

松乳菇凝集素分离及其性质的初步研究

焦迎春¹, 游潇倩², 余 梅³, 唐 达⁴

(1. 青海大学 生物科学系, 青海 西宁 810001; 2. 南京农业大学, 江苏 南京 210095;

3. 青海普兰特药业有限公司, 青海 西宁 810007; 4. 博福一益普生(天津)制药有限公司 天津 300384)

摘 要: 将松乳菇菌丝体凝集素(LDL)粗提液与牛、驴及人 O 型血共 3 种红细胞悬液进行凝集反应以检测其凝集活性, 进行糖抑制、温度、pH 值及二价金属离子影响研究。结果表明: 3 种血细胞松乳菇菌丝体凝集素粗提液均能凝集, 其中对牛血细胞凝集活力最强, 为 211; 温度 4~40℃, 松乳菇菌丝体凝集素样品都具有活性, 处于 30℃左右温度时凝集素活力最强; 松乳菇凝集素粗提液对碱的耐受性要比对酸的强; 甘露糖醇对凝集素无抑制作用, 其它 4 种糖(乳糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖)对凝集素均有部分抑制作用; 供试 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对凝集素无抑制作用。

关键词: 松乳菇; 凝集素; 凝集活力

中图分类号: S 646.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)06-0195-04

凝集素(lectin)是一类非免疫起源, 不具有酶活性, 具有糖专一性, 可促使细胞凝集的糖蛋白^[1]。植物、动物、微生物中都有分布^[2], 尤其是大型真菌的子实体、菌丝、菌核、孢子中含量较多^[3]。真菌凝集素具有很强的抗肿瘤活性, 如双孢菇、牛肝菌、口蘑和灰树花凝集素对 HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)有明显的抑制作用^[4]。随着对生物体内细胞癌变、受精、分化及分子识别等生命过程的进一步研究, 凝集素现已广泛应用于化学、生物化学、生物学、细胞学、免疫学及医学等各个领域, 并且在临床医学检验、治疗和工业生产上有着重要的地位^[5]。

松乳菇(*Lactarius deliciosus*)系担子菌亚门伞菌目红乳菇科(*Russulaceae*)乳菇属(*Lactarius*)真菌^[6], 富含多种生理活性物质, 特别是凝集素含量丰富^[7]。但目前对于松乳菇凝集素的研究主要集中在提取分离方面, 未对其进行系统研究。该试验从松乳菇液体培养菌丝体中提取凝集素, 对其进行初步纯化、测定理化性质, 旨在为从液体培养真菌菌丝体中获取凝集素这一新的理论提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种与血液来源 松乳菇菌种由青海大学微生物实验室提供; 牛血和驴血均由青海大学农牧学院提供; 人 O 型血由青海大学医务室提供。

1.1.2 培养基 改良 PDA 液体培养基(1 000 mL)^[8]: 将马铃薯去皮, 切成小块, 称取 200 g, 于 1 000 mL 蒸馏水中煮沸

30 min, 8 层纱布过滤, 收集马铃薯滤液, 加入食用蔗糖 20 g 到滤液中溶解, 蒸馏水补至 1 000 mL, pH 值自然, 121℃高压蒸汽灭菌 20 min。

1.1.3 试剂 采用试剂均为国产分析纯, 肝素由青海大学生物化学实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 松乳菇菌丝体凝集素(LDL)的提取^[9] 由以下公式计算粗提液中的蛋白质含量, 以磷酸缓冲液做空白对照。蛋白质含量(mg/mL) = $1.45A_{280} - 0.74A_{260}$ 。

1.2.2 2%血细胞悬液的制备^[10]。

1.2.3 血凝活力测定^[11]。

1.2.4 温度对凝集素凝集活力的影响 将凝集素粗提液分别在 4、30、40、50、60、70、80、90、100℃下水浴处理 10 min, 迅速冷却至室温, 检测其对血红细胞的凝集活性。

