

甲壳纲动物凝集素的结构特征和分离纯化方法

Characterizations and purification methods of Lectins of crustaceans

孙杰^{1,2}, 安利国¹, 王雷², 王宝杰²

(1. 山东师范大学 生命科学学院, 山东 济南 250014; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)00-0072-04

凝集素(Lectin)是指所有非免疫原的能凝集细胞或沉淀含糖大分子的蛋白质或糖蛋白,一般具有糖结合专一性,能与糖蛋白或糖脂分子中的糖相结合。

早在1888年,俄国的Herman发现蓖麻籽的蛋白质提取物能凝集红细胞,从而开始了凝集素的研究。目前人们分离纯化的凝集素已经超过了1000种,凝集素广泛存在于动物、植物、微生物中。随着研究的深入,人们认识到凝集素在生物体内具有很多重要的生理功能,在生物、医药等方面具有广泛的应用前景。凝集素纯化方法的发展和凝集素性质研究的日益深入,使凝集素的应用范围也越来越广,已经成为生物化学、生物学、免疫学及医学等各个领域中有用的研究工具,也被应用于临床诊断、治疗和工业生产。例如凝集素可以用于分离纯化含糖高分子;分离和纯化细胞;鉴定微生物;研究细胞表面特征以及探索免疫反应机理。从锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[1]中纯化的凝集素可以用来检测人的血清中唾液酸复合物的含量,用于不同时期癌症的监测。直到20世纪初,人们才从甲壳动物中发现了凝集素的存在。随着对甲壳动物凝集素的分离纯化和理化性质的研究,人们发现甲壳纲动物凝集素具有许多共同的特征和理化性质,而且在免疫反应中起到了非特异性免疫识别因子的作用,对于激活甲壳动物免疫系统从而抵御微生物的侵害具有重要作用。因此,甲壳纲动物凝集素的分离纯化以及性质、结构、功能的研究,对阐述甲壳纲动物免疫系统的激活,免疫作用的发生具有重要意义。甲壳纲动物是重要的经济海洋生物,其防御、抗病机理的研究,对水产动物养殖业的发展具有巨大的指导作用。作者对甲壳纲动物凝集素的特性和分离纯化方法进行总结,以期对甲壳纲动物凝集素的分离纯化工作提供新的思路。

1 甲壳纲动物凝集素的特点

动物凝集素是一族具有异型分子结构的蛋白

质,具有高度的结构差异性。最初根据它们的糖识别结构域(CRD)及其它区域组成和生理生化特征的不同分为两类:钙离子依赖性的C型凝集素和巯基依赖性的S型凝集素。最近依据蛋白的三维结构和一级序列的分析结果,提出了一个更加完整的分类,将动物凝集素分为4类^[2]:C型凝集素、P型凝集素、正五角蛋白凝集素和半乳糖结合的凝集素,而S型凝集素被重新归类为半乳糖结合的凝集素。在甲壳纲动物中,大部分已经纯化的凝集素不属于已有的凝集素分类,它们具有共同的特点和性质。

大多数甲壳纲动物凝集素都含有共价结合的糖分子,是糖蛋白。各种凝集素的含糖量不等,种类也各不相同。甲壳纲凝集素分子中糖的组成主要是甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、半乳糖、唾液酸等。Roberto^[3]从淡水对虾中纯化了一种含糖量11%的凝集素,它与人的免疫球蛋白轻链J和K分别具有22%和27%的相似性。各种凝集素的分子质量相差很大,从数万到数百万不等,甲壳纲凝集素分子都由多亚基组成的,但亚基数目各不相同,有的是由相同亚基组成的,也有由不同亚基组成的。Kawabata等^[4]等先后从日本鲎(*Tachypleus tridentatus*)中纯化了5种不同的凝集素,这些凝集素的亚基数、分子质量大小、血凝活性等方面差异很大,其中分子质量最大的为460 ku,最小的仅有27 ku。

尽管甲壳纲凝集素在结构、分子质量大小以及亚基数目上差异很大,但是它们的糖结合特性却很相似,它们具有共同的特点就是针对N-乙酰基糖类和唾液酸类糖蛋白的结合特异性,如N-乙酰神经酰胺

收稿日期: 2005-12-26; 修回日期: 2006-04-21

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(30400330)

