

家蝇蛹凝集素的分离工艺和性质的初步研究*

曹小红** 陈 一 张 燕

陈锦英

(天津科技大学食品科学与生物工程学院, 天津 300222)

(天津医科大学基础医学院医学微生物教研室, 天津 300222)

摘要 通过缓冲液浸提、戊二醛固定化红细胞吸附、亲和层析和凝胶过滤等方法, 从家蝇蛹中分离纯化出一种对半乳糖专一的凝集素。结果表明, 亲和层析后, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测家蝇蛹凝集素 (MPL) 分子质量为 84 ku。Sephadex G-200 凝胶过滤后, MPL 分子质量为 86 ku。家蝇蛹凝集素专一性识别 D-半乳糖, 其血凝活力对热不稳定, 不依赖 Ca^{2+} , 在 pH 6~9 之间稳定。家蝇蛹凝集素对 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* 和 *Salmonella typhi* 有抑制作用。

关键词 家蝇蛹, 凝集素, 抑菌活性, 血凝活力, 糖专一性, 固定化红细胞

学科分类号 Q965

凝集素是一类酶和抗体之外的糖结合蛋白。研究结果表明, 昆虫缺乏特异性很高的免疫系统, 凝集素在其免疫系统中起着重要的作用, 参与了细胞免疫和体液免疫, 还与昆虫的抗菌作用有关^[1]。家蝇生长在充满病原菌的环境中, 其有效的防卫机制成为研究的热点, 在前人的研究中发现, 家蝇血淋巴能凝集红细胞, 因此推测其血淋巴中含有凝集素, 王霖等^[2]研究了亲和层析法纯化家蝇幼虫凝集素、家蝇凝集素的诱导^[3], 本文在前人研究的基础上, 讨论了家蝇蛹凝集素 (*Musca domestica* Pupae Lectin, MPL) 的提取工艺, 提出了用固定化红细胞吸附法粗提凝集素, 并研究了家蝇蛹凝集素的理化性质和凝集反应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 固定化兔红细胞: 兔红细胞用 5% (体积比) 戊二醛固定, 再用 PBS 配成 10% 的悬液。

1.1.2 家蝇蛹血淋巴: 取针刺诱导后的蛹, 研磨粉碎, 用昆虫生理盐水 (0.85% NaCl, pH 7.9) 浸提, 然后在 4℃ 静置 24 h。离心取上清液, 保存。

1.1.3 菌种: 大肠埃希菌, 伤寒沙门菌, 枯草芽孢杆菌, 均为本室保藏。

1.1.4 家蝇: 本室养殖。

1.2 方法

1.2.1 戊二醛固定化兔红细胞吸附凝集素: 取血淋巴和戊二醛固定化兔红细胞 (glutaraldehydeized red blood cells, GRBC) 悬液混合, 使 GRBC 浓度达 30%, 室温缓慢搅拌 1 h, 离心, 沉淀用昆虫生理

盐水 (BIS) 溶液洗涤后, 加入三倍体积的 100 mmol/L 半乳糖溶液 (0.9% NaCl) 进行解吸附, 然后离心, 取上清液, 浓缩透析。

1.2.2 亲和层析: 使用 Sepharose 4B 亲和层析柱 (1.1 cm × 30 cm), 红细胞吸附纯化的凝集素用 BIS 稀释至 5 g/L 后, 取 2 ml 上柱。用 BIS 洗脱杂蛋白, 再用 0.1 mol/L 半乳糖溶液 (溶于 BIS) 洗脱。洗脱组分在 280 nm 下测定吸光度值以确定是否为蛋白质。将蛋白质组分收集、浓缩、对蒸馏水透析。

1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 参照 Laemmli 方法, 分离胶 12%, 浓缩胶 5%。电泳后, 用考马斯亮蓝 R-250 和 Schiff's 试剂染色。

1.2.4 凝胶过滤: 参照 Fischer 方法, 用 Sephadex G-200 柱 (1.1 cm × 30 cm)。加样量为 2 mg MPL (溶于 2 ml BIS 中)。

