

海蜇糖蛋白的 特性及免疫活性

任国艳 著



中国原子能出版社
China Atomic Energy Press

HAIZHE TANGDANBAI DE
TEXING JI MIANYIHUOXING

海蜇糖蛋白的 特性及免疫活性

任国艳 著



中国原子能出版社
China Atomic Energy Press

图书在版编目(CIP)数据

海蜇糖蛋白的特性及免疫活性/任国艳著. --北京:
中国原子能出版社, 2017. 9
ISBN 978-7-5022-8516-6

I. ①海… II. ①任… III. ①海蜇—糖蛋白—研
究 IV. ①Q959.132

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 237046 号

海蜇糖蛋白的特性及免疫活性

出 版 中国原子能出版社(北京市海淀区阜成路 43 号 100048)
责任编辑 蒋焱兰 邮箱:ylj44@126.com QQ:419148731
特约编辑 曾 仙 肖 萍
印 刷 河南承创印务有限公司
经 销 全国新华书店
开 本 710mm×1010mm 1/16
印 张 10.5
字 数 210 千字
版 次 2017 年 9 月第 1 版 2017 年 9 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-5022-8516-6
定 价 35.00 元

出版社网址:<http://www.aep.com.cn> E-mail:atomep123@126.com

发行电话:010—68452845 版权所有 侵权必究

目 录

CONTENTS

第一章 海蜇及糖蛋白的研究进展	001
第一节 海蜇的研究进展	003
一、海蜇的概述	003
二、海蜇的营养和药用价值	004
三、海蜇生物活性研究进展	005
第二节 糖蛋白的研究进展	006
一、糖蛋白的概述	006
二、糖蛋白的分析方法	007
三、糖蛋白生物活性的研究进展	016
参考文献	023
第二章 海蜇糖蛋白的提取	029
第一节 材料与方法	031
一、原料	031
二、试验方法	031
第二节 试验结果与分析	033
一、总蛋白标准曲线的绘制	033
二、总糖标准曲线的绘制	034
三、NaCl 溶液提取糖蛋白单因素试验结果	034
四、NaCl 溶液提取糖蛋白响应面优化试验结果	038
五、磷酸盐缓冲液提取海蜇糖蛋白的单因素试验结果	043
六、磷酸盐缓冲液提取海蜇糖蛋白的响应面优化试验结果	046
七、磷酸盐缓冲液提取海蜇糖蛋白工艺条件的确定和验证试验	049
第三节 讨论	049
第四节 小结	050
参考文献	051

第三章 海蜇糖蛋白的分离纯化	053
第一节 材料与试剂	055
一、试验材料	055
二、试验试剂	055
三、试验仪器及设备	056
四、试验方法与步骤	057
第二节 结果与分析	059
一、氯化钠提取糖蛋白分离纯化	059
二、磷酸盐缓冲液提取的糖蛋白分离纯化	061
三、高效液相结果与分析	063
四、糖蛋白 SDS-PAGE 电泳试验结果	064
第三节 讨论	066
第四节 小结	069
参考文献	070
第四章 海蜇糖蛋白的理化性质及结构特点	075
第一节 试验材料与试剂	077
一、试验材料	077
二、试验试剂	077
三、试验仪器及设备	078
四、试验方法	078
五、糖蛋白结构特点分析	080
第二节 结果与分析	081
一、海蜇糖蛋白的基本化学组成	081
二、海蜇糖蛋白的热稳定性	082
三、糖蛋白氨基酸组成	084
四、糖蛋白单糖组成	086
五、糖蛋白糖肽键特征分析	087
六、糖蛋白红外光谱分析	089
七、质谱检测结果与分析	090
第三节 讨论	092
第四节 小结	095
参考文献	097
第五章 海蜇糖蛋白体外免疫活性	103
第一节 材料与设备	105
一、试验材料	105

