

## 阿魏侧耳酸提水溶性多糖的研究

董洪新<sup>1,2</sup> 吕作舟<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 烟台师范学院生命科学学院 烟台 264025)

(<sup>2</sup> 华中农业大学应用真菌研究所 武汉 430070)

**摘 要:** 从热水浸提过的阿魏侧耳(*Pleurotus ferulae*)子实体中用 3% 的三氯乙酸提取出另一种水溶性粗多糖 PFA, 将 PFA 经 Sevage 法脱蛋白、透析、CTAB 络合去沉淀后得多糖 PF<sub>3</sub>。苯酚硫酸法测得 PF<sub>3</sub> 糖含量为 94.1%; 用光散射和 GPC 联机测得 PF<sub>3</sub> 重均分子量为  $1.965 \times 10^6$ ; 用 IR 和 GC 分析了组成和结构, PF<sub>3</sub> 由鼠李糖、木糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成, 含有  $\alpha$ -糖苷键。同时研究了 PF<sub>3</sub> 对核糖核酸酶的抑制作用, 表明在浓度 5mg/mL 时其抑制率可达 44.4%。

**关键词:** 阿魏侧耳, 多糖, 核糖核酸酶, 抑制

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)01-0101-03

阿魏侧耳(*Pleurotus ferulae* lanzii)又名阿魏蘑、白灵菇等, 具有较高的食、药用价值。我们曾用热水浸提子实体, 经分离纯化得到两种具有抗肿瘤活性的多糖 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub><sup>[1]</sup>。从热水浸提过的残渣中用 3% 的三氯乙酸提取, 经分离纯化得另一水溶性多糖 PF<sub>3</sub>, 同时对 PF<sub>3</sub> 理化特性进行了初步研究, 并且研究了 PF<sub>3</sub> 对核糖核酸酶(RNase)的抑制作用, 国内外尚无阿魏侧耳多糖这方面的研究报道。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 阿魏侧耳子实体:** 由北京金信食用菌有限公司提供。

**1.1.2 试剂:** D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖、L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-核糖、D-岩藻糖等为生化试剂(上海试剂二厂); CTAB(溴化十六烷基三甲基铵) RNase(核糖核酸酶)为 Sigma 公司产品; RNA(注射用)由如皋生物化学制药厂生产; 透析袋(D32)为 Bromma 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 多糖的分离纯化和分析

**1.2.1 粗多糖 PFA 的提取:** 将热水浸提过的子实体残渣加 8 倍量的 3% 的三氯乙酸浸提, 15℃ 过夜, 过滤, 离心, 将提取液用 20% 的 NaOH 中和至 pH 为 7, 浓缩、醇析沉淀、丙酮洗涤、真空冷冻干燥得酸提水

溶性粗多糖 PFA<sup>[2]</sup>。

**1.2.2 酸提粗多糖的纯化:** 将 PFA 用 Sevage 法脱蛋白后, 加等体积的 0.1mol/L CTAB 和硼酸盐缓冲液(pH8), 离心, 去除沉淀、上清流水透析, 乙醇沉淀、真空冷冻干燥得白色粉末 PF<sub>3</sub><sup>[3]</sup>。

**1.2.3 糖含量的测定:** 采用苯酚-硫酸法, 以葡萄糖为标准物, 用 722 型光栅分光光度计作比色分析<sup>[4]</sup>。

**1.2.4 紫外分光光度法:** 将 PF<sub>3</sub> 配成水溶液, 采用 UV-160A 紫外可见光谱仪扫描(200~300nm)。

**1.2.5 分子量的测定:** 采用凝胶渗透色谱和光散射联用法(GPC-LS)测量。

**1.2.6 分子构型分析:** 采用红外光谱分析, 用 Nicolet FT-IR 红外光谱仪进行测定, 以 KBr 为参照物。

**1.2.7 糖组成分析:** 采用气相色谱法, 使用 GC-9A 气相色谱仪。

#### 1.3 多糖对核糖核酸酶(RNase)的抑制试验

**1.3.1 RNase 的活性测定:** 参照文献 5 进行。

**1.3.2 缓冲液的配制:** 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液及磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液按文献 6 配制。

