

# Analysis of Agglutination from *Cerasus humilis* Lectin on Micro Algae, Bacteria and Yeast

Hongyan Han<sup>1</sup>, Aiqing Ji<sup>1</sup>, Linjing Chen<sup>1</sup>, Junjie Du<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Jinzhong University, Jinzhong Shanxi

<sup>2</sup>Shanxi Agriculture University, Jinzhong Shanxi

Email: \*hhy0822@126.com

Received: Apr. 8<sup>th</sup>, 2017; accepted: Apr. 27<sup>th</sup>, 2017; published: Apr. 30<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

A lectin has been isolated from seed of the *Cerasus humilis* using a procedure that involved degreasing of petroleum ether, extraction of phosphate buffer, precipitation of 50% ammonium sulfate and dialysis with PBS. Then we researched on its agglutination activity toward micro algae, bacteria and yeast. The results showed that *Cerasus humilis* lectin could not agglutinate *Chlorella pyrenoidosa* of freshwater micro algae, but could agglutinate *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus*; *Cerasus humilis* lectin had ability to agglutinate *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. As the bacterial density increased, agglutination became more and more obvious; *Cerasus humilis* lectin could agglutinate yeast cells after heat treatment. In general, the higher the concentration of lectin is, the greater the effect of agglutination will be.

## Keywords

*Cerasus humilis* Lectin, Agglutination, Micro Algae, Bacteria, Yeast

# 欧李凝集素对微藻、细菌和酵母凝集作用分析

韩红艳<sup>1</sup>, 冀爱青<sup>1</sup>, 陈林晶<sup>1</sup>, 杜俊杰<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>晋中学院, 山西 晋中

<sup>2</sup>山西农业大学, 山西 晋中

Email: \*hhy0822@126.com

收稿日期: 2017年4月8日; 录用日期: 2017年4月27日; 发布日期: 2017年4月30日

\*通讯作者。

## 摘要

本试验以欧李果仁为材料,经石油醚脱脂后,用磷酸盐缓冲液PBS (PH7.4)浸提,50%饱和硫酸铵沉淀,PBS透析,获得欧李凝集素粗提液,分别研究它对微藻、细菌和酵母的凝集作用。研究表明:欧李凝集素能够凝集铜绿微囊藻和斜生栅藻,对蛋白核小球藻无凝集作用;对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌均有一定的凝集能力,并且随细菌密度的增加,凝集现象越明显;欧李凝集素能凝集热处理后的酵母菌细胞,凝集素浓度越高,凝集效果越显著。

## 关键词

欧李凝集素,凝集作用,微藻,细菌,酵母

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

凝集素是一类能凝集细胞和沉淀单糖或多糖复合物的非免疫来源的非酶蛋白质,包括微生物凝集素、植物凝集素和动物凝集素。凝集素具有独特的生化性质及生物学功能,使其在医学和生物学研究上有着广泛的用途,可以促有丝分裂、抗真菌、抗病毒、杀虫及抗肿瘤等多种活性[1]-[7]。大多数植物凝集素存在于贮藏器官中,它们既可以作为一种氮源,也可以在植物受到危害作为一种防御蛋白发挥功能[8]。凝集素在其它植物中研究较多,比如雪花莲凝集素基因、豌豆外源凝集素基因等,但到目前为止很少有关于欧李凝集素研究报道。欧李作为我国特有的一个古老野生果树种,以药源植物利用已有 2000 多年记载历史,因此,本文以“农大钙果 4 号”为材料,研究欧李凝集素对微藻、细菌和酵母的凝集作用,旨在为日后研究欧李凝集素在医学方面的应用提供理论参考。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 试验材料

选取山西农业大学培育的“农大钙果 4 号”为试验材料。蛋白核小球藻,铜绿微囊藻,斜生栅藻购自光大藻种店铺;大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,枯草芽孢杆菌和酵母来自于晋中学院生物科学与技术学院。