1.2.5 酸碱对凝集素凝集活力的影响^[11]。

1.2.6 糖抑制试验^[9]。

1.2.7 二价金属离子对凝集素凝集活力的影响^[10]。

2 结果与分析

2.1 凝集素的凝集活力测定

松乳菇菌丝体提取液加入硫酸铵沉淀后, 用 2% 驴血细胞悬液检测具有凝集活性。用紫外吸收法测松乳菇菌丝体凝集素粗提液中蛋白质的含量为 0.71 mg/mL。凝集素粗提液血凝活力测定结果表明(表 1, 凝集现象见图 1~6), 松乳菇菌丝体凝集提取液能凝集人 O 型血、牛、驴的红细胞, 其中对牛血红细胞的凝集活力最强, 血凝滴度为 2¹¹; 对驴血红细胞的血凝滴度为 2⁶; 对人血红细胞的凝集活力最弱。

第一作者简介: 焦迎春(1973), 女, 硕士, 副教授, 现从事微生物及微生物工程科研及教学工作。E-mail: jyc_22@163.com。

收稿日期: 2009-12-20

表1 松乳菇菌丝体凝集素提取液的凝集活力

凝集活力	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	210	211
人O型血	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
驴血	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
牛血	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注:“+”有凝集反应,“—”无凝集反应。

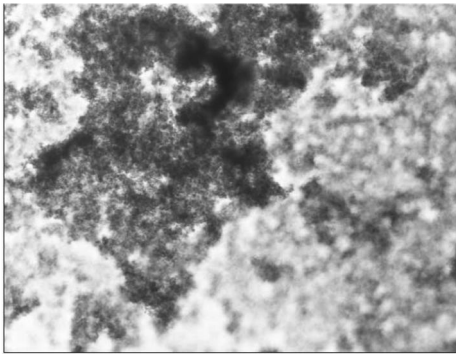


图1 LDL与驴血红细胞的凝集结果(10×40)

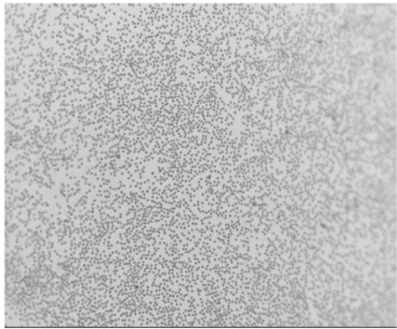


图2 驴血与生理盐水(对照)结果(10×40)



图3 LDL与牛血红细胞的凝集结果(10×40)

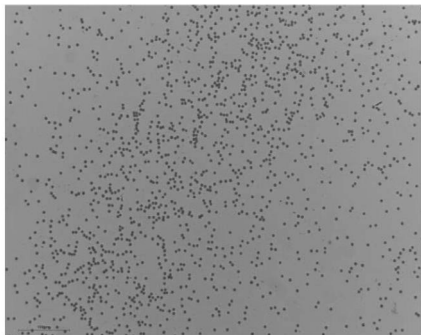


图4 牛血与生理盐水(对照)结果(10×40)

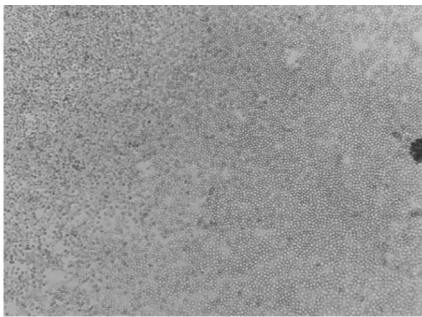


图5 LDL与人O型血红细胞的凝集结果(10×40)

