

文章编号:1000-0615(2000)06-0570-05

珠母贝糖胺聚糖的纯化及其化学性质

吴红棉¹, 雷晓凌¹, 洪鹏志¹, 陈方², 吴铁², 艾春媚²

(1. 湛江海洋大学食品工程系, 广东 湛江 524025;

2. 广东医学院药理教研室, 广东 湛江 524023)

摘要:珠母贝糖胺聚糖粗制品经吸附、等电点沉淀、醇沉、溴化十六烷基三甲铵(CTAB)络合等法进行分离纯化, 得一糖胺聚糖级分。经醋酸纤维素薄膜电泳显示为单一区带。化学组成分析表明:该级分氨基己糖含量较高(71.3%),其中以氨基半乳糖为主(59%),含有少量的己糖醛酸,含硫酸基、半乳糖、岩藻糖。元素分析表明其碳、氢、氮、硫的含量分别为37.7%、5.8%、5.8%、3.0%。对级分的残余氨基酸分析表明,84.2%氨基酸已被清除。

关键词:马氏珠母贝;糖胺聚糖;纯化;化学性质

中图分类号:S986.2;R931.74 文献标识码:A

Purification and chemical properties of glycosaminoglycan extractea from *Pinctada martensis*

WU Hong-mian¹, LEI Xiao-ling¹, HONG Peng-zhi¹,

CHEN Fang², WU Tie², AI Chun-mei²

(1. Department of Food Science and Technology, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Pharmacological Department of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: A crude product of glycosaminoglycan (GAG) was prepared from whole viscera of *Pinctada martensis* by the processes of enzymatic hydrolysis and ethanol precipitation and subsequently purified through active carbon and diatomaceous earth adsorption and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) chelation. The actate film electrophoresis of purified GAG displayed a single band. The chemical components of purified GAG showed high content in hexosamine (71.3%) in which galactosamine mainly accounts for 59% with less content of hexuronic acid, galactose, fucose and sulphonic acid group. In addition, the elemental analysis indicated the contents of carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur being 37.7%, 5.8%, 5.8% and 3.0%, respectively. The total content of amino acids in purified GAG was 11.3% showing that there was 84.2% of amino acids removed from dried whole viscera (71.6% total amino acids).

Key words: *Pinctada martensis*; glycosaminoglycan; purification; chemical properties

糖胺聚糖,因具有抗凝血、抗肿瘤、抗病毒、降血脂、增强免疫等生理活性^[1],已成为学术界瞩目的一类生物高分子。近年来,国内外对海参^[2,3]、乌贼^[4]、大西洋鳕^[5]、鲨^[6]或其软骨^[7]、海星^[8]、扇贝^[9]、甲壳动物^[10]等的糖胺聚糖进行了研究。

收稿日期:2000-09-30

资助项目:广东省重点科技攻关课题(97-66)

作者简介:吴红棉(1953-),男,广东恩平人,硕士,副教授,主要从事水产品加工及综合利用方面的研究。Tel:0759-2382460

马氏珠母贝(*Pinctada martensis*)是我国南海珠母贝的主要贝种,在广东、广西部分地区养殖量极大。珠农在采珠后,所余珠母贝全脏器(每年资源量约达1 000~1 200t)除食用外,大部分作为饲、饵料,造成该资源的很大浪费,亟待综合利用。笔者报道了从马氏珠母贝全脏器中提取得到糖胺聚糖粗制品,经体外抗肿瘤试验初步证实其有抗肿瘤活性^[11],本文在此基础上对粗制品进行了纯化,经醋酸纤维素薄膜电泳测定其纯度,并对其化学性质进行了分析。

1 材料与方法

1.1 原料

马氏珠母贝全脏器:购自雷州市流沙镇珍珠养殖场,分装冷冻备用。

1.2 试剂与材料

乙醇、乙酸钠、溴化十六烷基三甲铵(Cetyltrimethylammonium bromide,简称CTAB)、浓硫酸、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、氯化钾、苯酚、吡啶、盐酸一半胱氨酸、丙酮、乙酰丙酮、磷酸三钠、四硼酸钠、对二甲氨基苯甲醛、硼酸、巴比妥、巴比妥钠、冰醋酸、乙酸钡、氯化钡等,均为分析纯。硅藻土、活性炭:化学纯。

