**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200g/L，葡萄糖20g/L，KH2PO43g/L，MgSO41.5g/L，柠檬酸0.1g/L，维生素B10.01g/L，加水补足至1L，调节pH6.5，25℃下培养25天。

**2、菌丝样品处理：**

将所得菌丝离心（8000rpm，5min），冻干，并称取菌丝体干重60g（按照10g/L计算至少需要发酵6L，但是灰喇叭菌发酵产率可能不足10g/L，故发酵10L），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120g，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90g烘干的样品分装于3个250mL烧杯中（每个烧杯30g），加入95%的乙醇，搅拌1h，浸泡12h后离心每个烧杯分到离心管（5000rpm，10min，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30g固体物质倒入2000mL烧杯中，加入1200mL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℃），4h后吸出搅拌子，抽滤或离心（4000rpm，10min，4℃）；

（4）将定性滤纸放入沸水中煮10min，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1000mL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1/5Sevage试剂(氯仿：正丁醇=4：1(v/v))混合后，涡旋振荡3min后离心(5000rpm，5min，4℃)；

（2）取最上层液体再加入1/5Sevage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10min的透析袋中（截留分子量为3000），流水透析24h，再用蒸馏水透析12h，每隔4h换水一次，77半周长，1/4)；

**MD=77mm；r=24.5mm=2.45cm**

**液体体积为94mL，透析袋体积=πr2\*h；**

**剪的长度20cm，有效长度15cm**

**体积=15\*3.14\*2.452=283mL/3=94mL**

（4）将透析袋中溶液装入250mL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（48h，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(5000rpm，10min,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0.01g无水葡萄糖于25mL烧杯中，加蒸馏水溶解，定容于100mL容量瓶；

5%苯酚：取0.5mL于10mL容量瓶；

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

（3）取一定稀释度的样品1mL于离心管中；

（4）分别向标准液和样品液中加入1.0mL5%的重蒸苯酚，摇匀后加入5.0mL浓硫酸(缓慢、冰水浴、沿管壁)；

（5）涡旋混匀，放入水浴锅中（15min，100℃），流水冷却至室温；

（6）490nm测吸光度值。

**还原糖的测定（DNS法）：**

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

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

（3）取一定稀释度的样品2mL于离心管中。

（4）分别加入1.5mLDNS试剂（将0.63g二硝基水杨酸和26.2mL2mol/LNaOH（2.096gNaOH溶解于26.2mL蒸馏水），加到50mL含有18.2g[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0.5g重蒸苯酚和0.5gNa2SO3，搅拌溶解，冷却后加水定容到100mL，贮于棕色瓶中，常温保存）。

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

（6）在设置波长为540nm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2mg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4000rpm ，5min；

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

（4）称取样品2mg溶于1mL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10mg冻干多糖粉末于5mL具塞刻度试管中，加入2mL2M三氟乙酸(TFA)，在110℃条件下水解2h（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5mL具塞刻度试管中；

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

（5）用移液枪加入0.5mL乙酸酐，90℃条件下反应30min；

（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1h，去除上层浮渣，抽滤；（同时配置0.5M的HCL）

（2）15倍体积的0.5M的HCL浸泡DEAE填料1h，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0.5M的NaOH浸泡DEAE填料1h，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1mL/min），填料装到30cm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1mL/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2M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0.1M开始，以0.1M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2MNaCl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2MNaCl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0.5M的HCL浸泡DEAE填料1h，抽滤。水洗DEAE至中性。用15倍体积的0.5M的NaOH浸泡DEAE填料1h，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1mL/min不要随意改动，否则影响分离效果。

**SephadexG-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50mg/mL的多糖溶液，取1mL该多糖溶液，加入**SephadexG-200层析柱**（2.6×80cm），用超纯水洗脱，洗脱速度为0.3mL/min。

（2）收集分离组份，每管收集10mL，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80MP压力下压8min；

