

西兰苔凝集素的分离纯化及性质研究

许平平, 张学武

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文采用硫酸铵沉淀法, 分别以生理盐水, 蒸馏水, pH=7.2 的 Tris-HCl 缓冲液, pH=7.2 的磷酸缓冲液为浸提液, 对西兰苔凝集素进行提取, 然后依次利用 DEAE-52 阴离子交换层析和 Sephadex G-75 对凝集素粗品进行分离纯化, 并对纯化后的西兰苔凝集素的部分性质进行研究。结果表明: pH=7.2 的 Tris-HCl 缓冲液的提取率最高, 为 $3.57 \pm 0.02\%$; 纯化后的西兰苔凝集素分子量约为 27 ku, 糖含量为 $7.60 \pm 0.03\%$, 其凝血活力为 28; 糖抑制试验表明, 西兰苔凝集素的凝集活性受 D-甘露糖和阿拉伯糖的抑制; 热稳定性实验表明 90 °C 以下凝集素的凝集活性不受温度影响, 有较好的热稳定性。此外, 西兰苔凝集素的最适 pH 范围是 7~8, 强酸强碱环境中其凝血活性明显下降。在含有 Ca^{2+} 的溶液中其凝集活性有所增强, 表明西兰苔凝集素活性受 Ca^{2+} 影响较大。

关键词: 西兰苔; 凝集素; 凝血活性

文章编号: 1673-9078(2014)7-224-229

Purification and Partial Characterization of Lectin from *Broccolini*

XU Ping-ping, ZHANG Xue-wu

(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Broccolini lectin (BL) was extracted from *Broccolini* with normal saline, distilled water, Tris-HCl buffer and phosphate buffered saline (PBS), followed by ammonium sulphate precipitation, and finally purified by chromatography DEAE-52 and Sephadex G-75. Partial characterization of BL was also studied. The results showed that Tris-HCl buffer had the highest extraction rate of $3.57 \pm 0.02\%$. Molecular mass of BL was estimated as 27 ku by SDS-PAGE. The BL contained $7.60 \pm 0.03\%$ sugar and its clotting activity was 2⁸. The sugar inhibition test showed that its hemagglutinating activity of erythrocyte could be inhibited by D- mannose and arabinose. Moreover, the lectin remained stable at 20~90 °C and its optimum pH was 7~8. Its clotting activity was significantly decreased in strong acid and strong alkali environment. The lectin reaction was also influenced by divalent cations Ca^{2+} , in which its hemagglutinating activity was increased.

Key words: *Broccolini*; lectin; hemagglutinating activity

凝集素 (Lectin) 是指一种糖蛋白或结合糖的蛋白, 广泛存在于各种植物、无脊椎动物和高等动物中, 因其能凝集红细胞而得名。大多数凝集素存在于植物的成熟种子中, 但在叶、茎和根等组织器官中也有发现^[1-2], 凝集素最大的特点是能够识别糖蛋白和糖脂, 尤其是细胞膜中复杂的糖链结构。凝集素对糖基的结合具有特异性, 这可通过糖抑制试验进行研究^[3], 此特异性取决于凝集素中糖基结合位点的大小、形状、糖链中决定簇的位置等^[4]。

凝集素具有细胞凝集能力, 不仅能凝集红细胞, 还能凝集肿瘤细胞, 淋巴细胞, 精子, 细菌等^[5]。此外, 凝集素还能识别并结合细菌、肿瘤细胞表面的糖结构, 从而抑制它们的生长。鉴于凝集素的诸多功

能, 它被广泛应用于病原菌的防治, 癌症的治疗, 细胞的分型, 含糖基生物大分子的检测等方面。

西兰苔, 又称小小西兰花、芦笋型青花菜、青花笋, 属十字花科芸薹属, 由西兰花与芥蓝杂交选育而成, 据美国权威机构检测, 其抗癌物质含量比普通蔬菜高出五到十倍, 其抗肿瘤物质种类也多, 张学武, 杨艳婧^[6]研究了西兰苔籽中异硫氰酸盐的抗肿瘤活性, 结果显示异硫氰酸盐能有效地抑制卵巢癌细胞 OVCAR-3 生长, 且抑制率随药物浓度增大而增大, 呈明显的剂量关系。且半抑制率为 78.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。王晓琴^[7]等对西兰苔叶黄酮的抗癌活性进行了研究, 发现西兰苔叶黄酮对 SW480、HepG2、Hela 和 A549 这 4 种癌细胞的生长均有抑制作用, 西兰苔中其他的抗癌物质还有待发掘。

