

海湾扇贝肝素样多糖分离方法的研究*

王长云 管华诗 林 洪

(青岛海洋大学海洋药物与食品研究所, 青岛 266003)

提要 于1992年1月—1993年2月, 对从海湾扇贝中提取获得的糖胺聚糖(GAG)用乙醇和溴化十六烷基三甲铵(CTAB)分级分离, 并对所得制品用琼脂糖凝胶电泳和高效液相色谱验证, 以研究一种简便、快速的分离提纯方法。结果表明, 扇贝GAG水溶液在乙醇量60%时分离获得的级分, 其GAG-CTAB络合物再用2.0 mol/L NaCl溶液解离得到的主要级分, 琼脂糖凝胶电泳和高效液相色谱均显示出单一区带, 红外光谱类似于肝素的。证明这一提纯过程是一简便、快速的分离提纯方法。

关键词 海湾扇贝 糖胺聚糖 分离提纯

动物中糖胺聚糖(GAG)(或称氨基多糖, 酸性粘多糖等)具有多种生物活性, 已引起医药界的高度重视。对糖胺聚糖性质、结构及其构效关系研究的前提是获得单一组分的纯品。糖胺聚糖是蛋白多糖的糖链部分, 提取时最常用的方法是蛋白酶水解法(樊绘曾, 1983; Kennedy, 1979)。鉴于蛋白酶难以断裂糖肽键及其附近肽键, 提取所得糖胺聚糖可能保留较长肽段或氨基酸残基; 又由于同一组织中可能存在多种蛋白多糖, 每种蛋白多糖中又含不止一种糖胺聚糖, 因此, 除去蛋白质后, 对混合糖胺聚糖的分级分离是提纯的关键。用于糖胺聚糖的分级分离方法很多, 其中, 沉淀法是较常用的方法, 且以乙醇、溴化十六烷基三甲铵(CTAB)或氯化十六烷基吡啶(CPC)作为沉淀剂运用最为广泛(樊绘曾, 1983)。该法特点是可简便、快速地处理大量样品。本文用乙醇和CTAB作为沉淀剂对扇贝糖胺聚糖进行分离提纯, 成功地分离出了肝素样糖胺聚糖, 为探讨一种快速、经济的糖胺聚糖分级分离方法打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 糖胺聚糖制品 海湾扇贝(*Argopecten irradians* Larmarck), 1992年1月采自青岛海洋大学太平角养殖场。取出软体部, 分离去闭壳肌(剩余部分俗称“扇贝边”), 摘去消化盲囊以去油脂和色素。所得部分捣碎匀浆, 用蛋白酶水解法提取糖胺聚糖, 初步纯化后得混合糖胺聚糖制品(王长云等, 1992)。

1.1.2 主要试剂 无水乙醇(C.P.), 丙酮(A.R.), 乙酸钠(A.R.), 氯化钠(A.R.), 溴化十六烷基三甲铵(CTAB)(A.R.), 肝素(Hep)、透明质酸(HA)和6-硫酸软骨素

* 硕士学位论文。王长云, 男, 出生于1965年2月, 硕士, 讲师。

收稿日期: 1994年1月8日, 接受日期: 1995年1月17日。

(CS6) 标准样品。

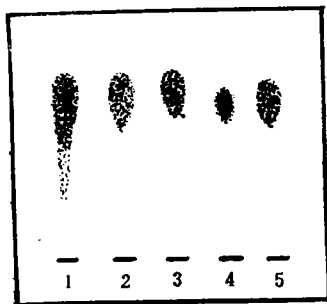


图1 F3-3(1)、F3-3(2) 和肝素 Hep(3)、透明质酸HA(4) 及 6-硫酸软骨素 CS6(5)标准样品的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of fraction F3-3(1), F3-3(2) and standard samples of Hep(3), HA(4) and CS6(5).

收得级分 F3-3-2。最后未解离沉淀再加 2.0 mol/L NaCl 溶液, 同法得级分 F3-3-3。

1.2.2 分析测定方法 用 DYY-III8 型电泳仪, 参照 Carl 等 (1977) 测定琼脂糖凝胶电泳; 用 HITACHI-655 高效液相色谱仪, 参照 Karamonos 等 (1991, 1992), 测定高效液相色谱; 用 10 DX-FTIR 型红外光谱仪, 参照平野茂博等 (1972), 测定红外光谱。

2 结果与讨论

乙醇沉淀法得三个级分 F3-1, F3-2, F3-3, 回收率分别是 1.93%, 28.98%, 69.10% (相对于 F3)。可见, F3-3 为主要级分。其琼脂糖凝胶电泳斑点不集中, 未显单一区带, 表明为非单一组分 (图 1)。其高效液相色谱图中有 3 个峰, 可能代表 3 个组分, 并与混合标准样 Hep-HA-CS6 的洗脱曲线非常相似, 各峰的保留时间 (与洗脱浓度相对应) 也接近 (图 2)。可以认为, 乙醇分级分离所得的 F3-3 含有 Hep, HA 和 CS6 样组分, 且 Hep 样组分含量最高 (峰 3, 峰面积占总峰面积 53.30%, 对应于百分含量)。因此需进一步分级分离。

