

# 黄芪糖蛋白的分离纯化及其理化性质、组成成分分析

李敏,高丽,岳晓华,薛慧清\*,冯前进,周然\*  
(山西中医学院实验管理中心,太原 030024)

**[摘要]** **目的:**提取分离、纯化具有免疫抑制活性的黄芪糖蛋白(AmGP-2)并考察其理化性质、组成成分。**方法:**黄芪经水浸提,盐析分离,sevage试剂脱游离蛋白等方法提取糖蛋白,采用阴离子色谱柱和凝胶色谱柱进行纯化。通过苯酚-硫酸法、BCA、Molish 试验、茚三酮反应、气相色谱分析、氨基酸分析、SDS-PAGE、UV、IR、 $\beta$ -消除反应等分析黄芪糖蛋白的理化性质及组成成分。**结果:**AmGP-2 易溶于水,等电点约 4.7,蛋白质、糖类成分质量分数依次为 56.7%、29.3%,相对分子质量约 31 kDa;含有 18 种氨基酸,其中天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸含量较高;糖链部分含有阿拉伯糖、葡萄糖及 2 种未确定的单糖。**结论:**AmGP-2 具有显著的免疫抑制活性,为中药免疫抑制剂的开发提供参考。

**[关键词]** 黄芪糖蛋白;氨基酸组成;等电点

**[中图分类号]** R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0048-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014130048

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1544.026.html>

**[网络出版时间]** 2014-05-13 15:44

## Isolation and Purification of Astragali Radix Glycoprotein and Analysis of Its Physicochemical Properties and Composition

LI Min, GAO Li, YUE Xiao-hua, XUE Hui-qing\*, FENG Qian-jin, ZHOU Ran\*

(Experiment Management Center, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

**[Abstract]** **Objective:** To extract and purify Astragali Radix glycoprotein (AmGP-2) having immunosuppressive activities, then investigate its physicochemical properties and composition. **Method:** AmGP-2 was handled by water extraction, salting separation, sevage method; Then purified by anion and gel chromatography. Physicochemical properties and composition of AmGP-2 were analyzed by phenol-sulfuric acid method, BCA method, Molish test, ninhydrin reaction, gas chromatography, amino acid analysis, SDS-PAGE, UV, IR and  $\beta$ -elimination reaction. **Result:** AmGP-2 was soluble in water with isoelectric point (pI) of 4.7 and relative molecular weight about 31 kDa, contents of proteins and carbohydrates were 56.7% and 29.3%, respectively; It contained 18 kinds of amino acids, higher content including aspartic acid, glutamic acid and lysine; Its carbohydrates chain portion contained arabinose, glucose and two kinds of undetermined monosaccharides. **Conclusion:** AmGP-2 had significant immunosuppressive activity, this study could provide a reference for development of immunodepressants of Chinese herbal medicines.

**[Key words]** Astragali Radix glycoprotein; composition of amino acids; isoelectric point

**[收稿日期]** 20130921(005)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划课题(2011BAI07B01);国家国际合作专项项目(2013DFA30700);山西省科技攻关计划项目(20130321031-01);山西省自然科学基金项目(2009011013-1)

**[第一作者]** 李敏,硕士,助教,从事中草药的提取分离纯化及鉴定研究,Tel:0351-2272442,E-mail:limi\_1983@163.com

**[通讯作者]** \*薛慧清,博士,教授,从事中药及天然药物的提取分离纯化及活性研究,Tel:0351-2272277,E-mail:xuehuiqing@sina.com;

\*周然,博士,教授,从事方剂药效及其物质基础研究,Tel:0351-2272223,E-mail:zhouran58@soho.com

糖蛋白是一类由糖类同多肽或蛋白质以共价键连接而形成的结合蛋白<sup>[1]</sup>,广泛存在于动物、植物和某些微生物中,且存在形式各不相同。许多中草药、营养价值较高的菌体和藻类及一些大宗作物中所含糖蛋白均具有显著的药用功效和保健功能<sup>[2-3]</sup>。

