**灰喇叭菌子实体及菌丝多糖提取实验**

**样品处理：**

**1、配置PDA培养基[1]：**

马铃薯 200 g/L，葡萄糖 20 g/L，KH2PO4 3 g/L，MgSO4 1.5 g/L，柠檬酸 0.1 g/L，维生素B1 0.01 g/L，加水补足至 1 L，调节pH 6.5，25 ℃下培养25天。

**2、菌丝样品处理：**

将所得菌丝离心（8000 rpm，5min），冻干，并称取菌丝体干重60 g（按照10 g/L计算至少需要发酵6 L，但是灰喇叭菌发酵产率可能不足10 g/L，故发酵10 L），过60 目筛，得到灰喇叭菌丝体干燥粉末。

**3、灰喇叭菌干货处理：**

取灰喇叭菌干货120 g，60 ℃烘干至恒重，过60 目筛，得到灰喇叭菌干燥粉末。

**多糖提取[2]：**

（1） 称取90 g烘干的样品分装于3 个 250 mL烧杯中（每个烧杯30 g），加入95 %的乙醇，搅拌1 h，浸泡12 h后离心每个烧杯分到离心管（5000 rpm，10 min，4 ℃）（若离心不下去，选择先离心再抽滤{2层滤纸}）；

（2） 弃去上清液，将30 g固体物质倒入2000 mL烧杯中，加入1200 mL蒸馏水和搅拌子，并用保鲜膜将瓶口密封（防止水分的挥发）；

（3） 将该烧杯放入集热式恒温加热磁力搅拌器中（85 ℃），4 h后吸出搅拌子，抽滤或离心（4000 rpm，10 min，4 ℃）；

（4） 将定性滤纸放入沸水中煮10 min，连接真空泵，将所得溶液（尽量使溶液冷却，不能使水蒸气透过安全瓶进入隔膜真空泵中）倒入覆有两层滤纸的布氏漏斗中进行过滤并测糖含量；

（5） 将滤液倒入1000 mL蒸发瓶中，于30-70 ℃（不同糖液温度不同，根据实际情况确定）条件下旋转蒸发。

**除蛋白[3]：**

（1） 将浓缩液加入1/5 Sevage试剂(氯仿：正丁醇=4：1(v/v))混合后，涡旋振荡3 min后离心(5000 rpm，5 min，4 ℃)；

（2） 取最上层液体再加入1/5 Sevage试剂，重复8-15 次，（紫外扫描，并测糖含量）最下层有机溶剂回收利用；

（3） 将除蛋白后的溶液装入已沸水浴10 min的透析袋中（截留分子量为3000），流水透析24 h，再用蒸馏水透析12 h，每隔 4 h换水一次，77半周长，1/4)；

**MD=77mm；r=24.5 mm=2.45 cm**

**液体体积为 94 mL， 透析袋体积=πr2 \*h；**

**剪的长度20 cm，有效长度15 cm**

**体积=15\*3.14\*2.452=283mL/3 =94 mL**

（4） 将透析袋中溶液装入250 mL蒸发瓶中，在65 ℃条件下进行浓缩，将浓缩液装入烧杯中（测糖含量），再加入4倍体积95 %乙醇并用保鲜膜封口，放入冰箱中（48 h，4 ℃），醇沉后的乙醇要保留（测糖含量）；