根据 CTAB 季铵基上的阳离子与糖胺

1.2 方法

1.2.1 分级分离方法

乙醇沉淀法 将初步纯化的糖胺聚糖制品 (用 F3 表示) 溶于蒸馏水, 配成 1% 糖液。在搅拌下缓缓加入乙醇-乙酸钠试剂 (无水乙醇与 5% 乙酸钠混合, 醇量 80%), 使醇量达到 20%, 按醇沉操作法回收多糖 (王长云等, 1992), 得级分 F3-1。清液再加乙醇-乙酸钠试剂, 使醇量依次达到 40% 和 60%, 同上法分别制得 F3-2 和 F3-3。

CTAB 沉淀法 将 F3-3 配成 1% 糖液, 滴加 5% CTAB 溶液, 出现沉淀, 过滤得沉淀 (GAG-CTAB 络合物)。加入 0.3 mol/L NaCl 溶液, 40℃ 下不停搅拌, 解离 24 h, 过滤得解离液和沉淀 (未解离)。向解离液中加入乙醇, 使醇量达 60%, 回收多糖, 得级分 F3-3-1。未解离沉淀继续加 1.0 mol/L NaCl 溶液, 同上法解离、回

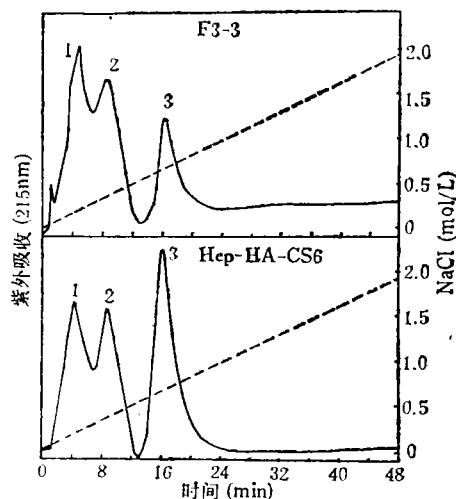


图2 F3-3 和肝素、透明质酸、6-硫酸软骨素混合糖胺聚糖标准样品高效液相色谱

Fig. 2 HPLC of fraction F3-3 and standard mixture of Hep, HA and CS6

——梯度洗脱时 NaCl 浓度 (mol/L)。保留时间和峰面积百分比: F3-3 1. 5.23min, 26.30%; 2. 9.02 min, 19.41%; 3. 17.00min, 53.30%。Hep-HA-CS6 1.透明质酸 (HA), 4.59 min, 21.36%; 2. 6-硫酸软骨素 (CS6), 8.97 min, 20.09%; 3. 肝素 (Hep), 16.44min, 58.52%。

聚糖上的阴离子形成的季铵络合物(聚阴离子盐)极不溶于水,但可在一定浓度的无机盐溶液中解离的特性,用 CTAB 沉淀法对 F3-3 进行进一步分级分离,得到 3 个级分。其中,2.0 mol/L NaCl 解离获得的级分 F3-3-3 回收率为 57.01% (相对于 F3-3),是主要级分。其琼脂糖凝胶电泳斑点清晰集中,基本显示单一区带(图 1);而且其电泳行为类似于肝素,相对迁移率与标准样肝素一致(表 1)。而其高效液相色谱中峰 3 为主要组分,并与标准样肝素保留时间极为接近(图 3 a),可以认为 F3-3-3 主要为肝素样物质,这同琼脂糖凝胶电泳结果相吻合。F3-3-3 的高效液相色谱中仍有两个小峰,表明 F3-3-3 仍含有其它组分,但含量已很微小。对 F3-3-3 进行的红外光谱分析表明,F3-3-3 具有典型的糖胺聚糖红外光谱,并与肝素的红外光谱类似(图 3 b),这一结果与琼脂糖凝胶电泳和高效液相色谱一致。

