

人参培养细胞中活性六糖的 分离及结构鉴定*

邓 斌¹ 郑光植² 沈月毛³ 罗建平⁴ 甘烦远²

(¹中国烟草育种研究(南方)中心, 玉溪 653100)

(²中国科学院昆明植物研究所, 650204)

(³Department of Chemistry, The University of Washington, WA98195, USA)

(⁴兰州大学生物系, 730000)

摘 要

将用酸水解人参细胞方法得到的寡糖素(oligosaccharins of *Panax ginseng*), 是一组聚合度(DP)由 3~12 单糖组成的水溶性混合物, 经活性碳柱, Dowex 50(H⁺)柱, Bio-Gel P-2 凝胶柱后由半制备型 ODS 柱在 HPLC 分离到一个六糖, 通过 GC, GC-MS, FAB-MS(包括 linked-scanning, 即联动扫描)和 ¹³C-NMR 测定, 推测出这个六糖有两种可能结构。

关键词 人参; 培养细胞; 寡糖 DP-6; 结构

植物初生壁中结构多糖降解的具有一定聚合度和结构的寡糖片段, 具有诱导植物抗毒素的活性, 对植物的生长发育和形态建成亦有着重大影响^[1]。寡糖素的发现给现代生物学一个重大启示: 糖类也能和核酸、蛋白质一样可作为信息分子^[2]。对糖类和蛋白质、脂类以及核酸相互作用的研究有可能揭示细胞识别、相互作用、细胞间信息传递和调节基因表达的分子机理, 有着重大的理论研究价值和应用前景。

作者已分离纯化了人参寡糖素中 DP-6 的寡糖, 这个六糖对多种药用植物悬浮培养细胞的生长和次级代谢物含量都有显著提高; 初步试验表明能增强烟草抗多种病害能力(另文报道)。本文利用多种分离纯化方法, 以及 GC、GC-MS、FAB-MS 和 ¹³C-NMR 技术, 分析确定了这个六糖的糖链结构。

材 料 和 方 法

1.1 材料制备及分离

使用的人参细胞系(70 代以上)来自于郑光植教授实验室。

1.1.1 寡糖素样品来源 大量寡糖素样品是通过愈伤组织培养和细胞悬浮培养所得组织和细胞水解而来。

收稿日期: 1995-11-06; 接受日期: 1995-12-30。

* 国家自然科学基金及云南省“八五”生物技术重点攻关资助项目。

1.1.2 制备方法 将培养细胞和愈伤组织在匀浆机上, 4000 r/min 破碎 15 分钟, 过滤物干燥后得 500 克干物质, 加入 80% 乙醇 1500 ml 在室温下浸泡 24 个小时。滤渣用 1500 ml 的氯仿: 戊醇(4:1), 60°C 条件回流 6 个小时。滤去液体后用丙酮和水洗涤干燥后得细胞壁干物质。干物质用 1 mol/L HCl 1200 ml, 于 90°C 在转动容器中酸水解反应 1.5 小时, 用 NaOH 中和至 pH 7.0, 滤去沉淀。

1.1.3 寡糖素的含量测定 样品中糖含量的定量测定, 采用 Dubios 方法, 即苯酚-硫酸法^[6], 以葡萄糖为标准品。

1.1.4 寡糖素级份的鉴定 TLC 检测柱层析后的寡糖, 溶剂系统是正丁醇: 乙酸: 水 = 2:1:1。正相板为高效 GF254, 蔗糖标准品对照, α -萘酚硫酸溶液作显色剂。

1.1.5 寡糖素的分离纯化

(1) 初步纯化分离纯化 细胞壁干物质水解液经活性炭柱脱色后, 过 Dowex 50H⁺ 离子交换柱(1.0×50 cm)柱层析, 双蒸水洗脱, 除去 Na⁺, 再用 Bio-Gel P-2(1.0 cm×50 cm)柱层析, 双蒸水洗脱, 流速: 12 ml/h, 每 10 分钟收集一管。收集 R_f 介于原点和蔗糖标准品之间的级份, 重复上 Bio-Gel P-2 柱, 则可得分段的寡糖素。

