

乌贼墨糖胺聚糖的制备与理化性质研究

李孝东¹, 王凤山^{1*}, 宋允胜², 曹吉超¹, 徐斌¹

(1. 山东大学药学院 生化与生物技术药物研究所, 山东 济南 250012;

2. 山东黄河医院, 山东 济南 250032)

摘要: 本实验采用胰蛋白酶、链霉蛋白酶两次酶解, 乙醇沉淀和 DEAE-纤维素离子交换柱分离, 从新鲜无针乌贼(*Sepiella maindroni* de Rochebrune)墨中提取得到乌贼墨糖胺聚糖(GAG); 经醋酸纤维素薄膜电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳证明乌贼墨 GAG 为均一性多糖; 紫外扫描无蛋白质的特征吸收峰; 红外光谱分析, 样品具有典型的 GAG 吸收峰; 对该 GAG 酸水解产物的薄层色谱、纸色谱研究表明该 GAG 主要由氨基半乳糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖 3 种单糖组成, 含量分别为 25.6%、29.2%、23.3%; 硫酸根和蛋白质含量分别为 8.2%、3.5%。

关键词: 乌贼墨; 糖胺聚糖; 制备; 理化性质

中图分类号: Q959.216⁺.106 文献标识码: A 文章编号: 1002-3461(2004)04-0024-04

Study on the preparation and properties of glycosaminoglycans from the ink of *Sepiella maindroni* de Rochebrune

LI Xiao-dong, WANG Feng-shan, SONG Yun-sheng, *et al.*

(Institute of Biochemical and Biotechnological Drug, School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: One kind of glycosaminoglycans (GAG) was extracted and purified from the ink of *Sepiella maindroni* de Rochebrune by using the procedures of trypsin and pronase digestion, ethanol precipitation and DEAE-cellulose ion-exchange chromatography. It was proved to be homogeneous by polyacrylamide gel and cellulose acetate membrane electrophoresis. No protein absorption was shown in UV spectrum, but typical absorption of GAG was shown in the IR spectrum. It was identified by paper and thin layer chromatography of the acid hydrolyzate that the GAG was composed of galactosamine, glucuronic acid and fucose. The percentage content of galactosamine, glucuronic acid, fucose, sulfate and protein in the GAG was 25.6%, 29.2%, 23.3%, 8.2% and 3.5%, respectively.

Keywords: ink of *Sepiella maindroni* de Rochebrune; glycosaminoglycans; preparation; physical and chemical properties

乌贼墨是储存于乌贼墨囊内腔中、当乌贼遇到天敌时喷出的一种防身物质, 可影响或麻痹入侵者的视觉与嗅觉。乌贼墨是由肉眼看不见的黑色颗粒构成的黏稠的混悬液,

每 1 mL 中含颗粒 200 mg, 即 20%, 其主要化学成分为黑色素和蛋白多糖的复合体。黑色素是吲哚醌的聚合物, 与蛋白质结合或不结合。鲜乌贼墨中含有水分、色素、蛋白质、

* 通讯作者; E-mail: fswang@sdu.edu.cn Tel: 0531-6652375

脂肪、糖类物质,比例为 75:15.5:6.3:3.0:0.2。乌贼墨作为药物最早应用于止血,《本草拾遗》中有“治血刺心痛”的记载。现代临床应用证明它是一种良好的全身性止血药,对妇科、外科、内科等多种出血止血效果显著^[1]。20 世纪 90 年代,日本青森产业技术中心和弘前大学发现乌贼墨具有抗肿瘤作用,并从中提取得到一种高效抗癌活性成分多糖-蛋白复合物,其多糖部分主要由等摩尔比例的葡糖醛酸(GlcA)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)和岩藻糖(Fuc)构成的一种全新结构的糖胺聚糖(GAG)^[2,3]。