（5） 将醇沉后的多糖装入已称重的离心管中，离心(5000 rpm，10 min, 4 ℃)。

（6） 离心结束后，再次对上清液进行浓缩，将所得的浓缩液冻干并于干燥器中保存（注意写明：姓名，提取时间，多糖种类）。

**多糖含量的测定[4]：**

**总糖的测定（苯酚硫酸法）：**

（1） 称取0.01 g无水葡萄糖于25 mL烧杯中，加蒸馏水溶解，定容于100 mL容量瓶；

5 % 苯酚：取0.5 mL于10 mL容量瓶；

（2） 用移液枪分别移取0，0.2，0.4，0.6，0.8，1.0 mL置于50 mL的离心管中，再补加蒸馏水至1 mL，制成不同浓度的标准液；

（3） 取一定稀释度的样品1 mL于离心管中；

（4） 分别向标准液和样品液中加入1.0 mL 5 % 的重蒸苯酚，摇匀后加入5.0 mL浓硫酸(缓慢、冰水浴、沿管壁)；

（5） 涡旋混匀，放入水浴锅中（15 min，100 ℃），流水冷却至室温；

（6） 490 nm测吸光度值。

**还原糖的测定（DNS法）：**

（1） 称取0.1 g无水葡萄糖于25 mL烧杯中，加蒸馏水溶解，定容于100 mL容量瓶中。

（2） 用移液枪移取0，0.2 ，0.4，0.6，0.8，1.0置于25 mL的离心管中，补加蒸馏水至2 mL，制成不同浓度的标准液。

（3） 取一定稀释度的样品2 mL于离心管中。

（4） 分别加入1.5 mL DNS试剂（将0.63 g二硝基水杨酸和26.2 mL 2 mol/L NaOH（2.096 g NaOH溶解于26.2 mL蒸馏水），加到50 mL含有18.2 g[酒石酸钾钠](http://baike.baidu.com/view/688761.htm" \t "_blank)的热水溶液（低于50 ℃）中，再加入0.5 g 重蒸苯酚和0.5 g Na2SO3，搅拌溶解，冷却后加水定容到100 mL，贮于棕色瓶中，常温保存）。

（5） 放入水浴锅中（100 ℃，5 min），流水冷却至室温，用蒸馏水补足至10 mL，加塞后混匀；

（6） 在设置波长为540 nm紫外分光光度计中检测各溶液的吸光度值

最后根据公式：多糖=总糖-还原糖

**多糖理化性质分析[5]：**

**测定分子量：**

称取样品2 mg溶于1mL蒸馏水中，寄去江南大学测定分子量。

（1） 称取分子量为5000、10000、100000Mw的葡聚糖标准品2mg于1.5mL离心管中，加入1mL蒸馏水；

（2） 离心4000 rpm，5 min；

（3） 用移液枪移取20 µL上清液装入流动相为蒸馏水、流速为1 mL/min、柱温为30 ℃的色谱柱中，以保留时间为横轴，1 g Mw为纵轴，绘制标准曲线；

（4） 称取样品2 mg溶于1 mL蒸馏水中，步骤同上；

（5） 根据峰型分布判断样品纯度，并利用色谱工作站分析样品的保留时间，得到样品的分子质量。

**单糖组成分析：**

（1） 称取10 mg冻干多糖粉末于5 mL具塞刻度试管中，加入2 mL2 M三氟乙酸(TFA)，在110 ℃条件下水解2 h（最后几分钟将盖子打开，让三氟乙酸挥发）；

