

云南溪菜多糖的分离纯化及其性质研究

邵 华 胡鸿钧*

(中国科学院武汉植物研究所 武汉 430074)

提 要 从云南溪菜中提取的水溶性胞外粗多糖(EPS),用Sevag法脱蛋白后,经DEAE-纤维素柱层析和葡聚糖凝胶G-200柱层析可得到纯品。溪菜多糖复合物经碘试验证明含有少量淀粉,BaCl₂试验检测出含有SO₄²⁻,琼脂糖凝胶电泳显示含有糖类及蛋白质,且其组成不均一。用Lowry法测得蛋白质含量为13.54%,苯酚-硫酸法测得糖含量为78%。经薄层层析和纸层析鉴定,溪菜多糖复合物的酸水解物中含有大量D-甘露糖(D-Mannose),少量D-核糖(D-Ribose)及L-鼠李糖(L-Rhamnose),其含量比为4 1.5 1。

关键词 云南溪菜, 多糖

ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLYSACCHARIDES FROM PRASIOLA YUNNANICA

Shao Hua Hu Hongjun

(Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Wuhan 430074)

Abstract The polysaccharides extracted from *prasiola yunnanica* by hot water are EPS (extracellular polymeric substances). They are deproteinized by Sevag method for several times and purified by DEAE-cellulose and Sephadex G-200 chromatography column in turn. The crude polysaccharides were proved to have a little starch and some SO₄²⁻ by iodine indicator and BaCl₂ solution respectively. A agarose gel electrophoresis shows the existence of sugar and protein which are inhomogeneous. It has 13.54% of protein essayed by Lowry method, and 78% of sugar by benzene-H₂SO₄ method. And the rest are ash and water.

The components of the crude polysaccharides were identified by paper chromatography and TLC which were D-Mannose, D-Ribose and L-Rhamnose with the ratio of 4 1.5 1. D-Ribose in the algal polysaccharides studies is quite rare.

Key words *Prasiola yunnanica*, Polysaccharides

目前国内外关于多糖的研究报道虽然较多,但是在已知的约3万余种藻类中,迄今只对其中约150种的多糖进行了一定程度的研究。在藻多糖的研究中大型藻类引起人们的广泛重视,并从多方面进行了大量研究^[1,2],其中褐藻、红藻在国内的研究已较为深入,微藻中的蓝藻多糖亦有报道^[3]。绿藻中的多糖虽也有研究,但关于溪菜多糖方面的工作尚未

见报道。

云南溪菜 (*Prasiola yunnanica* Jao) 为绿藻门丝藻目溪菜属水生或亚气生藻类, 以水生种类居多, 其中淡水生种类多分布在山涧、溪流中, 其它少数种类则分布在海岸附近, 喜生有机质丰富之地; 气生种类生长于潮湿的土壤、岩石、树皮之上。我国的四川、湖北、西藏、云南、台湾等省及日本均有分布, 有些地方称之为“水陆菜”。早在八百多年前, 我国就有食用溪菜的记载, 并被人们视为佳肴。除食用外, 溪菜还有药用功能, 我国的贵州省清溪县民间以其为枪伤要药, 云南省民间用作清凉菜食用, 湖北省神农架地区以溪菜泡茶, 可清热祛毒¹⁾。溪菜干品的营养成分经分析鉴定, 含有 34.68% 的蛋白质、0.76% 的脂肪, 其氨基酸组成亦十分丰富, 含有 17 种氨基酸, 人体必需的 8 种氨基酸中含有 7 种^[4]。我们仅对其多糖成分进行初步研究。^{*}

1 材料与方法

1.1 材料

云南溪菜采自云南丽江的金沙江, 60 烘干后密封置冰箱中冷藏。DEAE-纤维素为 Whatman 进口分装产品, Sephadex G-100、G-200 均为 Pharmacia 公司产品。薄层硅胶薄板为江苏福山生化试剂厂产品。单糖样品为 Sigma 公司产品。其它化学试剂均为分析纯或化学纯。

1.2 分离、提取及纯化

溪菜干品切碎后用蒸馏水在 80 恒温下提取 5 h 后, 用滤布滤去藻渣, 滤液离心 (5 000 r/min, 15 min), 收集上清液, 浓缩后加 2.5 倍体积 95% 乙醇沉淀多糖, 沉淀物用丙酮清洗、冰冻干燥, 可得多糖粗品。该粗品配成 1% 溶液, 用 Sevag 法脱蛋白^[5]5 次后, 加入 2.5 倍体积乙醇沉淀多糖, 先后用无水乙醇和丙酮洗涤, 冰冻干燥。

脱蛋白的多糖, 用蒸馏水溶解后经过 DEAE-纤维素柱 (直径 2 cm, 长 25 cm, OH⁻型) 层析, 流速 25 mL/h, 每管收集 3 mL, 苯酚-硫酸法检测糖含量, 分别用蒸馏水、0.5 mol/L NaCl 及 2 mol/L NaCl 溶液洗脱, 依次得 P₁、P₂、P₃ 组分, 烘干后称重。取含量较高的 P₂ 经葡萄糖凝胶 G-100 及 G-200 柱层析 (直径 2 cm, 长 52 cm), 用蒸馏水洗脱, 流速 12 mL/h, 蓝色 Dextran 2000 测外水体积 (V₀)。收集单峰部分, 可得纯品 P_{2C}^[6]。