黄芪功效益气固表、利水消肿、托毒生肌等,具有增强机体免疫功能、保肝、利尿、抗衰老、抗应激、降压等药理作用。以往黄芪有效成分的研究主要集中于多糖、皂苷和黄酮等成分,有关其蛋白质的报道很少。前期研究发现黄芪中蛋白类成分具有明显的免疫抑制作用<sup>[4-7]</sup>。故本实验拟通过分析黄芪糖蛋白的理化性质及组成成分,为该成分的制剂开发提供参考。

## 1 材料

AKTA Purifier-10 型生物活性分子系统(美国 GE),7890A 型气相色谱仪(美国 Agilent 公司),L-8900型氨基酸自动分析仪(日本日立),Cary 50 型紫外-可见分光光度计(美国瓦里安),IS10 型傅立叶变换红外光谱仪(美国 Themro),LGJ-10 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂),SpectraMax 190 型酶标仪(美国美谷公司)。

黄芪采自山西浑源黄芪种植基地,经山西中医学院科研中心尚彩玲老师鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,凭证标本保存于该室;丙烯酰胺、双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、四甲基乙二胺、 $\beta$ -巯基乙醇、考马斯亮蓝 R-250、溴酚兰(美国 BBI 公司),低相对分子质量标准蛋白(美国 Amersham 公司,批号 BM525),甘氨酸、三羟甲基甘氨酸、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵(美国 Amresco 公司),DEAE-Cellulose 32 和 Sephadex G-50 填料(国药集团化学试剂有限公司),D-木糖、阿拉伯糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、半乳糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 11508-200404,1506-20001,140651-200301,110833-200503,100226-200404),牛血清蛋白对照品(上海生工生物工程有限公司,批号 AD0023),混合氨基酸对照品(日本 Wako 公司,批号 11692049),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),水为蒸馏水,其他试剂均为国产分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 黄芪糖蛋白的提取分离**<sup>[8]</sup> 取黄芪药材,粉碎成絮状,取一定量加水浸泡 12 h,于  $<55\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴浸提 2 次,合并提取液,过滤,滤液离心( $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,30 min,下同),浓缩上清液,加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至过饱和,于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  静置过夜,离心,取沉淀,加适量水溶解,经 sewage 试剂脱蛋白,重复 3 次,直至无变性蛋白,将上清液置于透析袋透析,冷冻干燥,即得黄芪糖蛋白(AmGP-2)粗品。

**2.2 AmGP-2 的纯化**<sup>[4-9]</sup> 将活化后的 DEAE Cellulose 32 填料装柱( $1.6\ \text{cm}\times 30\ \text{cm}$ ),加  $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{pH}\ 5.6$  乙酸-乙酸钠缓冲液平衡,上样后加  $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{pH}\ 5.6$  乙酸-乙酸钠缓冲液和  $0\sim 1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaCl}$  溶液梯度洗脱,于 280 nm 处检测,按峰型收集洗脱峰, $\alpha$ -萘酚检测含糖部分,得到峰 I,II 共 2 个组分。将收集峰浓缩后上 Sephadex G-50( $1.6\ \text{cm}\times 80\ \text{cm}$ )凝胶色谱柱,加水洗脱,峰 II 经洗脱得单一峰,冷冻干燥,得单一 AmGP-2,经活性测定具有明显的免疫活性。药理研究发现,AmGP-2 对小鼠脾淋巴细胞有抑制作用,对佐剂性关节炎(AA)模型大鼠和实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型小鼠有治疗作用。

**2.3 理化性质测定**

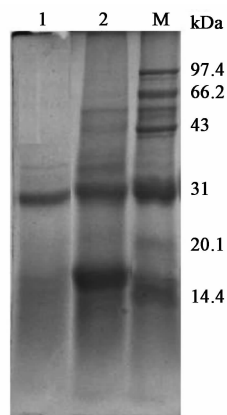
**2.3.1 一般理化性质** AmGP-2 易溶于水,不溶于甲醇、乙醇、乙醚、丙酮、三氯甲烷等有机溶剂。 $\text{pH}\ 5.8$ 。比旋光度 $[\alpha] -56.38^{\circ}$ 。

