

绿色巴夫藻硒多糖的提取、分离与纯化*

张新宇 王雷 李光友¹ 朱延雄²

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

¹(国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266003) ²(青岛市科技情报中心 青岛 266003)

提要 于1995年3—7月采用本实验室培养的绿色巴夫藻,经沸水提取及去除蛋白、小分子物等杂质后,通过Sephadex G-50柱层析进行分离、纯化实验。结果表明,分离纯化所得到的两种多糖——4P1和4P2,通过醋酸纤维素薄膜电泳及Sephadex G-100凝胶过滤检验纯度后,证实其均为单一含硒多糖,且都带负电。两种硒多糖含硒量都较低,分别为77mg/g和220mg/g。

关键词 硒多糖 分离 纯化

学科分类号 Q539

自1957年Schwarx发现(王远亮,1987)硒具有可替代V_E防止营养性肝坏死的特性以来,人们对硒的营养性及药用性兴趣越来越浓。据报道,微量元素硒在人体中主要以谷胱甘肽过氧化物酶的形式参与生理代谢活动,从而具有防癌抑癌、清除人体有害自由基、预防疾病等作用(王远亮,1987)。在发现硒的营养性之前,人们就已经发现过量无机硒的服用能使人体中毒。实验表明:以口服有机硒制剂和口服无机硒制剂做分组对照实验,发现有机硒的活性远高于无机硒,而且毒性很小(谢丽琪等,1990)。因此,深入研究有机硒,对于更好地利用硒的营养性而防止其毒性具有重要意义。

很多种多糖是广谱的非特异性免疫促进剂,它们可以促进体内体液免疫及细胞免疫,加强抗体或补体生成,从而达到抑制和消除癌细胞的效果,而对人体正常细胞并无不良效应(方积年,1986)。由此,硒多糖有望既作为有机硒制剂发挥硒的营养性,又作为一种免疫多糖增强机体免疫功能。本实验从富硒海洋微藻中提取硒多糖并进行分离、纯化及硒含量测定。

1 材料与方法

1.1 材料

由本实验室从5种海洋微藻中筛选出的绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*,以下简称为4P微藻),细胞壁薄,具较强的富硒能力。经过人工协迫培养,4P干藻粉含硒量达1mg/g。

1.2 方法与步骤

1.2.1 粗提 干藻粉经沸水煮提3次,每次提5—7h,3000r/min离心20min,收集上

* 国家“八五”科技攻关资助项目,85-08-07-04号。张新宇,男,出生于1972年4月,硕士,Fax:0086-0532-2879079

收稿日期:1998-04-09,收修改稿日期:1999-08-09

清液(方积年, 1984)。

1. 2. 2 检测多糖含量 用硫酸- 苯酚法(Dubois, 1956), 采用淀粉标准曲线。

1. 2. 3 硒含量测定 原子荧光法, 仪器为 XGY- 1011 型多功能原子荧光分析仪。

1. 2. 4 去杂质 采用 Seavage 法(Staub, 1965), 6-10 次去除蛋白, 静水透析 1h(用于测定透析外液中硒及糖含量), 流水透析 24h 去除小分子杂质。

1. 2. 5 纯化分离及纯度检验 粗提液加五倍体积工业酒精析出其中多糖(樊绘曾, 1983), 无水乙醇洗涤, 真空抽滤, 以适量蒸馏水溶解, 配液浓度为大约 300mg/ ml。经 Sephadex G- 50 柱层析进一步纯化。柱型为 20mm × 920mm, 上样体积 3. 5ml, 流速 15ml/ h。

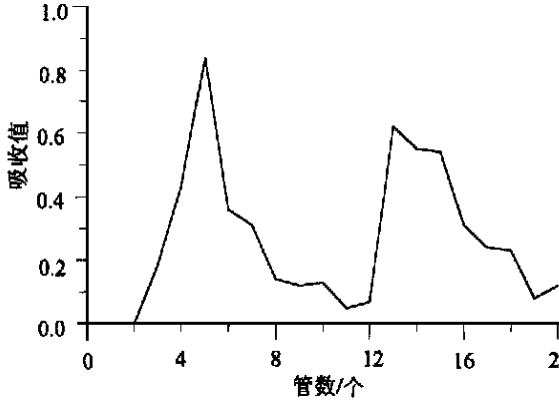


图 1 4P 微藻多糖纯化图谱

Fig. 1 Chromatography of 4P microalgae polysaccharide on Sephadex G- 50 gel filtration