1.3 理化性质

1.3.1 淀粉含量 粗多糖配成 1% 溶液, 滴加数滴碘试剂后呈现明显蓝色。P₁、P₂、P₃ 3 个组分均不变色。用淀粉溶液标准曲线法于 620 nm 波长下比色查得淀粉含量^[7]。

1.3.2 SO₄²⁻ 检测 粗多糖溶液滴加数滴 1% BaCl₂ 溶液以除去游离的 SO₄²⁻, 5 mg 粗多糖用 2 mL 1 mol/L 盐酸于 100 封管水解 5 h, 冷却后滴加 BaCl₂ 溶液, 所用玻璃器皿均以硝酸洗涤^[8]。

1.3.3 蛋白质含量 电泳检测: 1.5% 琼脂糖制板 (2.5 cm × 7.5 cm), 0.2 cm 厚, 硼酸盐缓冲液 pH = 10, 0.5% 溴酚蓝溶液做指示剂, 电泳 15 min (电压 300V), 置乙醇中固定后分别以 0.1% 甲苯胺蓝溶液及 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 溶液染色 30 min, 然后置醋

* 1) 钱澄宇: 1984. 药用藻类 (未刊稿)。

酸 乙醇 水(0.1 5 5)中脱色。茚三酮反应: 粗多糖水溶液、 P_2 (未过 Sephadex G-200 柱)遇茚三酮均呈蓝紫色, P_2 不变色。含量测定: 按 Lowry 法^[9]进行, 以牛血清白蛋白(BSA)为标准样品。

1.3.4 糖含量 用苯酚-硫酸法测定^[7]。

1.3.5 单糖组成 水解: 称取粗多糖 10 mg, 加入 6 mL 1 mol/L 硫酸溶液后于 100 封管水解 5 h, 水解液冷却后用饱和的 Ba(OH)₂ 溶液中和, 然后离心去除沉淀, 上清液浓缩后备用。纸层析: 层析滤纸 12 cm × 25 cm, 溶剂系统为正丁醇-吡啶-水(8 4 3)。分别将浓缩后的水解液及各种标准单糖用毛细管点样, 上行层析 10 h。层析毕, 于烘箱中烘干展层剂, 均匀喷洒苯胺-二苯胺-三氯乙酸显色剂, 然后置 100 烘 10 min 显色^[10]。薄层层析: 薄层(5 cm × 20 cm), 先喷 0.02 mol/L 醋酸钠溶液, 然后置 100 烘箱中活化 1 h, 冷却后置干燥器中备用。水解液依次点 5 个样, 展层剂同纸层析, 待展层剂距顶端 1 cm 时取出, 烘干展层剂后, 用玻璃板遮住中间 3 个样品而仅将两侧样品显色, 显色剂同上。刮取中间对应位置的硅胶并以 1 mL 蒸馏水提取后, 加苯酚-硫酸比色^[11]。

2 结果与讨论

2.1 云南溪菜多糖的 3 个组分

由溪菜藻体结构及破碎方法可知本实验提取的为胞外多糖(EPS)。30 g 溺菜提取可得 1.41 g 粗多糖, 得率为 4.7%。溪菜的热水提取物, 经 DEAE-纤维素柱层析分离为中性多糖(水洗组分)1 种(P_1)及酸性多糖 2 种(0.5 mol/L NaCl 及 2 mol/L NaCl 溶液洗脱物, 依次为 P_2 和 P_3)。 P_1 、 P_2 、 P_3 3 个组分干燥后的重量为 5.5 mg、20.5 mg、1.5 mg, 其重量比为 3.6 13.6 1。 P_1 、 P_2 及 P_3 均比粗多糖更易溶于水。其中 P_1 、 P_3 为纯白色, P_2 为红褐色。

Sephadex G-100 洗脱结果显示 P_2 大部分组分分子量大于 10 万(洗脱体积小于外水体积), 仅有 1 个小峰的洗脱体积大于 V_0 , 其分子量应小于 10 万。Sephadex G-200 洗脱图(图 1)显示 P_2 至少含有 7 种分子量不同的组分, 其中高峰部分洗脱液呈明显的红褐色(透明), 为胶体溶液。干燥后呈白色粉末状, 易溶于水。

2.2 溪菜多糖的理化性质

碘实验显示粗多糖中含有淀粉。从

标准曲线上计算出其含量为 0.084%。经 DEAE-纤维素柱层析分离后, P_1 、 P_2 、 P_3 均与碘试剂不反应。

粗多糖的盐酸水解液加入 BaCl₂ 溶液后立即产生明显的白色 BaSO₄ 沉淀, 证明云南溪菜多糖中有较多共价结合的硫酸基存在, 而硫酸基对于多糖的理化性质及生物活性都有重要影响。多种硫酸酯多糖具有独特的医药保健功能, 如治疗肿瘤、肝炎, 降血脂、血糖,

