

## 富硒灵芝硒蛋白 (Se-GL-P) 生化性质的初步分析\*

杜明<sup>1,2)</sup> 胡小松<sup>1)</sup> 王聪<sup>3)</sup> 赵广华<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

<sup>2)</sup>哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 哈尔滨 150001;

<sup>3)</sup>东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

**摘要** 作为阐明一种从富硒灵芝中得到的蛋白(Se-GL-P)结构与功能关系的基础性工作, Se-GL-P 的结构在此得到了初步表征. 分子质量通过电泳和分子筛两种方法进行了测定, 通过高效液相色谱、毛细管等电聚焦电泳、原位胶内酶切和 Edman 降解等方法分别测定了蛋白质的氨基酸组成、等电点、肽图以及 N 端氨基酸序列等方面的性质, 并对其同源性进行了鉴定. 结果表明, 该蛋白质的相对分子质量为 36 600, 等电点为 4.01, N 端 20 个氨基酸序列为 DINGGGATLPQKLYLTPDVL. 实验得到结论: Se-GL-P 是一种新的硒蛋白, 并属于功能性 DING 蛋白家族的一员.

**关键词** 富硒灵芝, 硒蛋白, Se-GL-P, 性质, 分析

**学科分类号** Q5

灵芝具有多种生物活性, 较重要的是抗肿瘤、双向免疫调节、镇静安神、强心、抗缺氧、清除自由基以及延缓衰老等作用<sup>[1~4]</sup>. 研究表明, 灵芝蛋白可能是灵芝中具有免疫调节活性的成分之一, 具有潜在的临床应用价值<sup>[5]</sup>. 微量元素硒同样具有许多生物学活性, 怎样把灵芝与硒元素的生物活性很好地结合起来是一个非常有趣的课题. 最近富硒灵芝被成功培育, 目的是通过富硒增加灵芝的活性, 同时富硒灵芝又可以是作为一种优良的有机硒补充剂<sup>[6]</sup>. 许多硒蛋白具有多种重要的生理功能, 它也是硒在人体内发挥作用的主要形式. 基于以上原因, 本课题组从富硒灵芝子实体中纯化出一种硒蛋白(Se-GL-P)<sup>[6]</sup>, 以期发挥灵芝蛋白和微量元素硒的共同功效.

蛋白质组学研究的两大核心技术是蛋白质成分的分离和鉴定. 蛋白质经分离纯化后, 必须通过适当技术鉴定, 才能知道蛋白质的性质、结构和功能, 从而最终实现蛋白质组的研究<sup>[7,8]</sup>. 因此, 本文将对纯化得到的 Se-GL-P 的结构进行初步表征, 旨在了解它的结构, 进而对它的同源性进行鉴定, 为进一步阐明该蛋白质结构与功能间的关系打下基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与试剂

Se-GL-P 由本课题组从富硒灵芝子实体中分离纯化得到<sup>[6]</sup>; Sephadex G-150、电泳分子质量标准、分子排阻层析蛋白质分子质量标准、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、APS、TEMED、等电点标准试剂盒等购自 Sigma-Aldrich 公司(北京); 微量元素标准品、D-葡萄糖标准品、三氟乙酸(TFA)、 $\beta$ -D-麦芽糖苷(n-dodecyl  $\beta$ -D-maltoside)购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶(trypsin)购自 Roche 公司; 乙腈为 Fisher 色谱纯.

### 1.2 实验方法

**1.2.1 Se-GL-P 分子质量及糖含量的测定.** 通过 SDS-PAGE 法和分子排阻层析 2 种方法对其分子质量进行测定<sup>[9~11]</sup>. 采用苯酚-硫酸法对其结合的糖含量进行测定, 用标准 D-葡萄糖制作标准曲线<sup>[12]</sup>.

\* 中国教育部“新世纪优秀人才支持计划”基金资助(NCET-04-0134).

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-62737434, E-mail: gzhao318@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-07-04, 接受日期: 2006-08-29

**1.2.2 Se-GL-P 等电点测定.** 采用毛细管等电聚焦电泳法(CIEF)测定 Se-GL-P 的等电点<sup>[13]</sup>. 等电点标准蛋白为: 核糖核酸酶 A(ribonuclease A),  $pI = 9.45$ ; 碳酸酐酶(carbonic anhydrase),  $pI = 5.89$ ; 肠促胰酶肽(CCK peptide),  $pI = 2.75$ .

