

核盘菌多糖的构象及其构象变化的研究^{*}

于宪潮 王德润 刘 毅 于 奥

(南开大学中心实验室 天津 300071)

刘如林 孙邦福

(南开大学生物系 天津 300071)

茹详斌

(军事医学科学院 北京 100000)

摘 要 研究了一种由 *Sclerotinia sclerotiorum* ss-001 产生的具有潜在抗肿瘤活性的微生物胞外多糖——核盘菌多糖的溶液行为及构象变化。通过对其在不同离子强度和不同 pH 值下 $[\eta]$ 值的考察,发现其在不同离子强度下和一定的 pH 范围内溶液行为稳定。但当 $\text{pH} > 12.36$ 时其 $[\eta]$ 值急剧变小。利用透射电镜对样品在不同条件下分子形貌的研究表明,这种溶液行为的变化是由分子构象的变化产生的。

关键词 构象,溶液行为,葡聚糖,多糖

70 年代以来,在对多糖的研究中发现许多微生物多糖具有抗肿瘤活性,这引起了人们广泛的兴趣和关注。到目前为止,研究人员已经对多种多糖,包括香菇多糖(Lentinan),热凝多糖(Cardlan),小核菌多糖(Scleroglucan),裂褶菌多糖(Schizophyllan)进行了大量的结构及性能的研究,其中香菇多糖和裂褶菌多糖已经在日本开始应用于临床。有关小核菌多糖和热凝多糖的研究也进行的比较深入。但对核盘菌多糖的研究目前尚处于不成熟阶段。

核盘菌多糖是由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)产生的体外荚膜多糖^[1],以下简称 SSG,其分子结构与 Grifolan^[2~4], Lentinan^[5], Schizophyllan^[6,7] 及 Scleroglucan^[8] 相似(见图 1)。主链是由 β -D-(1~3) 键合的吡喃葡萄糖构成的,在主链上每三个葡糖基

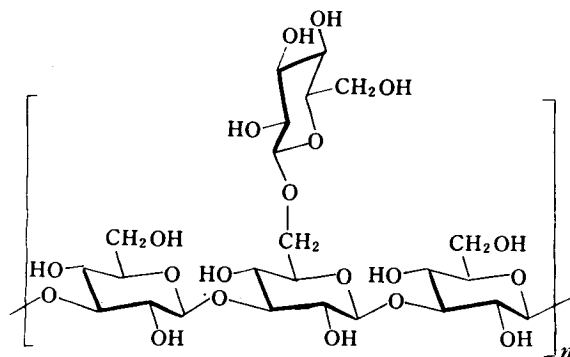


Fig.1 Molecular structure of SSG

^{*} 1993-05-17 收稿; 本项目为国家自然科学基金资助项目

再以 β -D-(6~1) 键合一个吡喃葡糖侧链。实际上核盘菌多糖包括几种类型的(1~3), (1~6)- β -D-葡聚糖^[9], 不同之处在于(1~3)和(1~6)连接的交联度, 分枝点的分布及主架结构。

核盘菌的这种分子结构是其具有抗肿瘤活性的决定因素之一。此外, 其分子在水溶液中的构象也是一个必不可少的影响因素。研究表明, 这种多糖在水溶液中常常采取三螺旋结构^[10]。Ohno^[10]等人利用 ^{13}C -NMR 谱对其不同条件下分子的构象进行了研究, 研究表明核盘菌多糖在固态和水溶液中均存在规则构象。

本文通过在不同条件下对核盘菌多糖在水溶液中特性粘度变化的研究, 并借助透射电子显微镜, 比较直观地对其分子在水溶液中的构象及构象变化进行了阐述。

1 实验部分

1.1 实验样品制备

采用扬州江苏农学院提供的菌株 *Sclerotinia Sclerotiorum* SS-001, 在 28℃, 摇床振荡培养 4 天; 将发酵液的 pH 值调至 7.0, 80℃ 水浴 2min; 然后调 pH 值 2.0, 经超速离心(10,000rpm; 30min)除去菌体; 加入氯仿-异戊醇(5:1), 混匀后经超速离心(5,000rpm)去除蛋白; 收集上清液, 用无离子水透析两天; 用 95% 乙醇沉淀多糖; 用丙酮、乙醚浸泡样品, 洗涤数次; 60℃ 下烘箱中干燥即得待分析用样品。

