

云芝糖肽的结构组成分析

邹巧根 王伟 宋喆 相秉仁*

(中国药科大学分析测试中心,南京 210009)

【摘要】目的:对云芝糖肽的结构与组成进行研究。方法:采用还原衍生化气相色谱,紫外、核磁、高碘酸氧化、Smith降解、琼脂糖凝胶电泳等方法。结果:云芝糖肽由葡萄糖、半乳糖、岩藻糖、甘露糖、木糖和鼠李糖组成,具有 α 、 β 型糖苷键,连接方式有(1 \rightarrow 4)、(1 \rightarrow 6)两种,含有结合态蛋白,糖肽键类型初步确定为N-连接。结论:首次对云芝糖肽的化学结构与组成进行了较为细致的研究。

【关键词】云芝糖肽 结构 组成 糖苷键 糖肽键

【中图分类号】 TQ460.7+2;R284.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2004)04-0371-03

云芝又称彩云革盖菌^[1],按照真菌分类,是多孔菌科真菌云芝属云芝(*Coriolus versicolor*(L)Fr.)的子实体,别名杂色云芝。云芝性微甘、寒,能清热、消炎,主治气管炎、肝炎、肿瘤等。云芝糖肽(polystictus proteoglycan, PSP)是从天然产物担子菌纲云芝中提取的一种混合蛋白多糖(Proteoglycan),有文献报道其系由15%蛋白质组成的蛋白多糖体^[2],具有免疫调节作用,临床用于抗肿瘤、抑制动脉硬化、消炎等作用。本文对云芝糖肽的结构和组成进行研究。

1 材料

1.1 仪器

14-A(Shimadzu[®])气相色谱仪;J&W DB-5(30 mm \times 0.25 mm \times 0.25 μ m)气相色谱柱;UV-2100(Shimadzu[®]);YDP20D型电子天平(联邦德国);800型离心沉淀器(上海手术器械厂);DYY-III-5型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);DYY-III 31A型电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.2 试样与试剂

云芝糖肽粗品(糖含量36%,昆山生物化学厂);云芝糖肽精品(糖含量80%,分子筛色谱鉴定为单峰,分子量约为12万,自制);葡萄糖、半乳糖、D-甘露糖(上海试剂二厂分析纯);L-岩藻糖、 α -鼠李糖(Fluka Chemie AG CH-9470 Buchs分析纯);木糖(E. Merck公司分析纯);肌醇(上海化学试剂公

司分析纯);琼脂糖(Agarose)(FMC[®], BioProducts公司);其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 单糖组成分析

2.1.1 方法 将云芝糖肽样品25 mg经水解处理后置于试管中,加入0.05 mol/L的氢氧化钠溶液2 ml使其溶解,后加入硼氢化钠80 mg作为还原剂,肌醇0.5 mg作为内标,在60 $^{\circ}$ C还原1 h。反应完全后加乙酸至无气泡逸出为止,以除去过量的硼氢化钠。用氮气吹干,加入甲醇1 ml并振荡溶解后,用氮气吹干除甲醇,反复5次以除去硼酸根。残渣在含有P₂O₅的真空中干燥6 h。将吡啶-醋酐(1:1)溶液2 ml加入盛有还原糖样的试管中,在100 $^{\circ}$ C温度下反应1 h,室温下用氮气吹干,除去过量的反应试剂,即得到糖醇乙酯衍生物。将该残渣用1 ml氯仿溶解,滤过,收集过滤液,进样1 μ l。将多种标准单糖按照上述方法同样处理,进行气相色谱分析,作为对照。

2.1.2 结果 从云芝糖肽中检测到6种单糖,单糖种类及各组成单糖的摩尔比为葡萄糖-半乳糖-甘露糖-岩藻糖-木糖-鼠李糖(0.544:0.188:0.180:0.062:0.018:0.009)。

2.2 糖苷键类型的确证

2.2.1 方法 综合运用了核磁共振谱和化学方法(高碘酸氧化、Smith降解)对云芝糖肽的糖苷键类

型进行了分析。

2.2.2 高碘酸氧化^[4] 精密称取云芝糖肽样品 50 mg 溶解于 100 ml 浓度为 15 mmol/L 的 NaIO₄ 溶液中 4~20 °C 条件下置于暗处放置, 间或振摇。于 4 8 24 48 h..... 间隔取样, 稀释 200 倍后, 使用紫外分光光度计在 223 nm 处测定吸收值。随着高碘酸被消耗, 吸收值逐渐下降, 直至达到一个稳定值。

2.2.3 Smith 降解 取经高碘酸氧化后的云芝糖肽样品反应液 20 ml, 加乙二醇 2 ml 搅拌 30 min 以还原剩余的高碘酸, 对流水透析 48 h, 蒸馏水透析过夜, 于 40 °C 以下减压浓缩至小体积, 加入硼氢化钠以还原多糖醛, 于室温、暗处搅拌 18~24 h。用 0.1 mol/L 的乙酸调 pH 至 5.5, 以分解剩余的硼氢化钠, 对流水透析 48 h, 蒸馏水透析过夜, 低温干燥获多糖醇。

