

相同生长条件下几种枣叶凝集素生物活性分析

韩红艳¹, 冀爱青¹, 吕晨辰¹, 姚伟伟², 李翔³

(1. 晋中学院, 山西 榆次 030600; 2. 四川农业大学, 四川 雅安 611830; 3. 天津师范大学, 天津 300387)

摘要:提取 13 个枣品种叶片中的凝集素, 经硫酸铵沉淀、透析得到蛋白质提取液, 用不同类型的红细胞检测凝集活性(人的 A、B、AB、O 型血), 并通过糖抑制试验比较凝集素的生物活性。结果表明:不同品种枣叶中凝集素活性各不相同;同种凝集素对不同种类的血细胞的凝集作用不同, 如在凝集效价为 2^0 时, 梨枣的枣叶凝集素对 A、B、O、AB 型血细胞分别为中度凝集、高度凝集、中度凝集、轻度凝集;不同凝集素对同一种血细胞的凝集作用也不同:如在凝集效价为 2^0 时, “壶瓶 1 号”对 B 型血细胞为高度凝集, “骏枣”对 B 型血细胞为中度凝集, “壶瓶 6 号”对 B 型血细胞为轻度凝集;糖对凝集素的凝集作用均有抑制, 且抑制作用的强弱与其浓度和分子结构有关, 葡萄糖和果糖的抑制作用较弱, 而麦芽糖和蔗糖的抑制作用则较强。总体来看, “骏枣”和“壶瓶 3 号”的凝集作用最强, “壶瓶 4 号”的凝集作用最弱。

关键词:枣叶;凝集素;血细胞;糖抑制

中图分类号:S 665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)01-0031-04

植物凝集素(Lectin)一词,起源于拉丁语 Legere。它是非免疫起源的,能与糖类结合的一类蛋白质,具有使细胞凝集和使多糖沉淀的特性^[1],广义上是指能凝集红细胞及其它细胞的结合碳水化合物的蛋白质^[2]。随着科学研究手段和技术的发展,人们对凝集素的研究也越来越广泛,通过分离鉴定,对凝集素的分子结构,性质及功能作了大量的研究^[3]。目前成功地用于植物抗病虫害基因工程的植物凝集素基因主要有雪花莲凝集素基因、豌豆外源凝集素基因、麦胚凝集素基因、苋菜凝集素基因及核糖体失活蛋白基因等^[4],一些研究集中于凝集素的生物固氮体系^[5-7]。发掘新的植物凝集素,探索其利用的新途径,已成为国内外生物技术工作者新的竞争焦点。

枣树病虫害种类多、分布广、危害重,是造成枣树产量低,质量差的重要原因,当前严重发生的病虫害主要有枣步曲、枣粘虫、桃小食心虫,食芽象甲、枣疯病、枣锈病等。引起这些病虫害的大多为鳞翅目、同翅目等害虫及真菌和某些细菌,凝集素可以对其进行很好的防治作用。该试验取 13 个枣品种的叶片凝集素,并检测比较其凝集活性,同时进行凝集素的糖抑制试验,为凝集素对枣树病虫害的防治提供参考依据,并为下一步试验做准备。

1 材料与方法

1.1 试验材料

13 种枣叶:“梨枣”、“金昌一号”、“骏枣”、“芒果冬枣”、“壶瓶 1 号”、“壶瓶 2 号”、“壶瓶 3 号”、“壶瓶 4 号”、“壶瓶 5 号”、“壶瓶 6 号”、“壶瓶 7 号”、“壶瓶 8 号”、“京枣 39 号”。人的 A、B、O、AB 型血。

1.2 试验仪器

DS-1 高速组织捣碎机;水浴振荡器(HZS-H 哈尔滨东联电子技术开发有限公司);冷冻离心机(61-206-II 上海安亭科学仪器厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 凝集素的分离与提取 称取枣叶片各 100 g 剪切加入 0.9%生理盐水,组织捣碎机进行匀浆。4℃、4 800 r/min 离心 30 min,取上清液。加硫酸铵(70%饱和度),4℃过夜。4℃、4 800 r/min 离心 35 min 收集沉淀,用 PBS(pH 7.4)溶解,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液在 PBS 中透析过夜,得到粗品溶液。