1.2 样品特性粘数的测定

采用乌式粘度计测定样品的特性粘数。毛细管直径 0.64mm, 水的流出时间为 106s, 实验温度 25℃ $\pm$ 0.1, $[\eta]$ 值的计算利用外推法。

1.3 透射电子显微镜对核盘菌分子形貌的观察

将样品配制成 $1.5 \times 10^{-4} \text{mg/ml}$ 的稀溶液, 在此浓度下即保证试样分子以单分子出

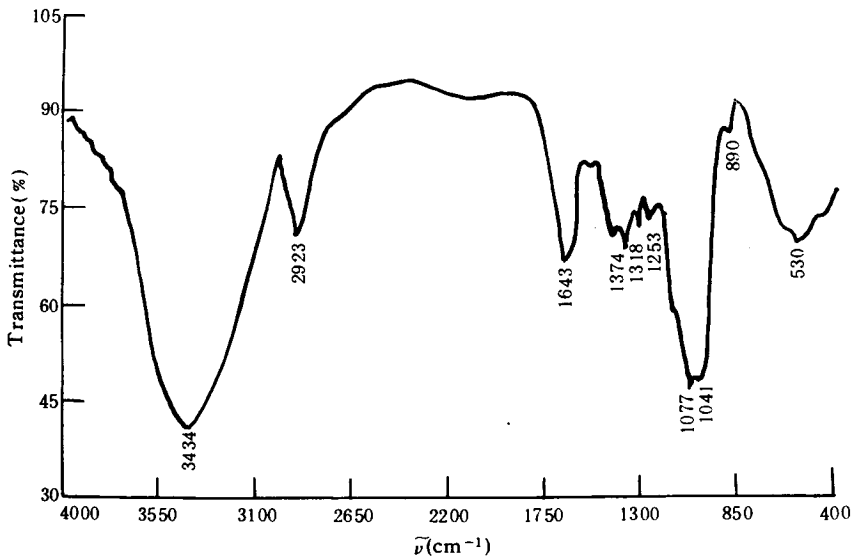


Fig.2 IR spectrum of SSG

现,又保证了在现场中有足够的观测目标。将配制好的溶液沾在涂有碳膜的铜网上,待溶剂挥发后,以 7° 角喷涂钨钨合金,利用 PHILIPS4EM400ST 透射电子显微镜观察照像。

本实验通过改变溶液的离子强度和 pH 值来观察特性粘数的变化,进而观察其分子构象的变化,并结合透射电镜对分子形象的观察加以研究。需要说明的一点,样品中已不含有蛋白质,图 2 为样品的红外光谱图,由图中看不出蛋白质的特征峰,因此以下讨论均为多糖的特性。

2 结果与讨论

2.1 离子强度对核盘菌多糖特性粘度的影响

核盘菌多糖是一种中性多糖,从理论上讲其分子在水溶液中的伸展程度不应受离子强度的影响。然而,由于分子的不对称性产生的极性以及与周围溶剂产生的诱导极性可能对分子的伸展程度产生一定的影响。通常这种作用较之分子间的氢键作用弱得多,对于多糖这种分子间存在很强氢键作用力的大分子而言,如果分子是中性的,即不带电荷,这种作用一般不会对分子的构象产生很大的影响。但是为了排除在作 pH 值对核盘菌多糖构象的影响的实验时可能产生的电荷的影响,首先对该多糖在水溶液中对离子强度的依赖性作了研究。

测定了核盘菌多糖在不同浓度的 NaNO_3 水溶液中的 $[\eta]$ 值,结果见图 3。

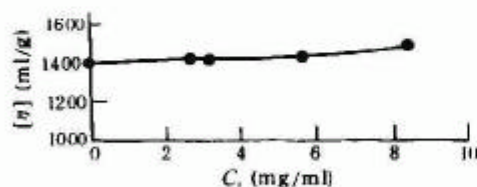


Fig.3 Effect of ionic strength on $[\eta]$ of SSG

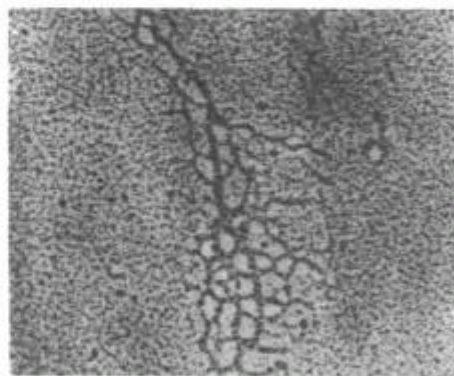


Fig.4 TEM picture of SSG molecule in water ($\times 50,000$)