近年来, 国内外对凝集素的研究很多, 越来越多的凝集素被发现, 凝集素的生物学功能备受关注。但是西兰苔是一种新型蔬菜, 目前国内外对它的研究甚少。本文首次对西兰苔凝集素进行分离纯化, 并对它

收稿日期: 2014-03-17

基金项目: 广州市基础研究项目 (2012J4100123)

作者简介: 许平平 (1988-), 女, 硕士, 研究方向: 糖生物技术与安全

通讯作者: 张学武 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物技术与食品工程

的部分性质研究,为西兰苔凝集素的结构鉴定及生物活性研究以及凝集素类药物开发提供研究资料。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器、材料与amp;试剂

1.1.1 仪器

F-90 粉碎机,浙江台州粮仪厂;78-1 磁力搅拌器,常州澳华仪器有限公司;Savant Modulyod 冷冻干燥器,美国 Thermo 公司;FC-16C 高速离心机,方统生物科技有限公司;UV2300 紫外分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;HH-S 数显恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗仪器厂;DBS-100 自动部分收集器,上海沪西分析仪器厂;HL-2B 恒流泵,上海精科实业有限公司;RE-52 旋转蒸发仪,上海荣生有限公司;PowerPac Basic 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.1.2 材料

西兰苔(购自广州市蔬菜研究所),鸡血(市售活鸡抽取)。

1.1.3 试剂

生理盐水,蒸馏水,Tris-HCl 缓冲液(pH=7.2, 0.02 mol/L,含 0.2 mol/L NaCl),磷酸缓冲液(pH=7.2, 0.02 mol/L,含 NaCl 0.2 mol/L),抗凝剂(1%肝素钠),TBS(pH=7.4, 0.15 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-HCl),TBS-Ca²⁺(TBS 含 CaCl₂ 0.1 mol/L),葡萄糖,麦芽糖,D-甘露糖,D-木糖,阿拉伯糖,蔗糖,D-葡萄糖美国,均购自 Sigma 公司,SDS-PAGE 用各种缓冲液等,所有试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 西兰苔凝集素的分离纯化

凝集素的粗提取

参照 CHEN Bei^[8] 的方法。将新鲜的西兰苔洗净,切碎,冻干后粉碎,准确称取 4 份干粉,每份 50.0 g,分别加入 200 mL 生理盐水,蒸馏水,pH=7.2 的 Tris-HCl 缓冲液,pH=7.2 的磷酸缓冲液,置于 4 °C 冰箱中 24 h,三层纱布过滤,滤液以 4 °C,5000 r/min 离心 20 min,收集上清液,于磁力搅拌器上,缓慢加入硫酸铵晶体至饱和度为 20%,溶解后置于 4 °C 冰箱中过夜,4 °C,5000 r/min 离心 20 min,弃沉淀,每份上清液分别加入硫酸铵晶体至饱和度为 80%,4 °C 冰箱中过夜,离心弃上清,将每份沉淀加入适量的浸提液进行溶解,依次用浸提液和蒸馏水透析 24 h,冷冻干燥即为凝集素粗品,按下式:提取率(%)=凝集素粗品的质量/西兰苔干粉的质量×100%,计算不同浸提液

的提取率。

DEAE-52 纤维素柱层析^[4]

填料的活化:称取 10.0 g DEAE-52 纤维素,蒸馏水浸泡过夜,以布氏漏斗加尼龙纱布进行抽滤,依次用 0.5 mol/L HCl 和 0.5 mol/L NaOH 溶液浸泡 0.5 h,蒸馏水洗至中性,用旋转蒸发仪除去填料中的空气,备用。

