刀豆凝集素的血凝活性及其性质研究

陈婧宜,王洪新*　(江南大学食品科学与技术国家重点实验室,江南大学食品学院,江苏无锡214122)

摘要　[目的] 为进一步研究刀豆凝集素提供依据。[方法] 从豆科植物刀豆属(Canavalia)中Canavalia ensiformis(L.)DC的干燥成熟种子中提取刀豆凝集素(Concanavalin A,简称ConA),进行血凝活性测定,并对其部分性质作了初步研究。[结果] 结果表明:采用胰蛋白酶修饰人血(A型)红细胞来检测ConA凝集活性时,发现其活性提高了8倍。ConA对人A、B、O、AB型及供血动物(兔,鸡,鸭,鸽,鲤、鲫鱼)的血红细胞都具有一定程度的凝集活性,无供体细胞专一性或血型专一性;D-葡萄糖和D-甘露糖是ConA的专一性结合糖。ConA是一种对热较稳定的凝集素,40 ℃以下时ConA很稳定,80 ℃以上保温20 min后,血凝活性完全丧失。在pH值范围5.8~8.3,ConA的凝集活性较高,在pH>11.9时,凝集活性完全丧失。变性剂脲浓度达到0.4 mol/L以上时,ConA的凝集活性可完全丧失。[结论] 该研究对今后系统阐明其生物学作用,扩大应用范围具有重要意义。

关键词　刀豆凝集素;活性测定;理化性质
中图分类号　Q946　　文献标识码　A　　文章编号　0517-6611(2008)01-00080-03

Study on Determination of Heggglutination Ativity of the Lectin from Canavalia ensiformis **(L.) DC and its Characteristics**

CHEN Jing-yi et al　(State Key Laboratory of Food Science and Technology,School of Food Science and Technology,Jiangnan University,Wuxi,Jiangsu 214122)

Abstract　[Objective] The aim of this research was to provide the base for studying the lectin from Canavalia ensiformis (L.) DC. [Method] The concanavalin A (ConA) was extracted from the dry mature seed of C. ensiformis (L.) DC, its heggglutination activity was determined and its part characteristics were studied. [Result] It as found the agglutinative activity of ConA could increase 8 times when detected with human red cell treated by typsin. ConA can agglutinate A、B、O and AB types of human blood and the erythrocytes of rabbit, chicken, duck, pigeon, common carp and crucian carp, without sepicificity of erythocyte agglutination. D-Glucose and D-Mannose were just the sugar which could band ConA specifically. ConA was a kind of lectin stable to heat treatment. It was stable at below 40 ℃, but it was completely inactive at above 80 ℃ for 20 min. ConA had higher lectin activity at pH of 5.8~8.3, but its lectin activity was inactive at pH above 11.9. The lectin activity of ConA was completely inactive when the denaturant urea concentration reached over 4 mol/L. [Conclusion] This study has important meaning for clarifying the biology function of ConA systematically in future and enlarging its application range.

Key words　Concanavalin A; Activity determination; Physicochemical characteristics

刀豆属豆科,因豆荚形似刀而得名"刀豆",又因荚形似人挟剑横斜,故又名"挟剑豆"。刀豆性味甘、温,功效温和中下气,益肾补元,治虚寒呃逆、呕吐、腹胀、肾虚腰痛、痰喘[1]。刀豆种子内含伴刀豆球蛋白(Concanavalin A,简称ConA)、脲酶(Urease)、L-刀豆氨酸(*L*-Canavanine)、胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitors)等物质。其中,ConA是一种植物血球凝集素(Phytohemagglutin),其本质是一类多价的、非免疫来源的、对糖及其缀合物高度专一识别的蛋白质。它在植物体内的作用是促进种子的成熟和发芽,储存蛋白质,转移糖,防御病原微生物,促进细胞生成等。它通过各种机制对动物产生抗营养作用,为刀豆种子中的抗营养因子。在刀豆种子中,ConA的含量较为丰富,占总蛋白的1%~3%[2-3]。

ConA最初用于免疫学研究。随着ConA纯化方法的发展及性质研究的日益深入,ConA应用的范围亦越来越广。除应用于临床诊断、治疗外,ConA已成为化学、生物化学、生物学、免疫学及医学等领域中有用的研究工具。提取的刀豆凝集素可以制成多种防癌、抗肿瘤保健食品及抗癌药物。它能对肿瘤和癌症患者的治疗起到积极的作用[3]。笔者以刀豆种子为材料,提取了具有血凝活性的刀豆凝集素(ConA),并对其理化性质、生物活性进行了初步探究,为进一步研究该凝集素提供了依据。