**1.2.3 Se-GL-P 氨基酸组成测定.** 采用美国 Waters 公司具有荧光检测器的 HPLC 及其专用方法进行测定<sup>[14]</sup>, 以未经过纯化的硒蛋白作为对照. 样品处理及衍生方法为 Waters 公司的专利所有.

**1.2.4 Se-GL-P 的 N 端氨基酸残基序列测定.** 蛋白质 N 端的氨基酸残基序列通过 Edman 降解的方法<sup>[15]</sup>, 在蛋白质序列仪(Protein Sequencer - 491, Applied Biosystems 公司, 美国)上进行测定.

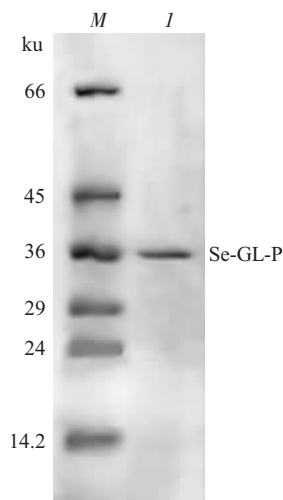
**1.2.5 Se-GL-P 肽质量指纹图谱测定.** 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对 Se-GL-P 的肽质量指纹图谱(PMF)进行鉴定分析, 依次经过电泳、胶内酶切和生物质谱 3 个步骤<sup>[16]</sup>, 再将质谱结果用 Mascot 软件在相应的数据库中进行肽指纹图谱检索<sup>[17, 18]</sup>.

**1.2.6 统计分析.** 采用软件 SAS 9.0 (SAS Institute Inc, USA)进行单因素方差分析, Microcal Origin 7.5 (Microcal Software, Inc., USA)作图, 显著水平为 0.05. 所有的实验作 3 个重复和 3 个平行.

## 2 结 果

### 2.1 Se-GL-P 的分子质量

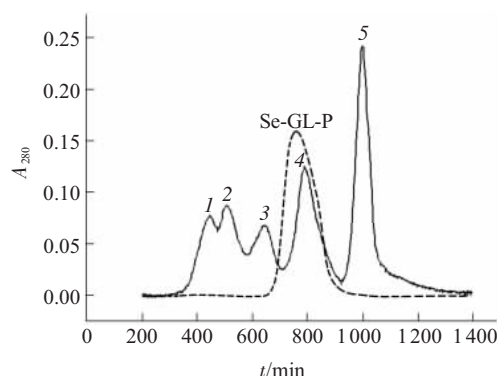
通过还原状态下 SDS-PAGE 法测定出来的 Se-GL-P 分子质量是 36 600 u, 结果如图 1 所示. 由分子排阻层析法测定 Se-GL-P 分子质量的结果如图 2 所示, 此方法得出的分子质量与加入了  $\beta$ - 巯基



**Fig. 1 SDS-PAGE analysis of Se-GL-P**

M: Protein molecular mass marker; I: Se-GL-P.

乙醇的 SDS-PAGE 得出的分子质量基本相当, 稍有不同是方法差异引起的. 因此, Se-GL-P 是只具有一个亚基的单链蛋白, 相对表观分子质量为 36 600.

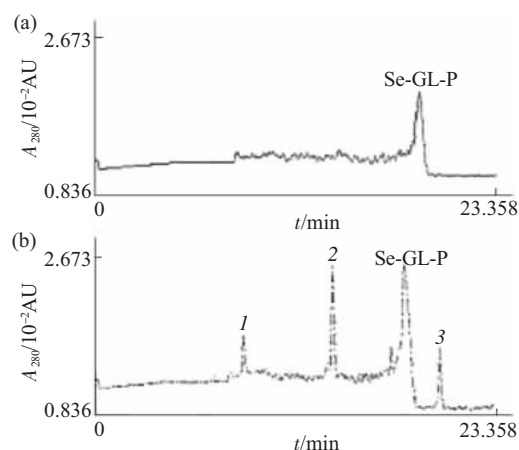


**Fig. 2 Overlay of a size exclusion chromatogram of Se-GL-P and size exclusion standards**

—: Size exclusion standards; 1:  $\beta$ -Amylase (200 000); 2: Yeast alcohol dehydrogenase (150 000); 3: Bovine serum albumin (66 000); 4: Carbonic anhydrase (29 000); 5: Horse heart cytochrome C (12 400). ----: Se-GL-P.