多糖醇经三氟乙酸于 100 °C 酸解 6 h, 碳酸钡粉末中和, 离心, 取上清液, 浓缩, 气相色谱分析。

2.2.4 结果 ¹H NMR δ 4.5~5.5 区域为多糖部分单糖残基上端基碳的质子信号。δ 值大于 5.0 的几个峰表明多糖中含有 α-糖苷键, δ 值小于 5.0 的几个峰, 且在 4.4~4.5 之间, 表明云芝糖肽中还含有 β-糖苷键。

¹³C NMR δ 值在 103 附近的信号显示多糖有 β-糖苷键, δ 值在 98~101 信号显示多糖有 α-糖苷键。这个结果与气相色谱有关单糖组成的分析结果和氢谱有关糖苷键的分析结果相一致。另外, 在 δ 60~85 有多重峰, 是多糖内单糖残基上 C2-C6 的信号, 由于重叠严重, 难以一一归属^[4]。

云芝糖肽在经高碘酸氧化 6 d 后高碘酸消耗达到最大值, 平均 1 mol 己糖残基约消耗 1.3 mol 高碘酸, 同时有约 0.3 mol 甲酸生成。高碘酸氧化产物经 Smith 降解后的气相色谱结果表明, 云芝糖肽中检测出主要产物为赤藓醇和甘油, 未检测到其它单糖, 可以推知其中可能含有 1→4、1→6 糖苷键, 无 1→3 糖苷键, 但无法确定是否存在 1→2 糖苷键。

因此, 云芝糖肽的糖苷键构型既有 α-型也有 β-型, 并且有 1→4 和 1→6 糖苷键。

2.3 云芝糖肽蛋白结合态的研究

据报道, 有人曾在云芝糖肽中检测到氨基酸, 但未见有对云芝糖肽的蛋白结合状态进行表征。由于结合蛋白的存在对于云芝糖肽的生理活性具有重要意义, 因此我们认为, 采用合理的方法测定

云芝糖肽中是否存在结合态的蛋白, 是我们面临的一项重要工作。

2.3.1 紫外光谱特征 对云芝糖肽水溶液在 200~800 nm 波长范围内扫描。结果显示云芝糖肽在 280 nm 处有一肩峰, 这应该是样品中蛋白的特征吸收。由于紫外扫描的云芝糖肽样品是经过脱蛋白处理的, 除去了非结合的游离蛋白, 此结果说明云芝糖肽中可能含有结合蛋白。

2.3.2 核磁共振特征 从云芝糖肽的 ¹H NMR 图上可以看到化学位移在 δ 1.2~2.5 范围内有一些信号, 这些应为云芝糖肽中部分氨基酸残基上的 CH、CH₂、CH₃ 的质子信号。

¹³C NMR 图中可以看到, 化学位移在 δ 173 有一小峰, 这应该是氨基酸中羰基碳的特征吸收峰, 在 δ 20 左右也有一吸收峰, 应为氨基酸残基中的 CH₃ 和 CH₂ 等碳的信号。以上信息也说明云芝糖肽可能含有结合态蛋白。

2.3.3 琼脂糖凝胶电泳特征 将同一多糖样品在同一块电泳凝胶的不同槽中重复点样, 待电泳结束后将其分开, 一半用甲苯胺蓝多糖染色液染色, 另一半用考马斯亮蓝蛋白染色液染色。若多糖中的蛋白为结合态, 应同时有蛋白和多糖特征染色。

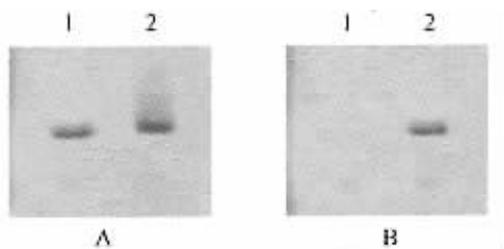


Fig 1. The images of the agarose gel electrophoresis

1. Standard amylose 2. PSP

A :Dyed by CBB G-250 ;B :Dyed by toluidine blue

由电泳图可见, 云芝糖肽样品经电泳后, 分别以多糖染色剂和蛋白染色剂染色, 结果既呈现出多糖显色特征又呈现蛋白显色特征, 而作为对照用的标准多糖样品, 只呈现出多糖的显色特征。由此可以说明, 云芝糖肽中应存在有结合态的蛋白。

2.4 云芝糖肽中蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝显色法对云芝糖肽的蛋白含量进行了测定, 结果表明云芝糖肽中蛋白含量在 6% 左右。

2.5 云芝糖肽的糖肽键的研究^[4 8]

2.5.1 氨基酸组成分析 称取 10 mg 云芝糖肽,

以 2 ml 6.0 mol/L 的盐酸溶液溶解,置安瓿管中,封管,110 ℃水解 24 h,切开封管,抽干后,进行氨基酸分析。

2.5.2 β -消除反应 称取 2 mg 云芝糖肽,溶解于 0.5 ml 的 0.2 mol/L NaOH-1.0 mol/L NaBH₄溶液中,45 ℃反应 24 h,然后取样做氨基酸分析,与酸水解结果比较各氨基酸相对含量的变化。