由图 3 可以看出核盘菌多糖的 $[\eta]$ 值几乎不随 NaNO_3 浓度的变化而变化。这说明离子强度对样品在水溶液中的分子伸展程度影响很小,即核盘菌多糖在水溶液中的构象对离子强度的依赖性较低,显示出良好的耐盐性。实验结果与前面所作的分析基本是一致的。

2.2 核盘菌多糖分子形貌

核盘菌多糖是一种 β -1,3 均多糖,其分子化学结构与小核菌多糖和裂褶菌多糖化学结构极其相似^[9]。Yanaki^[10] 等人通过测定小核菌多糖的重均分子量,均方旋转半径和特

性粘数,指出小核菌多糖空间尺寸与裂褶菌多糖相同,并且在稀溶液中的流体力学行为也相同.因而,认为小核菌多糖在水溶液中的结构与裂褶菌多糖相似,应为棒状三股螺旋结构^[15,16].

由于螺旋结构是刚性,单维伸展空间较大,因而具有较大的旋转半径,其表观分子体积也较大,表现为较大的 $[\eta]$ 值.并且这种螺旋结构通常是由多个亚基分子缔合成的,有时甚至可以形成分子体积很大的网状结构.透射电子显微镜对核盘菌多糖在水溶液中的分子形貌观察证实了以上观点.

图4、5、6是未经处理的天然核盘菌多糖分子的透射电子显微镜照片.由照片中可见核盘菌多糖在水溶液中的构象很复杂,存在多种空间结构,图4是核盘菌多糖分子完整的网状结构.这种网状结构不可能是共价交联结构,而是由亚基通过分子氢键两两结成螺旋结构构成的.其中有双螺旋、三螺旋,甚至还有单分子链混合、交织而成.

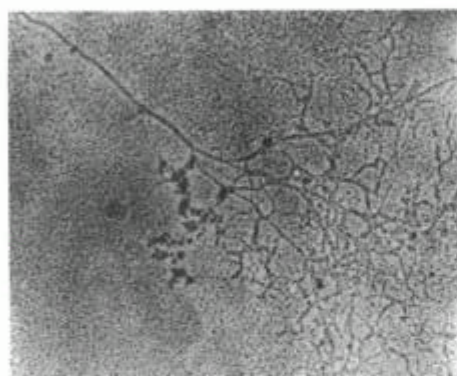


Fig.5 TEM picture of SSG molecule in water
($\times 30,000$)

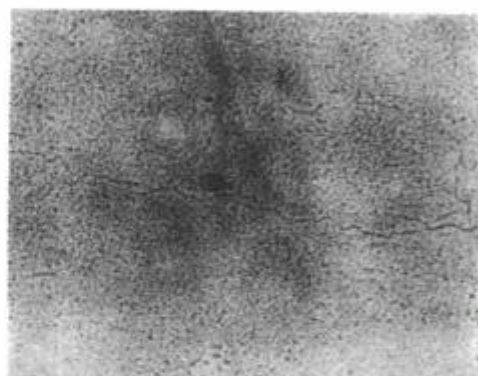


Fig.6 TEM picture of SSG molecule in water
($\times 40,000$)

由图5可以看出整个分子是由一般棒状刚性链和一个复杂的网状的末端组成的,在刚性链和网状结构的过渡区可以清楚地看到棒状部分由三股分子链构成的三螺旋结构,从链的表观粗细来看,网状部分可能既有三螺旋,也有二股螺旋,还有少量单链,这就进一步证明了作者认为图4是由核盘菌分子的网状结构组成的分析是可能的.

图6是一个线性大分子,分子很长,分子的螺旋构成从照片中尚分辨不清,但由分子的粗细可以推测这种棒状线性大分子可能是由双股螺旋构成的.由此可见,天然状态下的核盘菌多糖在水溶液中既有全网状结构的分子,也有部分网状分子和线性大分子.