1.3.2 2%血细胞样品的制备 取 A、B、AB、O 型人血,用 0.9 生理盐水反复洗涤 3~5 次,每次 1 000 r/min,5 min,弃去上清液,配成 2%(v/v)的血细胞悬浮液。

1.3.3 血细胞凝集试验 取 10 个小离心管(进行 1~10 号编号),每管分别加入 25 μ L PBS(pH 7.4),1 号管加入 25 μ L 凝集素样品,混匀取 25 μ L,加入 2 号管,3~10 号管依次进行系列倍比稀释;混匀,每管分别加入 25 μ L 2%血细胞悬液(PBS 作空白对照),室温放置 1 h 后显微镜检测,样品稀释度最高且有凝集现象的管的稀释倍数,为该样品的凝集效价。记录为 2^n (n 为产生凝集

第一作者简介:韩红艳(1976-),女,硕士,讲师,研究方向为园艺植物与细胞生物学。E-mail:hhy0822@126.com。

基金项目:山西省教育厅资助项目(20101128)。

收稿日期:2011-10-17

现象的最大稀释倍数)。

1.3.4 糖抑制试验 试验用4种糖分别为D-果糖(D-Fructose)、D-葡萄糖(D-Glucose)、蔗糖(Sucrose)、麦芽糖(Maltose),每种浓度分别为1、2、3 mg/mL。向小的离心管中加入25 μ L的枣叶凝集素提取液,分别加入不同种类不同浓度的25 μ L糖溶液,放置10 min,再依次加入50 μ L 2%的B型血细胞悬液,振匀。室温下放置1 h后,用显微镜进行检测(与血细胞凝集试验中对应的凝集效价为 2^0 凝集效果进行对比)。

2 结果与分析

2.1 13个枣品种叶片凝集素活力与酯酶同工酶关系

由表1可知,13个枣品种的叶片中提取的粗蛋白对人的4种血细胞在凝集效价为 2^0 时均有凝集作用,均未表现出血型专一性;在凝集效价为 2^0 时,同种凝集素对不同种类的血细胞的凝集活力不同。

表1 枣叶凝集素对不同血细胞凝集效价 2^0 时凝集活力的比较

品种	A型	B型	O型	AB型
“梨枣”	*	***	**	*
“骏枣”	*	**	**	**
“京枣39号”	***	***	***	***
“金昌一号”	*	***	**	***
“芒果冬枣”	*	***	**	**
“壶瓶1号”	***	***	***	**
“壶瓶2号”	*	***	***	***
“壶瓶3号”	***	***	***	***
“壶瓶4号”	*	**	*	***
“壶瓶5号”	*	***	***	**
“壶瓶6号”	*	**	*	*
“壶瓶7号”	*	***	**	**
“壶瓶8号”	***	***	**	*

注:“*”表示细胞凝集个数为20以下,为轻度凝集;“***”表示细胞凝集个数为20~40,为中度凝集;“***”表示细胞凝集个数为41以上,为高度凝集。

2.1.1 枣叶凝集素对A型血细胞的凝集活力 用A型血细胞分别对13种枣叶进行凝集活性检测(表2),其中京枣39号和“壶瓶1号”的枣叶凝集素对A型血细胞的凝集效价可以达到 2^7 ,”壶瓶3号”枣叶凝集素对A型血细胞的凝集效价为 2^6 ,”壶瓶8号”枣叶凝集素对A型血细胞的凝集效价为 2^5 ,”梨枣”、“金昌一号”、“壶瓶2号”、“壶瓶5号”和“壶瓶7号”的枣叶凝集素对A型血细胞的凝集效价为 2^4 ,”壶瓶4号”枣叶凝集素对A型血细胞的凝集效价则为 2^1 ,存在很大的差异。

表2 不同品种枣叶凝集素对A型血细胞凝集活力的检测

种类	2^0	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8
“梨枣”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“骏枣”	+	+	+	-	-	-	-	-	-
“京枣39号”	+	+	+	+	+	+	+	+	-
“金昌一号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“芒果冬枣”	+	+	+	+	-	-	-	-	-
“壶瓶1号”	+	+	+	+	+	+	+	+	-
“壶瓶2号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“壶瓶3号”	+	+	+	+	+	+	+	-	-
“壶瓶4号”	+	+	-	-	-	-	-	-	-
“壶瓶5号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“壶瓶6号”	+	+	+	+	-	-	-	-	-
“壶瓶7号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“壶瓶8号”	+	+	+	+	+	+	-	-	-