二、试验试剂	105
三、试验设备	106
四、试验方法	107
第二节 结果与分析	116
一、各组分在不同培养时间对小鼠脾淋巴细胞增殖活性的影响	116
二、各组分在不同培养时间对小鼠脾淋巴细胞转化活性的影响	117
三、不同浓度糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞增殖活性的影响	117
四、不同浓度糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞转化试验的影响	118
五、海蜇糖蛋白对细胞因子的影响	119
第三节 讨论	124
第四节 小结	126
参考文献	127
第六章 海蜇糖蛋白的体内免疫活性	131
第一节 试验材料与方法	133
一、试验材料	133
二、试验试剂	133
三、试验设备	135
四、试验方法	136
第二节 试验结果与分析	140
一、一般观察	140
二、海蜇糖蛋白对小鼠脾指数和胸腺指数的影响	141
三、海蜇糖蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响	141
四、海蜇糖蛋白对小鼠迟发型变态反应的影响	142
五、海蜇糖蛋白对小鼠血清溶血素的影响(HC ₅₀)	143
六、海蜇糖蛋白抗体形成细胞数测定(PFC)	144
七、海蜇糖蛋白对小鼠脾脏细胞活性的影响	144
八、海蜇糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞细胞因子的影响	149
第三节 讨论	153
第四节 小结	156
参考文献	158
缩略语词汇表	161

第一章

海蜇及糖蛋白的研究进展

第一节 海蜇的研究进展

一、海蜇的概述

海蜇(*Rhopilema esculentum* Kishinouye 1891)是生长在海洋中营浮游生活的大型食用、暖水性水母类,在南海、东海、黄海、渤海海域有着广泛的资源分布,种类繁多,资源十分雄厚。海蜇隶属于腔肠动物门,钵水母纲,根口水母目,根口水母科,海蜇属(*Rhopilema*)。世界已记录的海蜇属有海蜇(*R. esculentum*)、黄斑海蜇(*R. hispidum*)、棒状海蜇(*R. rhopalophorum*)和疣突海蜇(*R. verrilli*)四种^[1]。其中海蜇、黄斑海蜇和棒状海蜇等3种在中国已有记载。海蜇和黄斑海蜇两种水母被作为捕捞的对象,而棒状海蜇个体小(10~100 mm),伞部的中胶层薄、数量少,没有捕捞价值。海蜇是我国重要的海产品之一,早在一千六百多年前的晋代就已经有人开始食用。

海蜇外部个体形态可分为伞部(又称海蜇皮)和口腕部(又称海蜇口腕部)两部分,通体呈半透明,白色、青色或微黄色^[2]。伞部上面称为外伞部或上伞部,伞部里面则被称为内伞部或者下伞部。其中,外伞部表面光滑,伞的边缘有8个感觉器,位于由胃腔延伸至伞缘的主辐管和间辐管位置的凹陷内;伞内部可见发达的环状肌,环状肌呈红色、黄金色、深褐色或者乳白色,即加工时被刮掉的“皮”,人们通常称之为“血衣”;伞径一般30~50 cm,最大可达1 m,胶质较坚硬,通常青蓝色。口腕部为伞部以下部分,常被称为“海蜇头”,垂挂着许多须状物,称作腕或触手;由内伞中央下垂的圆柱体和口柄组成,口腕8枚,缺裂成许多瓣片;下方口腕处的棒状和丝状触须上有密集刺丝囊,能分泌毒液,其作用是在触及小动物时可释放毒液麻痹,以做食物。



我国有着以捕捞海蜇为渔业生产作业的传统,20 世纪 60~70 年代我国海蜇年产量为 6 万吨以上,而根据 2010 年《中国渔业年鉴》统计数据显示,我国海蜇养殖及捕捞年总产量约为 30 万吨^[3],海蜇主要栖息于内湾、河口、岛屿一带的浅海范围,一般在水深 20~30 m 的近海岸区域活动,在我国主要有广东海区、福建海区、浙江海区、江苏海区、山东海区和黄渤海海区等数个海蜇主产区。

