

磷沙蚕凝集素的分离纯化及生物活性研究

孔 静¹, 熊川男¹, 李 伟^{1,2}, 孔 亮¹, 金 桥², 白雪芳¹, 杜昱光¹

(1. 中国科学院 大连化学物理研究所 生物技术部, 辽宁 大连 116023; 2. 大连水产学院 食品工程系, 辽宁省水产品加工与贮藏重点开放实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 采用 DEAE Toyopearl 阴离子交换树脂、Bio Gel P 100 分子筛层析、Lactosyl Sepharose 4B 亲和层析和 Sephadex 75 分子筛层析技术从日本海的海洋无脊椎动物磷沙蚕 (*Chaetopterus variopedatus*) 中分离出 2 种凝集素, 通过体外细胞活性和酶活性实验观察它们的生物活性。结果表明, 从海洋无脊椎动物磷沙蚕中分离出一种 β -半乳糖特异性凝集素 (CVL) 和一种具有血凝活性, 但不被经测试的单糖和糖蛋白所抑制的相对分子质量为 30 000 的蛋白质 (CVL-1)。 β -半乳糖特异性凝集素 (CVL) 具有体外抑制 NB4 白血病细胞株的活性和抑制小鼠脾细胞的活性, IC_{50} 分别为 7.87 mg/L 和 22 mg/L。同时, 另一种蛋白质 (CVL-1) 具有 β -葡萄糖苷酶活性。

关键词: 磷沙蚕 (*Chaetopterus variopedatus*); 凝集素; β -葡萄糖苷酶; NB4 白血病细胞株; 脾细胞
中图分类号: Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)02-0059-06

凝集素通常被认为是非酶的非免疫的蛋白质或多价糖结合蛋白, 广泛存在于动物、植物和微生物中。它们在生物学研究中用来纯化多糖和糖蛋白, 以及用于细胞分离、细胞上糖结合蛋白的鉴定、促进淋巴细胞的有丝分裂和血型鉴定等研究。近来, 有一些具有催化活性的凝集素被报道^[1-4]。这使得凝集素的概念进一步发展成为“凝集素是糖密码的解译者”^[5]。

从海洋无脊椎动物中发现很多凝集素, 它们具有各种各样的生物活性。如在海绵 *Haliclona cratera* 的凝集素中观察到对 HeLa 细胞系和 FemX 细胞系具有细胞毒性^[6], 另一面对一些细胞具有促有丝分裂作用。硬果谷粒海绵 (*Chondrilla nucula*) 的凝集素抑制 HIV 病毒和人的 T 淋巴细胞的结合^[7]。从海鞘 (*Didemnum ternatanum*) 中提取的凝集素 DTL 抑制 HeLa 细胞的增生, 降低对胸腺核苷酸的利用和改变它们的形态^[8,9], 同时对海洋棘皮动物的细胞具有粘附和促生长作用^[10]。

作者为了研究海洋无脊椎动物磷沙蚕 (*Chaetopterus variopedatus*) 凝集素的生物活性, 采用 DEAE Toyopearl 阴离子交换树脂、Bio Gel P 100 分子筛层析、Lactosyl Sepharose 4B 亲和层析和

Sephadex 75 分子筛层析技术从磷沙蚕中分离出两种凝集素。通过体外细胞活性和酶活性实验对它们的生物活性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

磷沙蚕采自俄罗斯远东地区的日本海, 彼得大帝湾。采回后贮藏于 -20°C , 直至使用。

人红细胞和小鼠购自大连医科大学。人类白血病 NB4 细胞株由上海血液学研究所陈竺教授提供。

单糖购自 Merck (Darmstadt, Germany)。猪腺体糖蛋白 (Mucin from bovine submaxillary glands, BSM)、脱酸猪腺体糖蛋白 (asialo BSM)、脱酸胎球蛋白 (asialo fetuin) 和 p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside

收稿日期: 2005 06 30; 修回日期: 2005 12 24

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (2050885); 辽宁省教育厅资助项目 (05L086); 大连水产学院科研项目 (015690)

作者简介: 孔静 (1981), 辽宁葫芦岛人, 博士, 研究方向: 海洋生物中凝集素及其生物活性研究, E-mail: kjgg@dicp.ac.cn; 李伟, 通讯作者, 电话: 13591803523, E-mail: aisingioro@dlfu.edu.cn

购自 Sigma 公司(USA)。

1.2 方法

1.2.1 凝集素提取

将磷沙蚕研磨粉碎, 用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L, pH 7.6, Tris-HCl 缓冲液在 4℃ 抽提过夜。6 000 r/min 离心 20 min 取上清液。加入硫酸铵使硫酸铵的质量分数为 70%。6 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀, 溶于含 0.15 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L, pH 7.6, Tris-HCl 缓冲液中, 在去离子水中透析除去硫酸铵, 冻干。

干样品溶于 0.1 mol/L, pH 7.6, Tris-HCl 缓冲液中, 加入到用该缓冲液平衡过的 DEAE-Toyopearl (0.5 cm × 10 cm) 柱中, 收集未吸附在该柱上的组分(以下称为组分 I), 同时测定血凝活力。然后用线性梯度离子强度洗脱, 洗脱液中 NaCl 浓度为 0 ~ 1.0 mol/L, 收集有血凝活力的组分(以下称为组分 II)。

将组分 I 用超滤膜除盐浓缩。将浓缩的样品 5 mL 加入到用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L, pH 7.6, Tris-HCl 缓冲液平衡过的 Bio Gel P-100 (1.5 cm × 50 cm) 柱上, 用相同的缓冲液洗脱, 收集有血凝活力的组分。同时测定该组分的 β-葡萄糖苷酶活性。冻干得到样品 I。

将组分 II 按文献[11]方法, 加入到 Lactosyl-Sepharose 4B (1.5 cm × 20 cm) 亲和柱上进行层析, 用 0.2 mol/L 的半乳糖洗脱。透析除去半乳糖。再加入到用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L, pH 7.6, Tris-HCl 缓冲液平衡过的 Sephadex 75 (1.5 cm × 50 cm) 柱上, 用相同的缓冲液洗脱, 收集有血凝活力的组分。冻干得到样品 II。

1.2.2 蛋白质检测和总糖的检测

用 Bradford 法检测样品中蛋白含量^[12], 以牛血清白蛋白为标准蛋白。用酚-硫酸法检测样品中糖含量^[13]。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳采用 15% 分离胶, 5% 浓缩胶。凝胶用考马斯亮兰 R 250 染色, 蛋白质标准样与样品在同一条件下电泳^[14]。

1.2.4 胰蛋白酶对红细胞的消化

将人红细胞悬浮于 10 mL 含 0.15 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L, pH 7.6, Tris-HCl 缓冲液中, 加入 2 mg 胰蛋白酶, 37℃ 下消化 3 h。然后用该缓冲液洗

3 次, 在该缓冲液中配成 2% 红细胞悬浮液。

1.2.5 血凝活力测定

血凝活力测定在 96 孔 U 型微量血凝板中进行。先在每孔中加入 25 μL Tris-HCl 缓冲液, 再往第 1 孔中加入 25 μL 血清样品, 混匀后, 再从第 1 孔中吸取 25 μL 上述混合液加入第 2 孔, 以此类推作倍比稀释, 最后在每孔中加入 25 μL 体积分数为 2% 的 Tris-HCl 缓冲液红细胞悬浮液, 振荡摇匀, 在室温下放置 1~2 h 后, 肉眼观察。如红细胞不发生凝集则在“U”型血凝板小孔内沉于孔底形成一界线清晰的红色小点; 如发生凝集, 红细胞之间则形成一似网络扩散的红斑块。以有红细胞凝集活力的最大稀释度为该凝集素样品的凝集活力(凝集效价), 记为 2ⁿ, 以含 0.15 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L, pH 7.6, Tris-HCl 缓冲液作空白对照。