1.2.5 MPL 蛋白和糖含量的测定: 蛋白质用 Lowry 法定量, 用牛血清白蛋白做标准。糖含量测定用 Ashwell 方法, 以 D-半乳糖做标准。

1.2.6 血凝活力 (HA) 和糖抑制专一性的测定: 在 U 形孔的微量效价测定板上, 用 PBS 对 100 μl 样品进行倍比稀释后, 加入等体积 2% 的血球悬液 (0.15 mol/L NaCl), 在室温静置 2 h 后, 测定其效价 (titre), 效价定义为, 最后一个发生可见凝集反应的样品稀释倍数的倒数。

糖抑制专一性实验测定可以抑制一个效价凝集素的糖浓度。方法与测血凝活力大致相同, 用 PBS 对糖溶液进行倍比稀释后, 加入 100 μl 凝集素和

* 天津市自然科学基金重点项目 (003803911)。

** 通讯联系人。

Tel: 022-28193592, E-mail: caoxiaohong88@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-11-06, 接受日期: 2002-12-27

100 μ l 2% 的血球悬液, 1 h 后观察糖对 MPL 凝集红细胞的抑制情况.

1.2.7 pH, 温度, Ca^{2+} 对凝集活力的影响

温度的影响: MPL 用 BIS 配制成溶液, 在 0 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$ 范围的各个温度内加热 30 min, 冷却后, 测定血凝活力.

pH 值的影响: MPL 和各种缓冲液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下混合静置 24 h 后, 测定血凝活力.

Ca^{2+} 的影响: MPL 对含 100 mmol/L CaCl_2 的 BIS 透析后过夜测定血凝活力.

1.2.8 抑菌实验: 1 ml 菌悬液和 1 ml 凝集素 (5 g/L) 或血淋巴混悬, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养. 抑菌活性决定于对照组与实验组剩余菌落数的差异. 抑菌活性 (%) = (对照组的菌落数 - 实验组的菌落数) / 对照组的菌落数 $\times$ 100%.

2 结果与讨论

2.1 MPL 的纯化

MPL 的纯化包括戊二醛固定化兔血红细胞吸附和亲和层析. 亲和层析后, 用 0.1 mol 半乳糖洗脱后得到单一吸收峰 (图 1). 在 SDS-PAGE 中, MPL 出现 3 条带, 分子质量为 16 ku, 18 ku 和 50 ku (图 2), 其中分子质量为 16 ku 和 18 ku 的两个亚基含有糖结构. 分子质量为 84 ku. 凝胶过滤中, MPL 为一个对称的吸收峰 (图 3), 通过标准曲线测定 MPL 分子质量为 86 ku. 结合凝胶过滤的结果, 可知纯化的 MPL 为电泳纯, 家蝇蛹血淋巴的比活力 (specific activity) 是 0.38 titer/mg, 纯化的 MPL 比活力为 204.8 titer/mg (表 1). 每 30 g 蛹可得 5 mg MPL. MPL 含有 12.3% 中性糖.

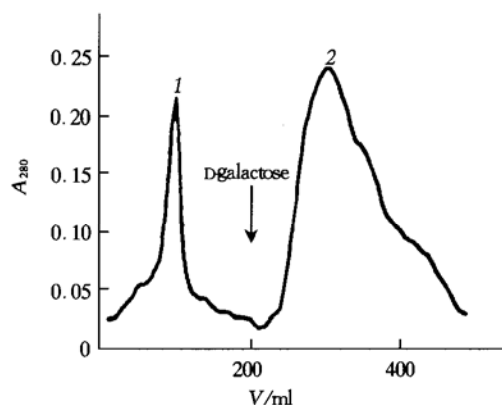


Fig. 1 Affinity chromatography of GRBC adsorbed MPL

The first peak represents the contaminant proteins. The second peak represents the lectin.

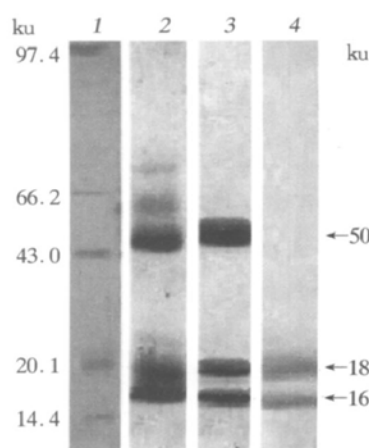


Fig. 2 SDS PAGE of MPL

1: protein molecular mass marker; stained with Coomassie Brilliant Blue G250. 2: GRBC adsorbed MPL; 3: purified MPL SDS-PAGE with β -mercaptoethanol, stained with Coomassie Brilliant Blue G250; 4: purified MPL SDS-PAGE with β -mercaptoethanol, stained with Schiff s.