二、海蜇的营养和药用价值

海蜇具有很高的经济价值、营养价值和药用价值,是我国重要海产品之一。根据我国卫生部门报道,对海蜇的成分、药理以及临床试验结果证明海蜇具有较高的药用价值,主要的药用部位有海蜇头、海蜇皮以及腹面、黑膜,成分含蛋白质、糖分、无机盐等。

海蜇作为食品,被称为是宴席佳肴,海蜇伞部的“海蜇皮”和口腕部的“海蜇头”均具有很高的经济价值和营养价值。除了这两部分外,海蜇中还存在着相当数量的生殖腺,俗称“海蜇花”,在加工过程中一般被扔掉,但在部分沿海地区,也有将其加工成“蜇米”食用的,其营养丰富,味道鲜美^[4]。

海蜇不但具有独特的风味,而且还富有极高的营养价值。海蜇含有大量的蛋白质、矿质元素、不饱和脂肪酸、多种维生素、少量的脂肪和多糖等营养物质,是一种理想的天然保健食品原料。根据有关方面对海蜇及其他水产品分析,海蜇的营养成分有它的独特之处,每 100 g 海蜇可食部分中,含水分 65.0 g,灰分 18.7 g,蛋白质 12.3 g,碳水化合物 3.9 g,脂肪 0.1 g,钙 182 mg,铁 9.5 mg,硫胺素 0.01 mg,核黄素 0.04 mg,烟酸 0.2 mg,胆固醇 16 mg^[5],这与人们日常所喜欢食用的鱼、蟹、贝和乌贼的营养成分进行比较,海蜇的食用部分达 100%。海蜇的食用方法很多,焖、炸、炒、拌及煮汤皆宜。时下许多宾馆、酒家筵席的头盆或烧烤拼盘中,必选海蜇。尤其是在夏日头盆小碟里的凉拌海蜇,清新爽口、色鲜味美,颇为食家所称道。

此外,海蜇也是一味治病良药,它的多种药用功能早在我国古代就有记载。祖传医学认为,海蜇具有清热解毒、化痰软坚、降压消肿的功能,对高血压、哮喘、慢性气管炎、胃溃疡和单纯性甲状腺肿大等有一定的疗效。据明代李时珍的《本草纲目》记载:海蜇“气味碱温,无毒,主治妇人劳损,积血带下,小儿风疾丹毒,烫火伤”;《医林纂要》中记载:一些水母可“补心益肺,滋阴化痰,去结核,行湿邪,止咳除烦”;我国医药学家陈藏器所著《本草拾遗》记有能“疗河鱼之疾”、“能解河豚

中毒之症”；在《雨航杂录》上也有记载，海蜇“性煖补”“治积”；《归砚录》谓：“海蛇，妙药也，宣气化痰、消炎行食而不伤正气，故哮喘、胸痛、症瘕、胀满、便秘、带下、疖、疽等病，皆可食用”；海蜇营养丰富，药用价值高，自古便是治病除疾的良药，海蜇凉拌有助于消化的作用。煮食海蜇、荸荠可治疗大便干燥；用海蜇与糯米加水煮成粥同糖一起服用，治疗大便干结和高血压；将冰糖、蜂蜜、海蜇皮拌匀，上锅蒸熟，可用于清热化痰、润肺止咳^[6]。

三、海蜇生物活性研究进展

据古今书籍、研究发现海蜇不仅烹煮后味道鲜美，而且海蜇具有丰富的营养价值和活性功能。海蜇含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物等有机成分，含有维生素、烟酸、磷、碘、铁等无机成分，其中海蜇含有的蛋白质、蛋白质复合物和多糖物质可能存在活性成分而在近几年得到研究，主要集中在对海蜇糖蛋白、多糖和胶原蛋白的研究上。