图7、8是将样品加热至95℃保持10~30min,然后在室温下冷却后的透射电镜照片.由图7中可以看出,经过这样一个变性和复性的变化,分子的螺旋结构部分解开,由解开的部分可以清楚看到,该分子是由三股螺旋构成的.图8是由另一个棒状线性分子链上的一个解开的环,这个现象与黄原胶分子经过类似处理后出现的结果非常相似^[12].由图中可以清楚地分辨出这是一个右手双螺旋分子.因此,可以证实上面的推测即部分线性棒状分子是双股螺旋结构.

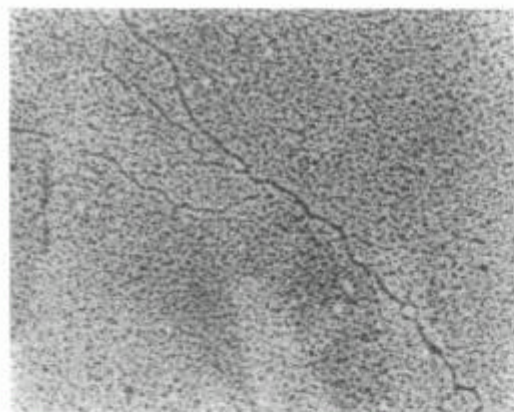


Fig.7 TEM picture of SSG molecule heated up to 95 °C in water ($\times 50,000$)

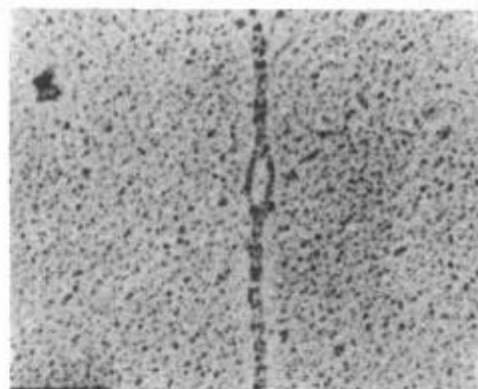


Fig.8 TEM picture of SSG molecule heated up to 95 °C in water ($\times 80,000$)

2.3 pH 值对核盘菌多糖在水溶液中构象的影响

对核盘菌多糖构象的研究,目前进行的还不多,但却有着非常重要的意义。其水溶液中的构象直接关联其抗肿瘤活性的强弱。许多有关(1~3)- β -D-葡聚糖的研究表明,三股螺旋结构是多糖具有抗肿瘤活性的必要条件之一^[10]。Ohno 等^[10],利用¹³C-NMR 对核盘菌多糖在不同浓度的 NaOH 水溶液中的构象进行了研究。研究中发现,当 NaOH 的浓度在 0.05~0.1mol/L 时没有信号出现,但当 NaOH 浓度 >0.15mol/L 时¹³C 峰出现了,当碱的浓度达到 0.25mol/L 时信号的峰宽最窄。由此他们认为当 NaOH 浓度在 0~0.1mol/L 时核盘菌多糖的分子链段的运动受到很强的限制;NaOH 浓度在 0.15~0.2mol/L 时,部分多螺旋结构解开形成一部分单螺旋区;当 NaOH 浓度 >0.25mol/L 时,螺旋结构消失而形成了无规线团构象。即核盘菌多糖在水溶液中的构象随着 NaOH 浓度的变化存在一个由规则到无规的转变。

对 pH=1.88~13.32 核盘菌多糖的特性粘数的研究发现,随着 pH 值的变化,在相当宽的范围内(pH=1.88~12.36)[η] 值基本保持不变,但当 pH>12.36 时[η] 值却突然下降,见图 9。

实验中当 pH>7.0 时用 HCl 调节 pH,当 pH<7.0 时用 NaOH 作 pH 调节剂。实验表明核盘菌多糖对 pH 值在相当宽的范围内不敏感,具有较强的耐酸碱性能。其原因在于这是一种中性多糖,并且分子间及分子内存在着较强的氢键作用,所以溶剂中的离子强度和一定范围的 pH 值变化不会影响其分子的高级结构。但是随着 pH 增加水中 OH⁻ 离子浓度增加,这就增加了水的溶剂化效应。当这种溶剂化效应增加到一定程度,足以克服多螺旋结构赖以存在的分子间氢键作用,以多亚基分子缔合^[12,13]而成的多螺旋或网状结构解缔。