**2.3.2 相对分子质量** 采用 SDS-PAGE 检测,分离胶质量分数 12.5%,浓缩胶质量分数 5%,上样量  $10\ \mu\text{L}$ ,AmGP-2 相对分子质量约 31 kDa,见图 1。

### 2.3 理化性质测定

**2.3.1 一般理化性质** AmGP-2 易溶于水,不溶于甲醇、乙醇、乙醚、丙酮、三氯甲烷等有机溶剂。 $\text{pH}\ 5.8$ 。比旋光度 $[\alpha] -56.38^{\circ}$ 。

**2.3.2 相对分子质量** 采用 SDS-PAGE 检测,分离胶质量分数 12.5%,浓缩胶质量分数 5%,上样量  $10\ \mu\text{L}$ ,AmGP-2 相对分子质量约 31 kDa,见图 1。



1. 纯品;2. 粗品;M. Marker

图 1 黄芪糖蛋白的 SDS-PAGE 检测

**2.3.3 等电点测定** 取 AmGP-2 单体少量,加 1% 甘氨酸溶液  $200\ \mu\text{L}$  溶解,转移至  $10\ \text{kDa}$  超滤管,离心( $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,15 min,下同),加入 1% 甘氨酸溶液  $200\ \mu\text{L}$ ,离心,重复 3 次,取上清液,过滤,收集滤液为样品,精密称取  $2.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  样品  $10\ \mu\text{g}$  置于胶上进行测试,固定 30 min,染色 30 min,脱色至本底

无色,见图 2,PI 约 4.7。

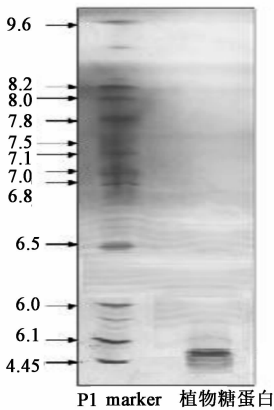


图 2 黄芪糖蛋白等电点测定

**2.3.4 蛋白质的含量测定** 精密量取  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  牛血清蛋白对照品,分别加水配成 0, 0.25, 0.5, 0.75,  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液,精密吸取对照品和样品各  $10 \mu\text{L}$  置于同一块 96 孔板中,每孔加入 BCA 工作液  $200 \mu\text{L}$ ,充分混匀,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min,冷却至室温,用酶标仪于  $562 \text{ nm}$  处测定吸光度 ( $A$ ),以  $A$  为纵坐标,质量浓度 ( $C$ ) 为横坐标,得回归方程  $A = 0.002C + 0.1137 (R^2 = 0.9954)$ ,线性范围  $0 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,计算 AmGP-2 中蛋白质质量分数 56.7%。

**2.3.5 糖类成分的含量测定** 配制  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖对照品溶液,加水稀释成 0.01, 0.02, 0.03, 0.04,  $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的系列溶液,以水作空白。分别精密量取各溶液 2 mL 于试管中,加入 5% 苯酚 1.0 mL,摇匀后迅速滴加浓硫酸 5.0 mL,放置 5 min,  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  加热 15 min,放置室温,于  $490 \text{ nm}$  测定  $A$ ,以  $A$  为纵坐标,葡萄糖质量分数为横坐标,得标准曲线  $Y = 6.815X - 0.0041 (R^2 = 0.998)$ ,计算 AmGP-2 中糖类成分质量分数 29.3%。

## 2.4 光谱分析

**2.4.1 紫外光谱图** 取  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  AmGP-2 溶于水,以水为空白,在  $200 \sim 800 \text{ nm}$  进行全波长扫描,结果显示在  $206, 280 \text{ nm}$  处各有 1 个吸收峰,说明 AmGP-2 中含有蛋白质和糖类成分。