刘希光等^[7]测定了海蜇的无机成分，主要含有 Zn、Co、Ni、Ba、Mn、Fe、Mg、Ca、Cu、Al、Sr、Mo、Cr、Cd、Pb、Si、V、Ti、Na、K、Li、Rb 等 22 种元素，并测定了海蜇不同部位氨基酸、脂肪的含量，对海蜇多糖做了部分理化性质和结构的研究，还研究了海蜇提取物（海蜇有效物）的生物活性，得到其提取物具有抗衰老、抗肿瘤和抗炎等的作用；苏秀榕等^[8]通过提取沙蜇刺胞毒素的活性蛋白注射吗啡戒断小鼠，得到次活性蛋白可以改善吗啡戒断小鼠的肾脏、心脏和肝脏的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性，使小鼠的机体抗性逐渐恢复正常；丁进锋等^[9]提取海蜇胶原蛋白并研究其对小鼠血脂的影响和抗氧化作用，表明了胶原蛋白肽具有辅助减低血脂水平和增强抗氧化功能的作用；金晓石等^[10]提取海蜇中的糖胺聚糖，研究糖胺聚糖对降血脂的作用，结果显示，经多酶水解的粗制品海蜇糖胺聚糖降血脂的作用显著；Ovchinnikova 等^[11]通过对水母胶层的分离获得一种含有 40 个氨基酸残基的抗菌肽，该抗菌肽对革兰氏阳性菌和革兰阴性菌均有一定的杀伤作用，并表明与海葵中的防御素以及阻滞钾离子通道的毒素具有部分相似性；Fukuda 等^[12]研究野生水母与人工养殖的水母之间脂肪酸的组成成分，发现这 2 种不同生存状态下水母脂肪酸组成存在差异，研究表明水母的饮食改变最终导致其脂肪酸的组成及含量发生变化；Yu 等^[13]从海蜇中发现某种蛋白质具有抗氧化作用，其中部分蛋白质具有较好的还原和金属螯合的作用；Hsieh 等^[14]研究发现海蜇胶原蛋白对风湿性关节炎的治疗效果显著。



国内外对海蜇的研究主要倾向于对活性成分的结构、活性功能以及结构和活性功能的关系,进一步研究海蜇的活性物质有利于更加有效地利用海蜇资源,为开发各种海蜇功能性食品提供科学的依据。

第二节 糖蛋白的研究进展

糖类研究初期,人们一直以为糖类在人体内的生理功能,就是为机体提供能量,每克碳水化合物能产生 17 kJ/g(4 kcal/g)。随着现代仪器分析(如 GC、HPLC、MS 等)在糖类化学上的利用,越来越多的糖类及糖类化合物被研究发现具有多种生理活性。在自然界中,糖类的存在方式大致可分为两种(图 1-1),即简单糖类(如葡萄糖、淀粉等)和复合糖化物(如糖蛋白、肽聚糖、脂多糖等)^[15]。

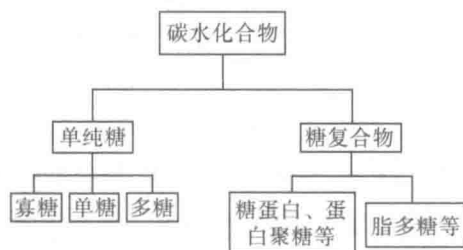


图 1-1 糖类化合物的分类

一、糖蛋白的概述

糖蛋白(glycoprotein)是一类复合糖化物(complex carbohydrates)或一类缀合蛋白,由比较短、带分支的寡糖与多肽链以多种形式共价修饰而形成的一类重要生理活性物质^[16],即指糖与蛋白质之间以蛋白质为主,在某一特定部位以共价键与若干糖分子链相连接而构成的分子,如图 1-2 所示为糖蛋白分子的空间模型示意图^[17]。糖蛋白在自然界中分布广泛,不仅存在于动物中,也存在于植物、单细胞有机体和病毒中,具有很多重要功能;糖蛋白是生物体内重要的生物大分子之一,在生物体内,大多数蛋白质以糖蛋白形式存在^[18,19],广泛分布在细胞膜、细胞间质、血浆以及黏液中,包括动植物和微生物凝集素、血型物质、黏液组分、膜蛋白和受体、部分酶、血浆蛋白、激素、全部抗体、补体因子毒素等,在增殖的调控、受精、发生、分化以及免疫等生命现象上起着十分重要的作用。在已研究过的动物体液、血液样本中,六七十种血浆蛋白质除清蛋白、 β -微球蛋白、溶菌酶等 7 至 8 种外,其余均为糖蛋白;而在脑垂体和胎盘性激素、促甲状腺激素和甲状腺