本实验表明当 pH>12.36 时,[η] 值突然下降了近 10 倍。这表明分子的表观体积大大下降了。这种变化,有两种可能性。一种是分子的水解造成的,另一种是分子的构象变化引起的。然而多糖的水解是在酸性条件下进行的,有些多糖需要在稀酸中加压才能

水解,因此水解的可能性可以排除,那么就只有一种可能性,即随着 pH 的变化,当 $\text{pH} > 12.36$ 时核盘菌多糖在水溶液中的构象存在一种突变。

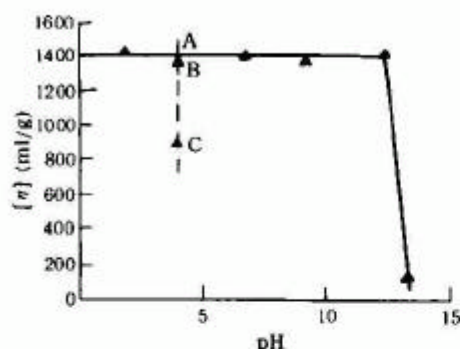


Fig.9 Effect of pH on $[\eta]$ of SSG

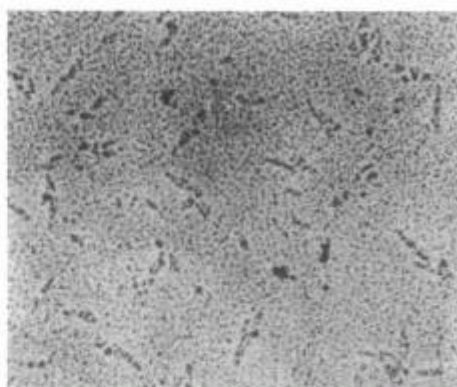


Fig.10 TEM picture of SSG molecule in aqueous sodium hydroxide $\text{pH}=13.32 (\times 50,000)$

图 10 是 $\text{pH}=12.36$ 时电镜照片。由照片中可见原来分子体积很大的网状结构消失了,取而代之的是分子体积较小的短链分子。这种短链分子是无规线团还是自身螺旋结构尚不能肯定,需作进一步的研究。但是有一点可以肯定,以多亚基分子缔合而成的多股螺旋和网状结构的确解缔了。当 $\text{pH} > 12.36$ 时亚基分子可以单独存在于溶液中。由于亚基分子较小,因此其特性粘数便大大下降了。

2.4 邻苯二甲酸氢钾对核盘菌多糖在水溶液中构象的影响

由图 9 中可以看到,当 $\text{pH}=4$ 时, $[\eta]$ 值出现了一个奇点,即图中的 C 点。这是以邻苯二甲酸氢钾作 pH 调节剂时出现的情况。为了证明这不是由 pH 变化引起的,可以比较一下 A、B、C 三点的 $[\eta]$ 值,这三点的 pH 值均为 4。A 点是 HCl 作 pH 调节剂, $[\eta]_A = 1382(\text{ml/g})$; B 点是以 H_2PO_3 作 pH 调节剂, $[\eta]_B = 1365(\text{ml/g})$; 而 $[\eta]_C$ 则小得多为 $917(\text{ml/g})$ 。A、B 两点 $[\eta]$ 值非常相近,与 pH 在 $1.88 \sim 12.36$ 之间的其它点的 $[\eta]$ 值也近似相等,这说明 C 点 $[\eta]$ 值的减小不是由 pH 变化引起的。并且前面已经讨论过离子强度也不会对 $[\eta]$ 值产生影响,因此 K^+ 离子的影响也可以排除。

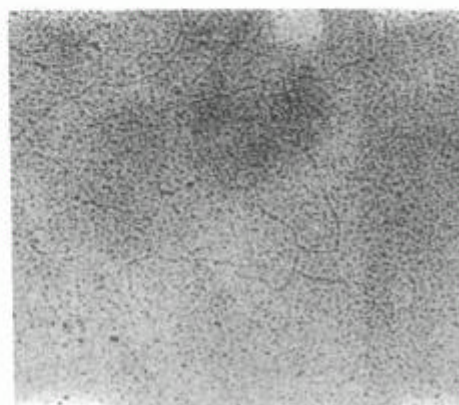


Fig.11 TEM picture of SSG molecule in aqueous sodium hydroxide $\text{pH}=4.0 (\times 50,000)$