胃蛋白酶:酶活力1:3 000,购自上海;枯草杆菌中性蛋白酶:酶活力1:5 000,无锡酶制剂厂产品。

标样:盐酸-D-半乳糖胺、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸、D-岩藻糖,均为Sigma产品;D-半乳糖、D-甘露糖、D-木糖,均为上海试剂厂产品;肝素钠(效价150IU·mg⁻¹),上海伯奥公司产品;硫酸软骨素C,Sigma产品。

染色剂:阿利新蓝。

透析袋DM-44:DM14 000MWCODALTONS;醋酸纤维素薄膜:规格为8cm×12cm。

1.3 主要仪器与设备

MK-C300N高速组织捣碎机(日本松下);JB-90-2恒温磁力搅拌器(上海天平仪器厂);ZK-82B真空干燥器(上海实验仪器总厂);Super Modulyo冷冻干燥机(英国EDWARDS);YX5-A台式离心机(裕鑫实业有限公司);721型分光光度计(上海第三分析仪器厂);UV-1601 UV-VISIBLE Spectrophotometer SHIMADZU紫外-可见光分光光谱仪(澳大利亚岛津公司);DYY-VI8型稳压稳流电泳仪;Hp1100高效液相色谱仪(美国惠普公司);ELCHNS-O元素分析仪(德国Vario公司)。

1.4 提取和纯化

1.4.1 珠母贝糖胺聚糖的粗提

珠母贝糖胺聚糖的粗提参考文献[3,12]的方法。经马氏珠母贝全脏器→匀浆→50℃自溶→胃蛋白酶水解→枯草杆菌中性蛋白酶水解→醇沉→洗涤→真空干燥→糖胺聚糖粗制品(粗GAG)。

1.4.2 珠母贝糖胺聚糖的纯化

珠母贝糖胺聚糖的纯化方法参考文献[13]的方法(图1)。

1.5 珠母贝糖胺聚糖的分析

醋酸纤维素薄膜电泳:参考文献[14]的方法。采用了2种不同缓冲液进行电泳:0.12mol·L⁻¹巴比妥钠(pH8.6),5V·cm⁻¹电泳60min;0.1mol·L⁻¹乙酸钡(pH8.0),5V·cm⁻¹电泳150min。以0.2%阿利新蓝染色。

糖胺聚糖(GAG)总含量的测定:参考文献[14]的方法,以6-硫酸软骨素(C-6-S)与肝素(Hp)为标品作测定,即设所购得的标品(C-6-S及Hp)中GAG含量为100%,以样品中的GAG含量与标品中