### 2.2. 试验器材

器材:96 孔圆底细胞培养板、生化培养箱 SPX-150BSH-II (上海新苗医疗器械制造有限公司)、电热恒温培养箱 DNP-9082BS-III (上海新苗医疗器械制造有限公司)、EU-2600R 紫外可见分光光度计(上海昂拉仪器有限公司)、电热恒温鼓风干燥箱 OHG-907835-III (上海新苗医疗器械制造有限公司)。

### 2.3. 试验药品

唾液酸(Sigma)、D-果糖、D-半乳糖、D-甘露糖、蔗糖、麦芽糖、石油醚、硫酸铵(均为分析纯)。

## 2.4. 试验方法

### 2.4.1. 欧李凝集素粗提取液的制备

取欧李仁 5 g, 去皮后用研钵磨成粉末。脱脂: 用石油醚(1:4, v:v)于 4℃ 浸泡脱脂 2 次后取出, 弃去上层石油醚后待其自然风干。浸提: 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液按照 1:7 (g/mL) 的比例在 4℃ 下浸提。盐析: 提取液经离心(4℃, 12.000 g, 30 min)后, 弃去沉淀, 取得上清液后采用 50% 饱和硫酸铵盐析, 4℃ 下过夜处理后经离心(4℃, 12.000g, 30 min)后弃去上清, 取得沉淀。透析: 将沉淀溶于 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中一起装入事先经处理好的透析袋中, 然后将透析袋泡入 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中, 透析 48 h, 其中用 0.1 mol/L 的氯化钡检测 PBS 缓冲液是否有白色沉淀, 透析完成后将袋内物质取出, 经离心(4℃, 12.000 g, 10 min)后取得的上清液即为欧李凝集素粗提取液。

### 2.4.2. 糖结合专一性测定

试验用浓度为 0.1 mol/L 的 D-果糖、D-半乳糖、D-甘露糖、蔗糖(Sucrose)、唾液酸、麦芽糖进行倍比稀释。再向凝血板各孔加入 25  $\mu$ L 制备好的 2% 的 B 型血细胞悬液, 待全部加完后震荡 1 min, 将凝血板室温静置 1 h, 观察凝集反应情况, 记录现象。

### 2.4.3. 欧李凝集素对微藻的凝集试验

参照文献[9]的处理方法将三种藻种用 SE 培养基培养, 取指数生长期的微藻培养物 10 mL, 经离心(4800 r/min, 10 min)收集微藻细胞, 加生理盐水, 离心(4800 r/min, 10 min)洗涤 2 次, 最后用生理盐水制成藻细胞悬液并在 680 nm 下测定其吸光度。取 25  $\mu$ L 凝集素样品于 96 孔圆底细胞培养板中用 PBS 缓冲液进行倍比稀释, 然后各加入 25  $\mu$ L 藻类细胞悬液混匀, 室温放置 1 h 后显微镜观察效果。

### 2.4.4. 欧李凝集素对细菌的凝集试验

将待测细菌用牛肉膏蛋白胨培养基经继代培养活化, 并计算菌液浓度。之后用生理盐水配置成原来体积的细菌悬液。将三种细菌悬液分别进行倍比稀释, 参照文献[10]每种菌在 6 个浓度下分别以 25  $\mu$ L 滴入 96 孔圆底细胞培养板, 然后在每一孔中都加入 4% 的人血细胞悬液, 在 37℃ 下培养, 30 min 后向每孔中再加提取的欧李凝集素 25  $\mu$ L, 在 37℃ 下继续培养, 30 min 后观察凝集情况并记录。

### 2.4.5. 欧李凝集素对酵母的凝集试验

取市售鲜酵母, 用生理盐水配制成约 1%~2%, 洗涤 3 次, 置沸水浴中 30 min, 过滤, 除去酵母凝块。取分散酵母菌, 用生理盐水洗涤 2 次, 离心(2500 r/min, 15 min), 去上清液, 用生理盐水配成 1% 酵母菌悬液(相当于  $1 \times 10^8$  菌/ml 浓度), 然后对凝集素进行倍比稀释, 加入到血凝板中, 低倍镜下观察酵母菌的凝集程度。凝集状况判定标准如表 1。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 凝集素糖结合专一性分析