作者简介: 孙杰(1982),女,山东潍坊人,硕士,主要从事对虾免疫研究;王雷,通讯作者, E-mail: wanglei@ms.qdio.ac.cn

(NeuAc)、N2乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc)、胎球蛋白 (Fetuin)、小牛粘液素 (BSM) 等。大部分甲壳纲凝集素对于 α 构型的糖分子有较强的结合特性, 对于 β 构型的多糖结合性较弱, 但也有对两种构型的多糖都有较强结合性的凝集素。甲壳动物凝集素与多糖的结合绝大多数要依赖金属离子的存在。二价金属离子, 尤其是钙离子, 在凝集素与多糖相互作用过程中具有不可替代的作用, 在凝集素的糖识别结构域 (CRD) 可能存在钙离子的结合位点, 它对于凝集素的正确折叠和结构稳定起到了重要作用。

另外, 由于甲壳纲动物几乎全部生活在水中, 其凝集素多数是对热敏感的, 当温度超过 75℃ 时, 大多数凝集素会丧失凝血活性, 但是在冰冻或低温 (4℃) 条件下, 能够长时间保持活性。pH 值对甲壳纲凝集素的性质影响也很大, 在温和的条件下, 凝集素的性质稳定; 当 pH 值极高 (> 11) 或极低 (< 4) 时, 大部分凝集素的活性消失。

凝集素具有多种生理生化功能, 如细胞识别、细胞间的粘附、受体介导的胞饮、细胞间糖类运输、细胞溶解、细胞毒素、细胞凝集等。甲壳动物只具有天然免疫, 不能产生免疫球蛋白, 在它们体内能够识别外物的分子被 Janeway^[5] 命名为模式识别蛋白 (PRPs), 凝集素就是一类典型的模式识别蛋白, 它能与微生物细胞壁上的糖类相结合, 引发无脊椎动物的天然免疫来抵御外来微生物的侵害。罗田^[9] 等从斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 中利用亲和层析得到两个蛋白, 一个为 18 ku 的凝集素, 另一个大小为 28 ku 的蛋白是抗白斑综合症病毒 (WSSV) 蛋白 PmAV, 18 ku 的凝集素可以识别病原, 并介导抗病毒蛋白 PmAV 发挥作用。

2 甲壳纲动物凝集素的纯化方法

在植物中, 凝集素的分离纯化多数采用传统的分级分离蛋白质的方法, 如: 硫酸铵分级沉淀、离子交换层析、分子筛凝胶过滤和超离心以及亲和层析法。从甲壳纲动物中提取凝集素, 一般不采用硫酸铵分级沉淀法, 主要运用离子交换层析、分子筛凝胶过滤和亲和层析法。甲壳纲动物凝集素的分离纯化的主要方法有以下几种。

2.1 凝胶过滤层析

凝胶过滤层析是常用的一项重要的蛋白质纯化技术, 它是根据蛋白质的分子质量的大小不同达到分离效果的。由于柱材料与蛋白质之间不是化学结合, 所以不会导致蛋白质的损失和生物活性丧失。由于甲壳纲凝集素几乎全部为多个亚基构成的大分子质量蛋白, 因此在分离纯化中常使用的是葡聚糖 (Sephadex) G200 层析柱。如 Jayasree^[7] 等在 2001 年利用 Sephadex G200 从印度对虾 (*Fenneropenaeus*

indicus) 中成功地分离出了一种 181 ku 的由两个亚基组成的凝集素。

但蛋白质分辨率差和杂蛋白含量多是凝胶过滤层析的主要缺点, 所以在近年来的凝集素分离纯化中, 凝胶过滤层析更多用于对凝集素的初步分离。

2.2 离子交换层析

离子交换层析是利用不同蛋白质表面电荷性质的不同, 达到分离纯化蛋白质的目的^[6]。当蛋白质与离子交换树脂结合后, 逐步增加洗脱溶液的离子强度, 蛋白质便会根据与柱材料结合的强弱不同, 由弱到强依次洗脱, 因此离子交换也是蛋白质纯化的重要手段。其中所选的离子柱材料的种类, 缓冲液的离子强度以及 pH 值, 都直接影响到分离纯化的结果。彭其胜^[8] 等利用离子交换层析和 Sephadex G200 凝胶过滤从中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 中纯化了一种由两个亚基组成的凝集素。但是由于甲壳纲动物血清中的各种蛋白的等电点差别不大, 且蛋白含量丰富, 因此所得的凝集素纯度不高, 往往含有杂蛋白, 因此离子交换层析也常用于凝集素的初步分离。Okino^[9] 等在硫酸葡聚糖亲和层析之后又运用离子交换和凝胶过滤层析, 从鲎血细胞内获得了一种 27 ku 的凝集素。