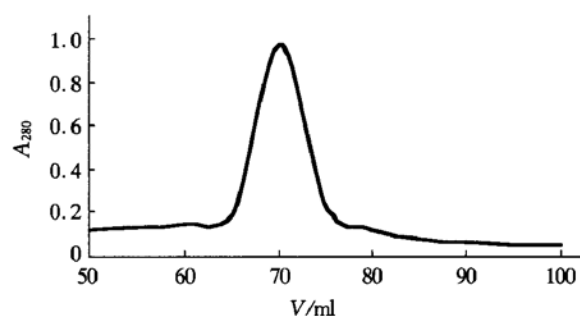


Fig. 3 Gel filtration of purified MPL

Table 1 Results of purification of MPL

Purification step	V/ ml	ρ / mg	HA ¹⁾ /titre	Specific activity /titre $\cdot$ mg ⁻¹
hemolymph	30	5 000	128	0.38
FRBC adsorbed MPL	2	10	1 024	102.4
purified MPL	2	5	1 024	204.8

¹⁾ Hemagglutination activity was expressed as a titer, the reciprocal of the highest two-fold dilution exhibiting positive hemagglutination (HA).

和传统的盐析后再亲和层析的方法相比, 采用红细胞吸附法粗提凝集素最大的优点在于此方法极大地除去了杂蛋白, 图 4 是对血淋巴盐析后的亲和层析图, 可见盐析后的粗提物中, 杂蛋白含量仍然很高, 而血细胞吸附后的凝集素已具有很高的纯

度,亲和层析表明红细胞吸附后的凝集素杂蛋白含量很低(图1)、其电泳(图2)和凝胶过滤实验(图5)均表明杂蛋白种类也很少。从表1可见血细胞吸附使得粗提物凝血的比活力提高了270倍。当所要提取的凝集素糖结合性质未知时,可以用糖抑制专一性实验测定血细胞吸附粗提物的糖结合性质,进而选取亲和层析合适的配基。虽然盐析后的样品也会产生凝血现象,但大量的杂蛋白会干扰糖抑制专一性实验的准确性,如果在盐析后再采用其他凝胶层析粗提,会增加成本,如果直接用亲和层析来试验各种配基,则不仅成本很高,配基的偶联也很困难。脊椎动物的红细胞表面含有各种各样的糖结合结构,是一种广泛的凝集素吸附介质,而且红细胞购买便宜,所以可以用较低的成本确定凝集素的糖结合专一性和亲和层析的配体。只需在解吸附一步中试验各种糖,就可以得到凝集素的糖结合性质(本文中家蝇凝集素的糖结合性质参照前人的研究^[2],从而省略了这一步)。

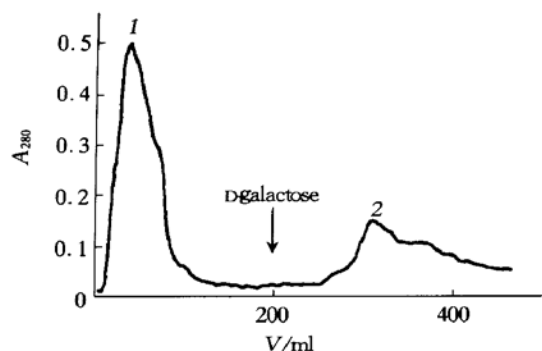


Fig. 4 Affinity chromatography of crude extract by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation

The first peak represents the contaminant proteins. The second peak represents the lectin.

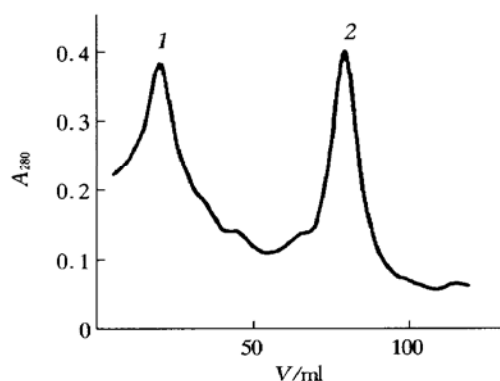


Fig. 5 Gel filtration of adsorbed MPL

The first peak represents the contaminant protein. The second peak represents the lectin.