球蛋白、包括水解酶、氧化酶和转移酶在内的许多酶类中发现也都是含有糖的蛋白质,可见糖蛋白在生物体中存在的广泛程度;糖蛋白分子中的糖链对蛋白质的功能起修饰作用,它好像细胞表面的天线,是细胞相互识别、粘连、信号接收、免疫应答、接触抑制、细胞分化、增殖以及受体功能等的分子基础。

糖蛋白相对分子质量从 1.5×10^4 至大于 10^6 , 它们的含糖量也随着不同的糖蛋白差异很大。糖链以直链或支链形式存在,据研究显示,糖基数一般在 1~15 个左右^[20,21]。糖蛋白的糖链在理论上应有无数种结构形式,但是由于生物体内的某种限制,使实际存在的糖链类型大大减少,许多不同种类的糖蛋白含有共同内核或者核心结构,不呈现重复双糖系列,一般由 2~10 个糖单体组成,最多不超过 15 个单体,而且末端成员是唾液酸或者岩藻糖。在糖蛋白中,糖的组成成分较为复杂,组成有 β -D-葡萄糖(Glc)、 α -D-甘露糖(Man)、 α -D-半乳糖(Gal)、 α -D-木糖(Xyl)、 α -D-阿拉伯糖(Ara)、 α -L-岩藻糖(Fuc)、葡萄糖醛酸(GlcUA)、艾杜糖醛酸(IduA)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、唾液酸 N-乙酰神经氨酸(NeuNAc)等。寡糖和蛋白质(多肽链)的结合方式主要有两种:①糖的半缩醛羟基和含羟基的氨基酸——丝氨酸、苏氨酸、羟基赖氨酸等^[22]以 O-糖苷键结合;②糖的半缩醛羟基和天冬氨酸的酰胺基以 N-糖苷键结合。

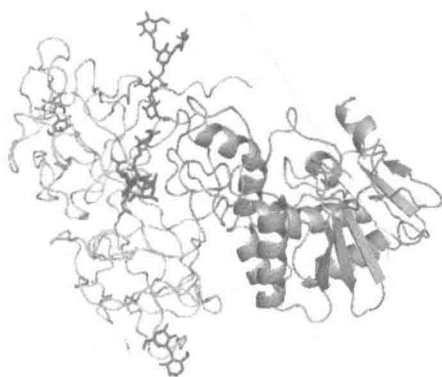


图 1-2 糖蛋白分子的空间模型示意图

二、糖蛋白的分析方法

(一)糖蛋白的提取

1. 醇提取

糖蛋白易溶于水而不溶于有机溶液,因此可用乙醇浸提糖蛋白,取沉淀后离



心干燥得糖蛋白粗品。Lee 等^[23]以梔子、龙葵和黑榆等果实作为试验对象,粉碎后置于地下室,暗置,用 99%乙醇浸提数月,过滤浸提物后经过浓缩和冷冻干燥,再冻干、盐析和透析,最后提取得到糖蛋白粗品。

2. 水提取

利用糖蛋白中糖具有高度亲水性(组成膜的糖蛋白除外),可用不同温度的水提取糖蛋白,有时在提取之前需要对原料进行脱脂处理,常用的方法为醚或醇回流。林玉满等^[24]将短裙竹荪菌粉用蒸馏水于 95℃左右提取 2 次,离心,去残渣,上清液用 3 倍体积的 95%乙醇沉淀,即得糖蛋白粗品;钱鑫^[25]在热水条件下(50℃),结合超声波辅助提取甘薯糖蛋白,料液比为 1:20,提取 1 h,提取 3 次可得到甘薯糖蛋白。

