

农业科学

沙葱多糖的 SephadexG—100 凝胶柱纯化和分子量的测定

扈瑞平^{1,2} 杜 玲³ 敖长金^{2*} 张兴夫² 邓 凤¹

(内蒙古医学院基础医学院¹, 呼和浩特 010059; 内蒙古农业大学动物科学与医学院², 呼和浩特 010018;
内蒙古师范大学生命科学与技术学院³, 呼和浩特 010022)

摘要 对通过热水浸提、三氯乙酸除蛋白和活性炭脱色后的沙葱粗多糖,采用 SephadexG—100 凝胶柱层析纯化,收集合并单一峰溶液命名为 SCSP,并对纯化产物 SCSP 进行相对分子质量的测定。结果表明,SCSP 凝胶柱层析洗脱曲线为单一狭窄对称峰,说明为均一组分多糖;SCSP 的相对分子质量为 5.89×10^4 克/摩尔。

关键词 沙葱多糖 SephadexG—100 凝胶柱层析 分子量

中图法分类号 S566.9; **文献标志码** B

沙葱(*Allium mongolicum* Regel)属被子植物门(Angiospermae),百合科(Liliaceae),葱属(*Allium*),学名蒙古韭,是内蒙古草原的一种优质牧草^[1],也是有待开发的宝贵遗传资源。多糖是自然界中含量最丰富的生物聚合物,几乎存在于所有生物中。大量研究表明,多糖具有多方面的生物学活性,诸如抗衰老、抗辐射、降血糖、降血脂、抗凝血、抗病毒、抗肿瘤与免疫调节等,而且对机体正常细胞没有毒副作用,可能成为理想的药物来源^[2]。因此,对多糖生物学活性的研究已成为当今生物科学的热门领域。

多糖的提取分离纯化是指多糖研究中获取样品的过程,一般这一过程包括提取分离、纯化和结构鉴定三个步骤,其中纯化是多糖研究的关键,其成功与否、效果的好坏都会直接影响后续研究的可行性和可信度^[3]。多糖的分离纯化是指将粗多糖

中的杂质去除而获得单一多糖组分的过程。一般是先脱除非糖组分,再对多糖组分进行分级。而脱除非多糖组分往往是先脱除蛋白质再去除小分子杂质^[4]。作者在前期研究中已经确定了沙葱多糖热水浸提法的最佳技术指标,并比较了 Sevage 法和三氯乙酸法两种除蛋白方法的优劣,确定了活性炭脱色法的最佳工艺参数。粗多糖是混合物,一般用柱层析法进行纯化,常用 Sephadex 凝胶柱层析,具有分子筛的作用,既可以达到进一步纯化多糖的目的,也可通过绘制单糖标准曲线测定多糖分子量^[5]。

1 试验材料

1.1 试验材料

新鲜沙葱于每年 6、7 月份采自内蒙古鄂尔多斯鄂托克旗天然草场,保鲜袋分装 -20 ℃ 冰箱保存。使用时 65 ℃ 烘箱烘干后准确称重用于多糖提取。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂

无水乙醇、98% 浓硫酸、苯酚、活性炭、氯仿、正丁醇、三氯乙酸,由北京化工厂生产;葡萄糖购自 Sigma 公司;SephadexG—100 购自 Pharmacia Co;以

2011 年 1 月 21 日收到,2 月 23 日修改

国家自然科学
基金(30960253)资助

第一作者简介:扈瑞平(1971—),女,内蒙古乌海人,副教授,博士,研究方向:分子生物学和天然植物活性成分研究. E-mail: huruiping2007 @ 163. com。

* 通讯作者简介:敖长金(1962—),男,内蒙古通辽人,教授,博导,研究方向:沙葱营养免疫。

上试剂均为分析纯。

1.2.2 主要仪器

旋转蒸发器 (RE52CS 型, 上海亚荣生化仪器厂); 冷冻干燥机 (FD - 1 型, 北京博医康技术公司); 循环水式多用真空泵 (SHB—III A 型, 巩义市予华仪器有限公司); 高速冷冻离心机 (GL—22M 型, 湖南 STXY 离心机仪器有限公司)。

2 试验方法

2.1 沙葱多糖的提取

沙葱多糖制备: 将烘干后沙葱用 98% 的工业酒精按 1:8 的比例(烘干沙葱: 酒精), 70 ℃ 脱脂 1 次, 65 ℃ 烘干后按 20:1 的水料比 80 ℃ 浸提 8 h, 抽滤弃去残渣后的多糖提取液经旋转蒸发仪浓缩到原体积的 1/3, 经 8% 的三氯乙酸除蛋白 1 次, 离心除去蛋白沉淀, 上清液经旋转蒸发仪浓缩除去残留三氯乙酸后, 将其稀释 10 倍, 在 80 ℃、1.0% 的活性碳添加量条件下, 脱色 40 min, 离心弃去活性碳, 将脱色后多糖溶液经旋转蒸发仪浓缩至原体积的 1/3, 按 1:1 比例加入无水乙醇 4 ℃ 过夜, 4 000 r/min 离心 30 min, 沉淀即为除蛋白、脱色后沙葱粗多糖, 将其用适量蒸馏水溶解后, 低温冷冻干燥, 称重备用。