1.2.6 血凝集抑制测试

在微量滴定 U 型板中将抑制剂 25 μL 连续 2 倍稀释于含 0.15 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L, pH 7.6, Tris-HCl 缓冲液中。在每个孔中加入等体积样品 (25 μL, 4 倍血凝集活性), 再加入等体积搅动后的 2% 红细胞悬浮液。1 h 后测定每种抑制剂的最小制剂浓度。在测试中, 使用胰蛋白酶消化后的 B 型红细胞。

1.2.7 β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase) 活性检测

在 96 孔平底板中, 分别加入 50 μL 待测样品, 50 μL 磷酸缓冲液(pH 7.4), 50 μL p-氮苯基-β-D-葡萄糖苷(p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside)。在 37℃ 中反应 1 h 后, 加入 50 μL 0.5 mol/L Na₂CO₃ 终止反应。用酶标仪在 410 nm 波长处检测吸光度。以反应体系中只有 100 μL 磷酸缓冲液(pH 7.4), 50 μL p-氮苯基-β-D-葡萄糖苷, 其它反应条件相同而未加样品组为对照。

1.2.8 细胞培养

人类白血病 NB4 细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液(内含青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 mg/L, 1 mmol/L L-谷氨酰胺)。在含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。

1.2.9 凝集素对 NB4 细胞的抑制作用

用 96 孔平底板培养, 四氮唑蓝比色法(MTT 法)观察样品 II 对人类白血病 NB4 细胞的杀伤或增殖抑制作用。MTT 法是以代谢还原四氮唑蓝(MTT)为基础。活细胞线粒体中存在与 NADP 相关的脱氢

酶。可将黄色的 MTT 还原为不溶性的蓝紫色的甲瓚(formazan),而死亡细胞此酶消失,MTT 不被还原,用二甲基亚砷(DMSO)溶解甲瓚后,可用酶标仪在 570 nm 波长处检测吸光度大小。

将数量为 4.5×10^4 个/mL 处于对数生长期的 NB4 细胞 100 μ L、不同浓度的样品 II 溶液,并加含 10% 胎牛血清的 RPMF 1640 培养基液至每孔 200 μ L,在 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养 72 h 后,加入 20 μ L MTT(5 g/L),再培养 4 h 后,弃去培养基,加入 180 μ L DMSO,在恒温振荡器上振荡 60 s 后,用酶标仪在 570 nm/630 nm 波长处检测吸光度。每个浓度的样品 II 溶液设 3 个平行样。根据测得的吸光度值计算抑制率。

抑制率= [(对照组吸光度值- 实验组吸光度值)/ 对照组吸光度值] $\times$ 100%

1.2.10 脾细胞悬液的制备

无菌条件下取出小鼠脾脏,置于 Hanks 液中。在 200 目不锈钢网上研磨小鼠脾脏,制成脾细胞悬液。离心 2 000 r/min, 10 min,去上清液。用双蒸水低渗破坏红细胞(3 mL/个)后,离心 2 000 r/min,

10 min。再用 Hanks 液洗 2 次,离心得灰白色沉淀。用台盼蓝染色,计数活细胞。用含 10% 胎牛血清的 RPMF 1640 培养液调整细胞数至 2×10^5 个/mL 的脾细胞悬液。