2.2 糖结合性质

大多数凝集素是一类糖蛋白,每个分子至少有一个结合糖的部位,它们之间的相互作用类似于抗原-抗体反应。凝集素的糖结合专一性通常用半抗原抑制专一性实验测定。尽管这种方法是半定量的,但它可以得到各种糖对凝集素凝集活力的相对抑制能力。因此在使用更准确的方法之前使用糖抑制专一性实验对大量的糖进行实验是一种很经济的方法。

由表2可见,单糖中D-半乳糖对MPL有抑制作用,6-磷酸D-半乳糖不抑制MPL,说明吡喃环中C5对MPL的识别作用很重要,葡萄糖及其衍生物(表中未列)和岩藻糖没有抑制作用,说明C4和C6对MPL的识别作用也很重要,塔罗糖(半乳糖C2位异构体)有抑制作用,说明C2对MPL的识别不起作用,C2位的羟基被乙酰基取代后的 α 与 β 半乳糖苷有抑制作用,一方面说明C2对MPL的识别不起作用,同时也说明 α 和 β 键连接对MPL的识别不起作用,这一点也可由蜜二糖和乳糖对MPL的抑制作用得到相同的验证。半乳糖醇没有抑制作用,说明成环方式对MPL的识别有作用。寡糖中鼠李糖和水苏糖没有抑制作用,实验所采用的几种糖蛋白也没有抑制作用,可能是空间位阻影响了它们与MPL的结合。

Table 2 Hemagglutination-inhibition experiments with carbohydrate

Carbohydrate	Minimum inhibitory concentration ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
D-glucose	-
D-galactose	100
D-talose	100
N-acetyl- α -D-galactoside	100
N-acetyl- β -D-galactoside	100
D-galactose-6-phosphate	-
Galactitol	-
D-mannose	-
L-fucose	-
N-acetyl-D-galactosamine	-
Sialic acid	-
Lactose	100
Melibiose	100
Raffinose	-
Stachyose	-
Fetuin	-
Bovine transferrin	-
Human transferrin	-

"-" represents no inhibition effect under any concentration.

2.3 pH, 温度, Ca^{2+} 对凝集活力的影响

在 30℃ 加热 30 min 后 MPL 血凝活力保持不变, 在 40℃ 加热后血凝活力部分丧失, 60℃ 加热 30 min 后完全丧失, 说明 MPL 对热不稳定. 图 6 是 pH 对血凝活力的影响. 血凝活力在 pH 6 到 9 之间保持不变. 对 CaCl_2 透析后不影响 MPL 的血凝活力, 说明 Ca^{2+} 对血凝活力没有影响.

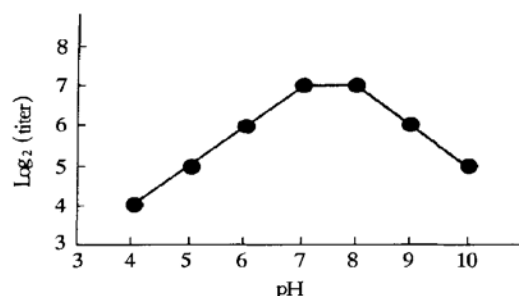


Fig. 6 Effect of pH on hemagglutination activity of the MPL

2.4 抑菌活性

凝集素和血淋巴的抑菌活性见表 3. 实验测得 MPL 对 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* 和

Table 3 Antibacterial activity in MPL and hemolymph of *Musca domestic* pupae

Type of bacteria	Inhibition/ %	
	with hemolymph	with MPL
<i>Escherichia coli</i>	0	39.8
<i>Bacillus subtilis</i>	0	45.3
<i>Salmonella typhi</i>	27.1	66.2

Salmonella typhi. 显示抑菌活性. 有学者认为, 凝集素与细菌胞壁上糖链结合, 导致细胞破壁, 达到抑制细菌生长的作用, 因此, 研究家蝇蛹凝集素的抑菌活力, 对于揭示其凝集活力具有一定的意义.

2.5 展望

本文从家蝇蛹中纯化了一种对 D-半乳糖专一的凝集素 MPL, 探讨了提取纯化工艺, 并初步研究其理化特性、血凝活力和抑菌活力, 为进一步的研究打下了基础. 要进一步确定 MPL 的结构与性质, 需要进行氨基酸序列分析、更多糖和糖蛋白的凝集抑制实验、MPL 与更多微生物的反应及精确的仪器分析.