注:“+”表示有凝集现象,“-”表示无凝集现象,下同。

2.1.2 枣叶凝集素对B型血细胞的凝集活力 用B型血细胞分别对13种枣叶进行凝集活性检测(表3),其中“京枣39号”、“金昌一号”、“壶瓶3号”和“壶瓶5号”的枣叶凝集素对B型血细胞的凝集效价可以达到 2^7 ,”壶瓶1号”、“壶瓶2号”、“壶瓶7号”和“壶瓶8号”的枣叶凝集素对B型血细胞的凝集效价为 2^6 ,”梨枣”和“芒果冬枣”的枣叶凝集素对B型血细胞的凝集效价为 2^5 ,最低的是“壶瓶6号”枣叶凝集素对B型血细胞的凝集效价则为 2^2 。

表3 不同品种枣叶凝集素对B型血细胞凝集活力的检测

种类	2^0	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8
“梨枣”	+	+	+	+	+	+	-	-	-
“骏枣”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“京枣39号”	+	+	+	+	+	+	+	+	-
“金昌一号”	+	+	+	+	+	+	+	+	-
“芒果冬枣”	+	+	+	+	+	+	-	-	-
“壶瓶1号”	+	+	+	+	+	+	+	-	-
“壶瓶2号”	+	+	+	+	+	+	+	-	-
“壶瓶3号”	+	+	+	+	+	+	+	+	-
“壶瓶4号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“壶瓶5号”	+	+	+	+	+	+	+	+	-
“壶瓶6号”	+	+	+	-	-	-	-	-	-
“壶瓶7号”	+	+	+	+	+	+	+	-	-
“壶瓶8号”	+	+	+	+	+	+	+	-	-

2.1.3 枣叶凝集素对O型血细胞的凝集活力 用O型血细胞分别对13种枣叶进行凝集活性检测(表4),无凝集素的凝集效价达到 2^7 ,”壶瓶3号”的枣叶凝集素对O型血细胞的凝集效价为 2^6 ,”京枣39号”、“壶瓶1号”、

“壶瓶 2 号”和“壶瓶 5 号”的枣叶凝集素对 O 型血细胞的凝集效价为 2^5 , 最低的是“壶瓶 4 号”和“壶瓶 6 号”枣叶凝集素对 O 型血细胞的凝集效价则为 2^2 。

表 4 不同品种枣叶凝集素对 O 型血细胞凝集活力的检测

种类	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸
“梨枣”	+	+	+	+	-	-	-	-	-
“骏枣”	+	+	+	+	-	-	-	-	-
“京枣 39 号”	+	+	+	+	+	+	-	-	-
“金昌一号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“芒果冬枣”	+	+	+	+	-	-	-	-	-
“壶瓶 1 号”	+	+	+	+	+	+	-	-	-
“壶瓶 2 号”	+	+	+	+	+	+	-	-	-
“壶瓶 3 号”	+	+	+	+	+	+	+	-	-
“壶瓶 4 号”	+	+	+	-	-	-	-	-	-
“壶瓶 5 号”	+	+	+	+	+	+	-	-	-
“壶瓶 6 号”	+	+	+	-	-	-	-	-	-
“壶瓶 7 号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“壶瓶 8 号”	+	+	+	+	-	-	-	-	-

2.1.4 枣叶凝集素对 AB 型血细胞的凝集活力 用 AB 型血细胞分别对 13 种枣叶进行凝集活性检测(表 5), 无凝集效价达到 2^7 , “京枣 39 号”和“壶瓶 3 号”的枣叶凝集素对 AB 型血细胞的凝集效价可以达到 2^6 , “金昌一号”、“壶瓶 2 号”和“壶瓶 4 号”的枣叶凝集素对 AB 型血细胞的凝集效价为 2^5 , “壶瓶 5 号”、“壶瓶 7 号”和“壶瓶 8 号”的枣叶凝集素对 AB 型血细胞的凝集效价为 2^4 , 最低的是梨枣和“壶瓶 6 号”枣叶凝集素对 AB 型血细胞的凝集效价则为 2^2 。