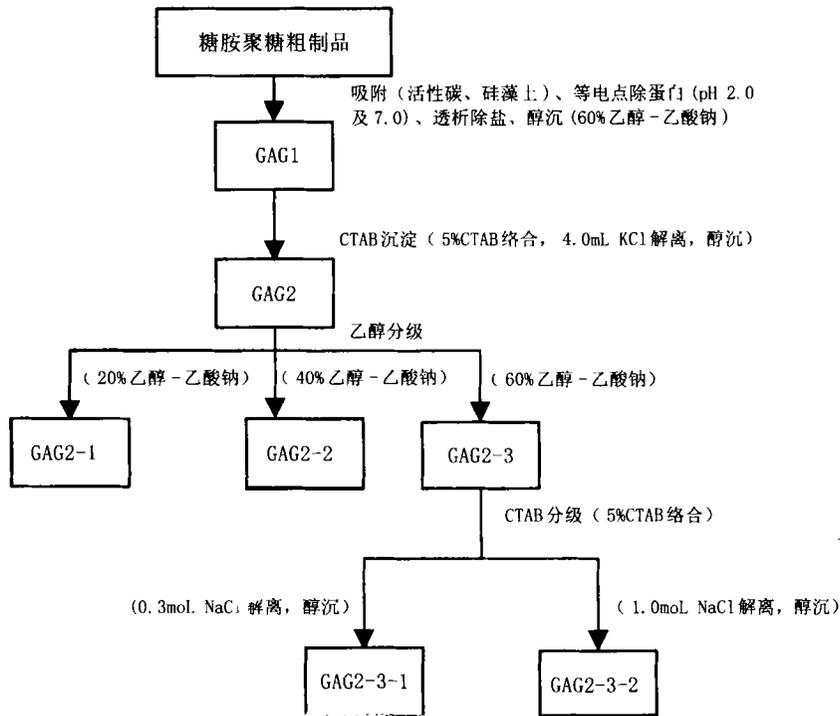


图1 糖胺聚糖纯化路线图

Fig. 1 Flow sheet for GAG purification

的作对照。

总氨基己糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖的测定:参考文献[15]的方法。

己糖醛酸的测定:硫酸呋唑法^[16];硫酸基的鉴别:参考文献[3]的方法。

样品残余氨基酸的测定:样品经6N HCl水解后用HP 1100高效液相色谱仪测定。

元素分析:采用ELCHNS-O元素分析仪(德国Vario公司产品)。

2 结果与讨论

2.1 珠母贝糖胺聚糖的分离纯化

粗GAG为双酶水解后醇沉所得的GAG粗制品,其中GAG含量仅为33.3%,含氮量为5.4%,灰分含量为12.5%,表明尚含有较多的蛋白质、无机盐等杂质,因此对粗GAG进行除蛋白和脱盐处理。采用活性炭吸附及等电点沉淀后,取清液1mL加入20%三氯乙酸,无浑浊现象,表明蛋白质的清除较彻底;经透析后取透析液1mL加入10% AgNO₃,无白色物质出现,证明脱盐较完全。样品经醇沉后得GAG1,GAG1用CTAB络合法进一步除杂,得GAG2,所余CTAB上清液再醇沉后的微量沉淀已无阿利新蓝染色物,证明清液中已无多糖。

除杂后的GAG2为若干种糖胺聚糖的混合物,因此用醇沉法及CTAB络合法对GAG2进行分级分离,经不同浓度的乙醇沉淀得3个级分,其中GAG2-3为主要级分。再经CTAB络合法分级分离,经0.3molNaCl解离的级分为GAG2-3-1,量极小。经1.0molNaCl解离的级分为GAG2-3-2,为主要级分。

从表1中可知,纯化过程中主要级分的GAG含量在逐级提高,表明蛋白质、无机盐等杂质在不断被

除去。最后纯化的主要级分 GAG2-3-2 的得率为 2.3×10^{-3} 。

表 1 纯化中的 GAG 含量、回收率、得率比较

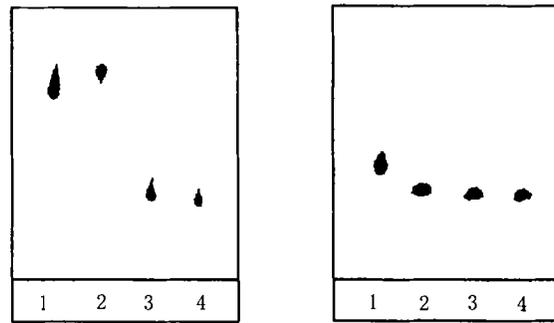
Tab.1 Comparison of GAG content, recovery rate, extraction rate in purified product

	GAG 含量* (%)	GAG 含量** (%)	回收率 (%)	得率
CPG	33.3	49.3		10.3×10^{-3}
GAG1	86.5	114	58.0	6.0×10^{-3}
GAG2	109.2	154	52.9	3.2×10^{-3}
GAG2-3	112.7	161	93.1	2.9×10^{-3}
GAG2-3-2	118.2	170	78.2	2.3×10^{-3}

注: * 为以 C-6-S 为标品测得的 GAG 含量; ** 为以 Hp 为标品测得的 GAG 含量; 设标品中的 GAG 含量为 100%, 以样品中的 GAG 含量与其作对照, 即相对含量。