1.2.11 凝集素对小鼠脾细胞的作用

用 96 孔平底板培养,四氮唑蓝比色法(MTT 法)观察样品 II 对小鼠脾细胞的杀伤或增殖抑制作用。具体方法见 1.2.9。

2 结果和讨论

2.1 凝集素的分离纯化

采用 DEAE Toyopearl 阴离子交换树脂,分离出不吸附于该树脂,但有凝血活性的组分 I 和吸附于该树脂的具有凝血活性的组分 II(图 1)。组分 I 和组分 II 分别经过进一步提纯(图 2),得到样品 I 和样品 II。样品 I 经 SDS-PAGE 电泳检测,在加入 β -巯基乙醇和没有加入 β -巯基乙醇时均表现为一相对分子质量为 30 000 的蛋白质(图 3)。样品 I 和样品 II 的糖含量均为小于 1%。

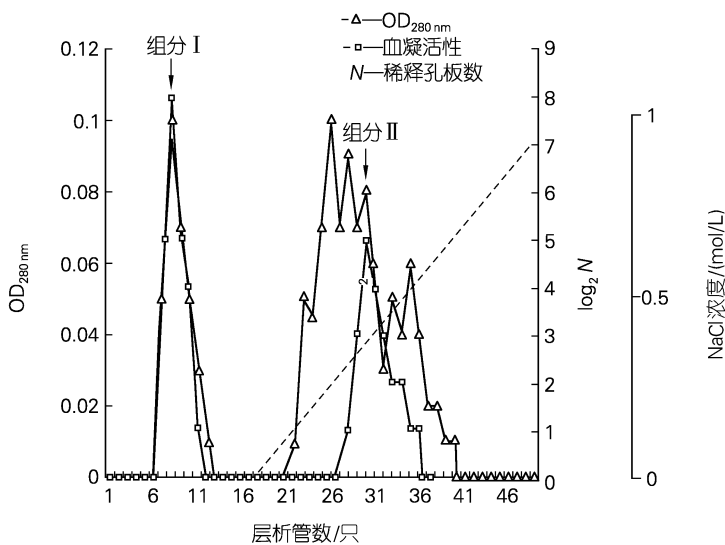


图1 磷沙蚕抽提液的 DEAE Toyopearl 阴离子交换层析图

Fig. 1 Anion exchange chromatography of crude extract of *Chaetopterus variopedatus* on DEAE-Toyopearl

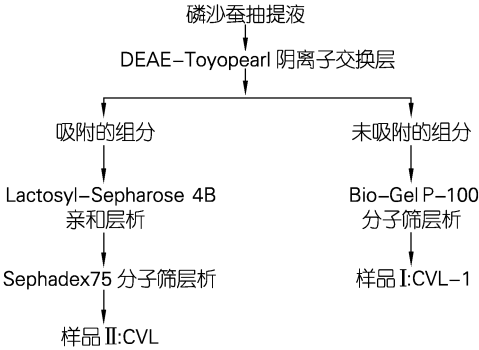


图 2 分离样品 I 和样品 II

Fig. 2 Isolations of sample I and sample II

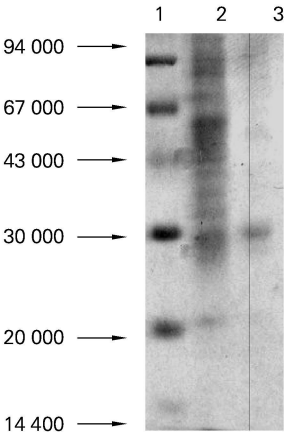


图 3 SDS-PAGE 电泳

Fig. 3 SDS PAGE electrophoresis

- 1. 标准蛋白质样品; 2. 磷钨酸粗提液; 3. 样品 I 未加入 β -巯基乙醇和加入 β -巯基乙醇(图上未显示)
- 1. Marker proteins; 2. Crude extract of *Chaetopterus variopedatus*;
- 3. Sample I in presence of β mercaptoethanol and in absence of β -mercaptoethanol (not shown)