（2） 反应结束后，覆上已扎孔的保鲜膜，放于-80 ℃冰箱中冻至固体状；

（3） 将离心管放入冷冻干燥机中干燥2天，干燥完成后，将浓缩后的多糖装入5 mL具塞刻度试管中；

（4） 分别加入10 mg盐酸羟胺（易潮解）、0.5 mL吡啶（有严重刺激性气味及腐蚀性），二者均在90 ℃烘箱内加热30 min并冷却至室温；

（5） 用移液枪加入0.5 mL乙酸酐，90 ℃条件下反应30 min；

（6） 所得反应产物即可进行气相色谱分析；

（7） 根据样品各峰的保留时间，确定样品的糖醛酸和单糖组的种类；根据各峰面积的比值确定各单糖之间的比例关系。

**多糖的纯化[2]：**

**DEAE-52离子交换柱分离：**

（1） DEAE填料干粉在15倍体积的蒸馏水中浸泡1 h，去除上层浮渣，抽滤；（同时配置0.5M的HCL）

（2） 15倍体积的0.5 M的HCL浸泡DEAE填料1 h，抽滤；（同时配置0.5M的NaOH）

（3） 水洗DEAE至中性（一般需要水洗7-8次）；

（4） 用15倍体积的0.5 M的NaOH 浸泡DEAE填料1 h，抽滤；

（5） 水洗填料至中性（一般需要水洗7-8次）；

（6） 将处理好的填料加入一定量的水；

（7） 用止水夹夹住层析柱的底端，从层析柱上端加入1/3柱体积的蒸馏水，缓慢加入填料（用玻璃棒引流），让填料在柱中自然沉降。若水面超出柱体积则打开止水夹，使多余的蒸馏水流出（流速1 mL/min），填料装到30 cm的高度为止；（此时调节仪器各项参数）

（8） 用蒸馏水平衡2个柱体积（流速1 mL/min），加入样品溶液（用一次性胶头滴管处理）；

（9） 加入样品后先用蒸馏水洗脱两个柱体积，并收集分离纯化后的样品溶液，每管收集10mL；

（10） 用2 M的NaCl溶液进行线性洗脱，并收集分离纯化后的样品溶液，之后计算洗脱下来的NaCl浓度（亦可以从0.1 M开始，以0.1 M为单位试验，根据不同NaCl浓度下多糖含量选择可以将糖洗脱下来的浓度）；

（11） 用苯酚硫酸法测定多糖的含量（隔管测，并观察峰形）；

（12） 将收集管中相同离子强度的多糖溶液合并收集，-4 ℃保存；

**注：**

**每次再生：**先用2 M NaCl洗脱2个柱体积，再用蒸馏水洗脱2个柱体积才可进行下一组实验。

**3次活化：**先用2 M NaCl洗脱2个柱体积，再用30 %的乙醇洗涤，重复上述的预处理步骤。（15倍体积的0.5 M的HCL浸泡DEAE填料1 h，抽滤。水洗DEAE至中性。用15倍体积的0.5 M的NaOH 浸泡DEAE填料1 h，抽滤。水洗DEAE至中性。）

**保存：**可将DEAE短期保存于4 ℃，30 %的乙醇中。

中压柱子的柱头需要把螺丝拧的特别紧才可以保证柱子的密封状态。

洗脱样品的流速是1 mL/min不要随意改动，否则影响分离效果。

**Sephadex G-200葡聚糖凝胶色谱柱分离：**

（1） 将经离子交换柱初分离的样品配制成50 mg/mL的多糖溶液，取1 mL该多糖溶液，加入**Sephadex G-200层析柱**（2.6×80cm），用超纯水洗脱，洗脱速度为0.3 mL/min。

（2） 收集分离组份，每管收集10 mL，并采用苯酚硫酸法隔管检测各收集液的糖含量；

（3） 进行多糖分子量测定、单糖组成、红外分析。

**注：葡聚糖凝胶的型号可依据多糖分子量选择：**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 产品名称 | 范围 | 产品名称 | 范围 |
| 葡聚糖凝胶G-10 | <700 | 葡聚糖凝胶G-75 | 1000-50000 |
| 葡聚糖凝胶G-15 | 100-1500 | 葡聚糖凝胶G-100 | 1000-100000 |
| 葡聚糖凝胶G-25 | 100-5000 | 葡聚糖凝胶G-150 | 1000-150000 |
| 葡聚糖凝胶G-50 | 500-10000 | 葡聚糖凝胶G-200 | 1000-200000 |