2.2 醋酸纤维素薄膜电泳

GAG2-3-2 在 2 种不同缓冲剂中的电泳图谱见图 2, GAG2-3-2 的电泳图谱显示为单一的蓝色斑点, 集中清晰, 提示样品纯度较高。电泳相对迁移率见表 2。在巴比妥钠缓冲系统中, GAG 的迁移率与重复单位平均阴离子基团数相关。结果显示以 Hp 的迁移率为最高(1.0)时, C-6-S 的迁移率也很高(0.95), 而 GAG2-3-2 仅为 0.38。提示 GAG2-3-2 重复单位(或各糖基)的平均阴离子基团数较低。在乙酸钡缓冲系统中, 各种 GAG 的迁移速度与钡离子和聚糖的离子基团相互作用的程度不同有关。结果显示在此系统中 C-6-S 的迁移率最高, GAG2-3-2 的迁移率(0.96)接近于 Hp 的迁移率(1.0)。



0.12mol·L⁻¹巴比妥钠(pH8.6) 0.1 mol·L⁻¹乙酸钡(pH8.0)

图 2 GAG2-3-2 醋酸纤维素薄膜电泳图谱

Fig.2 Acetate film electrophoresis of fraction GAG2-3-2

1. 硫酸软骨素, 2. 肝素, 3. GAG2-3, 4. GAG2-3-2

2.3 珠母贝糖胺聚糖的主要化学成分

按前述文献方法测定, 纯化后所得的珠母贝糖胺聚糖主要级分 GAG2-3-2 的主要化学成分含量如表 3。另按文献[3]方法鉴别, 表明样品含硫酸基。

表 3 GAG2-3-2 的化学成分含量

Tab.3 Main chemical compositions of GAG2-3-2

	氨基已糖总量 (%)	氨基半乳糖含量 (%)	已糖醛酸含量 (%)	半乳糖含量 (%)	岩藻糖含量 (%)
GAG2-3-2	71.3	59.0	6.2	6.6	1.9

从其主要化学成分可知: ①氨基已糖含量高, 而已糖醛酸含量低, 二者比例较悬殊, 提示该糖胺聚糖在结构上有其特殊性; ②氨基已糖中以氨基半乳糖为主, 提示在一级结构的重复单位组成上与软骨素有相似之处^[14,17]; ③其它单糖成分如己糖和脱氧己糖的测定表明含有半乳糖和岩藻糖, 以半乳糖含量为高。

2.4 珠母贝糖胺聚糖残余氨基酸分析

GAG2-3-2 经 HCl 水解后用 HP1100 高效液相色谱仪测定, 结果见表 4。

结果表明残余氨基酸含量较低,GAG2-3-2中氨基酸总含量约为11.3%,原料(珠母贝全脏器)中氨基酸总含量为干重的71.6%^[18],说明已有84.2%的氨基酸被清除。

2.5 元素分析

经元素分析仪测定,GAG2-3-2的主要元素含量分别为:碳(C)37.7%,氢(H)5.8%,氮(N)5.8%,硫(S)3.0%。

氮含量较高,与GAG2-3-2中含较多的氨基已糖有关;硫含量相对较低^[9],提示其硫酸基的含量相对较低。

3 结论

结合使用乙醇沉淀、CTAB络合等法可分离纯化马氏珠母贝全脏器中的糖胺聚糖。纯化后的主要级分GAG2-3-2的得率为 2.3×10^{-3} ,得率较高。GAG2-3-2经醋酸纤维素薄膜电泳显示为单一区带。化学成分分析表明GAG2-3-2的氨基已糖含量高(71.3%),已糖醛酸含量低(6.2%),氨基已糖中以氨基半乳糖为主(59.0%),半乳糖与岩藻糖的含量分别为6.6%与1.9%。残余氨基酸分析表明GAG2-3-2中84.2%的氨基酸已被清除。元素分析表明:GAG2-3-2的碳、氢、氮、硫含量分别为37.7%、5.8%、5.8%、3.0%。