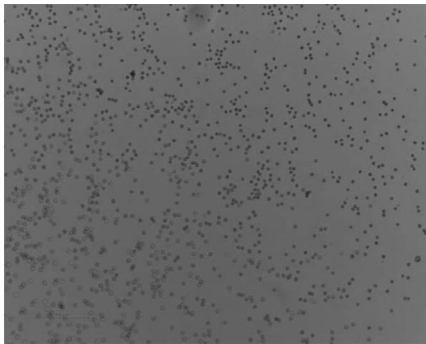


图6 LDL与生理盐水(对照)结果(10×40)

2.2 凝集素热稳定试验测定

由表2可知,松乳菇菌丝体凝集素经过40℃以下处理后,对人O型血、牛血和驴血均具有凝血活性,以30℃处理时凝集活力最高,40℃处理后凝集活力丧失大部分,50℃及以上水浴处理后凝集素活力全部丧失。结果表明,松乳菇菌丝体凝集素对热敏感,热稳定性较低。

表2 温度对松乳菇菌丝体凝集素凝集活性的影响

温度/℃	4	30	40	50	60	70	80	90	100
人O型血	+	+	+	—	—	—	—	—	—
驴血	+	+	+	—	—	—	—	—	—
牛血	+	+	+	—	—	—	—	—	—

注:“+”有凝集反应“—”无凝集反应

2.3 酸碱对凝集素活力的影响

由表3可知,松乳菇菌丝体凝集素经0.05、0.1和0.2 mol/L的HCl溶液处理后,对3种血红细胞无凝集活性;0.025 mol/L HCl溶液处理后,对人O型血和牛血有凝集活性;0.0125 mol/L HCl溶液处理后,对3种血红细胞均有凝集活性。凝集素样品经不同浓度NaOH溶液处理后,对人O型血和牛血有较强的凝集活力;但经0.2和0.1 mol/L NaOH溶液处理后对驴血红细胞丧失了凝集活力。结果表明,松乳菇凝集素对碱有较强的耐受性,对酸表现出的耐受性较差。

2.4 糖对凝集素抑制试验

在人O型血测定糖抑制试验中,500 μg/mL以上浓度的乳糖、125 μg/mL以上的葡萄糖及15.62 μg/mL以

上的蔗糖抑制凝集素的活力; 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下的麦芽糖对凝集素活力无影响; 甘露糖醇对凝集活力无影响; 但在 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乳糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖抑制试验中, 血红细胞出现溶血现象。在驴血测定糖抑制试验中, 只有 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葡萄糖浓度下对凝集素活力有抑制作用, 其它糖浓度对凝集素活力无影响。在牛血测定糖抑制试验中, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下乳糖、葡萄糖、蔗糖及麦芽糖对凝集素活力有抑制作用; 其它糖浓度对凝集素活力无影响。

表3 酸碱对松乳菇菌丝体凝集素凝集活力的影响

浓度 / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	HCl					NaOH				
	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125
人O型血	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
驴血	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+
牛血	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”有凝集反应, “—”无凝集反应

表4 糖对松乳菇菌丝体凝集素活力抑制影响

糖浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		1 000	500	250	125	62.50	31.25	15.62	7.81	3.90
人O型血	乳糖	/	—	+	+	+	+	+	+	+
	葡萄糖	/	—	—	—	+	+	+	+	+
	蔗糖	/	—	—	—	—	—	—	+	+
	麦芽糖	/	+	+	+	+	+	+	+	+
	甘露糖醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+
驴血	乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	葡萄糖	—	+	+	+	+	+	+	+	+
	蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	甘露糖醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+
牛血	乳糖	/	—	+	+	+	+	+	+	+
	葡萄糖	/	—	+	+	+	+	+	+	+
	蔗糖	/	—	+	+	+	+	+	+	+
	麦芽糖	/	—	+	+	+	+	+	+	+
	甘露糖醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”有凝集反应, “—”无凝集反应, “/”有溶血现象

2.5 二价金属离子对凝集活力的影响

由表5可知, 经过 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 处理后的松乳菇菌丝体凝集素样品对人O型血及驴血红细胞都具有凝集活力; 而牛血红细胞出现溶血, 不能测定凝集活力。