2.2 多糖的 SephadexG—100 凝胶柱纯化

2.2.1 凝胶柱的预处理

取 SephadexG—100 凝胶 9.0 g, 加入 150 mL 蒸馏水, 沸水中煮沸 1 h, 可以缩短膨化时间, 也可以去除凝胶颗粒中的气泡^[6]。

2.2.2 SephadexG—100 柱层析步骤

(1) 装柱: 采用湿法装柱 (层析柱规格为 50 cm × 2.6 cm), 要求装填致密均匀。柱子必须垂直安装, 取蒸馏水倒入柱内 1/3 处, 然后将预处理的葡聚糖凝胶用玻璃棒沿壁小心地缓慢倒入柱内, 尽量一次装完, 以免出现不均匀的断层。

(2) 平衡: 待凝胶沉降后打开螺旋夹, 用 3—5 倍的蒸馏水平衡层析柱, 使柱内的凝胶分布、膨胀度达到均衡状态。

(3) 上样: 为了避免在加样时将凝胶表面冲起,

加样前, 在平衡好的凝胶柱表面放一片干净的滤纸。将粗多糖配成 20 mg/mL 溶液, 过滤后, 沿柱壁缓慢加入, 用蒸馏水洗脱。要注意不要使液面低于胶面。

(4) 洗脱: 用蒸馏水洗脱, 流速 0.5 mL/min, 手动收集流份, 每管 3 mL。

(5) 收集: 每隔一管用苯酚-硫酸法^[7]跟踪检测多糖含量, 收集合并单一峰溶液。

(6) 浓缩: 收集的单一组分溶液冷冻干燥, 得白色精制多糖粉末, 命名为 SCSP。

2.3 多糖相对分子量的测定

参照陈洪亮^[8]和樊黎生^[9]葡聚糖凝胶层析法, 略有改动。所用凝胶为 SephadexG—100, 层析柱规格为 50 × 2.6 cm, 湿法装柱, 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液平衡 24 h。洗脱液为蒸馏水, 洗脱速度 0.5 mL/min。蓝色葡聚糖 (Dextran T—2000) 和各标准葡聚糖上样量均为 3 mg, 先用蓝色葡聚糖测得外水 (2002) 体积 V_0 , 再用已知分子量的标准葡聚糖 T—110、T—70、T—40、T—10 相继上柱。手动分管收集洗脱液, 每管 3 mL, 苯酚-硫酸法检测, 分别测定它们的洗脱体积 V_e 。以分子量 M_r 的自然对数 $\lg M_r$ 为坐标, V_e/V_0 为纵坐标绘制标准曲线。然后取分离、纯化的多糖 SCSP 3 mg 上柱, 在与标准曲线制作相同的条件下测定各自的洗脱体积 V'_e , 根据各自的 V'_e/V_0 从标准曲线上求得其对应的分子量。

3 结果与分析

3.1 多糖的凝胶柱层析纯化

由图 1 可见, 沙葱粗多糖的凝胶柱层析洗脱曲线为单一狭窄对称峰, 说明为均一组分多糖。

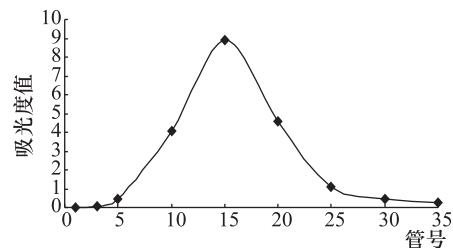


图 1 沙葱多糖 Sephadex G—100 洗脱曲线

3.2 多糖相对分子量的测定

SCSP 多糖分子量测定的标准曲线见图 2, 测定分子量的洗脱曲线见图 1, 该标准曲线的回归方程是: $y = -1.5758x + 8.6418$, $R^2 = 0.9945$ 。标准蓝色葡聚糖测得的外水体积 V_0 为 41.90 mL, SCSP 的洗脱体积 V_e' 为 31.49 mL。根据 V_e'/V_0 , 测得其分子量为 58 884 g/mol。

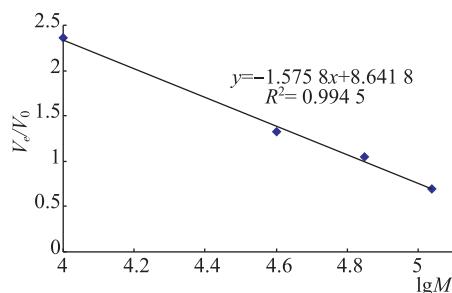


图 2 凝胶过滤测定分子量的标准曲线

4 讨论

凝胶过滤法又称凝胶柱层析法。由于凝胶具有一定大小的孔径, 故不同形状和大小的多糖分子在凝胶层析柱中移动速度不同, 其规律是较小分子移动的较慢, 较大分子移动的较快, 流出液跟踪检测多糖分布, 绘制洗脱曲线, 如只有单一一对称峰, 则表明为均一组分^[10]。凝胶柱层析可以用来分离大分子多糖中的小分子化合物, 如盐类、色素、小分子游离蛋白和小分子糖, 既起到纯化多糖的目的, 又可以用来鉴定多糖的纯度。沙葱多糖 SephadexG—100 凝胶柱层析洗脱曲线中只出现单一狭窄对称峰, 说明为均一组分多糖。