表 1 琼脂糖凝胶电泳结果

Tab. 1 The results of agarose gel electrophoresis

	F3-3-3	Hep	HA	CS6
R_f	1.50	1.50	1.29	1.42
R_{Hep}	1.00	1.00	0.86	0.95

R_f , 电泳相对迁移率; R_{Hep} 相对于标准样肝素的迁移率。

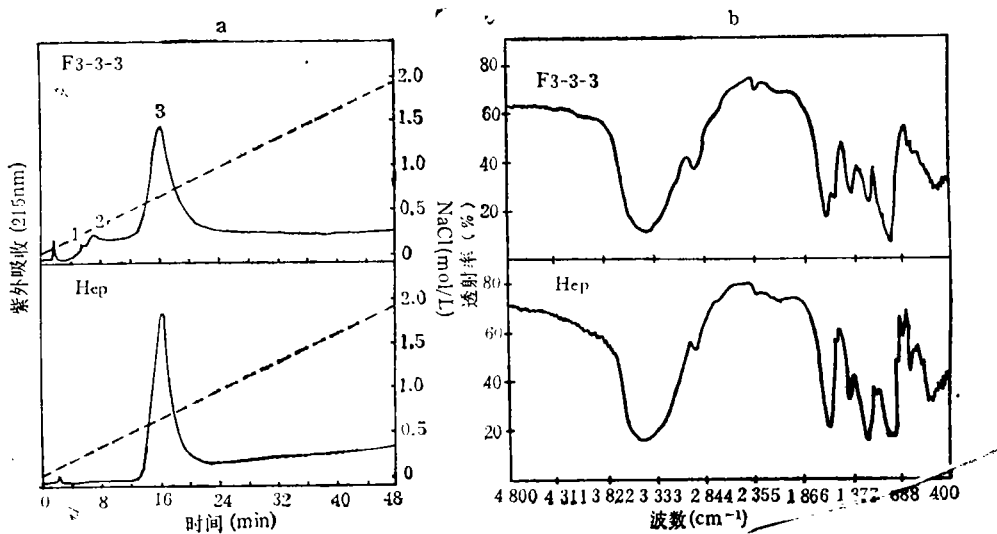


图 3 F3-3-3 和 Hep 高效液相色谱 (a) 及红外光谱 (b)

Fig. 3 HPLC (a) and Infrared spectrometry (b) of fraction F3-3-3 and Hep
——梯度洗脱时 NaCl 浓度(mol/L)。保留时间和峰面积百分比: F3-3-3 1. 5.47min, 0.56%; 2. 7.55min, 5.50%; 3. 16.31min, 93.04%。Hep 16.39min, 99.91%。

Kennedy (1979) 指出,尽管分离方法很多,有些方法已很先进,但尚难将各种糖胺聚糖完全分开。这是因为有许多限制因素,如分子量的分散性、硫酸化程度的不一致性、显微结构的不均匀性、肽或氨基酸残基数量的多变性以及两种硫酸软骨素的结构相似性,所有这些因素使糖胺聚糖出现显著的化学上重叠。况且,在一个特定蛋白多糖分子中,可

能含有一种以上的多糖链,这些多糖链在结构上有局部变化,但总体结构模式相同,因此,很难获得绝对意义上“纯”的大分子样品,而糖胺聚糖的结构也只能通过假设确定。本文用乙醇沉淀和 CTAB 沉淀法分离 F3, 所得 F3-3-3 级分可视为相对纯品, GAG 含量达 98.10%, 其中肝素样物质占 93.04%, 可用于下一步的分析鉴定。

3 结语

本文提出乙醇沉淀和 CTAB 沉淀两次分级分离的方法,对海湾扇贝糖胺聚糖制品 F3 进行处理,得到的 F3-3-3 基本为单一组分,即肝素样多糖,可以用于理化性质和结构研究。这表明该法是处理大量糖胺聚糖样品的有效之法,具有简便、快速的特点,在其它动物糖胺聚糖的制备提纯中值得借鉴。

参 考 文 献

- 王长云、管华诗, 1992, 扇贝边酸性粘多糖的提取, 青岛海洋大学学报, 海洋药物专辑, 71—77。
樊绘曾, 1983, 粘多糖及其提取分离, 海洋药物, 1: 40—55。
平野茂博等, 1972, Δ 多糖, 化学の领域, 增刊 96 号, 127—176。
Carl, P. D. et al., 1977, Identification of acidic mucopoly saccharides by agarose gel electrophoresis, *J. Chromatogr.*, 130: 299—304。
Karamanos, N. K. et al., 1991, Isolation and high-performance liquid chromatographic analysis of Ray (*Raja clavata*) skin glycosaminoglycans, *Comp. Biochem. Physiol.*, B, 100B(4): 827—832。
Karamanos, N. K. et al., 1992, Isolation, characterization and properties of the oversulphated chondroitin sulphate proteoglycan from squid skin with peculiar glycosaminoglycan sulphation pattern, *Eur. J. Biochem.*, 204(2): 553—560。
Kennedy, J. F., 1979, Proteoglycans, Elsevier, Amsterdam. pp. 29—88。

FRACTIONATION OF HEPARINLIKE GLYCOSAMINOGLYCAN FROM BAY SCALLOP *ARGOPECTEN IRRADIANS* LARMARCK

Wang Changyun, Guan Huashi, Lin Hong

(Institute of Marine Drugs and Foods, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

ABSTRACT

Glycosaminoglycans (GAG) isolated from Bay scallop (*Argopecten irradians* Larmarck) was dissolved and fractionated with ethanol. The main fraction obtained by precipitating with 60% ethanol was fractionated further with CTAB. The final fraction was isolated from the GAG-CTAB complex with 2.0 mol/L NaCl. Agarose gel electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC) indicated that the final fraction contained single composition GAG whose infrared spectra showed that it was heparin-like. It is concluded that the process presented in this paper is a simple, convenient, and quick method for fractionation of GAG.

Key words *Argopecten irradians* Larmarck Glycosaminoglycan Fractionation