**多糖的结构分析：**

**红外的测定（IR）：**

（1）称取1mg样品于研钵中，加入100mg溴化钾研磨至完全均匀；

（2）取出混合物装入干净的压模内，置于压片机上，在80 MP压力下压8 min；

（3）将试样薄片装在试样架上，且用纯溴化钾作为参比片，按照操作方法从波长为4000 cm-1一直扫描到400cm-1。

**多糖分级水解：**

（1） 称取适量多糖样品（20 mg）于10 mL具塞试管中，用4 mL 0.05 M TFA溶解，然后在110 ℃条件下，水解1 h；

（2） 将水解液倒入50 mL离心管中，加3倍体积95 %乙醇沉淀，离心；

（3） 将上清液倒入20 mL具塞试管中浓缩干燥；

（4） 冻干的粉末用4 mL 2 M TFA 110 ℃水解2 h，再进行多糖的乙酰化(具体步骤同上述单糖组成分析)，进行气相色谱分析（此处样品编号为1）。

（5） 用药匙将沉淀从离心管中转移至10 mL具塞试管，继续用4 mL 0.2 M TFA 110 ℃条件下水解1 h；

（6）将水解液倒入50 mL离心管中，加3倍体积95 %乙醇沉淀，离心并将上清液倒入20 mL具塞试管中浓缩干燥；

（7） 上清液浓缩干燥后用4 mL 2M TFA 110 ℃条件下水解2h，再进行多糖的乙酰化(具体步骤同上述单糖组成分析)，进行气相色谱分析（此处样品编号为2）；

（8） 用药匙将沉淀从离心管中转移至10 mL具塞试管，沉淀继续用4 mL 0.5 M TFA 110 ℃条件下水解1 h；

（9）将水解液倒入50 mL离心管中，加3倍体积95 %乙醇沉淀，离心并将上清液倒入20 mL具塞试管中浓缩干燥；

（10） 上清液浓缩干燥后用4 mL 2 M TFA 110 ℃水解2 h，再进行多糖的乙酰化(具体步骤同上述单糖组成分析)，进行气相色谱分析（此处样品编号为3）；

（11） 沉淀则直接用4 mL 2 M TFA 110 ℃水解2 h，再进行多糖的乙酰化(具体步骤同上述单糖组成分析)，进行气相色谱分析（此处样品编号为4）。

**多糖高碘酸氧化：**

（1） 绘制高碘酸钠消耗量标准曲线：分别配制0.015 M的高碘酸钠和碘酸钠溶液各20 mL，分别将高碘酸钠和碘酸钠溶液以5:0、4:1、3:2、1:4、和0:5（v:v）混合，取各混合液1 mL，并用超纯水定容于100 mL容量瓶中。在230 nm（223 nm看国标，实验室两个波长处的吸光值都测量）处测定吸光值，绘制高碘酸钠消耗量曲线。

（2） 精确称取30 mg多糖样品，置于250 mL棕黑色试剂瓶中，加入0.015 M高碘酸钠60 mL，充分振荡使其溶解，加塞置于4 ℃冰箱黑暗处氧化（期间定时振荡，每24 h取样检测吸光值），直至吸光值基本稳定（随着高碘酸被氧化，故而吸光值会逐渐下降并趋于稳定）；

（3） 取样反应终产物5.0 mL，加0.5 mL乙二醇，室温放置20 min，以还原多余的高碘酸钠。用0.0099 M NaOH标准液滴定甲酸的生成量（加入两滴酚酞为指示剂），同时以0.015 M高碘酸钠溶液做对照。

**Smith降解：**

（1） 取经高碘酸氧化后的多糖溶液40 mL，加入乙二醇4 mL，并于室温搅拌30min，以终止反应；

（2） 自来水透析24 h，蒸馏水透析24 h（截留分子量：500），将袋内液体减压浓缩至40 mL；

（3） 加入100 mg硼氢化钠，搅拌均匀后室温暗处放置24 h，以还原多糖醛；

（4） 滴加0.1 M醋酸溶液，直至反应液PH为5.5并无气泡产生，以除去过量的硼氢化钠；

（5） 自来水透析24 h，蒸馏水透析24 h（截留分子量：500），将袋内液体减压浓缩并冷冻干燥得到多糖醇产物；

（6） 将其溶解于2 M TFA 6 mL，于110 ℃条件下水解2 h后，40 ℃减压蒸发出残余的TFA（加入适量甲醇蒸干，重复操作2-3次）采用多糖乙酰化，对水解产物进行衍生化；