样品 I 和样品 II 经过血凝活性抑制测试发现, 样品 I 不被经测试的单糖、寡糖和糖蛋白所抑制, 而样品 II 的抑制特性与文献[11]所报道的凝集素 CVL 一致(表 1), 且 SDS-PAGE 电泳亦显示相对分子质量为 30 000(数据未给出)。由此作者认定样品 II 是凝集素 CVL。虽然样品 I 和样品 II 相对分子质量相同, 但是样品 I 和样品 II 在分离纯化过程中以及后来的血凝活性抑制测试、生物活性测试中均表现完全不同的行为, 这表明样品 I 和样品 II 是 2 种性质不同的蛋白质。

血凝活性抑制测试是鉴定凝集素种类的有效方法。虽然样品 I 不被经测试的单糖、寡糖和糖蛋白所抑制, 暂时无法确定它的凝集素归属, 但是如果应用

更多的寡糖和糖蛋白, 应该可以找到它相应的特异性抑制剂。

表 1 血凝活性抑制测试

Tab 1 Inhibition of hemagglutination

抑制剂	最低抑制浓度(mmol/L)	
	样品 I	样品 II
D-半乳糖	NI	1.00
D-甘露糖	NI	NI
D-葡萄糖	NI	NI
N-乙酰 D-半乳糖胺	NI	1.00
N-乙酰 D-葡萄糖胺	NI	NI
D-岩藻糖	NI	3.40
L-岩藻糖	NI	NI
D-半乳糖醛酸	NI	4.30
猪腺体糖蛋白	NI	0.06 ^a
脱酸猪腺体糖蛋白	NI	0.06 ^a
脱酸胎球蛋白	NI	0.06 ^a

注: a 单位为 g/L; NI 表示不抑制

2.2 活性分析

2.2.1 β -葡萄糖苷酶活性

在分离纯化过程中, 组分 I 为不吸附于 DEAE-Toyopearl 上的成分。对其进一步在 Bio-Gel P-100 柱上进行纯化发现, 具有凝血活性洗脱峰同时具有 β -葡萄糖苷酶的活性(图 4)。将该洗脱峰收集后透析冻干得样品 I (CVL-1), 经电泳检测, 如前所述相对分子质量为 30 000。对照检测样品 II, 没有 β -葡萄糖苷酶的活性。

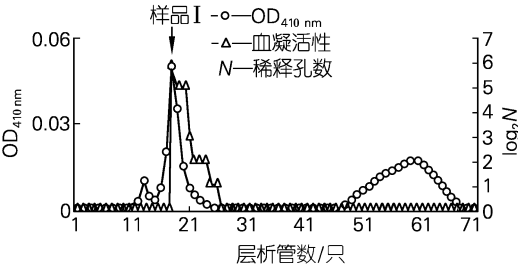


图 4 组分 I 的 Bio-Gel P-100 层析

Fig. 4 Gel filtration of non bound with DEAE Toyopearl fraction I on Bio-Gel P-100

凝集素通常不具有酶的活性。但是近来发现了从荷兰鸢尾和接骨木(*Sambucus nigra*)中提取的凝集素具有酶活性^[15, 16]。从牛蛙(*Rana catesbeiana*)卵中分离出的唾液酸特异性凝集素(cSBL)具有 RNase 的活性^[1-4]。cSBL 不凝集正常的人血细胞和成纤维细胞, 但可凝集各种肿瘤细胞。它的氨基酸序列有 65% 和从该牛蛙肝中来的 RNase 同源。它从结构和

功能上属于人胰 RNase 酶超家族。现在人们把这些凝集素命名为“凝集酶”(lecyzemes)。

另一方面,从玉米中分离出一种 88.7 ku 的复合体 CCL,同时具有凝集素活性和 β -葡萄糖苷酶活性^[17-19]。它含有 60 ku 的 β -葡萄糖苷酶活性部分和 30 ku 的凝集素活性部分。作者分离到的样品 I 属于这两类凝集素中的哪一类,目前仍在研究中。