（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4000cm-1一直扫描到400cm-1。

**多糖****分级水解：**

（1）称取适量多糖样品（20mg）于10mL具塞试管中，用4mL0.05MTFA溶解，然后在110℃条件下，水解1h；

（2）将水解液倒入50mL离心管中，加3倍体积95%乙醇沉淀，离心；

（3）将上清液倒入20mL具塞试管中浓缩干燥；

（4）冻干的粉末用4mL2MTFA110℃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1）。

（5）用药匙将沉淀从离心管中转移至10mL具塞试管，继续用4mL0.2MTFA110℃条件下水解1h；

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

（7）上清液浓缩干燥后用4mL2MTFA110℃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10mL具塞试管，沉淀继续用4mL0.5MTFA110℃条件下水解1h；

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

（10）上清液浓缩干燥后用4mL2MTFA110℃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3）；

（11）沉淀则直接用4mL2MTFA110℃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0.015M的高碘酸钠和碘酸钠溶液各20mL，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1mL，并用超纯水定容于100mL容量瓶中。在230nm（223nm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30mg多糖样品，置于250mL棕黑色试剂瓶中，加入0.015M高碘酸钠60mL，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24h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5.0mL，加0.5mL乙二醇，室温放置20min，以还原多余的高碘酸钠。用0.0099MNaOH标准液滴定甲酸的生成量（加入两滴酚酞为指示剂），同时以0.015M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40mL，加入乙二醇4mL，并于室温搅拌30min，以终止反应；

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

（3）加入100mg硼氢化钠，搅拌均匀后室温暗处放置24h，以还原多糖醛；

（4）滴加0.1M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24h，蒸馏水透析24h（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2MTFA6mL，于110℃条件下水解2h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20mg干燥多糖，然后将其溶解于5mL无水二甲亚砜中（用氮气驱赶空气后密封），每隔30min，涡旋震荡5min磁力搅拌，持续12h，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60mg经用石油醚多次洗涤过的NaH固体，将其溶解于5mL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4mL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2h，然后在暗室里，磁力搅拌反应过夜；

（5）加入1mL4mMNa2S2O3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24h，蒸馏水透析24h（截留分子量：500）后，将袋内液体加入到等体积氯仿中，离心（3000rpm，5min），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（3000rpm，5min），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（3500cm-1附近无-OH吸收峰）；

（9）向甲基化多糖中加入2mL90%（v/v）甲酸，密封水解6h，减压蒸干，加入3mL2M三氟乙酸TFA，110℃水解5h，减压蒸干（加入适量甲醇蒸干，重复操作2-3次)；

（10）用2hmL超纯水溶解，再加入25mg硼氢化钾KBH4室温反应2h，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1mL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]LiuR,ZhouZYu,LiuJK.ThreeNewKetoEstersfromCulturesoftheBasidiomyceteCraterelluscornucopioides.ChineseJournalofNaturalMedicines,2010,8(2):0088−0090.

[2]LiuYT,SunJ,RaoSQ,etal.Antihyperglycemic,antihyperlipidemicandantioxidantactivitiesofpolysaccharidesfromCatathelasmaventricosuminstreptozotocin-induceddiabeticmice.FoodandChemicalToxicology,2013,57:39-45.

[3]ZhangL,ZhaoS,XiongS,HuangQ,ShenSetal.Chemicalstructureandantioxidantactivityofthebiomacromoleculesfrompaddlefishcartilage.InternationalJournalofBiologicalMacromolecules,2013,54:65-70.

[4]HanXQ,ChaiXY,JiaYM,etal.Structureelucidationandimmunologicalactivityofanovelpolysaccharidefromthefruitbodiesofanediblemushroom,Sarcodonaspratus(Berk.)S.Ito.InternationalJournalofBiologicalMacromolecules,2011,47:420-424.

[5]LiJW,FanLP,DingSD.Isolation,purificationandstructureofanewwater-solublepolysaccharidefromZizyphusjujubacv.Jinsixiaozao.CarbohydratePolymers,2011,83:477-482