2.3 亲和层析

亲和层析是利用蛋白质这类大分子物质的特异的生物学性质对其进行纯化的方法, 它具有简单、迅速、高效的特点。亲和层析最有效的策略是结合目的蛋白到一个固定相, 然后用该蛋白特异的洗脱剂来解离它^[10]。亲和层析正是利用凝集素能够专一地可逆地与糖结合的特性, 利用固定化的糖作为亲和吸附剂 (配基) 来纯化凝集素的。近年来各种研究表明, 亲和层析是分离纯化甲壳纲凝集素的最有效的办法, 不仅可以获得高纯度、高活性的凝集素, 而且重复性很好。

用于纯化凝集素的配基 (亲和吸附剂) 主要有 3 种类型: (1) 天然的或修饰的聚糖; (2) 结合载体的单糖或双糖及其衍生物; (3) 结合载体的糖蛋白或糖肽。第一种类型的配基广泛用于植物凝集素的分离纯化, 甲壳动物凝集素的纯化常用的是后两种类型的配基。甲壳纲凝集素亲和层析根据亲和柱上所结合的配基 (亲和吸附剂) 不同, 可以分为两类: 一类是以乙酰类物质为配基的亲和层析, 乙酰类物质主要是单糖的衍生物; 另一类是以唾液酸类糖蛋白为配基的亲和层析, 固定化的唾液酸类糖蛋白具有较广的互补糖, 因此同一配基可以纯化糖专一性不同的凝集素。

2.3.1 乙酰基糖类为配基的亲和层析

这类亲和层析主要是根据有些甲壳纲凝集素与含乙酰基的糖类具有强烈的结合特异性来达到分离纯化的目的, 常采用的配基是 N2乙酰葡萄糖胺 (Glc2

NAc)、N₂乙酰半乳糖胺(GalNAc)等乙酰类己糖胺。通常是利用GlcNAc或GalNAc在一定条件下与CNBr活化的琼脂糖(Sephrose 6B等)相偶联形成亲和层析柱,将含有凝集素的粗提物与之结合后,以浓度更大的GlcNAc(GalNAc)或已知的与凝集素结合的其它特异性物质进行洗脱,从而得到较纯的目的蛋白。用这种方法分离的凝集素都具有较强的与乙酰糖类结合的特性。通过其它的糖类或糖蛋白的抑制试验,可以对凝集素的性质进行具体的分析研究。例如,Rajagopalan^[11]等利用GlcNAc₂Sephrose 6B亲和层析柱从印度对虾中纯化了一种由27 ku亚基组成的大约200 ku的凝集素。这种凝集素对含有乙酰基团的物质具有强烈的结合特性,对于一些虾类的致病菌具有凝集作用。

2.3.2 唾液酸类糖蛋白为配基的亲和层析

这类亲和层析用于纯化对唾液酸类糖蛋白具有特异性结合的凝集素,常用的配基是胎球蛋白(Fetuin)、小牛粘液素(BSM)等唾液酸类糖蛋白。唾液酸几乎分布在所有节肢动物和软体动物体内,是由N₂乙酰神经氨酸(NeuAc)衍化而来的。它是一个九碳糖家族,包括四十多个成员。而Fetuin和BSM是具有NeuAc末端的唾液酸类糖蛋白。其中Fetuin的末端为NeuAcA₂₃GalB₁₂₄GlcNAc,BSM的末端为NeuAcA₂₆GalNAc。由于Fetuin末端的N₂乙酰神经氨酸(NeuAc)是通过A₂₃糖苷键与半乳糖(Gal)相连的,而BSM末端的N₂乙酰神经氨酸(NeuAc)是通过A₂₆糖苷键与N₂乙酰半乳糖胺(GalNAc)相连的,因此有些时候甲壳纲凝集素对BSM的结合特异性要比对Fetuin要高一些。这类亲和层析所得的凝集素对于马或兔的血细胞具有较强的结合特性,因为这两种动物红细胞表面富含N₂乙酰神经氨酸(NeuAc)。

这类亲和层析利用Fetuin或BSM与CNBr活化的琼脂糖(Sephrose)形成亲和层析柱,将粗提的凝集素与之结合后,再利用EDTA或其它与凝集素特异性结合的物质进行洗脱。Maghil^[12]等利用BSM₂Sephrose 6B从淡水蟹(Paratelpusa jacquemontii)中分离出了一种由34 ku亚基组成的凝集素。