装柱:选择 2×20 的玻璃层析柱,洗净,剪一层析柱内径一致的圆形滤纸片置于底部,将柱下端连接好细塑料管,固定在铁架台上,倒入 Tris-HCl 缓冲液至 1/3 柱高,再将填料沿玻璃棒缓慢倒入柱中,如有气泡应排除或重装。拧开下端螺旋夹,使流速至 1 mL/5 min,待缓冲液接近纤维素面时,继续倒入填料,用玻璃棒搅拌表面层,以免形成分界层,通过恒流泵调节流量,至柱床体积不变为止。剪一与柱内径大小一致的圆形滤纸,从柱的上端轻轻放入,使其沉接于纤维素柱床表面,最后检查柱面是否平整、无气泡、不分层。继续平衡,至柱面高度不变及流出液与流入液的 pH 值一致为止。

上样:称取凝集素粗品 100 mg,加 2 mL Tris-HCl 缓冲液溶解,用吸管将纤维素柱上面的缓冲液吸出,只留一薄层液面,沿玻璃棒缓缓加入样品。拧开下端的螺旋夹,使样品进入填料中,待样品进入后用少量 Tris-HCl 缓冲液冲洗柱壁。

洗脱收集:采用含 0.05 mol/L、0.1 mol/L、0.2 mol/L、0.3 mol/L、0.4 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液进行浓度梯度洗脱,调节流速至为 0.5 mL/min,每管收集 8 min,每个浓度洗脱至 OD₂₈₀≤0.02,收集蛋白峰,检测出具有凝血活性的蛋白峰,依次用 Tris-HCl 缓冲液、蒸馏水透析 36 h,每 8 h 换一次透析液,冻干保存。

SephadexG-75 分子筛层析

填料的活化:称取 8.0 g SephadexG-75,加入 150 mL Tris-HCl 缓冲液,加热煮沸 1 h,期间不断搅拌,冷却后倾去上清液,再加入 Tris-HCl 缓冲液,轻轻搅拌,静置 20 min,倾去上清液,如此反复洗涤至液面无悬浮杂质即可。

装柱:与 DEAE-52 纤维素柱层析同。

上样:称取 50 mg 待纯化的样品溶于 2 mL Tris-HCl 缓冲液中,其余步骤与 DEAE-52 纤维素柱层析同。

洗脱收集:采用 Tris-HCl 缓冲液进行洗脱,其余步骤同 DEAE-52 纤维素柱层析。

1.2.2 糖含量的测定

采用蒽酮-硫酸法测定,将葡萄糖标准品配成 0、

20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液各 2 mL, 同时将适量 BL 用 2 mL Tris-HCl 缓冲液溶解, 再分别加入 8 mL 葱酮试剂, 冰水浴中冷却后沸水浴加热 15 min, 冷却后在 625 nm 下测吸光值, 然后以吸光值为纵坐标, 以葡萄糖浓度为横坐标, 得到的标准曲线方程为: $y=0.0025x+0.0177$, $R^2=0.9972$, 根据标准曲线计算凝集素的糖浓度, 利用如下公式计算糖含量:

糖含量 (%) = 糖浓度 ($\mu\text{g/mL}$) / 凝集素浓度 ($\mu\text{g/mL}$) $\times 100\%$

1.2.3 2% 鸡红细胞悬液的制备

取新鲜鸡血 5 mL, 加入 1 mL 抗凝剂, 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入适量 TBS 洗涤, 1000 r/min, 离心 3 min, 弃上清, 重复 4 次, 按红细胞挤压体积用 TBS- Ca^{2+} 配成 2% 红细胞悬液。

1.2.4 凝血试验

参照 LIN Peng 等^[9]的方法。用 TBS- Ca^{2+} 配置 1.071 mol/L 的凝集素溶液, 首先在 V 型 96 孔板各孔中加入 25 μL TBS- Ca^{2+} , 然后在各行首孔中加入 25 μL 凝集素粗品溶液, 混匀后从第一孔吸取 25 μL 加入第 2 孔, 接着从第二孔吸取 25 μL 加入第 3 孔, 以此类推, 最后一孔吸弃 25 μL , 最后每孔加入 25 μL 2% 红细胞悬液, 混匀, 并以 TBS- Ca^{2+} 作空白对照, 室温放置 30 min, 观察凝集现象。