### 2.2 Se-GL-P 的等电点和糖含量

测定蛋白质等电点的方法有多种, CIEF 是其中较为经典而可靠的一种, 通过这种方法也可以鉴定蛋白质的纯度. 等电点测定图谱如图 3 所示, 等电点标准品和 Se-GL-P 的保留时间和等电点结果如表 1 所示.



**Fig. 3 Chart of CIEF of Se-GL-P**

(a) Se-GL-P. (b) Mixture of Se-GL-P and standards. 1: Ribonuclease A; 2: Carbonic anhydrase; 3: CCK peptide.

**Table 1 Result of determination of  $pI$  of Se-GL-P by CIEF**

| Number | Sample             | Retain time | $pI$ |
|--------|--------------------|-------------|------|
| 1      | Ribonuclease A     | 8.90        | 9.45 |
| 2      | Carbonic anhydrase | 14.32       | 5.90 |
| 3      | CCK peptide        | 20.81       | 2.75 |
| 4      | Se-GL-P            | 18.26       | 4.01 |

图 3a 是 Se-GL-P 的 CIEF 图, 从中可以看出只有一个单一峰, 充分说明了 Se-GL-P 的纯度; 图 3b 是将样品与标准品混和后的 CIEF 图, 图中从左至右按出峰时间先后排列的依次为 Ribonuclease A, Carbonic anhydrase, Se-GL-P 和 CCK Peptide. 图 3a, b 两幅图中 Se-GL-P 的迁移率略微有所差异, 这是系统误差造成的. 根据图 3a 反映出的 Se-GL-P 纯度以及图 3b 中只有 4 个尖峰的结果可知, 这点差异并不影响对该蛋白质等电点的判定. 根据得到的等电点标准曲线可计算出 Se-GL-P 的等电点为 4.01, 是一种酸性蛋白.

Se-GL-P 中糖含量的测定结果显示, 该蛋白质中糖链部分的重量百分含量为 19.8%.

2.3 Se-GL-P 的氨基酸组成

Se-GL-P 的氨基酸组成测定结果如表 2 所示, 同时给出了有关 LZ-8 的氨基酸组成的数据<sup>[19]</sup>.

从表 2 可以看出, Se-GL-P 中的天冬氨酸 (Asp)、甘氨酸 (Gly)、谷氨酸 (Glu)、丙氨酸 (Ala)、和丝氨酸 (Ser) 的含量明显比较高, 其中 Asp (13.5%) 的含量是最高的. 并且, 酸性氨基酸 (Asp, Glu) 的含量明显比较高, 而碱性氨基酸的含量却比较低, 精氨酸和赖氨酸的摩尔百分含量分别只有 2.69% 和 3.29%. 因此, 从氨基酸组成来看, Se-GL-P 是一个酸性蛋白质.

硒代甲硫氨酸 (Se-Met) 的测定结果如表 3 所示. Se-GL-P 测试样品中, Se-Met 的浓度为 12.47 mg/L, 而测定出的氨基酸总量为 1.501 g/L, 所以 Se-GL-P 中 Se-Met 的含量为 8.308 mg/g. 另外根据 Se-Met 的分子质量 (196.1), 可以得出 Se-Met 中的 Se 占 Se-GL-P 总硒含量 (4.87 mg/g<sup>[6]</sup>) 的百分率为 68.725%, 所以其余的 31.275% 是以硒代半胱氨酸 (Se-Cys) 形式存在的.