表5 金属离子对松乳菇菌丝体凝集素活性的影响

血液类型	金属离子	
	Ca^{2+}	Mg^{2+}
人O型血	+	+
驴血	+	+
牛血	/	/

注: “+”有凝集反应, “—”无凝集反应, “/”有溶血现象

3 结论与讨论

凝集素分子与细胞表面糖分子的专一性结合是细

胞凝集作用的本质所在, 而且不同的凝集素对不同的糖基表现出不同的亲和特异性^[12]。

3.1 血凝活力测定试验

LDL 对牛血红细胞最为敏感, 说明牛血红细胞的表面可能存在较多能与 LDL 结合的糖分子, 但由于供试血红细胞的种类有限, 尚不能得出 LDL 是否具有人血型专一性和动物种属专一性。

3.2 热稳定性试验

LDL 在 50℃时就丧失了全部的凝集活性, 具有热不稳定性, 这与许多已经分离得到的真菌凝集素有较大差异, 其原因可能与供试的松乳菇采自低温生境有关。

3.3 酸碱影响试验

LDL 对碱表现出了极好的耐受性, 即使在最高碱浓度(0.2 mol/L)下也不会丧失凝集活性, 但对酸就很敏感, 这与冯昆^[11]试验结果一致。

3.4 糖抑制试验

除甘露糖醇外, 其余 4 种糖对 LDL 的凝集活性有抑制作用, 而且供试血红细胞不同, 糖的抑制也表现出了不同结果, 这与细胞表面的糖分子和凝集素分子中能与糖结合位点的性质有关。

3.5 二价金属离子影响试验

Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 不影响 LDL 的血凝活力。

参考文献

[1] 孙册. 谈谈凝集素作用的基本原理和糖蛋白的寡糖结构[J]. 生命的化学, 1994, 14(2): 3637-3638.
[2] 吴恩奇, 图力古尔. 蘑菇凝集素及其研究进展[J]. 菌物研究, 2006, 4(4): 69-76.
[3] 王贺祥, 黄荣春, 吴子斌, 等. 蕈菌凝集素[J]. 中国食用菌, 1997(1): 3-4.
[4] 王奎明, 铁涛, 王昌禄. 四种蕈菌凝集素的筛选及活性检测[J]. 氨基酸和生物源, 2007, 29(3): 8-11.
[5] 林玉满, 苏爱华. 长褶竹荪凝集素的分离纯化与部分生化性质[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(2): 261-263.
[6] 计红芳, 杨谦, 宋瑞清. 乳菇属真菌应用研究进展[J]. 林业科技, 2006 31(2): 28-30.
[7] Guillot J, Giollant M, Damez M, et al. Isolation and characterization of a lectin from the mushroom *Lactarius deliciosus* [J]. J. Biochem (Tokyo), 1991, 109(6): 840-845.
[8] 林亲雄, 陈京元. 碳源和氮源对松乳菇菌丝生长的影响[J]. 食用菌学, 2002 9(1): 44-46.
[9] 罗瑞鸿, 李杨瑞. 木豆凝集素的提取及凝血性研究简报[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(3): 262-264.
[10] 周春花, 黎敏, 张华, 等. 三角帆蚌肌肉凝集素及其活性[J]. 南昌大学学报(理科版), 2009, 33(1): 64-76.
[11] 冯昆. 黄绿蜜环菌凝集素的分离纯化、理化性质及其抗肿瘤活性的研究[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2006: 16-17.
[12] 刘庆龙. 肝菌凝集素纯化及其免疫调节活性的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2004: 24-25.