每试管收集 3ml 洗出液, 按硫酸苯酚法检测。检测时吸取 0. 2ml, 加蒸馏水 0. 8ml, 测多糖含量¹⁾, 比色杯厚度为 0. 5cm。

纯化所得多糖按峰合并, 移入透析袋中, 置于 40 ℃烘箱中浓缩至多糖浓度约为 0. 5mg/ ml。(1) 醋酸纤维薄膜电泳, 使用巴比妥缓冲液(pH= 8. 6, 离子强度为 0. 09), 在 120V 恒压条件下电泳 20min, 0. 5% 甲苯胺蓝溶液染色 5-10min, 0. 5% HAc 溶液漂洗、脱色数次(樊绘曾等, 1983)。(2) Sephadex G- 100 柱层析, 柱型为 20mm × 950mm, 以 0. 1mol/ L NaAc 溶液在 3ml/ h 流速下平衡 12h, 0. 1mol/ L NaCl 溶液洗脱, 流速 4ml/ h。洗脱液以每管 2ml 收集, 检测方法同 Sephadex G- 50 层析。

2 结果与讨论

2. 1 Sephadex G- 50 柱层析纯化分离结果

4P 微藻多糖经 Sephadex G- 50 柱层析纯化分离, 得到两个多糖峰(图 1)。经浓缩, 从峰 1 共收集多糖(以下简称 4P1) 3ml。从峰 2 共收集多糖(以下简称 4P2) 10ml。

2. 2 纯度检测结果

Sephadex G- 100 柱层析, 4P1 与 4P2 均峰形单一、左右基本对称, 表明 4P1 和 4P2 都是纯多糖(图 2)。

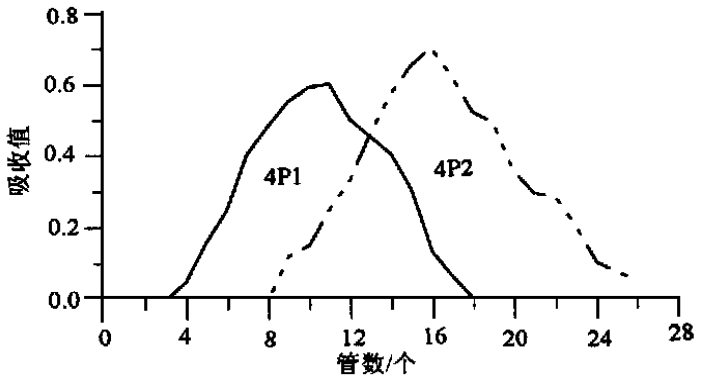


图 2 4P1、4P2 纯度检测图谱

Fig. 2 Chromatography of 4P1 and 4P2 on Sephadex G- 100 gel filtration

1) 为了简单迅速地得出曲线, 洗脱液的糖含量测定没有按标准的硫酸- 苯酚法。标准法为: 2ml 多糖液, 加 0. 05ml 80% 苯酚, 再加入 5ml 浓硫酸。实际操作为: 1ml 多糖液, 加 0. 025ml 80% 苯酚, 再加入 2ml 浓硫酸。

醋酸纤维素薄膜电泳, 4P1 和 4P2 都呈单一带, 表明两种多糖为纯物质。在微碱性条件下两种多糖均向正极移动, 说明它们带负电, 可能由于多糖携带的酸性基团所致。

2.3 硒含量、多糖含量跟踪测定结果(表 1、表 2)

表 1 4P 微藻固体样品硒含量

Tab. 1 Selenium content of solid samples of 4P microalgae

样品	干重(g)	硒含量($\mu\text{g/g}$)	总含硒量(mg)
4P 微藻粉	20.0	1000.0	20.00
4P 藻粉水提后残渣	13.8	1325.0	18.29
Sevage 法所分离蛋白	0.9	162.5	0.15

表 2 20克 4P 微藻粉水提液体样品硒及糖含量

Tab. 2 Selenium and sugar content of liquid samples of water-extracting 20g 4P microalgae

样品	数量(ml)	硒含量($\mu\text{g/ml}$)	总含硒量(μg)	糖含量(mg/ml)	总糖含量(mg)
粗提液	278	5.75	1599.0	7.025	1953.0
粗提液去蛋白后	210	4.00	840.0	6.075	1275.8
透析 1h 后外液	1000	0.01	10.0	0.025	25.0
透析 24h 后内液	198	3.24	641.5	4.60	910.8
4P1	3	0.03	0.1	0.440	1.3
4P2	10	0.11	1.1	0.500	5.0