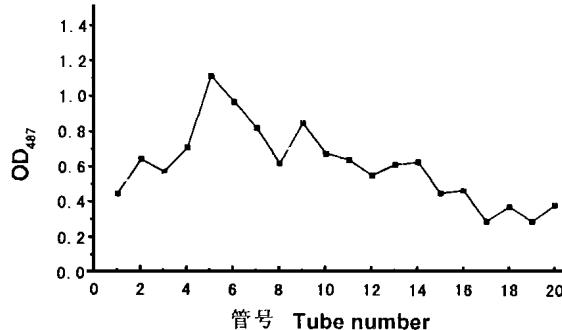


图 1 P_2 的 Sephadex G-200 柱层析

Fig. 1 Gel-filtration chromatography of P_2 on Sephadex G-200

促进蛋白质和核酸的生物合成等。常见的例如肝素(Heparin),具有阻止血液凝固的特性,可作为输血时的血液抗凝剂及用于防止血栓形成。更具意义的是,1958年,Gerber首次报道了硫酸酯多糖具有抗病毒活性,它对具有包膜的病毒能产生强大的抑制作用,因此,硫酸酯多糖的抗爱滋病病毒作用日益受到各国药理学家及病毒学家的重视,并在临幊上取得了一定的疗效。陈春英等^[12]报道,经硫酸酯化的箬叶多糖比酯化前具更高的抑制HIV(爱滋病病毒)的作用,可作为抗爱滋病的药物,而若将硫酸基去掉,则其部分生物活性丧失;此外,从海藻中提取的天然硫酸酯多糖也具有一定的抗爱滋病病毒的作用。云南溪菜多糖潜在的药用功能,目前正在进一步的研究之中。

电泳中用甲苯胺蓝及考马斯亮蓝染色均得到一条较为均匀的由阴极延伸到阳极的带,证明粗多糖中含有糖类及蛋白质,且其组成不均一。茚三酮反应显示粗多糖及P₂组分均含有蛋白质。用Lowry法测得蛋白质含量为13.54%,苯酚-硫酸法测得糖含量为78%,其余为灰分及水分。

P₂C遇茚三酮不变色,其理化性质及结构尚有待进一步研究。

2.3 云南溪菜多糖的单糖组成

粗多糖经酸水解并中和后离心,上清液置水浴上浓缩后以甲醇溶解并点样进行纸层析。结果可见有一个明显的灰色斑点,其颜色及R_f值与D-甘露糖相同;另有较浅的一个绿色斑点及一个紫灰色斑点,其颜色及R_f值分别与D-核糖及L-鼠李糖相同,说明粗多糖由大量D-甘露糖,少量D-核糖及L-鼠李糖构成,不含葡萄糖。以甘露糖的R_f值为1,则它们的相对R_f值之比为D-甘露糖·D-核糖·L-鼠李糖=1.00·1.14·1.29。硅胶薄层层析测得三者的含量比为4·1.5·1。在云南溪菜多糖的组成中发现D-核糖,这在有报道的藻类多糖的研究中尚属首次,该戊糖的存在对于多糖的结构及性质有何影响,尚需进一步探讨。

致谢 本文中云南溪菜部分营养成分测定由湖北省农科院测试中心协助进行,谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Percival E, McDowell R H. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. London: Academic Press, 1967.
- 2 Ramus J. The Production of Extracellular Polysaccharides by the Unicellular Red Alga Porphyridium Aerugineum. *J Phycol*, 1972, **8**: 97~111
- 3 曾和平, 郭宝江. 螺旋藻多糖的化学研究. 药学学报, 1995, **30**(11): 858~861
- 4 邵华. 云南溪菜(*Prasiola yunnanica* Jao)多糖的提取、分离及其性质研究. [中国科学院武汉植物研究所硕士学位论文] 武汉: 中国科学院武汉植物研究所, 1999. 7
- 5 Staub A M. Removal of Proteins -Sevag method. *Methods in Carbohydr Chem*, 1965, **5**: 5~6
- 6 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 武汉: 武汉大学出版社, 1994. 125
- 7 徐昌杰, 陈文峻, 陈昆松等. 淀粉含量测定的一种简便方法——碘显色法. 生物技术, 1998, **8**(2): 4~43
- 8 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1987. 16~17
- 9 Lowry O H, Rosebrough N H, Farr A L et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265~275
- 10 方积年, 叶淳渠, 吴淑云等. 亮菌多糖的研究. 生物化学与生物物理学报, 1984, **16**(3): 222~228
- 11 蔡武成, 袁厚积. 生物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社, 1982. 13~14
- 12 陈春英, 黄雪华, 周井炎等. 硫酸酯化箬叶多糖的结构修饰及其抗爱滋病病毒活性. 药学学报, 1998, **33**(4): 264~268