目前, 有超过 100 种具有各种专一性的凝集素已经商业化生产. 可是这些凝集素多为植物种子的凝集素. 因此, 家蝇蛹凝集素将构成一种新的凝集素资源应用于生物医药和食品行业当中.

致谢 实验过程中得到天津医科大学公共卫生学院王永明老师的协助, 谨此致谢.

参 考 文 献

- 1 Vasta G R, Marchalonis J J. Immunological significance of invertebrate lectins. In: Cohen N, eds. Recognition Proteins, Receptors and Probes: Invertebrates. New York: Alan R Liss, 1984. 177~191
- 2 王 霁, 李根君, 段吉群, 等. 舍蝇凝集素的分离、纯化和部分性质研究. 生物化学杂志, 1991, 7 (1): 47~52
Wang Q, Li G J, Duan J Q, et al. J Biochem, 1991, 7 (1): 47~52
- 3 姜 勇, 吴明荣, 雷朝亮, 等. 家蝇血淋巴凝集素诱导动力学的研究. 华中农业大学学报, 1998, 17 (2): 130~137
Jiang Y, Wu M R, Lei C L, et al. J Huazhong Agriculture University, 1998, 17 (2): 130~137

Isolation and Characterization of *Musca domestic* pupae Lectin*

CAO Xiao-Hong**, CHEN Yi, ZHANG Yan

(College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

CHEN Jin-Ying

(College of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300222, China)

Abstract A new galactose-specific lectin (MPL) from *Musca domestic* pupae was isolated. The purification procedure entailed extraction with aqueous buffer, GRBC (glutaraldehydeized red blood cells) adsorption, affinity chromatography on Sepharose-4B and gel-filtration on Sephadex-G-200. By SDS-PAGE, purified MPL yielded three bands, with a total molecular mass of 84 ku. By gel-filtration, the molecular mass of MPL was determined to be 86 ku. MPL exhibits high affinity towards D-galactose. The hemagglutination activity of MPL was independent of Ca^{2+} , heat liable and stable in the range of pH 6~9. Antibacterial activity of MPL has been observed against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhi*.

Key words *Musca domestic* pupae, lectin, antibacterial activity, haemagglutination activity, carbohydrate

specificity, glutaraldehydized erythrocyte

* This work was supported by a grant from The Key Project of Tianjin Natural Science Foundation.

** Corresponding author. Tel: 86-22-28193592, E-mail: caoxiaohong88@yahoo.com.cn

Received: November 6, 2002 Accepted: December 28, 2002

知识与动态

用基因工程提高光合同化 CO₂ 效率的

一个关键酶——果糖-1,6-二磷酸酶

马为民^{1,2)} 施定基¹⁾ 王全喜²⁾

(¹⁾中国科学院植物研究所, 北京 100093; ²⁾上海师范大学生物系, 上海 200234)

增加绿色植物光合同化 CO₂ 的能力, 无论对提高农作物产量, 还是缓解大气环境中 CO₂ 浓度日益升高的威胁, 都有重大的现实意义和深远的影响. 因此, 提高光合作用效率一直是在植物学、农业、林业、环境、海洋等领域工作的学者和生产者千方百计为之努力的方向. 虽然近百年来国内外已从整体、器官、组织、细胞、叶绿体和光合膜水平上取得了卓越的成果, 但如何在基因水平调控上取得成效, 近年来才有所突破.

最近 10 年中, 在植物基因工程的一个主要进展是增加了突变体和转基因植物的研究. 而在光合作用的酶基因调控中, 研究最多、最深的是核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶-加氧酶 (Rubisco) 的调控, 如, 最近 Hong 等在研究菠菜 Rubisco L 上的 Leu290 被 Phe 取代, 其 Ω 值 (羧化作用/氧化作用) 下降, 而 Val262 用 Leu 取代, Ala222 用 Thr 取代可提高 Ω 值和恢复固定 CO₂ 的能力, 以及利用转基因技术培育出能降低 Rubisco 蛋白量的烟草与 C₄ 植物黄花菊 (*Flaveria bidentis*), 但都没有明显提高光合效率. 最近, 果糖-1,6-二磷酸酶 (EC 3.1.3.11, FBPase) 的转基因研究出现了重大的突破.