（7） 最后将反应产物直接进行气相色谱分析。

**多糖甲基化：**

（1） 准确称取 20 mg 干燥多糖，然后将其溶解于 5 mL 无水二甲亚砜中（用氮气驱赶空气后密封），每隔 30 min，涡旋震荡 5 min 磁力搅拌，持续 12 h，只至二甲亚砜中无絮状物为止，即为多糖二甲亚砜溶液；

（2） 称取 60 mg 经用石油醚多次洗涤过的 NaH 固体，将其溶解于 5 mL 无水二甲亚砜中，在 60℃下磁力搅拌（此过程持续充氮气，以隔绝氧气），直至混合物变为墨绿色并且无氢气产生时停止操作，即得二甲亚砜碳负离子溶液；

（3） 将二甲亚砜碳负离子溶液逐滴加入到多糖二甲亚砜溶液中，混匀后，室温放置过夜，最后反应液由墨绿色变为红棕色，即为多糖羟基去质子溶液；

（4） 将多糖羟基去质子溶液，置于-20℃冰箱内，直至凝固；充入氮气以隔绝空气，再用注射器抽取4 mL 碘甲烷在氮气保护下逐滴滴入；溶液由红棕色逐渐变为黄色，并将黄色溶液密封后放置于 4℃冰箱中反应 2 h，然后在暗室里，磁力搅拌反应过夜；

（5） 加入1 mL 4 mM Na2S2O3 的水，以终止甲基化反应；

（6） 将甲基化反应物加入透析袋中，自来水透析24 h，蒸馏水透析24 h（截留分子量：500）后，将袋内液体加入到等体积氯仿中，离心（3000 rpm， 5 min），溶液分为上下两层，收集下层油状的黄棕色液体（重复两次），并加入等体积的水，涡旋震荡后离心（3000 rpm， 5 min），去除水相，重复 3-5 次；

（7） 最后向有机相里加入适量无水硫酸钠，充分震荡，以吸收溶液里的水分；

（8） 离心后收集液体，用氮气吹干，并利用红外光谱 IR 检测甲基化是否完全（3500 cm-1 附近无-OH 吸收峰）；

（9） 向甲基化多糖中加入2 mL 90%（v/v）甲酸，密封水解6 h，减压蒸干，加入 3mL 2 M 三氟乙酸 TFA， 110℃水解 5 h，减压蒸干（加入适量甲醇蒸干，重复操作 2-3次)；

（10） 用 2 mL 超纯水溶解，再加入 25 mg 硼氢化钾 KBH4 室温反应 2 h，使其还原，滴加醋酸使 pH 值成酸性。减压浓缩（加入适量甲醇和一滴醋酸蒸干，重复操作5 次）；

（11） 采用糖腈乙酸酯衍生化法对水解产物进行衍生化，最后将反应产物直接进行气质联用 GC-MS 分析。

**多糖核磁共振（NMR）：**

取多糖样品50mg溶于D20重水，反复冻干（重复3次，完全置换H），溶于1 mL重水中，加入核磁管，在室温下用核磁共振仪进行解谱分析。

**参考文献：**

[1] Liu R, Zhou Z Yu, Liu J K. Three New Keto Esters from Cultures of the Basidiomycete Craterellus cornucopioides. Chinese Journal of Natural Medicines, 2010, 8(2): 0088−0090.

[2] Liu Y T, Sun J, Rao S Q, et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of polysaccharides from Catathelasma ventricosum in streptozotocin-induced diabetic mice. Food and Chemical Toxicology, 2013, 57: 39-45.

[3] Zhang L, Zhao S, Xiong S, Huang Q, Shen S et al. Chemical structure and antioxidant activity of the biomacromolecules from paddlefish cartilage. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 54: 65-70.

[4] Han X Q, Chai X Y, Jia Y M, et al. Structure elucidation and immunological activity of a novel polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, Sarcodon aspratus (Berk.)S. Ito. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 47:420-424.

[5] Li J W, Fan L P, Ding S D. Isolation, purification and structure of a new water-soluble polysaccharide from Zizyphus jujuba cv. Jinsixiaozao. Carbohydrate Polymers, 2011, 83: 477-482