(2) HPLC^[4,5]分离 将通过 Bio-Gel P-2 柱纯化的寡糖素 II 峰部分的寡糖混合物用 QC-Trep 半制备 HPLC(Beckman 黄金系列 116)进行分离, 半制备型柱为 ZORBAX ODS 9.4 mm×25 cm 柱(DuPont Instruments), RI 检测, 流动相为双蒸水, 进样量为 500 μ l, 浓度 200 mg/ml, 流速为 5 ml/min, 纸速为 5 mm/min, 50 分钟为一个周期, 根据其峰型分部收集、TLC 检测, 将在薄层层析板上显示为单一点的部分冰冻干燥, 作 FAB⁻-MS 和 GC、GC-MS 测定。

1.2 测定方法及条件

1.2.1 GC、GC-MS GC 用 GC-9AG 型气相层析仪测定, GC-MS 用 Finnagan-4510 型质谱仪。分别用直接甲基化和先用钠硼氢还原再全甲基化(改良 Hakamori 法^[6]), 酸水解后还原乙酰化制成部分甲基化的糖醇乙酸酯, 并进行色谱-质谱联用分析, 通过标准谱查索(GC/MS/DS)和峰面积扫描, 确定该寡六糖中各单糖摩尔比及连接位置。

1.2.2 FAB⁻-MS VG Autospec 测定, 电离方式 LSIMS(二次液态离子质谱), 本底为甘油。测定该寡糖的分子量, 联动扫描(linked-scanning)测其分枝位置。

1.2.3 ¹³CNMR Bruker AM-400MHz 核磁共振仪测定, 重水(D₂O)为溶剂。

结果和讨论

2.1 人参寡糖素粗品的制备

酸水解前用 80% 乙醇抽提和 Sevage 法能较好的去除细胞内脂溶和蛋白部分, 以保证得到的寡糖素是初生细胞壁半纤维素的水解产物。在酸水解过程中, 应严格控制水解条件, 酸浓度偏大或小, 都会影响目的寡糖的得率。

2.2 分离纯化

在分离前用活性炭柱和 Dowex(H⁺)柱可以去除色素, 盐和皂苷类物质, 这为后面的寡糖分离具有很大的好处。通过 Bio-Gel P-2 柱进一步将混合寡糖素分段和纯化, 本实

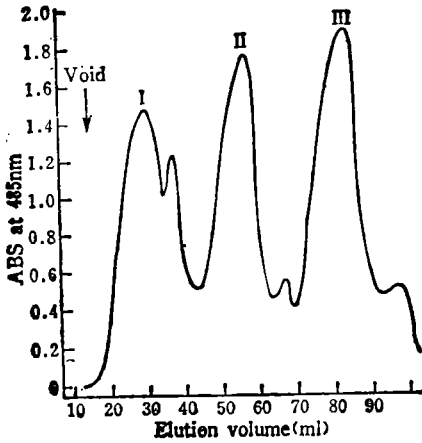


Fig. 1 Gel filtrated profile on Bio-Gel P-2 column of the hydrolysate of oligosaccharins

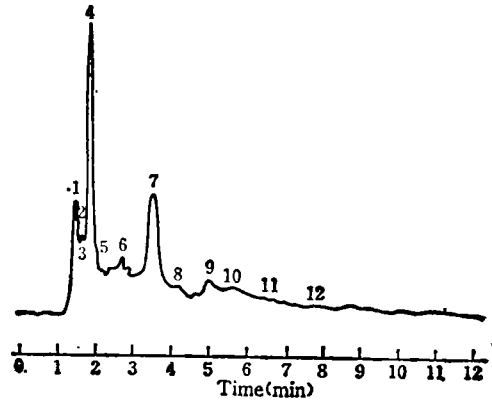


Fig. 2 HPLC of the GOB

验得到 DP6, 7, 8 占多数的一段(如图 1 所示 II 峰)。

就现阶段寡糖分离研究来看, 所有寡糖的最后分离纯化都是在 HPLC 中进行的, 在大部分未衍生化寡糖 HPLC 分离过程中, 洗脱溶剂采用纯水, 但各个寡糖峰的基线仍不能完全分离, 特别是进样量大的时候, 收集时要格外小心。图 2 为 Bio-Gel P-2 分离所得 II 峰部分进行 HPLC 分离图, 其中峰 7 为本实验收集到 TLC 上为单一点($R_f=0.59$)的部分。