用 6 种糖对欧李凝集素进行抑制试验, 将结果与血凝试验中凝集效价为  $2^0$  时对 B 型血的凝集结果进行比较, 可以得出, 6 种糖对欧李凝集素的抑制作用也具有专一性, 如表 2 所示, D-半乳糖、D-甘露糖和唾液酸对欧李凝集素有抑制作用, 其糖抑制的所需的最低浓度分别为 22.12 mg/mL、0.519 mg/mL、1.126 mg/mL, 而 D-果糖、麦芽糖和蔗糖对欧李凝集素无抑制作用。

### 3.2. 欧李凝集素对微藻细胞的凝集作用分析

从表 3 可以看出, 在测定的 3 种微藻中, 欧李凝集素仅对淡水微藻蛋白核小球藻无凝集作用; 对铜

**Table 1.** Criteria for determining the results of microscopic examination of yeast  
**表 1.** 酵母菌镜检结果判定标准

符号	判定标准
-	酵母菌散在周围
+	+5%以下酵母菌几个细胞凝集
++	++5%~20%酵母菌凝集成小块
+++	+++20%~50%酵母菌凝集成絮状凝块
++++	50%~100%酵母菌凝集成大絮状凝块

**Table 2.** Results of determination of carbohydrate specificity  
**表 2.** 糖专一性测定结果

糖	抑制所需最低浓度(mg/ml)
D-果糖	NI
D-甘露糖	1.126
唾液酸	0.519
麦芽糖	NI
D-半乳糖	22.120
蔗糖	NI

注释：NI 表示无抑制作用。

**Table 3.** Effect of lectin agglutination of *Cerasus humilis* microalgae  
**表 3.** 欧李凝集素对微藻的凝集作用

藻种	细胞密度( $10^4$ cell/L)	凝集浓度(ug/ml)
蛋白核小球 <i>Chlorella pyrenordosa</i>	110.3	-
铜绿微囊藻 <i>Microcystis aeruginosa</i>	105.4	0.032
斜生栅藻 <i>Scenedesmus obliquus</i>	210.5	0.016

-不凝集

绿微囊藻在凝集素倍比稀释中的最大浓度(0.032 ug/ml)产生了凝集作用，其它浓度无凝集作用；凝集素浓度稀释至 0.016 ug/ml 时仍然能对斜生栅藻产生凝集作用。

### 3.3. 欧李凝集素对细菌的凝集作用分析

三种菌液的所测得的浓度如表 4 所示。

测出三种菌种在 420 nm 下的 OD 值，如下表 5、表 6 和表 7 可以看出，其 OD 值随着浓度的降低而降低。菌种浓度从高至低依次编号为 1 至 6 号。

三种菌对血细胞均有破坏作用，使血细胞发生凝集。大肠杆菌的 OD 值越大其凝集血细胞的能力越强，随着 OD 值得降低凝集能力减弱，当 OD 值为 0.002 时几乎无凝集能力，金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌对血细胞的凝集作用与之相似。但是，在菌液和红细胞发生凝集反应 30 min 后加入高浓度的欧李凝集素粗提液，能有效的解除菌液对血细胞的凝集作用，抑制细菌的毒害作用。

### 3.4. 欧李凝集素对酵母的凝集作用分析

从表 8 可以看出，欧李凝集素能凝集酵母菌细胞，且随凝集素浓度的变化，凝集效果也随之变化。

**Table 4.** Concentrations of the three kinds of bacteria**表 4.** 三种菌液的所测得的浓度

菌种	洁净离心管质量/mg	烘干后离心管质量/mg	质量差/mg	浓度 ug/ml
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	5.1135	5.1145	0.001	0.1
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	5.2368	5.2488	0.012	1.2
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	5.2067	5.2147	0.008	0.8

