

肉色杯伞抗炎蛋白的提纯及某些理化性质

柳雪枚 肖 宣 李虹奇

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

通过硫酸铵沉淀和 DEAE-Sephadex A-25 柱层析等步骤, 从肉色杯伞 (*Clitocybe geotropa*) 子实体中, 获得抗炎蛋白质晶体, 纯化后的抗炎蛋白质为针状结晶, 平均收率为 40 mg/0.5 kg。

经聚丙烯酰胺盘状电泳鉴定为单一区带, Sephadex G-100 柱层析 UV 280 nm 吸收峰为均一峰形。分子量 3 万左右。据测定, 其 N-末端氨基酸为缬氨酸。该蛋白由 17 种氨基酸按不同比例构成, 其中苏氨酸居首位, 其次为丝氨酸。此肽不含糖。

关键词 肉色杯伞; 抗炎蛋白; N-末端

近年来, 国内外已有不少研究者从不同生物体中获得具有抗炎活性的多肽和蛋白质^[1-4], 但还未见从真菌中提取抗炎多肽或蛋白质的报导。我们实验室自 1980 年从麝香中获得抗炎多肽^[5]之后, 又相继从哺乳动物和节肢动物中获得过抗炎蛋白质。

本文报导从食用真菌——肉色杯伞中获得的抗炎蛋白结晶及其某些理化性质, 这将为进一步研究具有抗炎活性多肽蛋白的结构与功能的关系提供一些资料。

材料与 方法

(一) 材料

1. 原料: 肉色杯伞 (*Clitocybe geotropa*) 采购自山西省五台山区。

2. 仪器: 系统柱层析仪 (瑞典 LKB), 旋转浓缩仪 (日本 EYELA), 氨基酸自动分析仪 (日本日立 835), 冷冻离心机 (日本日立)。

3. 试剂: 硫酸铵, 甲叉双丙烯酰胺, 丙烯酰胺, 过硫酸铵, 四甲基乙二胺, DNS 试剂, 聚酰胺膜 (以上均国产)。透析膜 (美国 UNION CARBIDE), Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-25 (以上均瑞典 Pharmacia)。

(二) 方法

1. 提纯: (1) 取 500 g 肉色杯伞干粉, 用 0.9% NaCl 浸泡湿润, 于 75℃ 水浴 10 min, 用

10,000 r/min 冷冻离心机离心 20 min, 上清液加入硫酸铵 (59 g/100 ml 上清液), 于 4℃ 放置过夜, 再用 10,000 r/min 冷冻离心, 用蒸馏水溶解沉淀 (15 ml 蒸馏水/100 ml 上清液), 15,000 r/min 冷冻离心, 弃去不溶物; 上清液对 0.3% NaCl 于 4℃ 透析三天, 袋内部分旋转浓缩, 浓缩液 20 ml 待上柱。(2) 上述浓缩液过经 0.3% NaCl 平衡后的 DEAE-Sephadex A-25 柱, 用 0.3% NaCl 洗脱, UV 280nm 监测, 收集吸收峰部分, 经旋转浓缩至 50 ml, 对蒸馏水透析 (4℃, 两天), 针状晶体析出。

2. 聚丙烯酰胺盘状电泳: 采用 Davis^[6] 高 pH 不连续体系, 胶浓度 10%。

3. Sephadex G-100 层析用蒸馏水洗脱, UV 280 nm 监测。

4. N-末端测定: 标准氨基酸混合物与样品分别用 DNS-Cl (二甲基氨基苯磺酰氯) 标记。参考 Minguang Lee^[7] 和 Woods 及 Wang^[8] 的方法做双向聚酰胺薄膜层析。

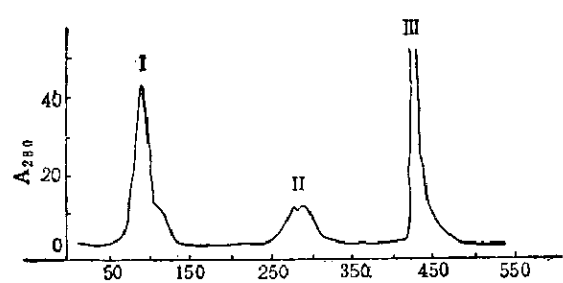
5. 氨基酸成分分析: 样品用 6 mol/L HCl 在真空封闭玻管中, 于 110℃ 水解 24 小时, 于氨基酸自动分析仪上测定。