无凝集现象时, 红细胞沉于 V 型板的孔底部, 呈一光滑小圆点; 有凝集现象时, 红细胞相互聚集成一片絮状物, 不下沉。红细胞的凝集活力以有凝集现象产生时的最大稀释倍数表示, 本文用 2^n 表示 (n 表示样品倍比稀释次数)。

1.2.5 SDS-PAGE

表 1 SDS-PAGE 制胶各溶液使用量

Table 1 The formula of SDS-PAGE

溶液	5 mL 15% 分离胶用量/mL	2 mL 5% 浓缩胶用量/mL
蒸馏水	0.5	1.4
30% 丙烯酰胺	2.5	0.33
1 M Tris-HCl, pH 8.8	1.9	0.25
10% SDS	0.05	0.02
10% 过硫酸铵	0.05	0.02
TEMED	0.002	0.002

配胶: 按表 1 所示配方先制分离胶, 胶加入凝胶板后在胶面上灌满聚乙二醇, 静置 30 min 后倾去聚乙二醇, 用超纯水清洗胶面, 用滤纸吸干水分; 再按配方制浓缩胶, 溶液加完后将梳子小心插入胶中, 静置 30 min 后将梳子轻轻拔下, 卸掉玻璃板, 安装到电极支架上, 再将电极支架装配到电泳槽上, 在槽中加入

电泳缓冲液, 准备电泳。

上样: 上样前将凝集素样品中加入等体积的 2 \times Lading Buffer, 混匀后于 95 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 10 min, 用移液枪将凝集素样品 (20 μL) 和 Marker (5 μL) 依次加入梳子孔中。

电泳: 装配好电极, 在恒压 60 V 下, 电泳 30 min, 使溴酚蓝条带迁至分离胶, 再将电压升到 120 V, 约 35 min 后, 溴酚蓝条带接近凝胶下缘, 关闭电源, 结束电泳。

染色及脱色: 将玻璃板取出后小心将凝胶剥离下来, 放入装有考马斯亮蓝 R-250 的染色盒中, 于摇床上振荡染色 1 h; 将染色完毕的凝胶换到脱色液中振荡脱色, 更换脱色液至背景无色, 蛋白条带清晰可见为止。

1.2.6 糖抑制试验^[10]

配置 0.2 mol/L 各种糖溶液和 1.071 mg/mL 的纯化后的凝集素溶液, 首先在 96 孔 V 型血凝板上每孔加入 25 μL TBS- Ca^{2+} 缓冲液, 再各行首孔中分别加入 25 μL 凝集素溶液, 并倍比稀释, 最后一孔吸弃 25 μL , 各行再分别加入 25 μL 各种糖溶液, 最后每孔加入 25 μL 2% 鸡红细胞悬液, 混匀。室温下放置 0.5 h 后观察。以 TBS- Ca^{2+} 溶液作对照。

1.2.7 热稳定性试验

参照唐海淑等^[11]的方法。将 96 孔 V 型血凝板各孔加 25 μL TBS- Ca^{2+} 缓冲液, 把纯化后的凝集素溶液于分别置于温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ ~110 $^{\circ}\text{C}$ (以 10 $^{\circ}\text{C}$ 为梯度) 水浴中处理 30 min, 将不同温度处理的凝集素溶液 25 μL 分别加入各行首孔中, 并作倍比稀释, 末孔吸弃 25 μL , 最后每孔加入 25 μL 2% 鸡红细胞悬液, 混匀。室温下放置 0.5 h 后观察, 以未处理的凝集素溶液作对照。

1.2.8 金属离子稳定性试验

参照唐海淑等^[11]的方法。配置 0.05 mol/L 的各种金属离子溶液和 1.071 mg/mL 的纯化后的凝集素溶液, 其余步骤与糖抑制试验同。

1.2.9 酸碱稳定性试验^[12]

分别用 0.015 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液、0.015 mol/L Tris-HCl 缓冲液、0.015 mol/L 磷酸盐缓冲液、0.015 mol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制 pH 11.0~12.0、pH 9.0~10.0、pH 6.0~8.0、pH 3.0~5.0 的不同 pH 缓冲液, 再进行凝血试验, 在加入 2% 鸡红细胞悬液前加入各行先分别加入等量各不同 pH 值的缓冲液, 观察凝集现象。