**1.3.3 多糖对 RNase 的抑制作用:** 在系列具塞试管中, 分别加入 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)1.0mL, 0.06% RNA 1.0mL, 2 $\mu$ g/mL RNase 和不同浓度的多糖 PF<sub>3</sub>(1mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4mg/mL, 5 mg/mL)0.5mL, 于 37℃ 反应 5min, 加入 1.0 mol/L HCl 2.5mL, 并在加入 HCl 1min 时读出

基金项目: 湖北省重点科技计划资助项目(952P1007)

作者简介: 董洪新(1976-), 男, 山东高密人, 硕士, 助教, 主要从事应用真菌方面的教学和科研工作。Tel: 86-535-6681053; Fax: 86-535-6014101; E-mail: ytdhx@163.com

收稿日期: 2003-05-20, 修回日期: 2003-08-18

$OD_{420}$  值,计算抑制率<sup>[7]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 多糖的基本物理性质

PF<sub>3</sub> 为白色粉末,较难溶于冷水,易溶于热水或稀酸溶液,其水溶液浓度较大时呈胶体状,易被醇、酮等有机溶剂析出。

### 2.2 多糖的糖含量分析

以不同浓度的葡萄糖溶液与苯酚-硫酸反应,在 490nm 处测吸光度,得到多糖浓度  $x$  (mg/mL) 与吸光度  $y$  之间线性方程  $y = -0.0314 + 0.2816x$ ,相关系数  $r = 0.9968$ ,由此计算出多糖 PF<sub>3</sub> 的糖含量为 94.1%,可见 PF<sub>3</sub> 的糖含量较高。

### 2.3 紫外光谱分析

多糖 PF<sub>3</sub> 的紫外扫描结果表明,PF<sub>3</sub> 仅在 200nm 显示多糖吸收峰,无 260nm 的核酸吸收峰和 280nm 处的蛋白质吸收峰,说明 PF<sub>3</sub> 不含核酸和蛋白质。

### 2.4 分子量测定

光散射强度在多角度激光散射仪(DAWN,DSP)于 632.8nm 波长和 25℃ 下测量,折光指数增量 (dn/dc) 为 0.140mL/g,溶剂为 0.1mol/L 的 NaCl,溶剂 RI 值为 1.333。分子量测定结果(表 1)表明,PF<sub>3</sub> 分布宽度较接近于 1,说明其组分比较均一。PF<sub>3</sub> 的分子量与 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 的分子量(见文献 [1])相比,三者的分子量各不相同,说明 PF<sub>3</sub> 为另一种多糖组分。

表 1 多糖分子量统计结果

Table 1 Results of molecular weight of PF<sub>3</sub>

Sample	t/min	Mn(g/mol)	Mw(g/mol)	Polydispersity (Mw/Mn)
PF <sub>3</sub>	11.554 - 23.983	$1.418 \times 10^6$	$1.965 \times 10^6$	1.385

### 2.5 红外光谱分析结果

从 PF<sub>3</sub> 的红外光谱图(图 1)可以看出,PF<sub>3</sub> 在 1250cm<sup>-1</sup> (O-H), 1640cm<sup>-1</sup> (C=O) 和 2925cm<sup>-1</sup> (C-H) 处显示出多糖的特征吸收峰,PF<sub>3</sub> 在 850cm<sup>-1</sup> 有吸收,表示有  $\alpha$ -糖苷键吸收峰,而在 890cm<sup>-1</sup> 无  $\beta$ -糖苷键吸收峰,且在 920cm<sup>-1</sup>、850cm<sup>-1</sup>、760cm<sup>-1</sup> 处有葡萄糖吡喃糖特征吸收峰;而 920cm<sup>-1</sup> 吸收峰相对较强,表明含  $\alpha$ -D-葡萄糖。

