血脂活性^[6]; 海蜇糖蛋白 JGP- III 具有清除自由基和免疫活性^[7-8]等, 但对海蜇头中不同组分糖蛋白免疫活性比较研究未见报道。本研究拟从海蜇头中分离纯化得到不同组分的糖蛋白, 比较其对小鼠脾淋巴细胞免疫活性的影响, 探讨海蜇不同糖蛋白的细胞免疫活性, 旨在为海蜇作为功能性食品进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

海蜇 2010 年 10 月购于青岛市沙子口渔港, 冰块冷却下低温运回实验室备用。

Balb/c 小鼠: 18~22g SPF 级, 购买于北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号为: SCXK(京)20100010。

Sp Sephadex C-25 阳离子交换树脂 美国 Pharmacia 公司; Sephacryl S-300HR 美国 Amersham BioscienceAB 公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳标准品、胎牛血清 洛阳爱普特生化试剂有限公司; RPMI1640 培养基 美国 Gibco 公司; 刀豆球蛋白(ConA) 美国 Sigma 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

蛋白质氨基酸自动分析系统 上海沪西分析仪器有限公司; 旋转蒸发器 天津市纽森科技有限公司; Jouan BR4i 低温冷冻离心机 法国 Jouan 公司; 低温冷冻干燥机 北京惠诚佳仪科技有限公司; Mini- 电泳系统 北京市六一仪器厂; 倒置荧光显微镜 日本 Olympus 公司; UV/VIS Bio40 紫外分光光度计 日本 Perkin Elmer 公司; 680 型酶标仪 美国 Biorad 公司; DL-CJ-1N 型超净工作台 北京东联哈尔仪器制造有限公司。

1.3 海蜇头糖蛋白的提取工艺流程

新鲜海蜇头→清洗、破碎→缓冲液浸提→过滤、离心→浓缩→乙醇分级沉淀→透析→低温冷冻干燥→海蜇头糖蛋白粗品

1.4 分离纯化^[9]

1.4.1 Sp Sephadex C-25 阳离子交换柱层析分离

收稿日期: 2011-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000765); 河南科技大学青年基金项目(2010QN003)

作者简介: 任国艳(1976—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为生物活性物质及功能制品。E-mail: guoyan.ren@yahoo.com.cn

用 5mL 提取缓冲液溶解 0.5g 海蜇头糖蛋白粗品, 微膜过滤后, 上样到层析柱(1.6cm × 60cm), 用 0~1mol/L NaCl 洗脱剂进行连续梯度洗脱, 流速 1mL/min; 每管收集 5mL, 用 220nm 波长检测蛋白质流出。收集后逐管检测多糖(用硫酸-苯酚法, 波长 490nm), 收集即有多糖检出又有蛋白质的检出管, 然后装入透析袋, 在水中透析 2d, 冷冻干燥, 即得海蜇头糖蛋白各级分的半纯品。

1.4.2 海蜇头糖蛋白各级分半纯品的 Sephacryl S300HR 柱层析

分别称取 0.1g 海蜇头糖蛋白各级分半纯品, 用 5mL 0.02mol/L pH7.2 磷酸缓冲液溶解, 微膜过滤后上柱, 用 pH7.2 PBS 缓冲溶液作为洗脱剂洗脱, 流速 0.5mL/min, 每管收集 2.5mL。按洗脱峰检测管中蛋白质和多糖的含量, 收集即有多糖又有蛋白质的管, 合并洗脱液, 在水中透析 3d, 冷冻干燥, 分离得到 JGP- II、JGP- III、JGP- IV 海蜇头均一糖蛋白。

1.5 SDS-PAGE 电泳方法

参考文献[10-11]方法(稍有改动)电泳, 即: 配制电泳试剂→制备 5% 浓缩胶、7.5% 分离胶、电泳缓冲液→样品变性处理→点样→恒压电泳→考马斯亮蓝和 PAS 染色→脱色→图像分析

1.6 小鼠脾淋巴细胞的制备

按照文献[12]的方法进行小鼠脾淋巴细胞分离。颈椎脱臼法处死小鼠, 无菌取脾, 将脾脏置于培养皿中, 用 Hank's 液漂洗, 粗剪成小块, 置入 200 目不锈钢筛网上, 用注射器芯轻轻挤压, 收集滤过的细胞悬液, 去除红细胞。再采用玻璃黏附法纯化淋巴细胞, 计数接种培养。制备 $1\sim5 \times 10^6$ 个细胞/mL 的细胞悬液待用。