1.3 数据分析

所有数据均用 Excel 软件处理, 结果用平均值±标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 不同浸提液的提取率

由表 1 可知, 不同浸提液的提取率有所不同, 其中 Tris-HCl 缓冲液的提取率最高为 3.57%, 磷酸缓冲液次之, 蒸馏水的提取率最低, 仅为 2.01%, 因此从提取效率来看, Tris-HCl 缓冲液是最佳浸提液, 且凝血试验表明 Tris-HCl 缓冲液提取的凝集素粗品的凝集活力可达 2³。

表 2 不同浸提液的提取率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Extraction rate of different extract solutions

浸提液种类	凝集素粗品的质量/g	提取率/%
蒸馏水	0.101±0.03	2.02±0.04
生理盐水	0.113±0.02	2.26±0.03
Tris-HCl 缓冲液	0.179±0.01	3.57±0.02
磷酸缓冲液	0.162±0.01	3.23±0.04

2.2 DEAE-52 阴离子交换层析

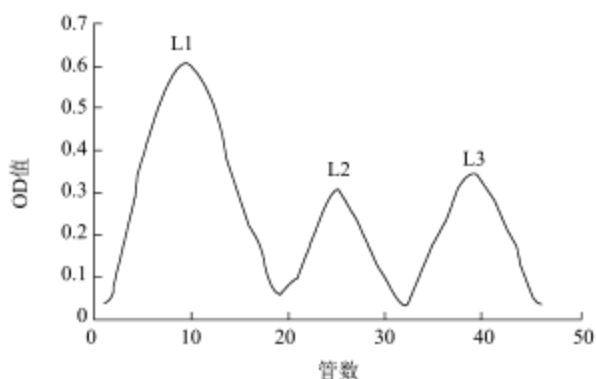


图 1 DEAE-52 阴离子交换层析图

Fig.1 DEAE-52 anion exchange chromatography

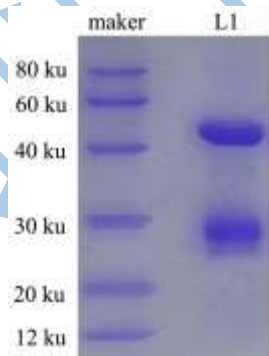


图 2 L1 的 SDS-PAGE 图

Fig.2 SDS-PAGE of L1

将冻干的凝集素粗品溶于 Tris-HCl 缓冲液中, 然后用 DEAE-52 阴离子交换柱进行层析, 经洗脱分离

收集, 得到 3 个不同的组分, 分离效果如图 1 所示。凝血试验表明, 组分 1 (L1) 具有较高凝集活性, 将 L1 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 得到两条带 (如图 2 所示), 表明 L1 中含有两种物质, 还需进一步纯化。

2.3 SephadexG-75 分子筛层析

L1 经 SephadexG-75 分子筛层析后, 得到两个不同的组分 (如图 3), 这与 L1 的电泳结果一致; 凝血试验表明只有第一个组分 (BL) 具有凝血活性, 与生理盐水对照组 (第三组) 相比其凝血活力很强, 可达 2⁸, 如图 5 所示; 将 BL 进行 SDS-PAGE 检测发现只有一条带 (如图 4), 说明 BL 是单一物质, 即西兰苔凝集素, 其分子量约为 27 ku。