### 2.6 多糖的单糖组成分析

将 PF<sub>3</sub> 制成三甲基硅烷衍生物进行气相色谱分析,标准单糖和多糖 PF<sub>3</sub> 的水解衍生物的气相图谱见图 2。与标准单糖比较,根据气相色谱分析中各

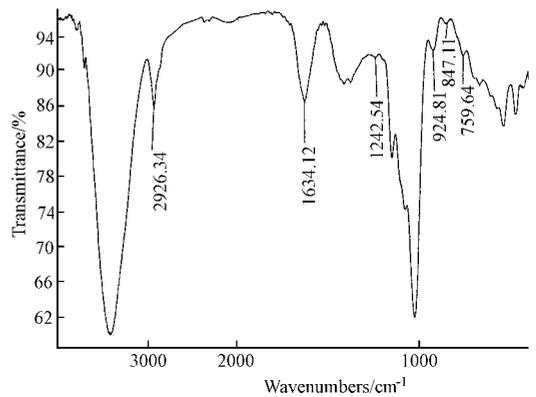


图 1 PF<sub>3</sub> 的红外光谱图

Fig. 1 IR spectrum of PF<sub>3</sub>

峰面积算出单糖组成的百分比。多糖 PF<sub>3</sub> 的单糖组成和含量汇集于表 2。从中可以看出,PF<sub>3</sub> 由鼠李糖、木糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成,其中含有较多的葡萄糖和半乳糖。PF<sub>3</sub> 的单糖组成和含量与 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 的单糖组成(见文献 [1])相比,三者的单糖组成和含量不相同,说明 PF<sub>3</sub> 为不同于 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 的另一种多糖组分。

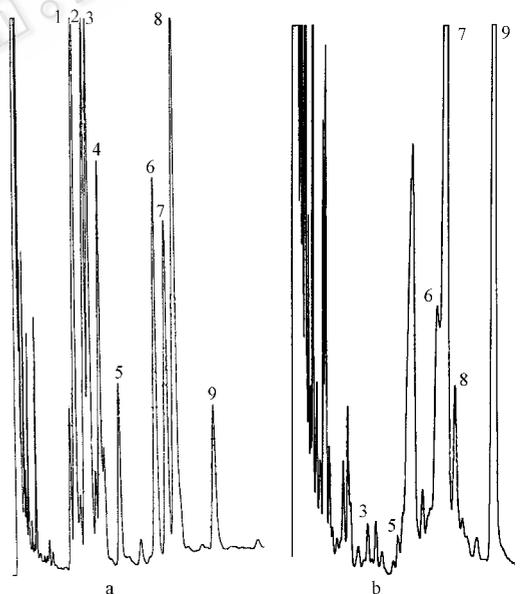


图 2 标准单糖(a)与 PF<sub>3</sub> 衍生物(b)的气相色谱图

Fig. 2 GC traces of standard sugar(a) and PF<sub>3</sub>(b)

1. Arabinose 2. Ribose 3. Rhamnose 4. Fucose;  
5. Xylose 6. Glucose 7. Galactose 8. Mannose.

表 2 多糖 PF<sub>3</sub> 的单糖组成和含量

Table 2 Content of components of PF<sub>3</sub>

Sample	Content/%				
	Rha	Xyl	Glc	Gal	Man
PF <sub>3</sub>	0.82	2.46	37.05	54.74	4.92

Rha :Rhamnose ;Xyl :Xylose ;Glc :Glucose ;Gal :Galactose ;Man :Mannose.