GAG 是相应蛋白聚糖整体分子结构中的“含糖片段”,通过共价键与蛋白聚糖的核心蛋白连接,因其具有抗凝血、抗肿瘤、抗病毒、降血脂、增强免疫等生理作用,已成为研究较多的一类生物高分子。我们采用蛋白酶水解、乙醇沉淀和 DEAE-纤维素离子交换柱分离的方法从乌贼墨中提取得到了一种 GAG,并对其理化性质进行了初步研究,为开发新的 GAG 资源提供科学依据。

1 材料和仪器

1.1 材料

新鲜乌贼墨,购于山东日照沿海,乌贼经山东大学药学院生药学研究所鉴定为曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni* de Roche-brune);胰蛋白酶(1:250)(上海源聚生物科技有限公司);链霉蛋白酶(Merck);DEAE-纤维素(Feinbiochemica Heidelberg);L(-)-岩藻糖(Fluka);葡萄糖醛酸(Sigma);D(+)-盐酸氨基半乳糖(Acros Organics);D(+)-盐酸氨基葡萄糖(上海试剂二厂);Sephadex G-25(Pharmacia);醋酸纤维素薄膜(2cm×8cm)(杭州四季青生物工程材料有限公司);牛血清白蛋白(上海长阳生化制药厂);硅胶 G(青岛高能达化工有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

LKB 层析系统(瑞典);DYY-12 型电脑三恒多用电泳仪(北京六一仪器厂);LGJ 0.5 冷冻干燥机(军事医学科学院实验仪器厂);Unico™UV-2102PC 型紫外分光光度计(优尼柯上海仪器有限公司);TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);PH211 台式微电脑酸碱度和温度测量计(意大利哈纳公司);Nexus 470 FT-IR 光谱仪, Nicolet。

2 方法

2.1 乌贼墨 GAG 提取

2.1.1 粗乌贼墨 GAG 的制备

取新鲜乌贼墨 500 g,加适量蒸馏水,用 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调 pH 值为 8,加入适量胰蛋白酶,40~45℃ 恒温搅拌 8 h,然后升温到 90℃,保持 10 min,冷却后 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,取上清液。上清液加入 4 倍量无水乙醇,离心,取沉淀。将沉淀物用适量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液溶解,调 pH 至 7.5,加入适量链霉蛋白酶,37℃ 恒温搅拌 24 h。酶解液加入等体积的氯仿,激烈振荡 5 min,静置分层。水相加入 4 倍量无水乙醇,离心,取沉淀。沉淀物用无水乙醇脱水 2 次,50℃ 真空干燥,即得淡黄色粗乌贼墨 GAG 1.37 g。

2.1.2 乌贼墨 GAG 的分离与纯化

将处理好的 DEAE-纤维素装柱(2.6cm×36cm),用蒸馏水平衡 5 个柱体积;称取粗乌贼墨 GAG 50 mg 以蒸馏水 10 mL 溶解,上柱,于 $\lambda_{206\text{nm}}$ 进行紫外检测。先以蒸馏水洗脱,流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,洗脱至无糖,再以 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液洗脱,收集洗脱峰,冷冻干燥。将冷冻干燥物用蒸馏水溶解,上 Sephadex G-25 柱脱盐,冷冻干燥,得到乌贼墨 GAG 纯品 30 mg。

2.2 纯度鉴定

2.2.1 醋酸纤维素薄膜电泳

参照 Wessler 法^[4],以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸为电泳液,电压 30 V,电流 3 mA,电泳时

间 160 min。0.2% 阿利辛蓝染色, 2% 醋酸洗脱。以硫酸软骨素(CS)作对照。

2.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

聚丙烯酰胺凝胶浓度为 15%; 以 Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.3)为电泳液; 浓缩胶: 电压 100 V, 电流 8 mA, 电泳 60 min; 分离胶: 电压 260 V, 电流 18 mA, 电泳 105 min。电泳完后, 以 0.2% 阿利辛蓝染色 1 h, 以 2% 醋酸洗脱。

2.3 光谱鉴定

2.3.1 紫外吸收光谱

将 GAG 配成 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 在 190~400 nm 范围内进行紫外扫描。

2.3.2 红外吸收光谱

采用衰减全反射测定法(ATR), 在 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 范围内进行红外光谱扫描。