结 果

(一) 提纯

经硫酸铵沉淀后, 对 0.3% NaCl 透

本文于 1986 年 12 月 29 日收到。



洗脱体积 Elution volume (ml)

图1 DEAE-Sephadex A-25 柱层析图

Fig. 1 Profile of DEAE-Sephadex A-25 column chromatography

柱: Column: 3cm×37cm
流速: Current velocity: 5ml/10min

析, 又经 DEAE-Sephadex A-25 柱层析 (图1), 将吸收峰 I 部分浓缩, 对蒸馏水透析, 即可析出具抗炎作用的蛋白结晶。

(二) 某些理化性质

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: (见图2)。提纯的抗炎蛋白于凝胶电泳上, 经考马氏亮蓝染色为一区带。

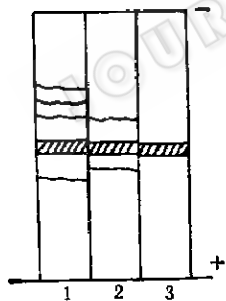


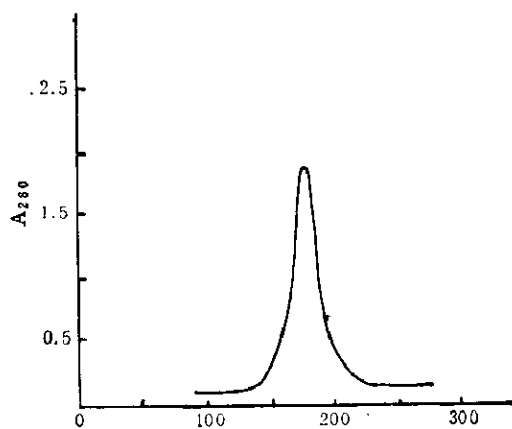
图2 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 10% Polyacrylamide gel electrophoresis Patterns

1. 硫酸铵沉淀的样品
Sample of ammonium sulphate fraction
2. DEAE-Sephadex A-25 柱洗脱样品
Sample of DEAE-Sephadex A-25 column elution
3. 抗炎蛋白 Anti-inflammatory protein

2. Sephadex G-100 柱层析: 见图3, 为一均匀 UV 280 nm 吸收峰。

3. 氨基酸组成: (见表1)。



洗脱体积 Elution volume (ml)

图3 抗炎蛋白的 Sephadex G-100 柱层析

Fig. 3 Sephadex G-100 column chromatography of anti-inflammatory protein

柱: Column 1.8cm×40cm
流速 Current velocity: 3.5 ml/10 min

表1 抗炎蛋白的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of anti-inflammatory protein

氨基酸 Amino acid	残基数/克分子 Residue/mol	整数比 Nearest integer
Asp	21.48	21
Thr	59.47	59
Ser	35.21	35
Glu	6.13	6
Gly	25.06	25
Ala	21.12	21
Val	18.44	18
Met	1.05	1
Lle	16.24	16
Ieu	20.45	20
Tyr	2.99	3
Phe	17.13	17
Lys	2.62	3
His	4.27	4
Arg	1.0	1
Pro	14.83	15