1.7 小鼠脾淋巴细胞活性检测

1.7.1 小鼠脾淋巴细胞增殖的检测

采用 MTT 法^[12]。取 24 孔细胞培养板, 每孔中加入 100μL 含 $1\sim5 \times 10^6$ 个细胞/mL 的细胞悬液, 每孔加入不同浓度的各组分糖蛋白, 最终体积为 500μL, 设空白对照孔(不加任何药物, 只有细胞和培养液), 同时设无细胞对照, 以排除假阳性。每一浓度 6 个重复孔。置于培养箱中培养 72h。培养结束前 4h, 每孔加 50μL MTT 染液继续培养。培养结束, 每孔加入 500μL 含 10% 的十二烷基硫酸钠(SDS)(用 10mmol/L 盐酸配制)溶液, 溶解结晶物, 在 570nm 波长处测定吸光。

1.7.2 小鼠脾淋巴细胞转化的检测

采用 MTT 法^[12]。取 24 孔细胞培养板, 每孔中加入 100μL 含 $1\sim5 \times 10^6$ 个细胞/mL 的细胞悬液, 每孔加入不同浓度的各组分糖蛋白, 最终体积为 500μL, 同时加入促 T 细胞有丝分裂原刀豆蛋白(ConA), 终质量

浓度为 5μg/mL。设空白对照孔(不加任何药物, 只有细胞和培养液), 同时设 ConA 对照及无细胞对照。每一浓度 6 个重复孔。培养和测定方法同 1.7.1 节。

2 结果与分析

2.1 乙醇分级沉淀

用 95% 乙醇进行分级沉淀, 根据沉淀情况分 4 个级别, 分别为 0~30%、30%~60%、60%~80%、80%~90%, 整个沉淀过程在冰浴条件下进行。将乙醇缓慢的加入提取液中, 并不停的搅拌, 冰箱中静置沉淀完全, 冷冻离心干燥。分别用硫酸-苯酚法检测各组分糖含量, 用 Folin-酚法检测蛋白含量。在 60%~80% 组分沉淀中, 既有蛋白又含有糖, 且含量较高, 得率也较高。综合考虑, 选择这一组分进行分离纯化。

2.2 Sp Sephadex C-25 阳离子交换柱层析分离

经过大量的预备实验, 选择 0~1mol/L 的氯化钠溶液进行连续梯度洗脱, 洗脱结果如图 1 所示: 用 0~1mol/L NaCl 在 Sp Sephadex C-25 阳离子交换上进行连续梯度洗脱, 海蜇头糖蛋白得到较好的分离。海蜇头粗糖蛋白经洗脱后, 得到 5 个主峰, 峰面积之比为: 4.27:12.73:65.24:13.18:4.58, 分别用硫酸-苯酚法和 Folin-酚法检测各组分糖含量和蛋白含量。结果发现: 峰 II、III、IV 即含有蛋白又含有糖, 糖和蛋白的含量分别为 4.37%、11.35%、4.23% 和 90.63%、87.32%、89.54%, 考虑本实验研究的对象, 选择峰 II、III、IV 进行研究, 并分别命名为 JGP- II、JGP- III、JGP- IV, 收集高峰部位, 透析, 冷冻干燥, 进行下一步分析。

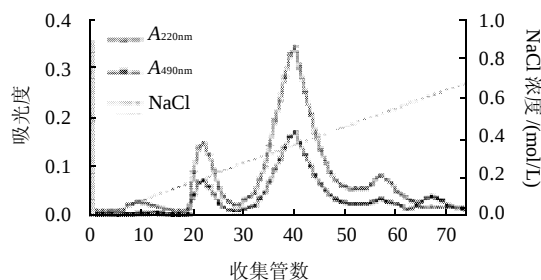


图1 海蜇头糖蛋白粗品在 Sp sephadex C-25 柱层析洗脱图谱
Fig. 1 Chromatographic profile of crude glycoprotein from jellyfish oral arms on Sp Sephadex C-25 column

2.3 Sephacryl S300HR 柱层析纯化海蜇头糖蛋白半纯品

采用 0.02mol/L pH7.2 磷酸缓冲液作为洗脱剂, 在 Sephacryl S300HR 层析柱上对海蜇糖蛋白 JGP- II、JGP- III、JGP- IV 进行纯化, 各组分糖蛋白通过层析柱后流出曲线如图 2~4 所示: 海蜇头糖蛋白半纯品 JGP- II、JGP- III、JGP- IV 在 Sephacryl S300HR 层析柱上的流出曲线, 均有 1 个主峰, 说明其组成均一, 取此高峰部分, 透析、冷冻干燥后, 备用。