2.2.2 样品 II 对 NB4 细胞和小鼠脾细胞的抑制作用

样品 II 经过和文献[11]对照,确定它是 β -半乳糖特异性凝集素 CVL。在它和人类白血病 NB4 细胞株培养 72 h 后,它表现出对人类白血病 NB4 细胞的杀伤或增殖抑制作用,IC₅₀ 为 7.87 mg/L(图 5)。样品 I 没有作用。同时,样品 II 和小鼠脾细胞培养 72 h 后,它在高浓度条件下表现出对小鼠脾细胞的杀伤或增殖抑制作用,IC₅₀ 为 22 mg/L(图 6)。

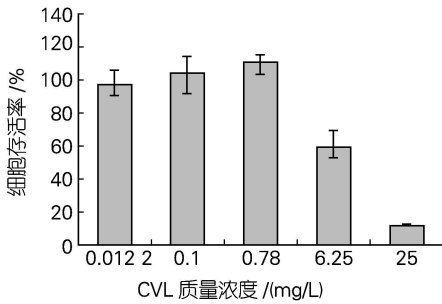


图 5 凝集素 CVL 对人类白血病 NB4 细胞的毒性

Fig. 5 Cytotoxic activity of CVL on NB4 cells

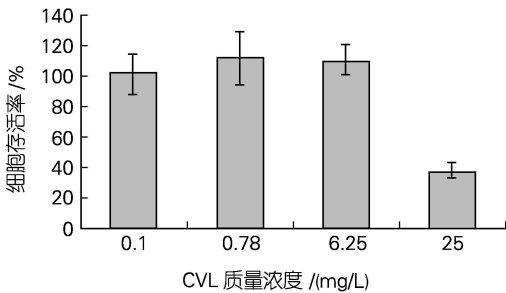


图 6 凝集素 CVL 对小鼠脾细胞的毒性

Fig. 6 Cytotoxic activity of CVL on T, B lymphocyte of mouse cells

凝集素的细胞毒性在海洋无脊椎动物中不是一个普遍的现象,至今报道很少。有一个毒蛋白从海绵 *Suberites domuncula* 中分离出来,它表现出很强的神经毒性和血淋巴毒性。CEL-III 是一种海参凝集素,它对人的红细胞具有一定的毒性^[20]。

海洋无脊椎动物的凝集素在细菌或藻类侵入到机体的时候发挥作用^[21,22],但它的生物功能还没有完全研究清楚。对于 CVL 的 NB4 细胞毒性的机理还有待研究。通过这些研究,可以更好地了解凝集素在海洋无脊椎动物生命过程中所发挥的作用。

参考文献:

- [1] Nitta K. Lecyyme[J]. **Methods Enzymol**, 2001, 341: 368-374.
- [2] Nitta K, Ozaki K, Tsukamoto Y, *et al.* Characterization of a *Rana catesbeiana* lectin resistant mutant of leukemia P388 cells[J]. **Cancer Res**, 1994, 54(4): 928-934.
- [3] Nitta K, Ozaki K, Ishikawa M, *et al.* Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily[J]. **Cancer Res**, 1994, 54(4): 920-927.
- [4] Nitta K, Oyama F, Oyama R, *et al.* Ribonuclease activity of sialic acid binding lectin from *Rana catesbeiana* eggs[J]. **Glycobiology**, 1993, 3(1): 37-45.
- [5] Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glyco-codes[J]. **J Biochem (Tokyo)**, 1996, 119(1): 1-8.
- [6] Pajic I, Kljajic Z, Dogovic N, *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity[J]. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 2002, 132(2): 213-221.
- [7] Schroder H C, Kljajic Z, Weiler B E, *et al.* The galactose specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti human immunodeficiency virus activity *in vitro* via stimulation of the (2'5') oligoadenylate metabolism[J]. **Antivir Chem Chemother**, 1990, 1: 99-105.
- [8] Belogortseva N I, Ovodova R G, Moroz S V, *et al.* Isolation and general characteristics of lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum* [J]. **Bioorg Khim**, 1994, 20(89): 975-983.
- [9] Odintsova N A, Belogortseva N I, Khomenko A V, *et al.* Effect of lectin from the ascidian on the growth and the adhesion of HeLa cells[J]. **Mol Cell Biochem**, 2001, 221(1-2): 133-138.
- [10] Odintsova N A, Belogortseva N I, Ermak A V, *et al.* Adhesive and growth properties of lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum* on cultivated marine invertebrate cells[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1999, 1448(3): 381-389.
- [11] Mikhey skaya L, Evtushenko E, Ovodova R, *et al.* Isolation and characterization of a new β -galactose specific lectin from the sea worm *Chaetopterus vario-*