1　材料与方法

1.1　材料　洋刀豆种子产自福建,购于无锡市北塘种子公司;戊二醛25%水溶液,纯度等级BR,上海生化试剂公司生产;糖抑制试验中所用的糖:D-葡萄糖、D-甘露糖、半乳糖、乳糖、海藻糖、鼠李糖、N-乙酰乳糖胺(GalNAc)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、蔗糖、麦芽糖,均为Sigma产品;凝集素的凝血试验作用的人血A、B、O、AB型血,由无锡市红十字中心血站赠送;兔、鸡、鸭、鸽、鲤鱼、非洲鲫鱼等动物血液,采自无锡市崇安农贸市场;胰蛋白酶为Merck产品;试验所用分析试剂均为分析纯。

1.2　方法

1.2.1　红细胞悬液的制备。取50 ml人血(A型),用预冷的0.01 mol/L等渗磷酸缓冲液(pH值7.4)(以下均使用这种缓冲液,简称等渗PBS)离心洗涤红细胞3~5次,除尽血浆,然后将红细胞以PBS配制成10%红细胞悬液,再加入等体积4%戊二醛(PBS配制),立即混匀,室温搅拌固定过夜之后再用PBS洗涤3~5次,除去未作用的戊二醛,洗净的红细胞以PBS配成5%悬液,加0.02%叠氮钠后于4 ℃冷藏。考虑到红细胞的沉降、溶血、器壁吸附等因素可能影响测定结果,该悬液应于测定当天新鲜配制[4-5]。

1.2.2　刀豆凝集素的提取。取100 g刀豆种子,用微型植物组织捣碎机粉碎过80目筛,以800 ml预冷石油醚(bp 30~60 ℃)脱脂,室温下使溶剂自然挥发至气味消失,后用0.01 mol/L PBS溶液800 ml,4 ℃下搅拌提取8 h(10 000 g,离心20 min),取上清液即得ConA粗品。

1.2.3　血凝活性的测定。按孙册等的方法[1],以人血(A型)红细胞悬液为介质,以红细胞凝集为标准,检测刀豆种子凝集素的活性。在96孔"V"型凝血板上,每孔加入50 μl血球缓冲液后,每排的第1孔中加入样品浸提液50 μl,混合均匀后倍比稀释,每块血凝板保留1排作空白对照。为了防止植物中皂甙和鞣质的干扰,也保留1排。在加入浸提液的孔中加入5%人血(A型)血球悬浮液,静置2 h后肉眼观察凝集素

作者简介　陈婧宜(1983-),女,江苏淮阴人,硕士研究生,研究方向:天然产物的开发利用。*通讯作者。
收稿日期　2007-08-19

活性。不同的凝集程度表示如下:“# ”表示红细胞凝集沉于孔壁呈伞状(100% 凝集);“+ + +”表示与上基本相同,但边缘不整齐,红细胞有下沉倾向(75% 凝集);“+ +”表示红细胞部分凝集,未凝集红细胞沉积于孔底,呈小圆点状(50% 凝集);“- ”表示红细胞呈圆盘状沉于孔底,液体清亮。一般以“+ +”作为判定的终点,计算凝集效价。其中,凝集效价以血凝滴度2^n(n 为孔的位孔数)表示。

1.2.4 胰蛋白酶修饰人血红细胞(A 型)对ConA 凝集活性的影响。取胰蛋白酶(3.5 U/mg),用0.01 mol/L PBS 缓冲液配制成3.5、1.75、0.35、0.175、0.035、0.017 U/ml 酶液。用上述胰蛋白酶液处理人血(A 型)红细胞,即在37 ℃培养箱中温育15 min,离心去上清液(2 500 r/min,10 min),以0.01 mol/L PBS 洗涤3 次,最后检测凝集活性。

1.2.5 热稳定性的测定。按施炜星等的方法。将ConA 初始浓度配成2 mg/ml。在水浴中进行加热处理,以20 ℃为起点,每升高10 ℃保持5 min,取出凝集素液,室温下冷却,在V 型微量血凝板上经倍比稀释,测定其凝集活性。