**2.4.2 红外光谱图** 取 AmGP-2 少量,采用 KBr 压片法于  $500 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$  扫描,见图 3,结果显示在  $3200 \sim 3600 \text{ cm}^{-1}$  间有吸收峰,主要是由多糖游离羟基的伸缩振动引起的;在  $2800 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$  的吸收峰是 C-H 伸缩振动,这一区域的吸收峰为糖类成分的特征吸收峰;  $1630 \text{ cm}^{-1}$  处吸收峰为 -CHO 的 C=O 伸缩振动造成的,是肽链上酰胺基的吸收峰;在  $840 \text{ cm}^{-1}$  处 1 个明显吸收峰是  $\alpha$ -型 C-H 变角振

动的特征吸收峰,表明存在  $\alpha$ -糖苷键,表明 AmGP-2 既含蛋白质又含有糖类成分,为糖蛋白。

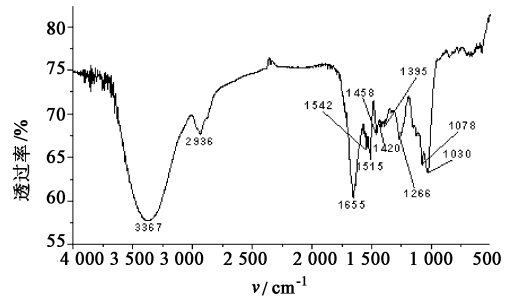


图 3 黄芪糖蛋白 IR

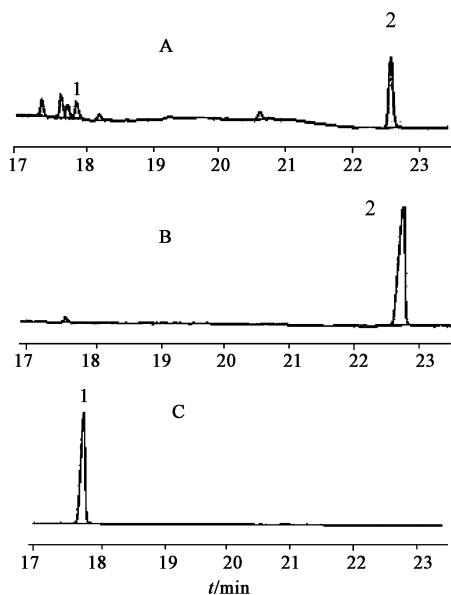
**2.5 氨基酸组成分析** 称取 2 份 AmGP-2,每份 10 mg,分别置于 10 mL 水解管中,各加入  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 10 mL,将水解管置于  $(110.0 \pm 1.0) \text{ }^\circ\text{C}$  恒温干燥箱中,水解 22 h,冷却后过滤,吸取水解液 5 mL,加  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 和 HCl 溶液调至 pH 7.0,加  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 定容至 25 mL。精密量取该水解样品液 2 mL,加入  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 2 mL,摇匀,作为供试品溶液。吸取混合氨基酸对照品溶液和测试品溶液 2~3 mL,经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,经氨基酸自动分析仪测定 ( $n = 3$ ),见表 1,结果发现 AmGP-2 含有 18 种氨基酸,总质量分数 26.38%,其中谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸含量较高。

表 1 黄芪糖蛋白中氨基酸组成成分

氨基酸残基	质量分数/%	氨基酸残基	质量分数/%
天冬氨酸 (Asp)	3.45	蛋氨酸 (Met)	0.17
苏氨酸 (Thr)	1.93	异亮氨酸 (Ile)	1.23
丝氨酸 (Ser)	1.40	亮氨酸 (Leu)	1.43
谷氨酸 (Glu)	4.09	酪氨酸 (Tyr)	1.06
脯氨酸 (Pro)	1.80	苯丙氨酸 (Phe)	1.01
甘氨酸 (Gly)	1.92	赖氨酸 (Lys)	2.16
丙氨酸 (Ala)	1.21	组氨酸 (His)	0.83
胱氨酸 (Cys)	0.45	色氨酸 (Trp)	0.01
缬氨酸 (Val)	1.80	精氨酸 (Arg)	0.81