FBPase 是调控光合和 PO₄³⁻ 循环的关键酶之一, 也是一个用基因工程提高光合同化 CO₂ 效率的关键酶. 该酶催化的反应处于代谢物离开卡尔文 (Calvin) 循环, 流入淀粉合成的一个分支点上, 并且是不可逆的. 与 Calvin 循环中的其他酶相比, FBPase 的含量极低, 该酶活性轻微受抑制, 就会导致 Calvin 循环更新能力的减弱、光合活性的急剧下降. 因此, Calvin 循环中的 FBPase 在决定碳元素到最终产物的分配上有着重要的战略地位.

2001 年, Miyagawa 等在《Nature Biotechnology》上报道, 把蓝藻叶绿体中的果糖-1,6-二磷酸酶 (FBPase) / 景天庚酮糖-1,7-二磷酸酶 (SBPase) 转入烟草叶绿体中, 在大气中 CO₂ 浓度为 360ppm 条件下, 明显提高了转基因烟草光合固定 CO₂ 的效率和糖类的累积, 同时也加速了其生长. 该研究是从基因水平上来调控 FBPase 活性. 过去人们认为, 要提高碳同化效率, 必须调控碳同化途径中的一套酶, 而这是首次表明了改变一个酶就能显著地提高植物的光合作用, 同时也是首次在转基因植物中用增加酶含量的方法来研究.

FBPase/SBPase 是从聚球藻 (*Synechococcus* sp. PCC 7942) 中分离出来的一个单独的酶. 它能催化水解对于更新 Calvin 循环中原碳受体——核酮糖-1,5-二磷酸 (RuBP) 所必需的果糖-1,6-二磷酸 (FBP) 或景天庚酮糖-1,7-二磷酸 (SuBP). 在高等植物中相应的反应是被两个分离的 FBPase/SBPase 所催化, 并且它们是被两个不同基因所编码的, 与蓝藻中的 FBPase/SBPase 没有重大的同源性. 因此, 蓝藻和高等植物之间的转基因不会出现基因沉默现象. 这是这两类生物之间转基因成功的原因之一. 作者设计了含有叶绿体中 FBPase/SBPase 的转基因烟草纯合体株系. 在 18 周后, 在两个株系——TpFS-3 和 TpFS-6 中, 明显提高了 FBPase/SBPase 的活性, 并且相对野生型烟草来说, 它们在高度和总干重上均增加了 1.5 倍. TpFS-3 植物也有更大的叶子、根和更粗的茎. 与上述表型观察一致的是, 在正常的大气中, CO₂ 浓度饱和以及光照强度大于 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下, TpFS-3 和 TpFS-6 与野生型植物相比, 光合活性分别提高了 1.24 倍和 1.20 倍. 同时在转基因植物中, 增加了有机物磷酸化代谢水平, 包括磷酸二羟丙酮, 果糖-6-磷酸和 RuBP, 还有各种碳水化合物.

2002 年, Thorbjørnsen 等成功地把土豆 (*Solanum tuberosum* L.) 叶绿体中的 FBPase (cp-FBPase) 基因克隆出来, 并转化到土豆块茎的造粉体. 与野生型的土豆块茎相比, 转基因土豆块茎中有着更高的 cp-FBPase 活性, 并合成了更多的淀粉. 在土豆块茎造粉体中过表达 cp-FBPase, 是生物合成淀粉的一条新途径.

因此, 对 FBPase 转基因的研究, 为调控 Calvin 循环、增加作物产量以及控制 CO₂ 开辟了一条新路.

2002 年, Wood 在《Trends in Plant Science》上指出, Miyagawa 等的文章是第一篇通过转基因手段来提高植物光合, 他强调: 蓝藻基因工程铺平了增加作物产量的道路. 在这样背景下, 我们与中国科学院上海有机化学研究所陈海宝研究员实验室合作, 正在通过蓝藻基因工程来强化 Calvin 循环的代谢途径, 提高蓝藻同化 CO₂ 的效率, 以期降低大气中的 CO₂, 减缓温室效应. 现在已经成功地把从小麦叶绿体中克隆的 FBPase 转入蓝藻中, 并证明可提高转基因蓝藻的光合同化 CO₂ 的效率.