3. 酸碱溶液提取

蛋白质是具有等电点的两性电解质,提取液的 pH 应选择在偏离等电点两侧的 pH 范围内。一般来说,碱性和酸性蛋白质可分别用偏酸性和偏碱性的提取液提取。但在用稀酸或稀碱溶液提取时,应防止过酸或过碱而引起蛋白质的可解离基团发生变化,导致蛋白质构象的不可逆变化及生物学活性的丧失。张黎明等^[26]使用微碱法提取山药糖蛋白,调节提取液 pH 为 7、8、9、10、11,研究 pH 对糖蛋白提取率的影响,最后通过正交试验得到微碱法提取山药糖蛋白的最佳 pH 为 10,提取率为 0.74%。

4. 酶解法提取

酶法提取糖蛋白是将样品粉碎至一定程度后置于酶所需的 pH 环境中,并加入某种酶提取糖蛋白。方秀萍等^[27]以海蜇皮为原料,通过对比枯草杆菌中性蛋白酶与胰蛋白酶对海蜇皮糖蛋白提取率的影响,最后确定胰蛋白酶对海蜇皮糖蛋白提取效果较好。提取具体操作方法为:海蜇皮脱盐、匀浆,加入胰蛋白酶,脱色,4000 r/min 离心 10 min 除去杂蛋白,再经过醇沉、干燥得到糖蛋白。

5. 稀盐溶液或缓冲溶液浸提

糖蛋白在稀盐溶液或缓冲溶液中稳定性好且溶解度大,这两种溶液是提取糖蛋白最常用的溶剂。糖蛋白在一定的盐溶液浓度内具有较理想的溶解度,利用此性质提取糖蛋白,再经过醇沉、除盐、干燥等步骤得到糖蛋白。此方法所使用的盐或缓冲液有 NaCl、PBS、NaClO₂-HOAc、草酸铵等,相对于醇提法、酶法,此法试剂简单、经济。酸碱法较易破坏糖蛋白的结构,水提法往往需要室温以上

才能得到较为理想的提取得率,而糖蛋白的结构可能由于温度的升高而被破坏。周国杰等^[28]以 NaCl 溶液为浸提剂提取波纹巴非蛤全脏器糖蛋白,并通过优化试验得到糖蛋白。章建设^[29]使用浓度 3% 的 NaCl 浸提液在料液比为 1:6、浸提温度 80 °C 下浸提 55 min 得到鱿鱼内脏糖蛋白。

(二)糖蛋白的分离纯化

糖蛋白的分离纯化是指糖蛋白研究中获取研究对象的过程,一般包括分离、纯化和纯度鉴定三个步骤。分离和提纯糖蛋白的方法,基本上类似于蛋白质和活性多糖的分离和提纯方法。分离纯化是糖蛋白研究的关键步骤,将会直接影响后续研究的可行性和真实性。