参考文献:

- [1] 张豁中,温玉麟. 动物活性成分化学[M]. 天津:天津科学技术出版社,1995.996-998.
- [2] Kariya Y, Watabe S, Ochiai Y, et al. Glycosaminoglycan from the body wall of the Sea Cucumber *Stichopus Japonicus*[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1990,95B(2):387-392.
- [3] 樊绘曾,陈菊娣,林克忠. 刺酸性粘多糖的分离及其理化性质[J]. *药学报*,1980,15(5):263-269.
- [4] Karamanos N K, Manouras A, Tsegenidis T, et al. Isolation and Chemical Study of the Glycosaminoglycan from Squid Cornea[J]. *Int J Biochem*,1991,23(1):67-72.
- [5] Karamanos N K, Mamouras A, Politou D, et al. Isolation and Highperformance Liquid Chromatographic Analysis of Ray (*Raja Clavata*) Skin Glycominglycans Comp[J]. *Biochem Physiol*, 1991.100B(4):827-832.
- [6] 杜晓东,张庭广,王军,等. 鲨鱼酸性粘多糖中的中性糖鉴别[J]. *中国海洋药物*,1991,(3):16-19.
- [7] 郝秀兰,叶淑芳,吴钟高,等. 鲨鱼骨粘多糖抗凝血作用[J]. *中国海洋药物*,1992,(4):17-22.
- [8] 沈文梅,骆传环,王益,等. 海星酸性粘多糖的理化性质研究[J]. *海洋药物*,1986,(2):1-5.
- [9] 王长云,管华诗. 海湾扇贝边中氨基多糖的研究[J]. *中国水产科学*,1994,1(2):32-39.
- [10] Ehrlich J, Patel B, Stivala S. Comparative Studies of Mucopolysac charides from Marine Animals. II. Illes [1] ecebrosus (Lesueur) and Various Crustaceans[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*,1981,52(1):95-101.
- [11] 吴红棉,洪鹏志,雷晓凌,等. 珠母贝全脏器中糖胺聚糖粗提物的制备及其生理活性初探[J]. *湛江海洋大学学报*,2000,(3):50-55.
- [12] 王长云,管华诗. 扇贝边中酸性粘多糖的提取[J]. *青岛海洋大学学报*,1992,(专辑):71-77.
- [13] 王长云,管华诗. 扇贝边中酸性粘多糖的提取和纯化方法研究[J]. *青岛海洋大学学报*,1995,(专辑):209-214.
- [14] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.413-414,397-400,406-407.
- [15] Wangner W D. A More Sensitive Assay Discriminating Galuctosamine and Glucosamine in Mixture[J]. *Anal Biochem*,1979,94:394-396.
- [16] Dische Z. A New Specific Color Reaction of Hexuronic Acids[J]. *J Biol Chem*,1947,167:189-198.
- [17] 商业部脏器生化制药情报中心站(编). 动物生化制药学[M]. 北京:人民卫生出版社,1983.208.
- [18] 章超桦,吴红棉,洪鹏志,等. 马氏珠母贝肉的营养成分及其游离氨基酸组成[J]. *水产学报*,2000,24(2):180-184.

表4 GAG2-3-2的氨基酸分析结果

Tab.4 Amino acid contents of GAG2-3-2

氨基酸名称	含量(%)	氨基酸名称	含量(%)
天冬氨酸(Asp)	0.076	酪氨酸(Tyr)	0.134
谷氨酸(Glu)	0.146	缬氨酸(Val)	0.278
丝氨酸(Ser)	1.99	蛋氨酸(Met)	0.133
组氨酸(His)	-	苯丙氨酸(Phe)	0.058
甘氨酸(Gly)	0.076	异亮氨酸(Ile)	0.071
苏氨酸(Thr)	4.145	亮氨酸(Leu)	0.168
丙氨酸(Ala)	1.738	赖氨酸(Lys)	-
精氨酸(Arg)	-	脯氨酸(Pro)	2.275
氨基酸总和	11.3%		