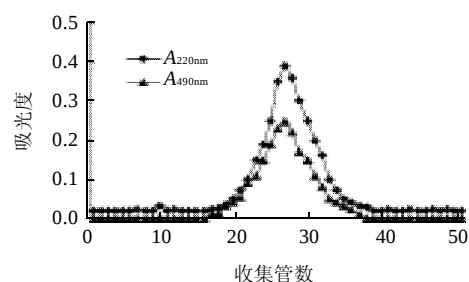


图2 JGP- II Sephacryl S-300HR 上洗脱图谱

Fig. 2 Chromatographic profile of JGP-II on Sephacryl S-300HR column

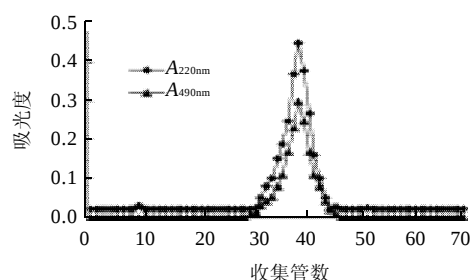


图3 JGP- III在Sephacryl S-300HR 上洗脱图谱

Fig. 3 Chromatographic profile of JGP-III on Sephacryl S-300HR column

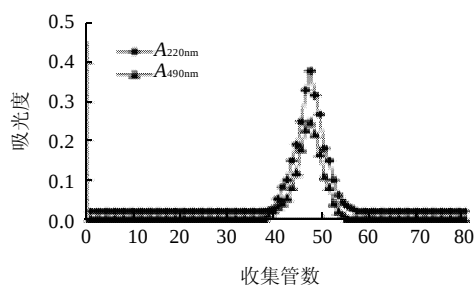
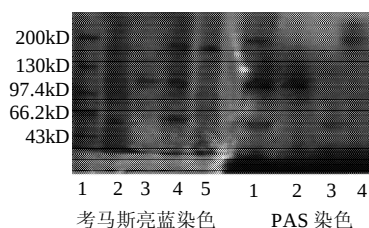


图4 JGP- IV在Sephacryl S-300HR 上洗脱图谱

Fig. 4 Chromatographic profile of JGP-IV on Sephacryl S-300HR column

2.4 不连续 SDS-PAGE 鉴定纯化后的糖蛋白



考马斯亮蓝染色: lane 1. 标准蛋白; lane 2. JGP- II; lane 3. JGP- III; lane 4. 粗提液; lane 5. JGP- IV; PAS 染色: lane 1. 粗提液; lane 2. JGP- III; lane 3. JGP- II; lane 4. JGP- IV。

图5 JGP- II、JGP-III、JGP- IV的 SDS-PAGE 上电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE of JGP- II, JGP-III and JGP- IV

由图5可见,通过两种染色方法证明海蜇头粗提液中含有3种糖蛋白,这3个组分经分离纯化后,均得到组成均一的糖蛋白。JGP- II、JGP- III和JGP- IV的分子质量分别为60、109.7kD和180kD。

2.5 不同糖蛋白对小鼠脾脏细胞增殖活性的影响

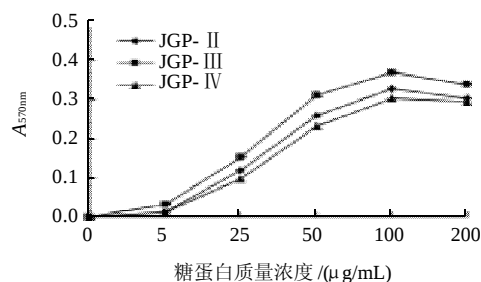


图6 不同质量浓度糖蛋白对脾脏细胞增殖活性的影响

Fig. 6 Effect of glycoprotein concentration on mouse spleen cell proliferation

测定淋巴细胞增殖反应是检测细胞免疫功能的常用方法,细胞增殖活性可以反应细胞免疫功能。3种糖蛋白JGP- II、JGP-III和JGP-IV对小鼠脾淋巴细胞增殖活性的影响如图6所示,当质量浓度小于100 μg/mL,随着质量浓度的增加,糖蛋白对脾淋巴细胞增殖作用增强,但糖蛋白质量浓度低于5 μg/mL时,糖蛋白对细胞增殖作用较小,质量浓度在5~100 μg/mL之间,糖蛋白对细胞增殖作用迅速增加,直至达到最大值。当质量浓度超过100 μg/mL时,随着质量浓度的增加,糖蛋白对脾淋巴细胞增殖作用减弱。对细胞增殖活性的影响,JGP- III > JGP- II > JGP- IV。范秀萍等^[13]研究章鱼糖蛋白发现,章鱼糖蛋白在一定剂量内对小鼠脾淋巴细胞有一定的增殖作用,但不同提取方法、不同硫酸铵分级沉淀获得糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞增殖作用不同。章建设等^[14]研究鱿鱼内脏糖蛋白发现,鱿鱼内脏糖蛋白在一定剂量内,对小鼠脾淋巴细胞有增殖作用。本实验结果表明3种糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞的增殖作用趋势基本与章鱼糖蛋白和鱿鱼内脏糖蛋白的一致,说明其具有细胞丝裂原性质。3种糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞增殖作用不同,可能是由于糖含量和蛋白含量(比例)不同造成的。