Table 2 Amino acid composition of Se-GL-P

| Amino acid | Se-GL-P (Mol %) | LZ-8 <sup>[19]</sup> (Mol %) | Amino acid | Se-GL-P (Mol %) | LZ-8 <sup>[19]</sup> (Mol %) | Amino acid | Se-GL-P (Mol %)    | LZ-8 <sup>[19]</sup> (Mol %) |
|------------|-----------------|------------------------------|------------|-----------------|------------------------------|------------|--------------------|------------------------------|
| Asp        | 13.52           | 18.37                        | Ala        | 10.86           | 6.77                         | Ile        | 3.31               | 5.31                         |
| Glu        | 10.85           | 5.43                         | Arg        | 2.69            | 3.40                         | Leu        | 4.42               | 5.56                         |
| Ser        | 8.37            | 5.78                         | Tyr        | 5.17            | 5.23                         | Lys        | 3.29               | 5.24                         |
| His        | 1.25            | 0.00                         | Val        | 6.03            | 9.79                         | Pro        | 4.59               | 4.58                         |
| Gly        | 11.56           | 7.61                         | Met        | 2.80            | 0.00                         | Trp        | ---- <sup>1)</sup> | 2.64                         |
| Thr        | 7.86            | 8.24                         | Phe        | 3.39            | 5.98                         | Cys        | 0.27               | 0.00                         |

<sup>1)</sup>Not detectable.

Table 3 Results and related information of determination of Se-Met

| Number | Item                                            | Value      |
|--------|-------------------------------------------------|------------|
| 1      | Content of Se-Met in solution detected          | 12.47 mg/L |
| 2      | Total amino acids amount detected               | 1.501 g/L  |
| 3      | Content of Se-Met in protein                    | 8.308 mg/g |
| 4      | Mr of Se-Met                                    | 196.1      |
| 5      | Selenium content of Se-GL-P                     | 4.87 mg/g  |
| 6      | Percentage of Se (Se-Met) in total Se           | 68.725%    |
| 7      | Computing percentage of Se (Se-Cys) in total Se | 31.275%    |

2.4 Se-GL-P 的 N 端氨基酸序列

用多肽氨基酸序列测定仪进行 Se-GL-P 的 N 端 20 个氨基酸残基的检测, 其排列顺序为: Asp (D)、Ile (I)、Asn (N)、Gly (G)、Gly (G)、Gly (G)、Ala (A)、Thr (T)、Leu (L)、Pro (P)、Gln (Q)、Lys (K)、Leu (L)、Tyr (Y)、Leu (L)、Thr (T)、Pro (P)、Asp (D)、Val (V)、Leu (L).

2.5 Se-GL-P 的肽指纹图谱 (PMF)

MALDI-TOF-MS 测定 Se-GL-P 的 PMF 结果如图 4 所示. Se-GL-P 经胰蛋白酶胶上酶切共得到 22 个肽段 (片段), 具体的分子质量信息如表 4 所示.

MALDI-TOF-MS 适宜测量相对分子质量在 500 以上的分子, 在几千以内质量准确度较高, 同时相对分子质量大于 5 000 的肽片段对检索没有很大帮

助<sup>[7, 8]</sup>. 因此, 本文选取酶解得到的全部肽段(片断)进行数据库检索. 图 5 给出了 Se-GL-P 质谱数据经过 Mascot 软件检索的结果. 在检索结果中, 得分 (Score)最高的蛋白质是 67 分, 是 3 种 RNA 合成酶 (RNA-dependent RNA polymerase), 得分排在前 5

位的蛋白质如图中(b)所示, Se-GL-P 的肽段与它们相匹配的情况如(c)中前 5 列所示. 这里的蛋白质得分 (Score)为 $-10 \times \text{Log}(P)$ , P 是这 2 种蛋白的质谱信息匹配, 是个随机事件的概率<sup>[17]</sup>.