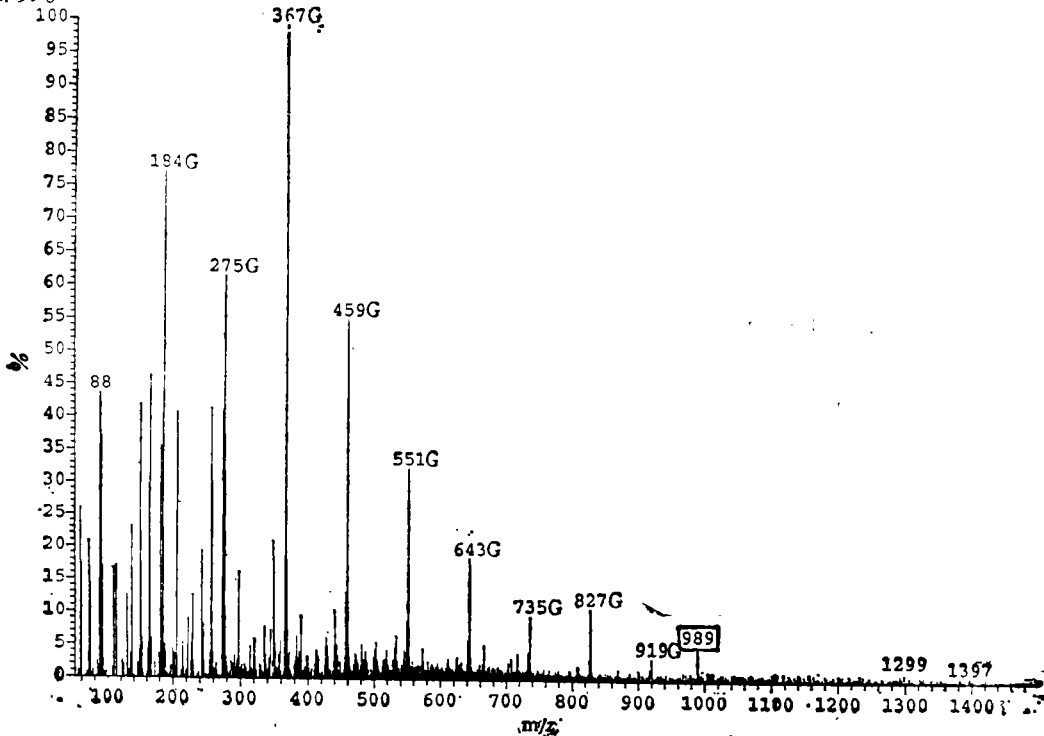


Fig. 3 FAB-MS spectrum of GOB DP-6 G, mixed with the peaks of glycerin.

2.3 快原子轰击质谱(FAB-MS)

从 FAB⁻-MS(图 3)上可以看出分子离子峰 m/z 989(M-1)(脱 5 分子水), 说明这个寡糖链中不存在分子量不为 180 的单糖, 在图谱上无明显的 162 碎片递减峰出现, 说明存在支链。联动扫描(图 4)发现 m/z 486(M-1), 说明支链连在主链的第二或第四个单糖分子上。

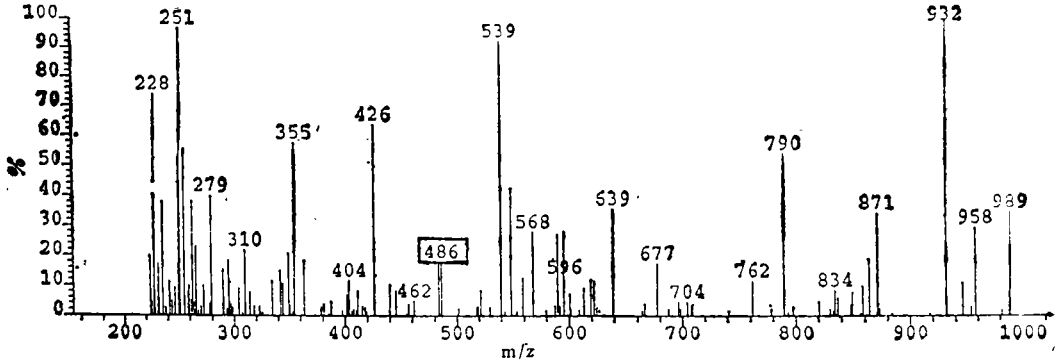


Fig. 4 Linked-scanning FAB⁻-MS spectrum of GOB DP-6

2.4 人参寡六糖中单糖间连接位置的测定

该寡糖完全甲基化酸水解后还原乙酰化衍生物作 GC 和 GC-MS 分析, 计算机检索, 与标准谱对照, 即可确定各个糖衍生物的色谱峰, 并将峰面积扫描后得到各单糖摩尔比, 结果见表 1。