灰离褶伞子实体营养成分测定与评价

李 晓, 张士颖, 李 玉

(食用菌教育部工程研究中心 吉林农业大学 菌物研究所, 吉林 长春 130118)

摘 要: 对野生的灰离褶伞子实体营养成分和营养价值进行分析, 灰离褶伞子实体中粗蛋白、粗纤维、粗脂肪、灰分、多糖含量分别为 33.46%、7.15%、1.49%、5.85%、9.64%。每 100 g 蛋白质中氨基酸总量为 15.1815 g, 必需氨基酸总量 6.1093 g, 非必需氨基酸总量为 9.0722 g, 氨基酸评分、化学评分、必需氨基酸指数分别为 8.26、5.85、76.4, 鲜味氨基酸总量为 6.5539 g/100g, EAA/TAA 为 40.2%, EAA/NEAA 比值 67.3%, 且富含矿质元素和多种维生素。结果表明: 灰离褶伞是一种高蛋白、低脂肪、味道鲜美、营养价值极高的珍稀食用菌, 具有良好开发利用前景。

关键词: 块根蘑; 鸡腿蘑; 氨基酸评分; 鲜味氨基酸

中图分类号: S 646.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)06-0198-04

灰离褶伞 *Lyophyllum cinerascens* (Bull. et Konr.) Konr. & Maubl., 又称块根蘑、鸡腿蘑、毛尖蘑、金沙蘑, 其菌肉肥厚、营养丰富、味道鲜美, 尤其是该蘑菇干制后香味更为独特。灰离褶伞主要生长在黑龙江大小兴安岭区域的废弃 30 a 左右并形成较厚腐殖质已开采过的金矿毛沙风化地带, 也有生长在腐殖质较厚且下面排水较好的林地内, 生长环境相当独特, 是大小兴安岭地区

特有的珍稀菌类, 目前还不能完全商业化栽培。为进一步开发利用这一珍稀野生食用菌, 试验对野生灰离褶伞营养成分作了较为全面的分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灰离褶伞子实体采集于黑龙江伊春新青林业局红林经营所, 自然晾晒, 干燥后粉碎备用。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白质测定 微量凯氏定氮法, 按照 GB/T 5009.5—2003 标准测定。

1.2.2 粗脂肪测定 按 GB/T 5009.6-2003 标准测定。

1.2.3 粗纤维测定 按照 GB/T 5009.10-2003 标准测定。

1.2.4 灰分测定 采用 550℃高温灼烧氧化法, 按

第一作者简介: 李晓(1976-), 男, 博士, 讲师, 现主要从事菌类作物方面研究工作。E-mail: lxmogu@163.com。

通讯作者: 李玉(1944-), 男, 博士, 教授, 现主要从事菌类作物方面研究工作。

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2008BADA1B01-1)。

收稿日期: 2009-12-20

Primary Study on Isolation and Characterization of Lectin from *Laclarius deliciosus*

JIAO Ying-chun¹, YOU Xiao-qian², YU Mei³, TANG Da⁴

(1. Department of Biological Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016; 2. Nanjing Agricultural University, Jiangsu, Nanjing 210095; 3. Qinghai Plateau Pharmaceutical Limited Company, Xining, Qinghai 810007; 4. Beifour-Ipsen(tianjin) Pharmaceutical Limited Company, Tianjin 300384)

Abstract: The lectin was extracted from the mycelium of *Laclarius deliciosus*, which was detected for hemagglutinating activity using human erythrocyte(O type) and animal erythrocytes(cattle and donkey). The experiments whether the factors such as sugar, temperature, pH, divalent metal ions and so on affect hemagglutinating activity of lectin were carried out. The results showed that the lectins of crude extract from *Laclarius deliciosus* were able to agglutinate 3 types of erythrocytes and cattle red blood cell were the most sensitive to lectins. Lectins manifested different tolerance to heat treatment in the range of temperature 4~40℃, while the most hemagglutinating activity at 30℃. The tolerance of lectins for alkali liquor was stronger than that for acid liquor. The hemagglutination to 3 types of erythrocytes was inhibited by lactose, saccharose, dextrose and maltose but D-mannitol. While it was not affected by Ca²⁺, Mg²⁺.

Key words: *Laclarius deliciosus*; lectin; hemagglutinating activity