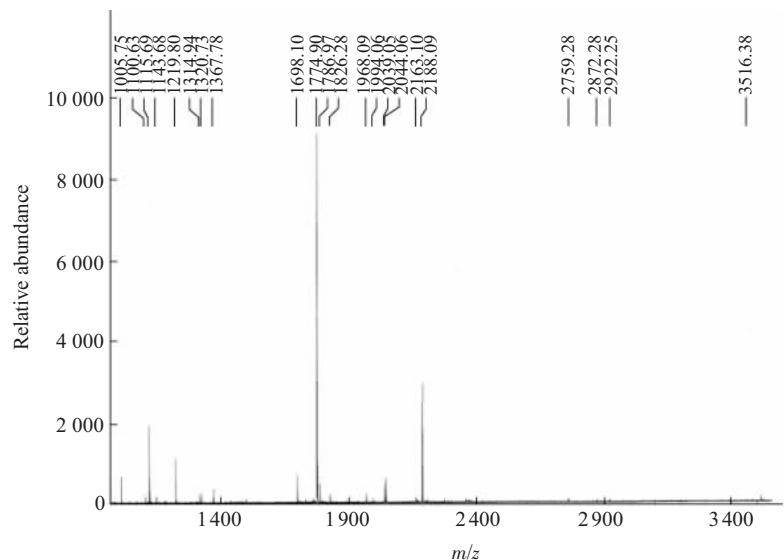


Fig. 4 Peptide mapping of Se-GL-P degestion by trypsin

Table 4 Molecular information of peptide fractions of Se-GL-P hydrolyzed by trypsin

| Number | Mr (peptide) | Number | Mr (peptide) | Number | Mr (peptide) | Number | Mr (peptide) |
|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|
| 1      | 1005.75      | 7      | 1320.73      | 13     | 1968.09      | 19     | 2759.28      |
| 2      | 1100.63      | 8      | 1367.78      | 14     | 1994.06      | 20     | 2872.28      |
| 3      | 1115.69      | 9      | 1698.10      | 15     | 2039.05      | 21     | 2922.25      |
| 4      | 1143.68      | 10     | 1774.90      | 16     | 2044.06      | 22     | 3516.38      |
| 5      | 1219.80      | 11     | 1786.97      | 17     | 2163.10      |        |              |
| 6      | 1314.94      | 12     | 1826.28      | 18     | 2188.09      |        |              |

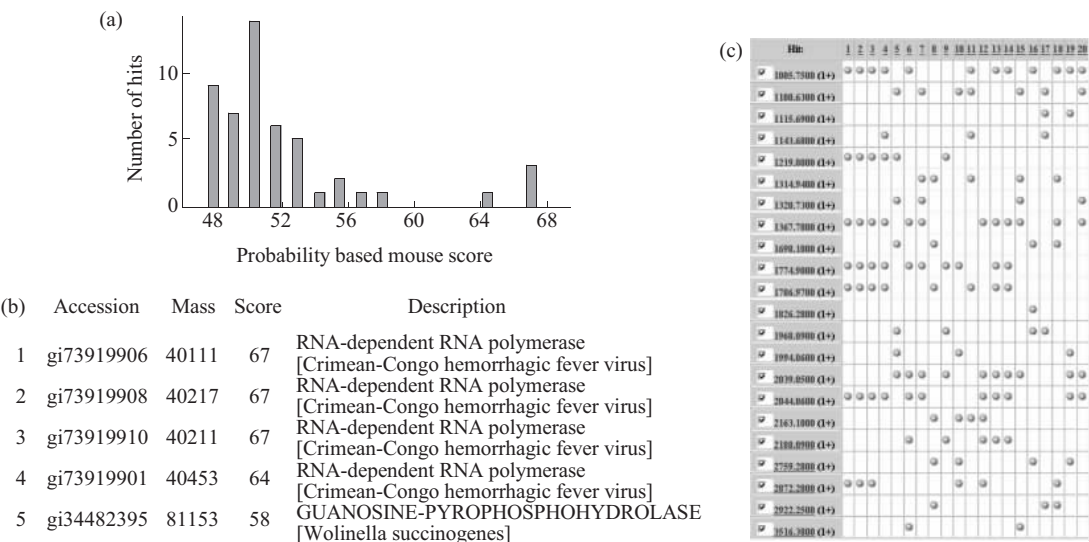


Fig. 5 The Mascot search result of Se-GL-P

(a) Score distribution; (b) Description of five kinds of protein with higher score; (c) Overview of matching with peptides (1st~20th).