**Table 5.** The concentration and the OD value of *Escherichia coli***表 5.** 大肠杆菌的浓度与 OD 值

项目	1	2	3	4	5	6
浓度ug/ml	0.1	0.05	0.025	0.0175	0.00875	0.004375
OD <sub>420nm</sub>	0.017	0.011	0.008	0.007	0.005	0.002

**Table 6.** The concentration and the OD value of *Staphylococcus aureus***表 6.** 金黄色葡萄球菌的浓度与 OD 值

项目	1	2	3	4	5	6
浓度ug/ml	1.2	0.6	0.3	0.15	0.075	0.0375
OD <sub>420nm</sub>	0.041	0.021	0.012	0.005	0.004	0.002

**Table 7.** The concentration and the OD value of *Bacillus subtilis***表 7.** 枯草芽孢杆菌的浓度与 OD 值

项目	1	2	3	4	5	6
浓度ug/ml	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025
OD <sub>420nm</sub>	0.017	0.015	0.008	0.005	0.004	0.002

**Table 8.** The record of *Cerasus humilis* lectin agglutination yeast**表 8.** 欧李凝集素对酵母的凝集情况记录

项目	倍比稀释的欧李凝集素							
浓度ug/ml	0.032	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001	0.0005	0.00025
凝集情况	+++	+++	++	++	+	+	+	-

大体上来讲，凝集素的浓度越高，凝集效果越明显。

在低倍镜下观察到的欧李凝集素对酵母凝集作用的。凝集素的浓度从 0.032 ug/ml~0.0005 ug/ml 依次梯度递减，对酵母的凝集作用也依次降低，当浓度降低到 0.00025 ug/ml 时，酵母细胞不表现凝集。结合表 8 可知浓度为 0.00025 ug/ml 酵母菌散在周围；浓度为 0.002 ug/ml、0.001 ug/ml、0.0005 ug/ml 时，+5% 以下酵母菌几个细胞凝集；浓度为 0.008 ug/ml、0.004 ug/ml 时，++5%~20% 酵母菌凝集成小块；浓度为 0.032 ug/ml、0.016 ug/ml 时，+++20%~50% 酵母菌凝集成絮状凝块。

#### 4. 讨论

欧李凝集素可专一性的结合 3 种糖，分别为 D-半乳糖、D-甘露糖和唾液酸，说明欧李凝集素具有糖

结合专一性。

Bird 等人最早利用藻类(海藻)凝集素粗品研究对细菌的凝集作用[11],但结果表明对细菌只有微弱的凝集活性。凝集素对藻类细胞的凝集研究最先开展的是 Hori 等的实验,研究了多种不同类型的凝集素对海洋微藻的凝集作用[12],结果发现 16 种海洋微藻中有 4 种发生了凝集反应。凝集素对真菌的凝集作用来看,曾日中和黎瑜发现壳三糖的加入可以提高热失活橡胶蛋白的抗真菌活性[13],表明了橡胶蛋白对真菌生长的抑制作用与其几丁质的结合特性有关。通过检测不同浓度下的欧李凝集素对三种微藻细胞的凝集效果,可以看出欧李凝集素对蛋白核小球藻无明显的凝集作用,而郑怡等[9]研究得出坛紫菜凝集素(PHL)对蛋白核小球藻有凝集活性,这种差异是由于不同的凝集素其糖链结构不同所引起的。欧李凝集素对于铜绿微囊藻和斜生栅藻来讲,凝集效果较为明显,并且在高浓度下效果显著。同时本实验中欧李凝集素对酵母菌有凝集作用,且凝集作用随着凝集素浓度的升高而加剧,对酵母菌的凝集现象越来越明显。总之,凝集素引起的藻类、细菌和酵母的凝集是一个比较复杂的过程,受多种因素的影响,与凝集素的性质,细胞的种类、细胞的表面特征和细胞在外界环境影响下其状态的改变等有关,今后我们将进一步的深入研究。