2.4 薄层色谱、纸色谱鉴别乌贼墨 GAG 的单糖组成

样品完全水解: 取 GAG 5 mg, 以 2 mL 水溶解, 再加入 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 2 mL, 封口, 100°C 水浴加热 10 h, 水解液加适量碳酸钡中和, 离心, 取上清液进行薄层色谱和纸色谱。

将硅胶 G 悬浮于 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液制作硅胶板($10\text{cm} \times 20\text{cm}$), 以醋酸乙酯: 吡啶: 水: 醋酸(5: 5: 3: 1)为展开剂进行薄层色谱, 上行展开 210 min。以正丁醇: 吡啶: $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸(5: 3: 2)为展开剂, 采用新华中速层析滤纸进行纸色谱, 上行展开 7 h。均以葡萄糖、半乳糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖、岩藻糖、葡萄糖醛酸作对照, 苯胺-二苯胺显色。

2.5 乌贼墨 GAG 化学成分的测定

蛋白质含量测定, 参照 Lowry 改良的 Folin-酚法^[6]。氨基半乳糖的含量测定, 参照 Elson-Morgan 法测定^[6]。葡萄糖醛酸的含量测定, 参照 Bitter-Muir 的呋唑法^[7]。岩藻糖的含量测定, 参照 Dische 法^[8]。硫酸基含量测定, 参照 Terho 法^[9]。

3 结果

3.1 产品收率

粗乌贼墨 GAG 收率为乌贼墨湿重的 2.7%, 纯品收率为粗品干重的 62%, 总收率为湿重的 1.7%。

3.2 性状与显色反应

乌贼墨 GAG 为白色絮状物, 无臭, 无味, 有引湿性, 易溶于水, 不溶于氯仿、乙醇、丙酮等有机溶剂, 溶液成黏稠状。硫酸-萘酚、硫酸-苯酚、硫酸-呋唑、盐酸半胱氨酸、Ehrlich 试剂反应均为阳性; 菲林试验、碘-碘化钾反应呈阴性。

3.3 电泳性质

在电泳过程中 GAG 均向阳极移动。醋酸纤维素薄膜电泳呈单一区带, 区带集中, 无拖尾, 见图 1。PAGE 亦显示一均匀区带。表明 GAG 为均一组分的酸性多糖。



图 1 乌贼墨 GAG 醋酸纤维素薄膜电泳图谱

3.4 光谱分析

紫外吸收光谱见图 2。 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 GAG 水溶液在 204 nm 有强的多糖吸收峰, 260 nm、280 nm 附近曲线平坦, 几乎无蛋白质吸收。 $A_{204} = 1.876747$, $A_{260} = 0.05382$, $A_{280} = 0.040241$, $A_{280}/A_{260} = 0.75$ 。说明样品中蛋白质含量很低。