多糖的理化性质和生物活性均与分子量密切相关, 因此分子量的测定是研究多糖性质的一项较为重要的工作。多糖相对分子量的测定没有一种绝对的方法, 其相对分子量只代表相似链长的平均分布而不是确切的分子大小。往往用不同的测定方法会得到不同的相对分子质量。我们采用凝胶过滤层析法通过葡聚糖标准分子量曲线求出 SCSP 的分子量为 58 884 g/mol。

参 考 文 献

- 包颖. 内蒙古葱属植物的地理分布. 内蒙古师大学报自然科学(汉文版), 2000; 6(29): 130—135
- 王克夷. 以糖类为基础的药物概况和发展趋向. 药物生物技术, 2001; 6(8): 321—323
- 袁忠海, 吴道澄, 李晓晔. 超声波对提取魔芋葡甘聚糖的影响. 第四军医大学学报, 2003; 24(3): 238—241
- 张维杰. 糖复合物生化研究技术(第二版). 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 94—97
- 穆赫塔尔·伊米尔艾山, 摩尔班·吾斯曼. 鱼腥草中总黄酮含量测定. 中草药, 2001; 32(10): 900
- 李润秋, 张翼伸. 针裂蹄多糖的研究. 药物学报, 1983; 18(6): 430—433
- 徐光域, 颜军, 郭晓强, 等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用. 食品科学, 2005; 26(8): 342—346
- 陈洪亮. 植物多糖的制备及对肉仔鸡免疫功能影响的研究. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2002: 37—38
- 樊黎生. 黑木耳多糖 AAP-a 级分的制备及其生物活性的研究. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2006: 27
- 刘成梅, 游海. 天然产物有效成分的分离与应用. 北京: 化学工业出版社, 2002

Studies on Purified with SephadexG—100 Column Chromatography and Molecular Weight Measured of *Allium mongolium Regel* Polysaccharides

HU Rui-ping^{1,2}, DU Ling³, AO Chang-jin^{2*}, ZHANG Xin-fu², DENG Feng¹

(Basic Curriculum Department of Inner Mongolia Medical College¹, Hohhot 010059, P. R. China;

College of Animal Science and Animal Medicine of Inner Mongolia Agricultural University², Hohhot 010018, P. R. China;

College of life Science and Technology of Inner Mongolia Normal University³, Hohhot 010022, P. R. China)

[Abstract] To rough sand onion polysaccharides, which is extracted by hot water, trichloramine acetic except protein and activated carbon decoloring, adopting sand onion SephadexG—100 gel column chromatography purification, collect merger single submmit solution named SCSP, and the purification product SCSP for molecular weight determination. The results show that SCSP gel column chromatography elution curve for a single narrow symmetrical peak, explain for homogeneous components polysaccharide, SCSP relative molecular mass for 5.89×10^4 .

[Key words] *Allium Mongolicum Regel* polysaccharide SephadexG—100 column chromatography molecular weight measure

(上接第 2776 页)

- 2 Shue J H, Ieda A, Lui A T Y, et al. Two classes of earthward fast flows in the plasma sheet. Journal of Geophysical Research-Space Physics, 2008; 113 (A2) : 1—11
- 3 Zhang L Q, Liu Z X, Baumjohann W, et al. Convective high-speed flow and field-aligned high-speed flows explored by TC-1. Chinese Science Bulletin, 2008; 53 (15) : 2371—2375
- 4 Ohtani S, Shay M A, Mukai T. Temporal structure of the fast convec-

tive flow in the plasma sheet: comparison between observations and two-fluid simulations. Journal of Geophysical Research-Space Physics, 2004; 109 (A3) : 1—16

- 5 Zhang L Q, LIU Zhenxing, MA Zhiwei, et al. Continuous tailward flow in the near-Earth magnetotail observed by TC-1 satellite. Chinese Science Bulletin, 2007; 52 (14) : 1980—1985

The High-speed Flow Distribution during the Magnetospheric Substorm

LU Xing-qiang, LI Ke-hua

(School of Nuclear Science and Technology, University of South China, Hengyang 421001, P. R. China)

[Abstract] The high-speed flow distribution during the magnetospheric substorm is investigated using the numerical simulation with the realistic magnetotail geometry. The results indicate that the high-speed flows perpendicular to the magnetic field are mainly distributed in the current sheet in the range of $|Z| < 0.25R_E$, and that parallel to the magnetic field are mainly distributed in two areas: the strong magnetic field areas in the Near-Earth and in the near the plasma sheet.

[Key words] magnetospheric substorm current sheet high-speed flows