## 2.7 PF<sub>3</sub> 对 RNase 的抑制结果

不同浓度的 PF<sub>3</sub> 对 RNase 的抑制作用结果见表 3。从中可以看出,当 RNA 浓度为 0.06% 酶浓度为 2μg/mL,反应 5min 时,PF<sub>3</sub> 对 RNase 的有抑制作用。随着多糖浓度的增加,抑制率增加,在 5 mg/mL 较高浓度时,PF<sub>3</sub> 对 RNase 的抑制率高达 44.4%。

表 3 多糖 PF<sub>3</sub> 对 RNase 的抑制率

Table 3 Inhibition of PF<sub>3</sub> on RNase

Concentration of PF <sub>3</sub> ( mg/mL )	1	2	3	4	5
Inhibition rate/ %	6.8	18.5	26.8	40.9	44.4

## 3 讨论

通过对多糖 PF<sub>3</sub> 的分析测试,与已报道的另两种多糖组分 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 在分子量和单糖组成及含量等方面相比存在不同,说明 PF<sub>3</sub> 为不同于 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 的另一种多糖组分,表明在经热水浸提出 PF<sub>1</sub> 和 PF<sub>2</sub> 的阿魏侧耳子实体残渣中还可以用酸提取出另一种多糖 PF<sub>3</sub>。多糖的结构测定是非常困难的,本研究通过红外光谱法对其分子构型作了初步分析,当然要彻底弄清楚多糖的结构,还需通过其他物理学、化学和生物学等方法来进行大量的工作。外源性核糖

核酸(RNA)可促进蛋白质的生物合成,调节细胞分化和基因表达,临床上应用较广,疗效显著。为了防止体内核糖核酸酶(RNase)降解作用,本文研究了 PF<sub>3</sub> 对 RNase 的抑制作用,以期与核糖核酸的治疗起协同作用,提高核糖核酸的疗效进行初步试验,其作用机理及抑制作用最佳条件尚待进一步探讨。

本文研究了 PF<sub>3</sub> 的基本理化特性和对 RNase 的抑制作用,PF<sub>3</sub> 是否有其他生物活性和实用价值仍需做继续深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 董洪新,吕作舟.阿魏侧耳多糖的分离纯化与抗肿瘤活性的研究.微生物学通报,2003,30(2):16-19.
- [2] 张丽萍,李森,黄丽萍.金顶侧耳酸提水溶性多糖的研究.真菌学报,1993,12(2):158-162.
- [3] 张欣,吕作舟.香菇菌盖多糖的提取纯化及其理化性质的研究.华中农业大学学报,1998,17(6):537-541.
- [4] 张惟杰主编.糖复合物生化研究技术.第二版.杭州:浙江大学出版社,1999,1-540.
- [5] Roth J S, Milstain S W A. New assay method with P<sup>32</sup> labeled yeast ribonucleic acid. J BioChem, 1952, 196:489
- [6] 杨新美主编.食用菌研究法,北京:中国农业出版社,1998,310-314.
- [7] 李泰明,王香琴,吴文俊,等.几种多糖对核糖核酸酶的抑制作用.药物生物技术,1997,2(2):109-113.

## Study on Soluble Polysaccharide by Acid Extraction from *Pleurotus ferulae*

DONG Hong-Xin<sup>1,2\*</sup> LU Zuo-Zhou<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

(<sup>2</sup> Institute of Applied Mycology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** The water-soluble polysaccharide PFA isolated by 3% trichloroacetic acid extraction from residues of fruit bodies of *Pleurotus ferulae*, Proteins were removed from PFA by Sevag method, and dialysed with water, precipitated with CTAB, and supernatant precipitated with alcohol, PF<sub>3</sub> was obtained. PF<sub>3</sub> contained 94.1% carbohydrate, the Mw of PF<sub>3</sub> was 1.975 × 10<sup>6</sup>. The components and structure of PF<sub>3</sub> were analyzed by IR and GC. PF<sub>2</sub> consisted of rhamnase, xylose, glucose, galactose, mannose; and PF<sub>3</sub> contained α-glucoside. It was found PF<sub>3</sub> had inhibition on RNase, inhibition rate was 44.4% at 5mg/mL concentration of PF<sub>3</sub>.

**Key words:** *Pleurotus ferulae*, Polysaccharide, RNase, Inhibition

Foundation item: Key Project of Science Technology of Hubei Province(952P1007)

\* Corresponding author. Tel 86-535-6681053; Fax 86-535-6014101; E-mail: ytdhx@163.com

Received date: 05-20-2003