2.6 Se-GL-P 的 N 端氨基酸序列 Blast 检索结果

将 Se-GL-P 的 N 端序列在 NCBI 数据库中用 Blast 软件进行序列比对检索<sup>[20]</sup>. 查询条件: Protein-protein Blast; N 端; 非还原状态; 20 个氨基酸残基; 采用不同的检索范围进行检索, 从纯化来源、分类和功能等方面进行限制检索条件, 检索

范围分别设定为有机体、真菌、抗氧化性+硒蛋白、硒蛋白+真菌、抗氧化性 + 真菌和抗氧化性+硒蛋白+真菌.

每种检索结果得分最高的前 3 位(得分过低的未列出)蛋白质的简单信息如表 5 所示.

Table 5 Results of Blast Research in NCBI

| Different limit                                | Sequences producing significant alignments:                                                                  | Score (Bits) | E Value            |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------|
| Sequence in organism                           | [Segment 3 of 5] Synovial stimulatory p                                                                      | 45.6         | 2×10 <sup>-4</sup> |
|                                                | Phosphate ABC transporter, perip...                                                                          | 45.6         | 2×10 <sup>-4</sup> |
|                                                | COG0226: ABC-type phosphate tr...                                                                            | 45.6         | 2×10 <sup>-4</sup> |
| Sequence in fungi                              | Hypothetical protein [Neurospora..                                                                           | 26.9         | 70                 |
|                                                | Acetyl-CoA carboxylase [Aspergillu..                                                                         | 26.5         | 94                 |
|                                                | Conserved hypothetical protein [Gi...                                                                        | 26.1         | 127                |
| Sequence in antioxidant + selenoprotein        | Thioredoxin reductase 1 [Rattus nor                                                                          | 15.1         | 1.5                |
|                                                | Selenoprotein W, muscle 1 [Rattus n                                                                          | 10.4         | 38                 |
|                                                | Selenoprotein P precursor (SeP)                                                                              | 9.5          | 68                 |
|                                                | Selenoprotein W, putative [Cryptoc...                                                                        | 10.0         | 28                 |
| Sequence in selenoprerein + fungi              | Hypothetical protein CNBB0320 [Cry...                                                                        | 10.0         | 28                 |
|                                                | Hypothetical protein FG07234.1 [Gi...                                                                        | 9.5          | 38                 |
| Sequence in antioxidant + fungi                | Thiol peroxidase that functions a...                                                                         | 15.0         | 7.9                |
| Sequence in antioxidant+ selenoprotein + fungi | No sequences corresponding to the entrez query antioxidant selenoprotein fungi were found in the nr database |              |                    |

The Expect value (*E*) is a parameter that describes the number of hits one can “expect” to see just by chance when searching a database of a particular size. It decreases exponentially with the Score (*S*) that is assigned to a match between two sequences. Essentially, the *E* value describes the random background noise that exists for matches between sequences.

3 讨 论

3.1 Se-GL-P 是一种硒蛋白

Se-GL-P 中 31.275%的 Se 以 Se-Cys 形式存在的, 68.725%的 Se 是以 Se-Met 形式存在, 这符合国际上对硒蛋白的定义, 因此得到的 Se-GL-P 为一种硒蛋白.

3.2 Se-GL-P 是一种新的蛋白质

3.2.1 等电点、分子质量等辅助手段的鉴定.

LZ-8 是第一个从普通灵芝(*Ganoderma lucidum*)中得到的纯化蛋白<sup>[19,21]</sup>. 通过对比可知: Se-GL-P 是一种含有约 19.8%糖链部分的糖蛋白, 分子质量是 36 600 u, 等电点是 4.01, 而 LZ-8 只含有 1.3%的糖链, 分子质量为 17 500 u, 而等电点为 4.4, 因此 Se-GL-P 与 LZ-8 之间存在很大的差别. 另外两者的氨基酸组成之间有很大的差异, Se-GL-P 中含有

His 和 Met, 而 LZ-8 中没有, Se-GL-P 中的 Arg (2.69%) 和 Lys (3.29%)含量远远低于 LZ-8 中的 Arg (3.40%) 和 Lys (5.24%), 这可能是 Se-GL-P 的等电点低于 LZ-8 的重要原因.

从这两种蛋白质的特性差异上可以推断, Se-GL-P 是另外一个从灵芝属中得到的蛋白质.