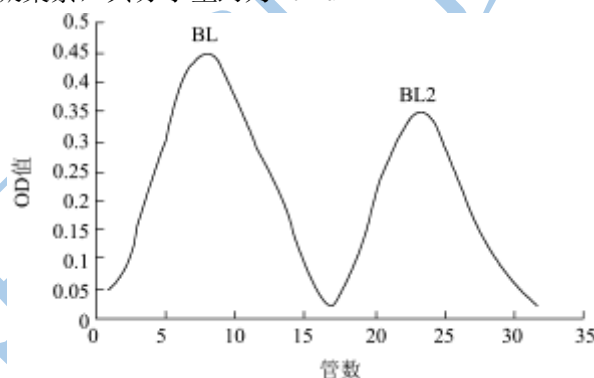


图 3 SephadexG-75 分子筛层析

Table 3 Effect of sugar on BL hemagglutinating activity

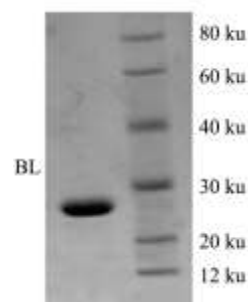


图 4 BL 的 SDS-PAGE 图

Fig.4 SDS-PAGE of BL

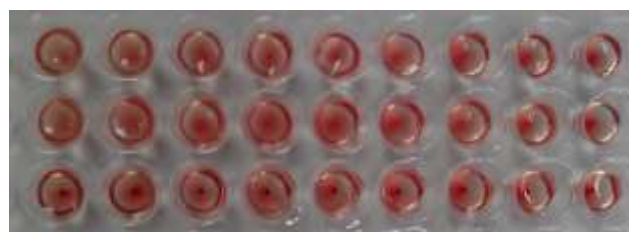


图 5 BL 凝血试验

Fig.5 Agglutination test of BL

2.4 糖抑制试验

糖抑制试验表明, 除在蔗糖溶液中 BL 的凝集活力无变化外, 在其他糖溶液中均有所下降, 其中在 D-甘露糖和阿拉伯糖溶液中下降幅度最大, 说明这两种

糖能够与红细胞竞争性结合 BL, 由此推测 BL 上这两种糖的结合位点较多, 具体实验结果见表 3。

表 3 糖溶液对 BL 凝集活力的影响

Table 3 Effects on hemagglutinating activity of BL by sugars

	葡萄糖	麦芽糖	D-甘露糖	D-木糖	阿拉伯糖	蔗糖	D-葡萄糖
凝集活力	27	27	25	27	25	28	26
最小凝集浓度/(mg/mL)	0.008	0.008	0.032	0.008	0.032	0.004	0.016

2.5 糖含量的测定

测得 BL 的 4 次吸光值的均值为 0.112 ± 0.08 , 根据标准曲线方程计算得 BL 的糖浓度为 38.0 ± 0.034

$\mu\text{g/mL}$, 其含糖量为 $7.60 \pm 0.025\%$ 。

2.6 温度、缓冲液 pH 及金属离子的影响

表 4 pH 对 BL 凝集活力的影响

Table 4 Effect of pH on BL hemagglutinating activity

	pH									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
凝集活力	24	25	26	26	28	28	27	26	25	25
最低凝集/(mg/mL)	0.064	0.032	0.016	0.016	0.004	0.004	0.008	0.016	0.032	0.032

由上表可知, 西兰苔凝集素 BL 的凝集活性受 pH 的影响, 在强酸强碱中凝集活性大幅下降, 其最适 pH

范围是 7~8。

表 5 温度对 BL 凝集活力的影响

Table 5 Effect of temperature on BL hemagglutinating activity

	温度/ $^{\circ}\text{C}$									
	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
凝集活力	27	28	28	27	26	26	26	25	25	24
最低凝集/(mg/mL)	0.008	0.004	0.004	0.008	0.016	0.016	0.016	0.032	0.032	0.064

由表可知, 在温度低于 90°C 时, BL 的凝集活性几乎基本保持不变, 只有在温度上升到 90°C 时, 其

活力才有所下降, 说明高温破坏了 BL 的蛋白质结构, 致使其凝集活性降低。

表 6 金属离子对 BL 凝集活力的影响

Table 6 Effect of metal ions on BL hemagglutinating activity

	金属离子									
	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Ni^{2+}	K^{2+}	Ca^{2+}	Mn^{2+}	Mg^{2+}	Na^{2+}	Ba^{2+}	Hg^{2+}
凝集活力	2^8	2^7	2^6	2^8	2^{10}	2^8	2^8	2^7	2^9	2^8
最低凝集/(mg/mL)	0.004	0.008	0.016	0.004	0.01	0.004	0.004	0.008	0.002	0.004

上表表明, 不同金属离子对西兰苔凝集素的凝集活性影响不同, 在含有 Ca^{2+} 的溶液中其凝集活性最强, 在含 Ni^{2+} 的溶液中凝集活性最弱, 表明凝集素 BL 受 Ca^{2+} 影响较大。