出现上述现象的原因可能在于邻苯二甲酸氢钾分子上还有一个游离羧基,羧基会与核盘菌多糖主链或侧链上的羟基发生作用,掩盖了部分羟基,同时增加了空间位阻,使得核盘菌亚基分子之间氢键结合力下降,发生了螺

旋结构的部分解缔, 并减少了再缔合的机会, 因此使分子出现自由伸展的趋势, 呈部分无规构象进而降低了分子的表现体积, $[\eta]$ 值下降. 图 11 是该条件下核盘菌多糖的透射电镜照片. 由照片中可以看出其分子变细, 出现了螺旋结构的解缔, 并表现出自由伸展的趋势.

总而言之, 核盘菌多糖在水溶液中的构象是比较复杂的. 当 pH 在 1.88 ~ 12.36 之间时基本上为多分子缔合的规则构象. 另外, 由于这是一种中性多糖, 因而离子强度对其构象的影响也较小, pH 值的变化在一定范围对其构象的影响也不大, 但当 pH > 12.36 时会出现一个构象突变.

参 考 文 献

- [1] 戴芳澜. 中国真菌总汇. 北京: 科学出版社, 1977
- [2] Ohno N, Suzuki I, Oikawa S, *et al.* *Chem Pharm Bull*, 1984, **32**: 1142
- [3] Ohno N, Lino K, Suzuki I, *et al.* *Chem Pharm Bull*, 1985, **33**: 1181
- [4] Ohno N, Lino K, Suzuki I, *et al.* *Chem Pharm Bull*, 1985, **33**: 1557
- [5] Saito H, Ohki K, Takasuka N, *et al.* *Chem Pharm Bull*, 1977, **58**: 293
- [6] Komatsu N. *Gam*, 1969, **60**: 137
- [7] Noviouge N. *Phys Ed*, 1980, **18**: 547
- [8] 刘如林. 小核菌葡聚糖的研究, 1990 (“七五攻关项目报告”)
- [9] Ohno N. *Chem Pharm Bull*, 1988, **36**: 819
- [10] Ohno N, Toshiro Yadomae. *Carbohydr. Res*, 1987, **159**: 293
- [11] Dealandes Y, Marchessault R H, Sarco A. *Macromolecules*, 1980, **13**: 1466
- [12] 王德润, 于宪潮, 赵大键等. 高分子学报, 1990, (1): 60
- [13] 王德润, 于宪潮, 赵大键. 高分子学报, 1990, (3): 322
- [14] Yanki T, Kojima T, Novisaye T. *Polymer Journal*, 1981, **13** (12): 1135
- [15] Norisaye T, Yanki T, Fujita H. *J. Polym Sci, Polym Phys Ed*, 1980, **18**: 547
- [16] Kashiwagi Y, Norisuye T, Fujita H. *Macromolecules*, 1981, **14**: 1220

STUDIES ON THE CONFORMATION AND CONFORMATIONAL VARIATIONS OF THE β -D-GLUCAN PRODUCED BY SCLEROTINIA SCLEROTIORUM SS-001

YU Xianchao, WANG Derun, LIU Yi, YU Ao

(Central Laboratory, Nankai University, Tianjin 300071)

LIU Rulin, SUN Bangfu

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

RU Xiangbin

(Military Medicine Institute, Beijing 100000)

Abstract The β -D-Glucan, with potential antitumor activity, produced by *Sclerotinia sclerotiorum* ss-001, was investigated on its solution behaviours, conformation and conformational change. By studying the effects of ionic strength and pH value on the intrinsic viscosity, the authors found that the solution behavior is relatively stable. Nevertheless, when the pH value of the solution surpassed 12.36, the value of intrinsic viscosity would decrease rapidly. By TEM we found this change of solution behavior was due to the conformational variations of the molecules.

Key words Conformation, Solution behavior, Glucan, Polysaccharide