**2.6 单糖组分的测定**<sup>[10]</sup> 称取 AmGP-2 10 mg,加入  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  三氟乙酸 2 mL,  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  水解 7 h,于  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 ( $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 10 min,取上清液,重复操作 3 次。配置糖腈乙酸酯衍生物进行气相色谱分析,色谱条件为柱子 hp-5 毛细管柱 ( $0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ m}, 0.25 \mu\text{m}$ ),FID 离子检测器检测,见图 4。结果显示 AmGP-2 中单糖的保留时间分别为 17.395, 17.681, 17.778, 17.915, 22.743 min,与葡萄糖 (22.738 min)、阿拉伯糖 (17.738 min)、甘露糖 (22.449

min)、半乳糖(23.385 min)、木糖(17.965 min)对照品的图谱比较,确定 AmGP-2 中单糖主要含有阿拉伯糖、葡萄糖,还有 2 种未检测出的单糖。



A. 供试品; B, C. 对照品; 1. 阿拉伯糖; 2. 葡萄糖

图 4 黄芪糖蛋白 GC

### 3 讨论

AmGP-2 溶于水,是一种酸性蛋白,含有 18 种氨基酸,人体必需氨基酸占总氨基酸的 39%,其中谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸含量较高。前期研究发现 AmGP-2 对小鼠脾淋巴细胞具有显著的免疫抑制作用,经 MTT 检测发现其质量浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对静止和活化状态的脾淋巴细胞均具有抑制作用<sup>[5]</sup>。AmGP-2 可改善 AA 关节炎,亦可提高 AA 大鼠对抗其他感染的能力<sup>[6]</sup>;同时还能显著改善 EAE 小鼠的症状,作用机制可能与减少炎性细胞的浸润有关<sup>[9]</sup>。

免疫抑制剂已被广泛用于治疗器官移植抗排斥

反应和自身免疫性疾病,但各类药物在抑制机体免疫反应的同时,均会产生不同程度的毒副作用,通过对 AmGP-2 理化性质和组成成分的测定,同时鉴于黄芪特有的双向调节作用,该成分有望研发成为一种新型中药免疫抑制剂。

### [参考文献]

- [1] 孙册,莫汉庆. 糖蛋白与蛋白聚糖结构、功能和代谢[M]. 北京:科学出版社,1998:22.
- [2] 朱科学,周惠明,郭晓娜. 植物糖缀合物的研究方法[J]. 食品科学,2002,23(12):141.
- [3] 阚建全. 甘薯糖蛋白的糖链结构与保健功能研究[D]. 重庆:西南农业大学,2003.
- [4] 杨向竹,薛慧清,冯前进,等. 黄芪糖蛋白对 T 淋巴细胞增殖活性的影响[J]. 上海中医药大学学报,2009,23(5):66.
- [5] 杨向竹,薛慧清,冯前进,等. HQ0805 对小鼠淋巴细胞体外活化的抑制作用[J]. 山西中医,2009,25(8):45.
- [6] 赵俊云,刘亚明,冯前进,等. 黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠外周血细胞因子及关节滑膜组织形态学的影响[J]. 上海中医药杂志,2010,44(5):78.
- [7] 赵俊云,刘亚明,冯前进,等. 佐剂性关节炎大鼠细胞凋亡的实验观察[J]. 中华中医药杂志,2010,25(11):1868.
- [8] 章培军,郭敏芳,张丽红,等. 黄芪糖蛋白抑制小鼠 EAE 的作用研究[J]. 山西大同大学学报:自然科学版,2012,12(5):42.
- [9] 吴东儒. 糖类的生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,1993:822.
- [10] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州:浙江大学出版社,1999:45.

[责任编辑 刘德文]