3.2.2 Se-GL-P 的同源性鉴定.

本论文中采用 PMF 和 N 端氨基酸序列两方面信息在互联网上检索的方法, 对 Se-GL-P 的同源性进行鉴定.

在 Mascot 检索中, 只有得分在 78 以上时, 检索结果才具有显著性( $P < 0.05$ )<sup>[17]</sup>, 而且得分值越高, 相似度才越高, 同种的可信度才越高. 而在对 Se-GL-P 的 PMF 检索结果中, 得分最高的只有 67 分. 所以, 经 Mascot 检索结果判定, Se-GL-P 是一种新的蛋白质, 此前该蛋白质的质谱信息、分子质



量信息、序列信息等方面均未见报道。

PMF的结果可以作为蛋白质种类鉴定的手段。然而,氨基酸序列也是蛋白质鉴定的首选方法之一,但蛋白质全序列测定工作量较大,投入也比较大,所以为了鉴定某种纯化出来的蛋白质,通常采用的是N端或者C端的部分氨基酸序列测定,必要时再对蛋白质的氨基酸全序列进行测定。

Se-GL-P的N端1~20个氨基酸序列,在NCBI数据库中检索,未发现有序列相似的真菌抗氧化性硒蛋白,在现有报道的真菌蛋白、硒蛋白、抗氧化性硒蛋白和真菌硒蛋白中与其序列相似的蛋白质得分(Score)也非常低(如表5所示)。

前文已比较了Se-GL-P同LZ-8<sup>[9]</sup>的氨基酸组成上的差异,已经可以判断它们之间的不同。而从氨基酸序列来看,Se-GL-P同LZ-8的差别也很大:Se-GL-P的N端序列为DINGGGATLPQKLYLTPDVL,然而LZ-8的N端序列是SDTALIFRLAWDVKKLSFDY<sup>[23]</sup>。因此,从N端前20个氨基酸残基序列来看,在所有已报道序列的蛋白质中,没有与Se-GL-P相同的,证明Se-GL-P是一种新的蛋白质。

研究表明,DING蛋白家族是普遍存在、但遗传特性并不清楚的一类蛋白质,一般分子质量为40 ku左右,具有DINGGG~氨基酸序列或者相近的N端<sup>[23]</sup>。Se-GL-P与DING蛋白家族N端的前6个氨基酸残基序列相同,因此,从N端的氨基酸序列和分子质量等方面的相似性来判断,从富硒灵芝中得到的Se-GL-P属于功能性DING家族中的一员。