从表1可见,苏氨酸残基数量居第一位,其次为丝氨酸、甘氨酸、天门冬氨酸和丙氨酸。

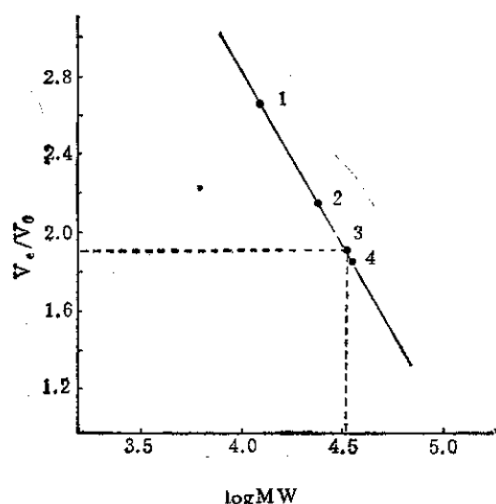


图4 Sephadex G-100 凝胶过滤测定抗炎蛋白分子量

Fig. 4 Estimation of the molecular weight of anti-inflammatory protein by sephadex G-100

- 1 细胞色素 C Cytochrome C (12400)
- 2 胰蛋白酶 Trypsin (24000)
- 3 抗炎蛋白 Anti-inflammatory protein
- 4 胃蛋白酶 Pepsin (35000)

4. 分子量估算: 根据氨基酸成分分析的结果及凝胶过滤法测定分子量的结果见图4, 估算出此蛋白分子量在三万左右。

5. N-末端氨基酸分析: (见图5)。

用 DNS 法分析, 聚酰胺双向层析结果表明, N-末端为缬氨酸, 与标准 DNS-缬氨酸 R_f 值相同。

6. 用蒽酮法测定结果证明此抗炎蛋白不含糖。

讨 论

由上述实验结果可见, 我们从食用真

菌肉色杯伞中获得的抗炎蛋白晶体, 抗炎活性高, 纯度好, 有可能进一步找出其活性片断, 并与从其他生物体中已经获得的抗

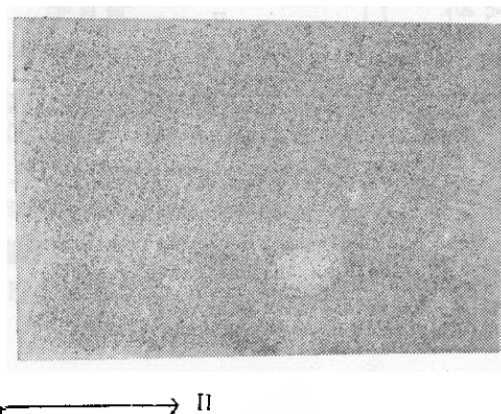


图5 聚酰胺薄膜双向层析图

Fig. 5 Two-dimensional separation by Polyamide Layer Sheets

炎多肽或蛋白质比较研究它们的结构与功能关系, 将是有实际意义的工作。

参 考 文 献

- [1] 木村正康等: 药学杂志, **98**: 422, 1978.
- [2] Shkenderv, S. et al.: *Toxicon*, **20** (1): 317, 1982.
- [3] 青沼 繁等: 药学杂志, **104**(4): 362, 1984.
- [4] 夏东元等: 生物化学杂志, **2**(1): 33, 1986.
- [5] 于德泉等: 药学报, **15**(5): 306, 1980.
- [6] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.
- [7] Minguarg Lee.: *Journal of chromatography*, **116**: 462, 1976.
- [8] Woods, K. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **133**: 369, 1967.

PURIFICATION AND SOME PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE PROTEIN FROM *CLITOCYBE GEOTROPA*

Liu Xuemei Xiao Xuan Li Hongqi

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

The anti-inflammatory protein has been fractionated and purified from *Clitocybe geotropa* by means of ammonium sulfate fraction and chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

It is a kind of needle-like crystal. The average yield is about 40 mg/0.5 kg.

One band is appraised with polyacrylamide gel electrophoresis and one peak is presented with Sephadex G-100 column chromatography at UV 280 nm. Molecular weight

is about 30,000 dalton.

According to the measurement its N-terminal amino acid is one of Val. This protein is made up of 17 amino acids in different ratio. Thr is in the first place and Ser is the second. One does not contain any carbohydrate.

Key words

Clitocybe geotropa; Anti-inflammatory protein; N-terminal