1.2.6 酸碱稳定性测定。在pH 值3.7 ~13.0 的缓冲系统中,分别用不同pH 值的缓冲液将ConA 配制成初始浓度2.5 mg/ml,室温下静置2 h,经倍比稀释后,用人血(A 型)红细胞测定不同pH 值条件的血凝活性。pH 值3.7 ~5.8,采用0.1 mol/L NaCl-HAc 缓冲液;pH 值6.2 ~7.8,采用0.1 mol/L NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 缓冲液;pH 值8.3 ~9.1,采用0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液;pH 值9.5 ~10.8,采用0.1 mol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$ 缓冲液;pH 值11.2 ~11.9,采用0.1 mol/L Na_2HPO_4-NaOH 缓冲液;pH 值12.2 ~13.0,采用0.1 mol/L KCl-NaOH 缓冲液。

1.2.7 糖专一性抑制试验。参考孙册等的方法[7]。将供试糖配制成500 mmol/L 的母液,加50 μl 于96 孔血凝板1 号孔,2 ~9 号孔加入50 μl 0.01 mol/L PBS,将糖做系列2 倍稀释,第10 号孔以PBS 为对照。在每孔中加入50 μl 凝集素溶液,室温下放置30 min 后,加入50 μl 5% 人血(A 型)血细胞悬液,2 h 后观察血凝情况。所用的糖分别是D-葡萄糖、D-甘露糖、半乳糖、乳糖、海藻糖、鼠李糖、N-乙酰乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺、蔗糖、麦芽糖。

1.2.8 人类不同血型和动物血液的专一性测定。参考孙册等的方法。所选用的血红细胞有:①人的A 型、B 型、O 型、AB 型,配制成5% 的红细胞悬液;②兔、鸡、鸭、鸽、鲤鱼、非洲鲫鱼等动物血液,配制成2% 的红细胞悬液。用上述人血和动物血的红细胞悬液与凝集素进行血凝反应。

1.2.9 不同浓度脲对ConA 凝血活性的影响。以0.01 mol/L PBS 缓冲液为溶剂,配制6、4、2、1 和0 mol/L 的脲浓度梯度。4 ℃放置12 h 后,经0.01 mol/L PBS 缓冲液透析12 h,检测凝血活性。

2 结果与分析

2.1 胰蛋白酶修饰人血红细胞(A 型)对ConA 凝集活性的影响 凝集素具有糖结合专一性,而细胞膜上分布着各种糖基,但是许多糖基紧密连在膜的脂质双分子层中,被连接于膜的糖蛋白包围,因而影响了凝集素的桥梁作用。而胰蛋白酶能水解这些糖蛋白,去除伸出脂质双分子层的部分,使得糖基暴露出来,从而容易与相应的凝集素结合,并产生细胞凝集[6]。

从表1 可以看出,对于ConA 来说,1.75 U/ml 胰蛋白酶即可使凝集活性达到最大;当胰蛋白酶的浓度升到3.5 U/ml,凝集效价(血凝滴度)并不增加;当胰蛋白酶浓度低于0.035 U/ml,对凝集活性已无影响。采用胰蛋白酶修饰人血红细胞(A 型)检测ConA 凝集活性时,发现其活性提高了8 倍,增加了血红细胞的敏感性、稳定性以及凝集素活性检测的灵敏度。

表1　胰蛋白酶修饰人血红细胞(A 型)对ConA 凝集活力的影响

Table 1　Effects of human erythrocytes (A group) modified by trypsinase on the hemagglutination activity of ConA

胰蛋白酶 Trypsin U/ml	血凝滴度 Hemagglutination titer(T)									
	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8	2^9	2^{10}
未处理 Untreated	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
3.50	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1.75	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
0.35	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
0.175	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0.035	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
0.017	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

注:“+ ”、“- ”分别表示凝集和不凝集。下同。

Note: “+ ”, “- ” indicate hemagglutination and no-hemagglutination, resp.. The same as below.

