

蝉拟青霉菌丝体糖蛋白的分离提取及组分测定

谭艾娟, 梁宗琦, 刘爱英
(贵州大学生命科学学院 贵州 贵阳 550025)

摘 要: 蝉拟青霉菌粉经脱脂、水提、丙酮沉淀、蒸馏水透析后得到糖蛋白提取物 GP, 经苯酚-硫酸法测定总糖含量为 34.79%; Lowry 法测定蛋白质含量为 63.45%; 糖蛋白提取物 GP 上 Sephadex G-25 柱层析, 逐管用紫外吸收法(280nm)检测, 发现有两个峰(PS₁ 和 PS₂)。PS₁ 总糖含量为 21.11%, 蛋白质含量为 77.1%, PS₂ 总糖含量为 44.98%, 蛋白质含量为 53.02%。

关键词: 蝉拟青霉; 菌丝体; 总糖; 糖蛋白; 柱层析

Extraction and Separation of Glycoproteins from the Mycelia of *Paecilomyces cicadae* with Analysis Test

TAN Ai-Juan, LIANG Zong-Qi, LIU Ai-yi
(College of Life Science, Gui Zhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: By means of degreasing, water-extracting, acetone-precipitating and dialyzing in distilled water, the total carbohydrate in the mycelial powder of *Paecilomyces cicadae* is tested as 34.79% by Phenol-Sulphuric Measure method and the protein content is 63.45% by Lowry. The glycoprotein possesses two absorbing peaks (PS₁ and PS₂) under ultraviolet spectrum as separated by Sephadex G-25. The protein content is 77.1% in PS₁ and 53.02% in PS₂, while the total carbohydrate is 21.11% in PS₁ and 44.98% in PS₂, respectively.

Key words: *Paecilomyces cicadae*; mycelia; total carbohydrate; glycoprotein; column chromatography

中图分类号: TS201.2.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0159-02

蝉花是一些蝉的土栖若虫受到蝉拟青霉(*Paecilomyces cicadae*)寄生的产物, 是我国三大名贵药用虫草之一。早在宋代唐曾微著的《证类本草》中就记述其有主治小儿“天吊, 惊痫, 瘰疬, 夜啼, 心悸”等功效, 在国内和东南亚有相当大的销售市场。藤多哲朗等从蝉花的培养液中分离到一种具有显著免疫抑制作用的物质, 将其命名为 ISP-1^[1]; 陈祝安^[2]、刘广玉^[3]等证明, 蝉拟青霉及人工培养物有明显的镇痛, 镇静和解热等功效, 且其作用与天然蝉花和冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)十分相似, 而且蝉拟青霉对机体的毒性甚微^[4], 其主要化学成份与天然冬虫夏草相似^[5]; 金丽琴^[6]、陈秀芳^[7]等证明, 蝉拟青霉能激活大鼠腹腔与肺泡巨噬细胞, 具有增强大鼠免疫能力、改善脂类物质代谢和保护脏器组织的作用, 很值得进一步研究。本文作者对蝉拟青霉菌丝体糖蛋白的分离提取及组分测定进行了初步研究, 为探索蝉拟青霉的药理作用的功能组分打下一定的基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

蝉拟青霉(*Paecilomyces cicadae* 0615)采自贵阳森林公园, 保存于贵州大学(南区)真菌资源研究室。

1.2 试剂

Sephadex G-25 Pharmacia 公司, 其他为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 菌丝体培养及菌粉制作

斜面培养基为 PDA 培养基; 液体培养基, 参照陈祝安等^[2]的方法配制。将斜面蝉拟青霉菌种制成分生孢子悬液, 接种于具有 50ml 培养液的 250ml 三角瓶中, 于 26℃ 摇瓶培养 120h 后过滤洗涤得新鲜菌丝体, 经 50℃ 鼓风干燥, 粉碎, 过 80 目筛得菌粉, 备用。

1.3.2 糖蛋白分离提取

1.3.2.1 去油脂

收稿日期: 2006-06-08

基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目(黔科合 15001B-19)

作者简介: 谭艾娟(1963-), 女, 副教授, 研究方向为生化药学。

取一定量的蝉拟青霉菌粉装入完好无损的滤纸袋内；加入菌粉量1~2倍(W/V)的乙醚于室温下浸泡三次，每次7~10h。回收和挥干乙醚后分别得到蝉拟青霉菌油脂和脱脂菌粉。

1.3.2.2 水提

将脱脂菌粉分别按(W/V)1:10、1:5、1:3的量依次加入热蒸馏水在70℃下浸提，每次时间3h，收集浸提滤液，过滤，于60℃，0.08MPa条件下真空薄膜浓缩至原料重量相当时即可。

1.3.2.3 丙酮沉淀

用预冷丙酮按原料体积的0.8及0.4倍两次处理浓缩滤液，4000r/min离心处理10min，去掉上清液，挥干丙酮后得到沉淀物。

1.3.3 分离纯化

1.3.3.1 透析

将挥干丙酮后的沉淀物加入适量水，使之溶解，体积约为原料体积相当，装入分子量为8000~12000的透析袋内，于2~3倍的蒸馏水内进行透析处理，温度65~70℃，时间每次1.5~3h，次数约为6~8次；收集透析外液，60℃，0.08MPa条件下真空薄膜浓缩后于相同条件下减压干燥。