2.5.3 结果 β -消除反应前后氨基酸分析结果显示,丝氨酸和苏氨酸的相对含量没有明显变化,说明云芝糖肽糖肽键的连接方式不是 O-连接。

3 结果与讨论

单糖组成分析中云芝糖肽水解产物在衍生化之前要先经硼氢化钠还原,否则经气相色谱分析会存在一种糖出现多重峰的现象,不利于组成的分析。云芝糖肽的糖苷键构型既有 α -型也有 β -型,并且有 1 \rightarrow 4 和 1 \rightarrow 6 糖苷键,但不能确定是否有 1 \rightarrow 2 糖苷键。

目前常用的测定蛋白含量的方法有 Lowry 法、紫外吸收法和考马斯亮蓝法等。因为本试验的对象是从真菌中提取的多糖类物质,不可避免地含有大量的还原性物质,如某些单糖、寡糖等。因此,以还原反应定量蛋白质的 Lowry 法就不适用了。云芝多糖溶液的浊度较大,不利于紫外吸收法的测定。考马斯亮蓝 G-250 比色法对云芝糖肽的蛋白质含量进行测定比较适合,测定结果为:云芝糖肽中的蛋白含量在 6% 左右。

氨基酸分析结果显示,云芝糖肽中含有 16 种氨基酸,具体结果为(数字表示每种氨基酸在所有氨基酸残基中的摩尔百分含量):asp 13.53, glu

12.02, ser 7.68, his 1.69, gly 13.42, thr 5.74, arg 2.39, ala 9.68, tyr 0.94, Cys 18.20, val 4.55, met 0.62, phe 1.48, ilu 2.31, leu 3.19, lys 2.57。

β -消除反应:温和条件下的稀碱水解,可把糖肽链上以 O-糖肽键连接的丝氨酸或苏氨酸从相连的单糖或者糖链上水解下来,在硼氢化钠存在下,分别转变为丙氨酸和 α -氨基丁酸。与天冬氨酸相连的 N-糖肽键,不能被稀碱水解下来,所以, β -消除反应在多糖结构分析中,常根据丝氨酸或苏氨酸在稀碱水解前后的含量变化来判断其糖肽键的类型,如果测到的经 β -消除反应后的丝氨酸或苏氨酸相对含量比不经 β -消除反应的含量有所降低,则可以说明其中含有 O-糖肽键。本试验中, β -消除反应前后氨基酸分析结果显示,丝氨酸和苏氨酸的相对含量没有明显变化,说明云芝糖肽糖肽键的连接方式不是 O-连接。

【参考文献】

- [1] 应建浙主编. 中国药用真菌图鉴[M]. 北京:北京科学出版社,1987:116-117.
- [2] Yang QY, Hu YJ, Li XY, et al. PSK international symposium[C]. KongHong 993, Fudan University Press, 1993:56.
- [3] 徐桂云(Xu GY), 陈汝贤(Cheng RX), 常理文(Chang LW), 等. 用毛细管气相色谱法测定多糖中单糖的组成[J]. 分析测试学报(J Instrum Anal) 2000, 19(3):71.
- [4] 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术[M]. 上海:上海科技出版社,1987:150-166.
- [5] 曾麒燕(Zeng QY), 周德义(Zhou DY), 吴耀生(Wu YS), 等. 红桂木凝集素糖蛋白的特征及其糖肽键性质的分析[J]. 广西医科大学学报(Acta Guangxi Med Univ), 1999, 16(3):293-295.
- [6] 田庚元(Tiang GY), 王 晨(Wang C), 冯宇澄(Feng YC), 等. 枸杞子糖蛋白的分离纯化、物化性质及糖肽键特征[J]. 生物化学与生物物理学报(Acta Biochim Biophys Sin), 1995, 27(2):201-205.

Research on the Structure and the Composition of Polystictus Proteoglycan

ZOU Qiao-Gen, WANG Wei, SONG Zhe, XIANG Bing-Ren

(Center of analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

【ABSTRACT】 AIM: To conduct research on the structure and the composition of polystictus proteoglycan (PSP). METHOD: GC, UV, NMR, periodic acid oxidation, Smith degradation, agarose gel electrophoresis have been used. RESULT: The composition and molecular ratio of the monosaccharides have been obtained. The result of analysis in glycosidic linkage of PSP was (1 \rightarrow 4) (1 \rightarrow 6) linking ways and both α -glycosidic linkage and β -glycosidic linkage existed in PSP. Protein was testified in PSP and there was no O-glycopeptide linkage in PSP. CONCLUSION: It was the first time to conduct research on the structure and the composition of PSP.

【KEY WORDS】 Polystictus proteoglycan; Structure; Composition; Glycosidic linkage; Glycopeptide linkage