## 基金项目

晋中市软科学计划项目(项目编号: R1601)。

## 参考文献 (References)

- [1] Nagre, N.N., Chachadi, V.B., Sundaram, P.B., *et al.* (2010) A Potent Mitogenic Lectin from the Mycelia of a Phytopathogenic Fungus, *Rhizoctonia Bataticola*, with Complex Sugar Specificity and Cytotoxic Effect on Human Ovarian Cancer Cells. *Glycoconjugates Journal*, **27**, 375-386. <https://doi.org/10.1007/s10719-010-9285-2>
- [2] Sharma, A., Ng, T.B., Wong, J.H. and Lin, P. (2009) Purification and Characterization of a Lectin from *Phaseolus Vulgaris* CV (Anasazi Beans). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2009**, 9 p.
- [3] Barrientos, L.G. and Gronenborn, A.M. (2005) The Highly Specific Carbohydrate-Binding Protein Cyanovirin-N: Structure, Anti-Hiv/Ebola Activity and Possibilities for Therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **5**, 21-31. <https://doi.org/10.2174/1389557053402783>
- [4] Van Asbeck, E.C., Hoepelman, A.I.M., Scharringa, J., Herpers, B.L. and Verhoef, J. (2008) Mannose Binding Lectin Plays a Crucial Role in Innate Immunity against Yeast by Enhanced Complement Activation and Enhanced Uptake of Polymorphonuclear Cells. *BMC Microbiology*, **8**, 229-238. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-229>
- [5] Rubinstein, N., Ilarregui, J.M., Toscano, M.A. and Rabinovich, G.A. (2004) The Role of Galectins in the Initiation, Amplification and Resolution of the Inflammatory Response. *Tissue Antigens*, **64**, 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.0001-2815.2004.00278.x>
- [6] Li, J., Wu, H., Hong, J., *et al.* (2008) Odorranalectin Is a Small Peptide Lectin with Potential for Drug Delivery and TARGETing. *PLOS ONE*, **3**, 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002381>
- [7] Bies, C., Lehr, C.M. and Woodley, J.F. (2004) Lectin-Mediated Drug Targeting: History and Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**, 425-435.
- [8] Young, N.M., Johnston, R.A.Z. and Watson, D.C. (1991) The Amimo Acid Sequences of Jacalin and the Maclurapomifera Agglutinin. *FEBS Letter*, **282**, 382-384. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80518-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80518-8)
- [9] 郑怡, 余萍, 刘艳如, 等. 坛紫菜凝集素的糖结合专一性和细胞凝集作用[J]. 武汉植物学研究, 2002, 20(2): 137-140.
- [10] Malliga, R.M., Nirmal, K.K., Subramaniya, B.R., *et al.* (2011) Isolation and Partial Characterisation of a Novel Lectin from *Aegle marmelos* Fruit and Its Effect on Adherence and Invasion of *Shigellae* to HT29 Cells. *Department of Biochemistry*, **6**, 1371-1379.
- [11] Bird, K.T., Chiles, T.C., Longley, R.E., *et al.* (1993) Agglutinins from Marine Macroalgae of the Southeastern United States. *Journal of Applied Phycology*, **5**, 213-218.
- [12] Hori, K. and Kamiga, H. (1996) Lectin—Like Compounds and Lectinreceptors in Marine Microalgae: Hemagglutination Andreactivity with Purified Letins. *Journal of Phycology*, **32**, 819-825. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00783.x>
- [13] 曾日中, 黎瑜. 橡胶蛋白——一种与乳胶凝固有关的具有抗真菌活性的植物凝集素[J]. 植物学报, 1998(s1): 24-28.

**期刊投稿者将享受如下服务：**

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[hjbm@hanspub.org](mailto:hjbm@hanspub.org)