1. 糖蛋白的分离

所谓分离就是将存在于生物体内的糖蛋白解离出来的过程。一般分离步骤为:材料-粉碎-提取-浓缩-沉淀-干燥。材料用砂磨或不锈钢磨(粉碎机)粉碎,一般越细越好,然后提取。最常用的提取方法是溶剂提取,由于糖蛋白中糖链的高度亲水性(组成膜的糖蛋白除外),因此可用不同温度的水提取,并尽量用室温的水提取以免糖蛋白失去活性。有时在提取之前要对原料进行脱脂和/或脱色处理,常用的方法是醇或醚回流;为了提高分离的选择性,也有人常在提取液中加入如乙酸、乙醇、苯酚、盐类等物质;为了提高分离的效率和得率,可使用超声波、微波进行辅助提取。对于提取组成膜的糖蛋白,可采用 Selvendran 提出的 $\text{NaClO}_2\text{-HOAc}$ 提取法,即依次用热水、草酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4]$ 水溶液循环提取后,将残余物用 0.6% NaClO_2 -0.2% HOAc 水溶液在 N_2 保护下升温至 70 °C,搅拌提取 30 min。由此所获得的糖蛋白提取液,常进行减压浓缩或膜分离技术浓缩,再用盐析或有机溶剂来沉淀目的产物。沉淀后有时还需干燥,干燥可用真空干燥、冷冻干燥和有机溶剂干燥。经上述方法沉淀而获得的糖蛋白中,还含有无机盐、有机溶剂不溶解的一些小分子有机物(如色素等)、大分子蛋白质、单纯多糖等杂质,所以只能称为粗糖蛋白。

2. 糖蛋白的纯化

糖蛋白的纯化是指除去粗糖蛋白中的杂质而获得单一糖蛋白组分的过程,一般经除杂和分级两步过程。糖蛋白纯化的第一步除杂就是将粗糖蛋白中的非糖蛋白组分除去,一般的程序是先脱蛋白质再除去其他小分子杂质。糖蛋白常用的脱蛋白方法为 Sevag 试剂法:它是根据蛋白质在氯仿等有机溶剂中变性的



特点,将提取液/Sevag 试剂[氯仿/正丁醇 5/1(V/V)]=5/1 混合,剧烈振荡、离心,变性后的蛋白质处于提取液与 Sevag 试剂的交界处,一般要经 3~6 次脱蛋白;有时为了不将含糖量少的糖蛋白除去,也不经过此步骤,放在分级步骤中去掉蛋白质。对于粗蛋白中的一些小分子杂质如无机盐、脱蛋白残留溶剂、低聚糖等,可采用透析法、膜分离法、离子交换树脂法和凝胶过滤法将其除去。经除杂后就获得了糖蛋白的混合物。糖蛋白纯化的第二步分级就是将糖蛋白混合物中的目的单一组分分离出来。常用的方法有 3 种。(1)纤维素阴离子交换柱层析法。常用的交换介质有 DEAE-纤维素、DEAE-葡萄糖凝胶、DEAE-琼脂糖等。此法适合于分离各种酸性、中性和黏性糖蛋白,然后用 pH 相同但离子强度不同或不同 pH 的缓冲溶液将酸性强弱不同的糖蛋白分别洗脱下来。(2)凝胶柱层析法。凝胶柱层析法是根据糖蛋白分子大小和形状而对糖蛋白进行分离纯化的,所以一般在糖蛋白的纯化中都采用先用纤维素阴离子交换柱层析纯化后,再用凝胶柱层析进行进一步的纯化。常用的凝胶介质有葡聚糖(Sephadex)凝胶,琼脂糖凝胶(Agrose)以及性能更佳的 Sephacryl 等。洗脱液常用蒸馏水、各种浓度的盐溶液及缓冲溶液。(3)亲和层析法。是根据凝集素能专一地、可逆地与游离的和复合糖类中的单糖或寡糖结合的性质,利用固定化凝集素亲和层析来分离纯化糖蛋白的手段。如用 ConA-Sephadex 作为亲和层析,由于 ConA 特异结合 α -D-甘露糖基和 α -D-葡萄糖基,因此含有上述糖基的糖蛋白、酶、多糖以及抗原等就与伴刀豆蛋白 ConA-Sephadex 发生亲和吸附,而不能形成特异结合的杂质则流出,然后再用含某种糖或甲基糖苷的缓冲溶液洗脱,释放出被吸附的糖蛋白。这一方法,简单易行,在温和条件下进行,不破坏糖蛋白的活性,通常得率也高,既可用于水溶性糖蛋白的分离纯化,也可用于细胞膜糖蛋白的分离纯化,但需要非极性去垢剂如 TritonX-100,NonidetP-40,Lubrol 等增溶膜糖蛋白。常用的分离介质是伴刀豆凝集素 ConA-Sephadex、蓖麻凝集素 RCA1-Sephadex,麦胚凝集素 WGA-Sephadex 花生凝集素 PNA-Sephadex 等。其他用于糖蛋白分级纯化的方法有分部沉淀法、盐析法、金属络合法、区带电泳法、超滤法、超离心法等。