表 5 不同品种枣叶凝集素对 AB 型血细胞凝集活力的检测

种类	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸
“梨枣”	+	+	+	-	-	-	-	-	-
“骏枣”	+	+	+	+	-	-	-	-	-
“京枣 39 号”	+	+	+	+	+	+	+	-	-
“金昌一号”	+	+	+	+	+	+	-	-	-
“芒果冬枣”	+	+	+	+	-	-	-	-	-
“壶瓶 1 号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“壶瓶 2 号”	+	+	+	+	+	+	-	-	-
“壶瓶 3 号”	+	+	+	+	+	+	+	-	-
“壶瓶 4 号”	+	+	+	+	+	+	-	-	-
“壶瓶 5 号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“壶瓶 6 号”	+	+	+	-	-	-	-	-	-
“壶瓶 7 号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-
“壶瓶 8 号”	+	+	+	+	+	-	-	-	-

2.2 13 种枣叶凝集素的糖抑制作用

用 4 种糖对 13 种枣叶凝集素进行抑制试验, 并将得到的结果分别与血细胞凝集试验中对应凝集素对血细胞的凝集效价为 2^0 的结果进行比较(表 6), 发现 4 种糖对 13 种枣叶凝集素均有抑制作用, 其中葡萄糖和果糖对凝集素的抑制作用较弱, 而麦芽糖和蔗糖的抑制作用则较强: 在 4 种糖的浓度为 1 mg/mL 时, 葡萄糖和果糖基只对“壶瓶 1 号”和“壶瓶 4 号”枣叶凝集素有轻微抑制作用, 麦芽糖和蔗糖除对“金昌一号”、“芒果冬枣”、“壶瓶 2 号”、“壶瓶 3 号”和“壶瓶 4 号”无抑制作用外, 对其它枣叶凝集素出现轻微抑制作用。在浓度为 2 mg/mL 时, 葡萄糖对“梨枣”、“芒果冬枣”、“壶瓶 1 号”、“壶瓶 3 号”、“壶瓶 5 号”、“壶瓶 6 号”和“壶瓶 8 号”的枣叶凝集素出现抑制作用, 麦芽糖和蔗糖对“京枣 39 号”和“壶瓶 2 号”没有抑制作用; 同一种糖浓度越大对同种凝集素的抑制作用越强: 如蔗糖浓度为 1 mg/mL 时“梨枣”的枣叶凝集素无抑制作用, 浓度为 2 mg/mL 对“梨枣”的枣叶凝集素有轻微抑制作用, 浓度为 3 mg/mL 对“梨枣”的枣叶凝集素抑制作用明显。

表 6 不同浓度糖类对凝集素与 B 型血细胞凝集作用的抑制

品种	葡萄糖 /mg · L ⁻¹			果糖 /mg · L ⁻¹			麦芽糖 /mg · L ⁻¹			蔗糖 /mg · L ⁻¹		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
“梨枣”	-	+	++	-	-	+	+	+	++	-	+	++
“骏枣”	-	-	+	-	+	++	-	+	++	+	+	++
“京枣 39 号”	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
“金昌一号”	-	-	+	-	-	+	-	+	++	-	+	+
“芒果冬枣”	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	++
“壶瓶 1 号”	+	+	++	-	+	+	+	+	++	+	+	++
“壶瓶 2 号”	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
“壶瓶 3 号”	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	++
“壶瓶 4 号”	-	-	+	+	+	++	-	+	++	-	+	+
“壶瓶 5 号”	-	+	++	-	+	++	+	+	++	-	+	+
“壶瓶 6 号”	-	+	+	-	+	+	-	+	++	+	+	++
“壶瓶 7 号”	-	-	+	-	+	++	-	+	++	+	+	++
“壶瓶 8 号”	-	+	++	-	+	++	+	+	+	-	+	++

注: “-”表示无抑制作用, “+”表示有轻微的抑制作用, “++”表示有明显的抑制作用。

3 讨论

3.1 血型与凝集素凝集活力的关系

13 个枣品种的叶片中提取的粗蛋白对人的 4 种血细胞在凝集效价为 2^0 时均有凝集作用; 在凝集效价为 2^0 时, 同种凝集素对不同种类的血细胞的凝集活力不同, 这是由于不同类型的红细胞, 其表面结构有一定的

差异,比如细胞表面能与植物凝集素结合的位点的数量或细胞膜的流体化状态等。所以植物凝集素对红细胞的凝集作用也具有一定的选择性,或者有凝集效果的强弱之分^[8]。不同凝集素对同一种血细胞的凝集作用不同,该试验中不同凝集素对同一种血细胞的凝集作用不同的结论与前人在其它材料的研究结果一致^[9],这与其凝集素的含量不同及其含有的凝集素种类、性质和糖结合位点不同有关。