Table 1. Methylation analysis of the linkage region of GOB-6

Methylation alditol acetate derivative	Molar ratios
2, 3, 4, 6-O-Me ₄ -Glc	0.9
2, 3, 6-O-Me ₃ -Glc	2.1
3, 6-O-Me ₂ -Glc	1
2, 3, 4, 6-O-Me ₄ -Gal	1.1
1, 2, 3, 6-O-Me ₄ -Man	0.9

2.5 核磁共振(¹³C-NMR)

从图 5 看 δ 95-107ppm 处为各个端基 C₁ 的化学位移值, 可以看出有 6 个端基碳 C₁ 峰(δ 103ppm 处重复 4 个峰), 与 Glc, Gal, Man 及甲基化标准图谱^[7]比较, δ 107.41 ppm 为 α -D-galactosyl 的端基 C₁ (支链位置, 空间张力引起向低场移动); δ 103 ppm 为 4 个 glucosyl 的 C₁ 均为 β 型; δ 98.87ppm 为 β -D-mannose 的端基 C₁ (未乙酰化), 处于糖链的还原末端; 对各碳原子的 δ 值指认如表 2。

Table 2 ¹³C-NMR data of GOB DP-6

δ (ppm)	107 (1 peak)	103 (4 peaks)	98 (1 peak)	80-79 (5 peaks)	77-75 (6 peaks)	74 (4 peaks)	73-71 (2 peaks)	64-63 (6 peaks)
Compd	Gal C ₁	4 × Glc C ₁	Man C ₁	3 × Glc C ₄ Man C ₄ Glc C ₂	Glc C ₃ , C ₆ Man C ₃ , C ₅ Gal C ₃ , C ₅	3 × Glc C ₂ Gal C ₄	Man C ₂ Gal C ₂	Glc C ₆ Man C ₆ Gal C ₆

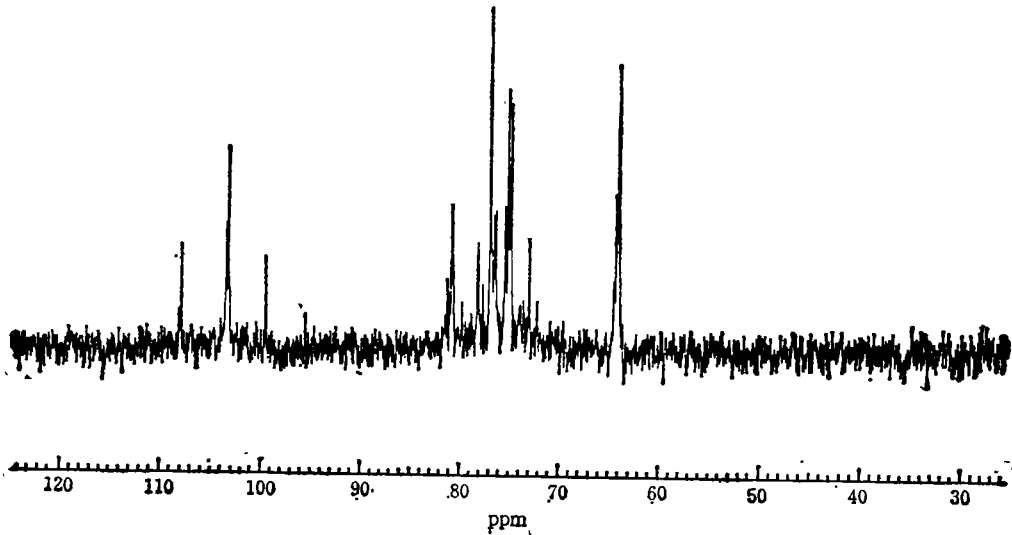
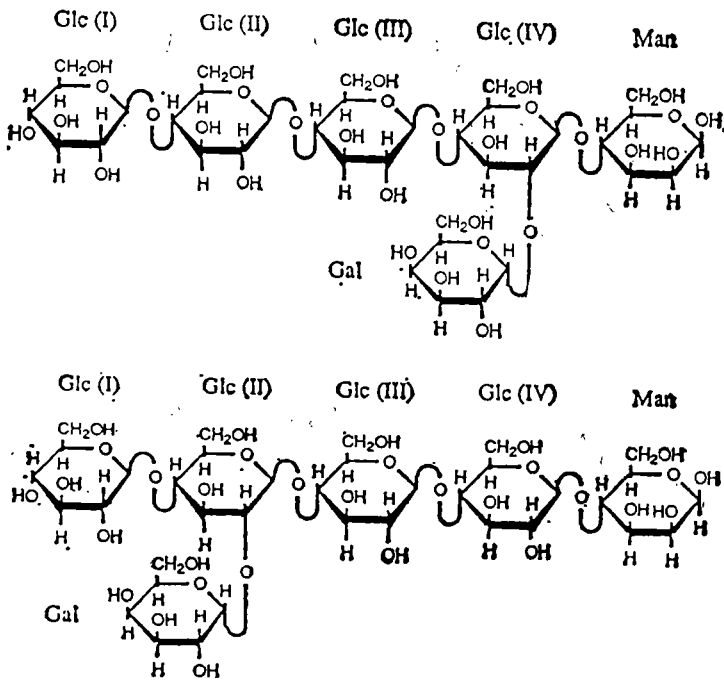
Fig. 5 ^{13}C -NMR spectrum of GOB DP-6