3. 糖蛋白纯度的鉴定

糖蛋白是大分子化合物,其纯度标准不能用通常小分子化合物的纯度标准来衡量,因为即便是糖蛋白纯品,其微观也是不均一的。糖蛋白的纯度只代表某一糖蛋白相似链长的平均配布,糖蛋白纯品实际上是一定相对分子质量范围的糖蛋白的均一组分。糖蛋白纯度鉴定常用的方法有:凝胶层析法、高压电泳法、

超离心法、旋光法和毛细管电泳法等。

糖蛋白纯度鉴定中最常用的是凝胶层析法,因该方法准确度较高。糖蛋白经凝胶层析得到单一对称洗脱峰,则证明该糖蛋白是均一组分。凝胶层析又分为常压层析和高压液相层析(HPLC),其中高压液相层析具有速度快、高分辨率和重现性好等优点,常用的商品柱是 μ -Bondagel柱系列和TSK柱系列。高压电泳法是利用糖蛋白在电场作用下,按其分子大小、形状及其所带电荷的不同而移动不同的距离,所以在电场作用下其迁移率不同,电泳结果显色后,如呈单一色斑,则表示该糖蛋白为均一组分,载体一般用玻璃纤维纸。该法鉴定糖蛋白纯度早期用得较多,现在大多不再利用,因其灵敏度不高。超离心法是利用糖蛋白在离心力场中沉降的速度与糖蛋白的密度、大小与形状有关,如某一糖蛋白在离心力场作用下形成单一区带,说明该糖蛋白的密度、大小和形状相似,证明该糖蛋白为单一组分。旋光测定法是利用比旋光度不同的糖蛋白在不同浓度乙醇中具有不同溶解度的性质来测定的,如果在不同浓度乙醇中所得的沉淀物的比旋光度相同,则证明该糖蛋白是均一组分。毛细管电泳法是一类以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力的新型液相分离技术。毛细管电泳包含电泳、色谱及其交叉内容,它使分析化学得以从微升水平进入纳升水平。近年来,毛细管电泳技术被应用到糖蛋白分离纯化方面,毛细管为分离通道时经过pH值和缓冲液浓度等的调整,可以高效分辨不同糖蛋白的微观不均一性,但这种方法重复性较差。

(三)糖蛋白的理化性质及结构的测定

1. 糖蛋白的热稳定性

不同的糖蛋白、蛋白质的热稳定性不同,不同的糖蛋白、蛋白质分子由于其空间结构、所含基团不同,所具有的热稳定性自然不同;蛋白质的变性作用是由于它的空间构象被破坏而引起其理化性质和生物性质发生变化,糖蛋白分子由于含有糖链结构,相对于不含糖链的蛋白质分子稳定性较高,在测定时表现为需要较高温度才能使糖蛋白变性、收缩^[30]。赵梅^[31]通过研究甘薯糖蛋白变性温度以及去糖基后的变性温度发现寡糖分子增加蛋白质的抗变性作用;糖蛋白、蛋白质分子的变性与其在溶液中的黏度相关,使用乌氏黏度计测出糖蛋白的黏度变化,换算后可以得到糖蛋白的变性温度 T_d 。DSC是20世纪60年代研究得到的一种热分析方法,并已广泛应用于研究蛋白质的热变性。20世纪80年代以后,各国学者利用DSC对蛋白质的热力学性质进行广泛研究^[32]。DSC是在程序控温条件下,测量输给样品和参比物之间的热量差与温度变化关系的一种技术^[33]。