3.2 13种枣叶中糖对凝集素的抑制作用

凝集素能与细胞表面的糖相结合从而使血细胞凝集,对其产生抑制作用的糖被认为结构互补于凝集素结合部位。大多数凝集素对寡糖具有更高的亲和力。与寡糖相比,尤其是更为复杂的寡糖相比,单糖或双糖需更高的浓度才能对凝集素抑制。这是因为凝集素的糖结合位点与寡糖或复杂寡糖更为互补的缘故^[10]。该试验中4种糖对13种枣叶凝集素均有抑制作用,且葡萄糖和果糖对凝集素的抑制作用较弱,这与前人的研究结果一致,而麦芽糖和蔗糖的抑制作用则较强,试验中在4种糖的浓度都为2 mg/mL时,葡萄糖和果糖对个别凝集素出现抑制作用,麦芽糖和蔗糖对各种基本都有抑制

作用;同一种糖浓度越大对同种凝集素的抑制作用越强。

参考文献

- [1] Sharon N, Lis H. Lectins[A]. London:Chapman and Hall,1989:1-2.
- [2] 王志斌,张秀梅,郭三堆.在转基因植物中利用植物凝集素防治害虫的研究[J].植物学通报,2000(2):15-19.
- [3] 郭明雄.从生物大分子结构特征解析植物凝集素的多样性[J].武汉植物学研究,2003(2):24-29.
- [4] 潘科,黄炳球,侯学文.植物凝集素在病虫害防治中的研究进展[J].植物保护,2002,28(4):42-44.
- [5] 熊维全,万群.植物凝集素及其在生物固氮中的作用[J].热带农业科技,2005,28(2):21-26.
- [6] 舒晓燕,阮期平,侯大斌.植物凝集素的研究进展[J].现代中药研究实践,2006,20(6):53-56.
- [7] 侯学文,黄剑威.植物凝集素及其在抗病虫害分子育种中的应用[J].植物生理学通讯,2006,42(6):1217-1223.
- [8] 郭春生,于蕾妍,葛蔚.芸豆植物凝集素的提取及血凝效果研究[J].中国兽药杂志,2008,42(1):49-50.
- [9] 王庆忠,张鹭,吴耘红,等.14种蔬菜中凝集素的提取和生物活性研究[J].中国热带医学,2008(5):749-752.
- [10] 高莹,瞿礼嘉,陈章良.植物凝集素的分子生物学研究[J].生物技术通报,2000(5):18-22.

The Study of Several Dates Varieties Lectin in Leaf for Blood Coagulation Effect

HAN Hong-yan¹, JI Ai-qing¹, LV Chen-chen¹, YAO Wei-wei², LI Xiang³

(1. Jinzhong University, Yuci, Shanxi 030600; 2. Sichuan Agriculture University, Ya'an, Sichuan 611830; 3. Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract: 13 dates Lectin of leaves extracted by ammonium sulfate precipitation, dialysis, got protein extracted fluid, which impacted different types of red blood cells detection agglutinate activity (people type A, type B, type AB, type O blood), and through the sugar suppression test, compared the biological activity of Lectin. The results showed that Lectin in different varieties dates had different activity; Same Lectin to different kinds of blood cells had different effect; As for the aggregation titer 2⁰, date leaf Lectin of 'Li Dates' to type A, type B, type O, AB blood cells separately for moderate aggregation, highly agglutinate, moderate agglutinate, mild aggregation; Different kind of Lectin to same kind of blood cells had different aggregation function; As for the aggregation titer 2⁰, 'HuPing Date 1' to type B cells for height of aggregation, 'Jun Dates' to type B cells for moderate aggregation, 'HuPing 6' to type B cells for mild aggregation; Sugar to the aggregation function of Lectin were restrained, and inhibiting effect was concerned with its concentration and molecular structure, the inhibition of glucose and fructose were relatively weak, but the inhibition of maltose and sucrose was stronger. In a word, 'Jun Dates' and 'HuPing 6' had the strongest aggregation function, HuPing 4 had the weakest aggregation function.

Key words: Date leaves; Lectin; blood cells; sugar suppression