## 参 考 文 献

- 1 赵 镭. 灵芝生物富硒及富硒灵芝硒蛋白的分离纯化和抗氧化性研究: [学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2004  
Zhao L. Biotransformation of Selenium by *Ganoderma lucidum* and Purification and Antioxidant Activity of Its Important Component, Seleno-protein: [Dissertation]. Beijing: China Agriculture University, 2004
- 2 Mizuno T. Oriental medicinal tradition of *Ganoderma lucidum* (Reishi) in China. In: Mizuno T, Kim B K, ed. *Ganoderma lucidum*. Seoul: Il-Yang Press, 1996. 101~106
- 3 Shi Y. Mushroom-derived preparations in the prevention of oxidative damage to cellular DNA: [Dissertation]. Hong Kong: Chinese University of Hong Kong, 2001. 56~78
- 4 Wasser S P, Weis A L. Medical properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspective (review). *Intl J Med Mushroom*, 1999, **19** (1): 31~62
- 5 叶波平, 王庆华, 周书进. 灵芝蛋白质的分离及其免疫活性研究. *药物生物技术*, 2002, **9** (3): 150~152
- 6 Du M, Zhao L, Li C R, *et al.* Purification and characterization of a novel fungi Se-containing protein from Se-enriched *Ganoderma lucidum* mushroom and its Se-dependent radical scavenging activity. *European Food Research & Technology*, 2007, **224** (1): 659~665
- 7 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 从序列到功能. 北京: 科学出版社, 2002. 72~86  
Qian X H, He F C. *Proteomics: From Sequence to Function*. Beijing: Science Press, 2002. 72~86
- 8 夏其昌. 蛋白质化学研究技术进展. 北京: 科学出版社, 1999. 240~244  
Xia Q C. *Progress of Research Technology on Protein Chemistry*. Beijing: Science Press, 1999. 240~244
- 9 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (5259): 680~685
- 10 朱厚础. 蛋白质纯化与鉴定指南. 北京: 科学出版社, 1999. 249~259  
Zhu H C. *Guide on Isolation and Identification of Protein*. Beijing, Science Press, 1999. 249~259
- 11 Hattan S J, Laue T M, Chasteen N, *et al.* Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem*, 2001, **276** (6): 4461~4468
- 12 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K. Colormetric method for determination of sugars and related substances. *J Annu Chem*, 1956, **28** (3): 350~356
- 13 刘晓达, 王全立, 马立人. 毛细管等电聚焦方法及其应用. *色谱*, 1997, **15** (5): 400~404  
Liu X D, Wang Q L, Ma L R. *Chin J Chromato*, 1997, **15** (5): 400~404
- 14 吴永尧, 罗泽民, 陈建英, 等. 水稻硒蛋白及其硒结合形态研究. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2000, **34** (2): 223~225  
Wu Y R, Luo Z M, Chen J Y, *et al.* *J Central China Normal University (Natural Sciences)*, 2000, **34** (2): 223~225
- 15 Edman P, Henschen A. *Protein Sequence Determination*. New York: Springer-Verlag New York Inc, 1975. 232~279
- 16 James P, Quadroni M, Carafoli E, *et al.* Protein identification in DNA databases by peptide mass fingerprinting. *Protein Sci*, 1994, **3** (8): 1347~1350
- 17 <http://www.matrixscience.com>, 2006-02-16
- 18 Matsudaira P T. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem*, 1987, **262** (21): 10035~10038
- 19 Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, *et al.* Isolation and characterization of a new immunomodulatory protei, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *J Biol Chem*, 1989, **264** (1): 472~478
- 20 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2005-07-17
- 21 Tanaka S, Ko K, Kino K, *et al.* Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, Ling zhi-8 (LZ-8). *J Biol Chem*, 1989, **264** (28): 16372~16377

22 Lin W H, Hung C H, Hsu C I, *et al.* Dimerization of the N-terminal amphipathic  $\alpha$ -helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *J Biochem Mol*

*Biol*, 1997, **272** (32): 20044~20048

23 Berna A, Bernier F, Scott K, *et al.* Ring up the curtain on DING proteins. *FEBS Lett*, 2002, **524** (1): 6~10

## Primary Analysis of Biochemical Characters of a Selenium-containing Protein From Se-enriched *Ganoderma lucidum* (Se-GL-P) \*

DU Ming<sup>1,2</sup>, HU Xiao-Song<sup>1</sup>, WANG Cong<sup>3</sup>, ZHAO Guang-Hua<sup>1</sup>\*\*

<sup>1</sup>College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

<sup>2</sup>College of Food Science & Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China;

<sup>3</sup>Food College, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

**Abstract** As a basic work of illustrating the relationship between the structure and function of a kind of protein purified from Se-enriched *Ganoderma lucidum* (Se-GL-P), the primary biochemical characters of Se-GL-P were characterized. Molecular mass was determined by two methods of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and size exclusion chromatogram. Amino acids composition, isoelectric point, peptide mass fingerprint, and the sequence of N terminal amino acids were determined by high performance liquid chromatography, capillary isoelectric focusing method, in-gel digestion, and Edman digestion method respectively. Results showed that, the Mr of Se-GL-P was 36 600, pI = 4.01, and the sequence of N-terminal amino acids was DINGGGATLPQKLYLTPDVL. A conclusion was drawn that Se-GL-P was a kind of new selenium-containing protein, and it was one member of DING protein family.

**Keywords** Se-enriched *Ganoderma lucidum*, selenium-containing protein, Se-GL-P, character, analysis

\*This work was supported by a grant from Program for New Century Excellent Talents in University in China (NCET-04-0134).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-10-62737434, E-mail: gzhao318@yahoo.com.cn

Received: July 4, 2006 Accepted: August 29, 2006