SDS-PAGE 得到两条带; SephadexG-75 分子筛层析得到两个组分, 第一个组分 (BL) 比第二个组分凝集活性高很多, 且电泳显示单一条带, 分子量约为 27 ku; 蒽酮-硫酸法测得 BL 含糖量为 $7.6 \pm 0.025\%$; 凝血试验显示 BL 具有较强的凝血活性, 最低凝集浓度为 0.004 mg/mL ; pH 在 7~8 范围内 BL 的凝集活性最强, 强酸强碱会使其活性大幅下降; 在含 Ca^{2+} 的溶液中 BL 的凝集活力有所增强, 表明其凝集活性受 Ca^{2+} 的影响; 此外, 西兰苔凝集素还具有较好的热稳定性, 在 $20^{\circ}\text{C} \sim 90^{\circ}\text{C}$ 范围内, 凝集活性几乎没有变化, 高于 90°C 时, 其凝集活性大幅下降, 可能是由于高温破坏

3 结论

本文以新型蔬菜西兰苔为原料, 对其凝集素进行分离纯化及部分性质研究, 得出以下结论: pH=7.2 的 Tris-HCl 缓冲液为最佳浸提液, 提取率为 $3.57 \pm 0.022\%$; 粗品经 DEAE-52 柱层析得到的 3 个组分中只有一个组分具有凝血活性; 此组分进行

了蛋白质的结构。后期本文还将对西兰苔凝集素的结构、抑菌活性及抗肿瘤活性进行研究。

参考文献

- [1] Yan Q, Jiang Z, Yang S, et al. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 442(1): 72-81
- [2] Yan Q J, Zhu L F, Kumar N, et al. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity [J]. Food Chemistry, 2010, 122(3): 589-595
- [3] Huang L H, Yan Q J, Kopparapu N K, et al. *Astragalus membranaceus* lectin (AML) induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia cells [J]. Cell Proliferation, 2012, 45(1): 15-21
- [4] Andrea L Battison, Rachael L Summerfield. Isolation and partial characterisation of four novel plasma lectins from the American lobster *Homarus americanus* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2009(33): 198-204
- [5] Lis H, Sharon N. The biochemistry of plant lectins (*phytohemagglutinins*) [J]. Biochemistry 1973, 42: 541-74
- [6] 杨艳婧, 张学武. 西兰苔籽中异硫氰酸盐鉴定及诱导 OVCAR-3 细胞凋亡研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (2): 562-562, 579
- YANG Yan-jing, ZHANG Xue-wu. Research on the identification of isothiocyanates from broccolini seeds and its inducing apoptosis effect on OVCAR-3 cells [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2010, 38(2): 562-562, 579
- [7] 王晓琴, 王冰芳, 张学武. 西兰苔叶黄酮体外抗癌活性的研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (35): 20014-20015, 20024
- WANG Xiao-qing, WANG Bing-fang, ZHANG Xue-wu. Study of broccolini flavonoids on anti-cancer activity *in vitro* [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2010, 38(35): 20014-20015, 20024
- [8] CHEN Bei, SHI Xiang-zhu ZH, WANG SHao-yun, et al. Isolation and characterization of the antifungal protein from bitter melon seeds [J]. Journal of Fuzhou University (Natural Science), 2006, 34(6): 929-932
- [9] LIN Peng, LIU Yan, YANG Hai-bo. Study on extracting and fractionating of protein from *Chiorella* spp [J]. Journal of Dalian University, 2002, 23(4): 70-72
- [10] X Y Ye, T B Ng, Paul W K sang, et al. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds [J]. Journal of Protein Chemistry, 2001, 20(5): 367-375
- [11] 唐海淑, 宁雪飞, 陈亮亮, 等. 骆驼蓬种子凝集素粗品活性的初步研究 [J]. 西北植物学报, 2010, 30 (4): 813-820
- TANG Hai-shu, NING Xue-fei, CHEN Liang-liang et al. Preliminary study of the activities of the crude lectin from *peganum harmala* seeds [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(4): 813-820
- [12] Ahmed H, Chatterjee B P. Further characterization and immunochemical studies on the carbohydrate specificity of jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) lectin [J]. J. Biol. Chem., 1989, 264: 9365-9372