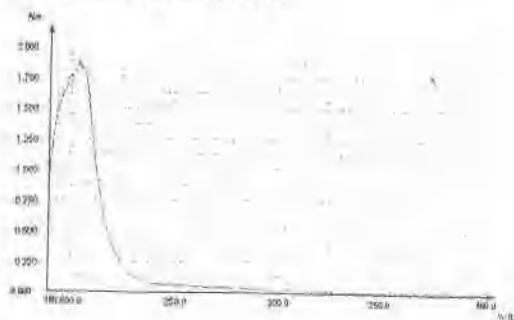


图 2 乌贼墨 GAG 的紫外吸收光谱

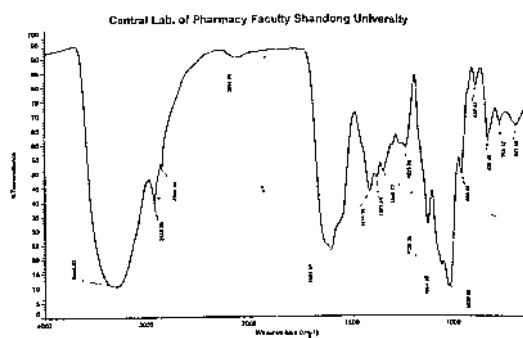


图3 乌贼墨 GAG 的红外吸收光谱

红外吸收光谱见图3。该图表明样品具有典型的GAG红外吸收特征。 3303 cm^{-1} 有强烈的O-H和N-H伸缩振动的特征吸收带,表明存在着多羟基结构; 2918 cm^{-1} 、 2850 cm^{-1} 是糖类C-H伸缩振动吸收峰; $1400\text{ cm}^{-1}\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 的一些峰是C-H变角振动;以上可判断该物质为多糖类化合物。 1630 cm^{-1} (肩峰)、 1058 cm^{-1} 及 1560 cm^{-1} 为C=O和C=N伸缩振动及N-H弯曲振动,表明存在着乙酰氨基结构; 1411 cm^{-1} 、 1345 cm^{-1} 、 1377 cm^{-1} 为羧基C=O伸缩振动和O-H弯曲振动耦合产生的3个峰,表明存在着糖醛酸上解离羧基结构和多糖羟基结构; 1125 cm^{-1} 为吡喃环羟基上C-O伸缩振动; 1058 、 1020 为糖环C-O-C伸缩振动引起的; 1235 cm^{-1} (弱)为S=O伸缩振动, 887 cm^{-1} (弱)为C-O-S伸缩振动(轴向配位), 828 cm^{-1} 为C-O-S伸缩振动(赤道配位);以上3峰证明含有硫酸基。 $830\text{ cm}^{-1}\sim 850\text{ cm}^{-1}$ 处有吸收,而在 900 cm^{-1} 处无吸收,提示糖苷键为 α 构型的可能。

3.5 乌贼墨 GAG 单糖的组成

样品完全水解后薄层色谱和纸色谱仅检出葡萄糖醛酸、氨基半乳糖、岩藻糖,说明乌贼墨GAG主要由这3种单糖组成。乌贼墨GAG组成成分定量分析结果见表1。由表1可知,该多糖是由等摩尔比例的葡萄糖醛酸、氨基半乳糖和岩藻糖构成。

表1 乌贼墨 GAG 各组分含量

组分	氨基半乳糖	葡萄糖醛酸	岩藻糖	硫酸根	蛋白质
百分含量 (%)	25.6	29.2	23.3	8.2	3.5
摩尔比	1	1.06	1	0.60	

4 讨论

制备GAG需降解蛋白聚糖中的蛋白质,使与之结合的GAG得以释放,目前常用的是蛋白酶水解和碱水解。碱可破坏糖链的结构,故在本实验中采用了蛋白酶水解法。我们在研究中发现,单用胰蛋白酶,所得粗GAG中蛋白质含量仍高达14%左右,所以采用2种酶酶解。胰蛋白酶对肽键专一性高,链霉蛋白酶对肽键专一性低,作用谱广,二者作用方式不同,因而二者合并使用,可使水解反应进行完全。通过紫外扫描及蛋白质含量测定可知,本实验酶解反应进行得较完全。

本研究采用胰蛋白酶、链霉蛋白酶经过2次酶解,以氯仿等除去提取液中的蛋白质,乙醇沉淀得乌贼墨GAG粗品,粗品经DEAE-纤维素离子交换柱分离,以Sephadex G-25脱盐,冷冻干燥制备GAG纯品。通过对其理化性质初步研究表明,该GAG为一均一性酸性多糖;结合红外吸收光谱的分析,可推测该GAG主要是由等摩尔比的GlcA、GalNAc和Fuc组成,其单糖组成及摩尔比例与文献^[3]报道中多糖-蛋白复合体的多糖部分一致。

乌贼墨是乌贼加工过程中的废弃物,虽然近年来国内外对乌贼墨进行了一系列研究和开发,但目前主要是作为一种保健食品。通过本实验GAG的研究,以期进一步探讨乌贼墨的药用价值,为更好地开发和综合利用乌贼墨这种海洋生物资源提供依据。对于乌贼墨GAG生物学活性,尚有待进一步研究。

(下转第23页)