1.3.3.2 柱层析

称取透析外液干粉30mg，用5ml蒸馏水溶解，上Sephadex G-25柱层析，柱规格25mm×100cm，用蒸馏水洗脱，流速5ml/min，每管收集5ml，逐管用苯酚-硫酸法^[8]检测糖峰，紫外吸收法(280nm)检测蛋白峰。将收集到的单峰分别于60℃，0.08MPa条件下真空薄膜浓缩后，再在同样条件下减压干燥。

1.3.4 总糖测定 苯酚-硫酸法^[8]。

1.3.5 蛋白质测定 Lowry法^[9]。

2 结果与分析

2.1 蝉拟青霉菌粉糖蛋白(GP)的提取

蝉拟青霉菌粉经脱脂，水提，丙酮沉淀，蒸馏水透析后得到糖蛋白提取物GP，经测定GP总糖含量为34.79%；蛋白质含量为63.45%。

总糖测定回归方程： $y=116.41x-1.27$ ， $r=0.9968$ 。式中， y 为糖浓度($\mu\text{g/ml}$)； x 为490nm处OD值。蛋白质测定回归方程： $y=1.431x$ ， $r=0.9975$ 。式中， y 为蛋白质浓度 mg/ml ； x 为500nm处OD值。

2.2 蝉拟青霉菌糖蛋白的组分分析

糖蛋白提取物GP上Sephadex G-25柱层析，逐管用紫外吸收法(280nm)检测蛋白峰，发现其为两个峰，分别为 PS_1 和 PS_2 。同时逐管检测糖峰，发现糖峰和蛋白

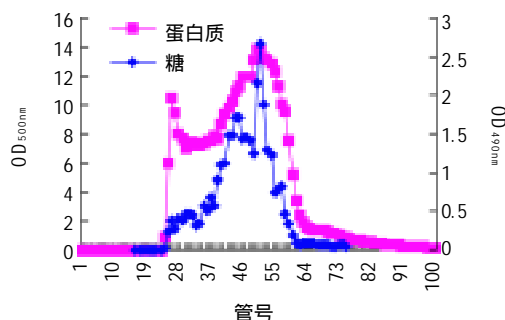


图1 糖-蛋白质峰形图

Fig.1 Peaks of carbohydrate and protein

峰基本吻合，说明 PS_1 和 PS_2 为糖蛋白。

2.3 两组分单峰蛋白和总糖含量

经测定 PS_1 总糖含量为21.11%；蛋白质含量为77.1%； PS_2 总糖含量为44.98%；蛋白质含量为53.02%； PS_1 的蛋白质含量较 PS_2 高， PS_2 的糖含量较 PS_1 高。

3 讨论

蝉拟青霉菌粉经去脂、水提，丙酮沉淀，透析得到的提取物GP，经测定其主要成分为糖和蛋白质，总含量为98.24%，纯度较高。经sephdexG-25柱层析，得到两个峰 PS_1 和 PS_2 ，经测定其主要成分仍为糖和蛋白质；且糖峰和蛋白峰分布基本吻合，说明该组分为糖蛋白，而不是糖和蛋白质的混合物。

蝉花作为名贵的传统中药，含有丰富的生理活性物质，具有广泛的药理作用，但传统上蝉花的获得是从野外采集，以全草入药，存在着人工采集困难，药源无法稳定供给等困难；蝉花主要的作用是明目和抗惊厥，但目前这方面的研究报道不多；且目前蝉花的药理作用的研究基本都是用水提物来进行的，其功能组分不明确，作用机理不清楚，蝉拟青霉菌丝体糖蛋白的分离纯化，为下一步通过生物模型检测验证蝉花的明目和抗惊厥等其他药理作用，探索其功能组分，打下一定的基础。

参考文献：

- [1] 幸兴球. 蝉花活性物质的研究动向[J]. 昆虫知识, 1993(4): 251.
- [2] 陈祝安. 蝉花的人工培养及其药理作用研究[J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 138-144.
- [3] 刘广玉, 胡蕊英. 天然蝉花和人工培养品镇静镇痛作用的比较[J]. 现代应用药学, 1991, 8(2): 5-8.
- [4] 陈万群, 陈古荣. 冬虫夏草代用品研究进展[J]. 中草药, 1994, 25(5): 269-271.
- [5] 俞滢, 顾蕾, 陈启琪, 等. 蝉花的化学成分分析[J]. 杭州师范学院学报, 1997(6): 61-63.
- [6] 金丽琴, 吕建新, 袁谦, 等. 蝉拟青霉对大鼠免疫功能和血液生化指标的影响[J]. 温州医学院学报, 2001, 31(12): 6-8.
- [7] 陈秀芳, 金丽琴, 吕建新, 等. 蝉拟青霉对大鼠腹腔及肺泡巨噬细胞的激活作用[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(6): 694-697.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1995: 16.
- [9] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, RARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265.