- pedatus[J]. *Carbohydr Res*, 1995, 275: 193-200.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [13] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 42-100.
- [14] Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [15] Hao Q, Van Damme E J M, Hause B, *et al.* Iris bulbs express type 1 and type 2 ribosome inactivating proteins with unusual properties[J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 866-876.
- [16] Van Damme E J M, Roy S, Barre A, *et al.* The major elderberry (*Sambucus nigra*) fruit protein is a lectin derived from a truncated type 2 ribosome inactivating protein[J]. *Plant J*, 1997, 12: 1251-1260.
- [17] Molina J, Landa A, Bautista G, *et al.* Molecular association of lectin and β -glucosidase in corn coleoptile [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1674: 299-304.
- [18] Martínez-Cruz M, Zenteno E, Córdoba F. Purification and characterization of a galactose specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptyle [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1568: 37-44.
- [19] Martínez M, Pérez-Campos E, Zenteno E, *et al.* Analysis of the lectins from teosinte (*Zea diploperennis*) and maize (*Zea mays*) coleoptiles[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 3783-3789.
- [20] Kuramoto T, Uzuyama H, Hatakeyama T, *et al.* Cytotoxicity of a GalNAc specific G type lectin CEL-I toward various cell lines[J]. *J Biochem* (Tokyo), 2005, 137(1): 41-50.
- [21] Diehl-Seifert B, Uhlenbruck G, Geisert M, *et al.* Physicochemical and functional characterization of the polymerization process of the *Geodia cydonium* lectin[J]. *Eur J Biochem*, 1985, 147(3): 517-523.
- [22] Wagner-Hulsmann C, Bachinski N, Diehl-Seifert B, *et al.* A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*) system[J]. *Glycobiology*, 1996, 6(8): 785-793.

The lectins from sea worm *Chaetopterus variopedatus*: isolation and biological activity

KONG Jing¹, XIONG Chuan¹, LI Wei^{1,2}, KONG Liang¹, JIN Qiao², BAI Xuefang¹, DU Yuguang¹

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Science, Dalian 116023, China; 2. Department of Food Engineering, Dalian Fisheries University, Key and Open Laboratory of Aquatic Products Processing and Utilization of Liaoning Province, Dalian 116023, China)

Received: Jun. 30, 2005

Key words: *Chaetopterus variopedatus*; lectin; β -glucosidase; NB4 human leukemia cell; lymphocyte

Abstract: A β -galactose specific lectin (CVL) was purified from the sea worm *Chaetopterus variopedatus*. CVL displays cytotoxic effect on NB4 human leukemia cells and T, B lymphocytes of mouse. The highest limit of CVL concentration causing a decrease in cell survival of 50% was evaluated to be 7.87 mg/L for NB4 cells and 22 mg/L for T, B lymphocytes of mouse. A new lectin (CVL-1) was purified from the same sea worm. Molecular weight of CVL-1 obtained was determined by SDS-PAGE to be 30 000. The hemmagglutination activity of CVL-1 was not inhibited by any of the monosaccharides and glycoproteins tested. CVL-1 is presented with β -glucosidase activity.

(本文编辑: 张培新)