2.6 不同糖蛋白对小鼠脾脏细胞转化的影响

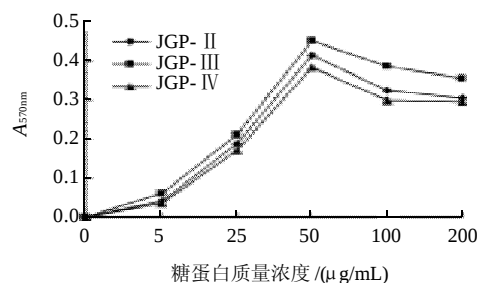


图7 不同质量浓度糖蛋白对脾脏细胞转化活性的影响

Fig. 7 Effect of glycoprotein concentration on mouse spleen cell transformation

细胞转化率高可以反映机体的免疫水平。3种糖蛋白JGP- II、JGP- III和JGP- IV对小鼠脾淋巴细胞转化能力的影响如图7所示,由图7可以看出,当质量浓度小

于 50 $\mu\text{g/mL}$, 随着质量浓度的增加, 糖蛋白对脾淋巴细胞转化能力有明显促进作用, 当质量浓度大于 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 随着质量浓度的增加, 糖蛋白对脾淋巴细胞转化能力有抑制作用。对细胞转化能力的影响, JGP- III > JGP- II > JGP- IV。对于脾淋巴细胞转化能力的影响, 不同的刺激物影响不同。鱿鱼内脏糖蛋白与 ConA 共同刺激小鼠脾淋巴细胞时, 对脾淋巴细胞转化无明显作用^[14]。灵芝多糖对脾淋巴细胞转化能力有抑制作用^[15]。本实验结果表明 3 种糖蛋白对细胞转化能力影响的双重性, 低质量浓度时促进细胞转化, 高质量浓度时抑制细胞转化, 不同组成成分的糖蛋白对细胞转化能力的影响也不同。

3 结 论

3.1 通过柱层析方法, 从海蜇头分离纯化出 3 种糖蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳验证, 每种糖蛋白组成均一。

3.2 在一定质量浓度范围内, 3 种糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞均有增殖作用, 增殖活性 JGP- III > JGP- II > JGP- IV, 表明 3 种糖蛋白具有细胞丝裂原性质。

3.3 在一定质量浓度范围内, 3 种糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞转化能力均有增强作用, 增强作用顺序 JGP- III > JGP- II > JGP- IV, 表明 3 种糖蛋白与细胞分裂素有协同作用。

参考文献:

- [1] YU Huahua, LIU Xiguang, XING Rong, et al. Radical scavenging activity of protein from tentacles of jellyfish *Rhopilema esculentum*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005, 10(15): 2659-2664.
- [2] 庄永亮. 海蜇胶原蛋白理化性质及护肤活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [3] YU Huahua, LI Cuiping, LI Ronggui, et al. Factors influencing hemolytic activity of venom from the jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye [J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(7): 1173-1178.
- [4] LI Cuiping, YU Huahua, LIU Song, et al. Factors affecting the protease activity of venom from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005, 24(15): 5370-5374.
- [5] 安桂香. 海蜇活性肽的制备及降压效果的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [6] 金晓石, 吴红棉, 钟敏, 等. 海蜇糖胺聚糖提取、纯化及其降血脂作用研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(4): 41-44.
- [7] 任国艳, 李八方, 赵雪, 等. 海蜇头糖蛋白清除自由基活性及构效关系的初步研究[J]. 中国海洋药物, 2008, 26(4): 41-44.
- [8] 任国艳. 海蜇头糖蛋白理化性质及免疫活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [9] 任国艳, 侯玉泽, 乌仁套迪, 等. 海蜇头糖蛋白的分离纯化及组成分析[J]. 食品科技, 2009, 34(7): 191-195.
- [10] YANG Jianting, WU Caie, LI Yingying, et al. Identification and purification of an allergic glycoprotein from *Ginkgo biloba* Kernel[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(4): 631-641.
- [11] NIE Shaoping, XIE Mingyong, FU Zhihong, et al. Study on the purification and chemical compositions of tea glycoprotein[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(4): 626-633.
- [12] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 155; 193.
- [13] 范秀萍, 雷晓凌, 吴红棉, 等. 章鱼糖蛋白对小鼠脾细胞的增殖作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(6): 585-586.
- [14] 章建设, 雷晓凌. 鱿鱼内脏糖蛋白提取工艺及其免疫活性初步研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(2): 167-169.
- [15] 陈春锋, 杨晓彤, 李绪全, 等. 5 个不同灵芝种菌株多糖理化性质及免疫活性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 628-633.