2.3.3 利用醛化动物血细胞分离甲壳纲凝集素

这种纯化方法的主要依据是凝集素具有与血细胞表面特异的糖蛋白结合从而凝集血细胞的性质。经醛类处理的红细胞可以认为是固定化的糖蛋白,是一种亲和吸附剂。这种吸附剂可以吸附多数凝集素,包括那些用单糖不能抑制其血凝活性的凝集素。凝集素与红细胞之间的结合力除了其与红细胞表面糖蛋白的特异性结合外,还包含次级的非专一作用(如疏水区的作用),因此洗脱时可能有困难。其过程是:将血细胞用甲醛或戊二醛固定,再将固定好的血细胞注入葡聚糖(Sephadex) G₂₅层析柱中。由于醛

化的血细胞直径与G₂₅柱的空隙相同,因此醛化的血细胞便均匀地分布在了G₂₅柱中。分离纯化凝集素时,样品中的凝集素便会与醛化血细胞表面的多糖结合,再用一种与凝集素特异结合的多糖进行洗脱,从而获得较纯的凝集素。利用这种方法,Edgar^[13,14]先后从罗氏沼虾(Macrobachium rosenbergii)中纯化了3种凝集素,从白滨对虾(Litopenaeus setiferus)^[15]中纯化了一种291 ku的凝集素。而希腊的Fragkiadakis^[16]则通过甲醛醛化的血细胞直接与甲壳动物的血清反应,尔以后以凝集素特异结合的物质进行洗脱的方法,从两种甲壳纲动物中纯化了两种不同的凝集素。

3 小结

以上总结了甲壳纲动物凝集素的基本特点和分离纯化的主要方法,甲壳纲动物凝集素在多糖结合特性、最适温度、pH值等方面都具有类似的特点和性质;在凝集素的纯化过程中,亲和层析是最有效和直接的纯化方法,而离子交换和凝胶层析是重要的辅助手段。在实际工作过程中,应根据样品的特性选择适当的试验方案,往往是几种不同手段的协调和组合,从而达到凝集素的纯化目的。

参考文献:

- [1] Prachya K. Isolation and characterization of lectin from Thai marine crab (*Scylla serrata*) with binding specificity to sialoglycoconjugates and its application [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, 7(4): 280-286.
- [2] 李春华, 魏晓锋, 李祥瑞. 半乳糖结合凝集素的结构与功能 [J]. *动物医学进展*, 2003, 24(4): 19221.
- [3] Zenteno R, Vazquez L, Sierra C, et al. Chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *Macrobachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2000, 127: 242-250.
- [4] Kawabata S, Iwanaga S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23: 392-400.
- [5] Medzhitov R, Janeway CA Jr. Inmate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition [J]. *Cell*, 1997, 91: 292-298.
- [6] Luo Tian, Zhang Xiabo, Xu Xun. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon* [J]. *FEBS Letters*, 2003, 551: 532-57.
- [7] Jayasree S. Purification and characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the Prawn *Penaeus indicus* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2001, 77: 237-242.
- [8] 彭其胜, 郭文扬, 王玉平. 中国对虾血淋巴液中的凝集素 [J]. *中国水产科学*, 2001, 7(4): 14-18.
- [9] Okino N, Kawabata S, Saito T, Hirata M, et al. Pur2

- ification characterization and cDNA cloning of a 27 ku lectin(L10)from horseshoe crab hemocytes[J]. J Bio chem, 1995, 270; 31 00&31 015.
- [10] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 2312232.
- [11] Maheswari R, Mullainadhan P, Arumugam M. Iso2 lation and characterization of an acetyl group&2 nizing agglutinin from the serum of Indian White Shrimp Fenneropenaeus indicus [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 402: 6&276.
- [12] Maghil D, Jeya S. Purification and characterization of a sialic acid sepecific lectin from the hemolymph of the freshwater crab Paratelpusa jacquemontii [J]. Eur J Biochem, 2003, 270: 4 34&24 355.
- [13] Vazquez L, Jaramillo L, Lascurain R, et al. Bacter2 al agglutination by the sialic acid specific serum lectin from Macrobrachium rosenbergii [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1996, 113(2): 35&2359.
- [14] Roberto Z, Edgar Z. Identification of lectin isoforms injuvenile freshwater prawns Macrobrachium rosen2 bergii[J]. Glycojugate Journal, 2000, 17: 33&2347.
- [15] Alpuche J, Pereyra A, Agundis C, et al. Purifica2 tion and characterization of a lectin from white shrimp Litopenaeus setiferus hemolymph[J]. Bio2 chim Biophys Acta, 2005, 1 724(12): 86&293.
- [16] Fragkiadakis G. Isolation of lectins from hemolymph of decapod crustaceans by adsorption on formalinized erythrocytes[J]. J Biochem Biophys Methods, 2000, 44: 10&2114.

(本文编辑: 张培新)