Fig. 6 Structure of GOB DP-6

综上所述,该寡糖具有如图6所示结构,其支链Gal连接在第二个还是第四个Glc-C₆上尚不能确定。

昆明植物所秦润保高工处作 HPLC, 该所仪器组进行质谱、气相、核磁等测定, 木全章教授实验室在实验过程中提供方便, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Albersheim P, Darvill A G. Oligosaccharins. *Scientific American*, 1986, 253(3): 58~64.

- [2] Darvill A G *et al.* Structure and function of plant cell wall polysaccharides. *J Cell Sci*, 1985, suppl 2: 203~208.
- [3] Dubois H *et al.* Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Biochem*, 1956, 28: 350.
- [4] Vratny P *et al.* Accelerated reversed-phase chromatography of carbohydrate oligomers. *J Chromatogr*, 1983, 254: 143.
- [5] Borje B. Separation and determination of phenylisocyanate-derivatized carbohydrates and sugar alcohols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr*, 1981, 218: 65.
- [6] Larson G *et al.* Application of simple methylation procedure for the analyses of glycosphingolipids. *Carbohydr Res*, 1987, 161: 281.
- [7] 龚运准编著:天然有机化合物的¹³C核磁共振化学位移。昆明:云南科技出版社,1987,308~403。

The Isolation and Structure Characterization of the Active Oligosaccharide DP-6 from Cultured *Panax ginseng* Cells

DENG Bing¹, ZHENG Guan-Zhi², SHEN Yu-Mao³,

LUO Jian-Ping⁴ and GAN Fang-Yuang²

(¹China Tobacco Breeding Research Centre (south), Yuzi 653100. ²Kunmin Institute of Botany, Academia Sinica, 650204, ³Department of Chemistry, The University of Washington, USA.

⁴Department of Biology, The University of Lanzhou, 730000)

ABSTRACT

The oligosaccharins isolated from acid-hydrolyzed cultured cells of *Panax ginseng* are a mixture of DP-3 to 12. The samples were passed through an active carbon column, a Dowex (H⁺) column, and a Bio-Gel P-2 column to obtain oligosaccharides DP-6, 7 and 8. They were finally separated by HPLC and the DP-6 oligosaccharide was obtained. Experiments showed that it could increase the growth rate of many cultured plant cells. Its structure was characterized by GC, GC-MS, FAB-MS and ¹³C-NMR measurements.

KEY WORDS: *Panax ginseng*; Cultured cells; Oligosaccharide DP-6; Structure