2.3.1 硒含量 通过水提法共提取出 4P 微藻粉总硒 20mg 中的 1.599mg, 得硒率为 8.5%, 大部分硒都留在残渣中。粗糖得率为 9.75%, 透析后以硫酸-苯酚法测得糖含量为 910.8mg, 然而经醇析后实际得糖量小于此数, 醇析母液中仍含有少量糖分。4P1 及 4P2 硒多糖得率较低, 其中含硒量极微, 4P1 含硒 77mg/g, 4P2 含硒 220mg/g。如何提高硒多糖得率及提高硒在多糖上的结合率; 硒在 4P1、4P2 上的结合方式, 以及 4P1、4P2 本身结构都还不明确, 都有待进一步工作解决。经过一系列分离纯化步骤以后, 4P1 和 4P2 仍然含硒, 从理论上推测, 硒以化学键方式结合的可能性要大于物理吸附方式。

2.3.2 多糖含量 透析外液中含有少量硒和糖, 小分子糖类及部分硒在透析过程中流失。Sevage 法所去蛋白含硒率远高于多糖, 可能硒在 4P 微藻体内更容易与蛋白结合。

3 结语

通过水提及一系列纯化步骤, 从富硒海洋微藻中分离出 4P1 和 4P2 两种纯硒多糖, 虽然其得率和含硒量都很低, 却具有重要意义。硒多糖有望发挥硒与多糖的双重功效, 成为临床上治疗多种疾病尤其是肿瘤疾病的有效药物。

参 考 文 献

- 王远亮, 1987. 生物硒的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 6: 28—34
 方积年, 1984. 多糖的分离纯化及其纯度鉴别与分子量测定. 药学通报, 19(10): 46—49
 方积年, 1986. 多糖研究的现状. 药学报, 21(12): 944—950
 谢利琪, 欧阳政, 谢秀祯, 1990. 酵母同化无机硒作用的研究. 微生物学报, 33(1): 36—40
 樊绘曾, 1983. 粘多糖及其提取、分离. 海洋药物, 1: 40—55
 樊绘曾, 陈菊娣, 吕培宏等, 1983. 刺参内脏酸性多糖研究. 海洋药物, 3: 134—137

- Dubois M., 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal Chem*, 28: 350—356
- Staub A M., 1965. Removal of proteins from polysaccharides. *Methods Carbohydr Chem*, 5: 5—11

EXTRACTION, ISOLATION, AND PURIFICATION OF SELENIUM POLYSACCHARIDE IN *PAVLOVA VIRDIS*

ZHANG Xin-yu, WANG Lei, LI Guang-you, ZHU Yan-xiong

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

(*First Institute of Oceanology, State Oceanic Administration, Qingdao, 266003*)

(*The Centre of Science and Technology Information, Qingdao, 266003*)

Abstract A kind of marine micro algae, *Pavlova virdis*, which we entitled 4P, was used to extract selenium-polysaccharide in laboratory. It was extracted three times in boiling water. After centrifugal operation (3000 round per minute, 20 minutes), the supernatant was collected and further isolated with Savag method (6—10 times) and dialysis method (in running water for 24 hours) in order to wipe out proteins and other little impurity. Then through purifying it with Sephadex G-50 gel filtration (diameter 20mm; length 920mm) we obtained two kinds of pure selenium-polysaccharides, which were entitled 4P1 and 4P2. They were checked with Sephadex G-100 gel filtration and cellulose acetate film electrophoresis. The results showed that they were homogeneous and negatively charged. The electrophoresis condition was barbitone buffer (pH= 8.6, Ion intensity = 0.09), constant 120 Volt for 20 minutes, 0.5% toluidine blue dyeing for 5—10 minutes, and 0.5% HAc solution decolouring several times.

Through this experiment, we measured the selenium (atom-fluorescence method) and sugar (Vitriol-Phenol method) content after each procedure. The ratio of gaining selenium from 4P marine microalga was only 8.5%. It contained 77 mg selenium per gram 4P1, and 220mg selenium per gram 4P2. The selenium content in selenium-polysaccharide is relatively small.

In conclusion, *Pavlova virdis* contained two kinds of pure selenium-polysaccharide, 4P1 and 4P2, it also showed that *Pavlova virdis* has very good ability to collect selenium during its growth.

Key words Selenium-polysaccharide Isolation Purification

Subject classification number Q539