2.2 热稳定性 ConA 是一种对热较稳定的凝集素。从表2 可以看出,当温度在40 ℃以下时,ConA 稳定,保持全部的凝血活性;当温度升到50 ℃时,保温20 min 后虽经缓慢冷却,但其凝集活性也有部分丧失,血凝滴度下降了3 个数量级;到60 ℃时剩下2^3 的血凝滴度,70 ℃时只剩下2^2 的血凝滴度,当在80 ℃以上保温20 min 后血凝活性完全丧失。

表2　温度对ConA 活性的影响

Table 2　Effects of temperature on the activity of ConA

温度 Temperature //℃	血凝滴度 Hemagglutination titer(T)							
	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8
20	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	-	-	-
60	+	+	+	-	-	-	-	-
70	+	+	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-

2.3 酸碱稳定性 从表3 可以看出,在pH 值为3.7 时,人血红细胞发生溶血,不能具体测定ConA 凝集活力。但若经$NaHCO_3$ 中和后,则ConA 在该pH 值下也有一定的凝集活力。在pH 值为5.8 ~8.3,ConA 的凝集活性较高;当pH 值> 8.3 时,ConA 的凝集活性下降;在pH 值为11.9、12.2 和13.0 时,ConA 的凝集活性完全丧失。其原因在于:在中性pH 值附近,静推斥能量小于其他稳定蛋白质相互作用的能量,因此ConA 是稳定的,然而在极端pH 值高静电荷引起的强烈分子

静电推斥导致ConA 蛋白质分子的肿胀和展开,部分埋藏在蛋白质分子内部的羧基、酚羟基和巯基离子化,这些离子化集团将自己暴露在水环境中,从而造成多肽链的散开,使得ConA 的空间结构发生根本性转变[8],ConA 产生不可逆变性,活力丧失。

2.4 糖专一性抑制 植物凝集素与糖分子的结合往往表现出一定的专一性,即其凝集活性往往被某一种或某一类单糖或寡糖所抑制。在半抗原抑制反应中,有最强抑制作用的糖定义为凝集素专一性糖[9]。

表3 pH 值对 ConA 活性的影响

Table 3 Effects of pH value on the activity of ConA

pH 值 pH value	血凝滴度 Hemagglutination titer(T)								
	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8	2^9
3.7	H	H	H	H	H	H	H	H	H
5.8	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6.2	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7.8	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8.3	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9.1	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9.5	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10.8	+	+	-	-	-	-	-	-	-
11.2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:H 表示溶血。

Note: H means hemolysis.

从表4 可以看出,D-葡萄糖、D-甘露糖能强烈抑制ConA 与人血(A 型)细胞的凝集反应,是ConA 的专一性抑制糖;鼠李糖、蔗糖、麦芽糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)对凝血反应也具有部分抑制作用。

表4 糖对 ConA 凝集活性的抑制作用

Table 4 Inhibition of sugar on the hemagglutination activity of ConA

糖 Sugar	浓度 Concentration /mmol/L							
	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9
D-葡萄糖 D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	-
D-甘露糖 D-mannose	+	+	+	+	+	+	-	-
半乳糖 Galactose	+	+	+	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	+	+	+	-	-	-	-	-
海藻糖 Trehalsoe	+	+	+	+	-	-	-	-
鼠李糖 Rhamnose	+	+	+	+	+	-	-	-
N-乙酰乳糖胺 N-acetylgalactosamine	+	+	+	+	-	-	-	-
N-乙酰葡萄糖胺 N-acetylglucosamine	+	+	+	+	-	-	-	-
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	+	-	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	-	-	-

2.5 血凝集活性 对于不同的动物,红细胞膜表面的寡糖成分和结构是不一样的。只有当红细胞膜表面的糖与凝集素分子中糖的结合部位构象相吻合时,才能引起凝集[9]。有些凝集素能区分人的A、B、O、AB 血型,有些还能区分人类血型的亚型。从表5 可以看出,ConA 并无人红细胞血型专一性,对人的A、B、O、AB 型血的红细胞均能发生凝集,血凝滴度为2^8;对供血动物种属也无专一性,对禽类血红细胞的血凝滴度为2^3~2^5,对鱼类血红细胞的血凝滴度为2^2。

2.6 不同浓度脲对 ConA 凝血活力的影响 从表6 可以看出,低浓度的脲(0.1 和0.2 mol/L)使ConA 凝集人血(A 型)红细胞的活性部分丧失,但当脲浓度达到0.4 mol/L 以上时,ConA 的凝集活性则完全丧失。

表5 ConA 的血凝活力

Table 5 Haemagglutination activity of ConA

红细胞来源 RBC sources		血凝滴度 Hemagglutination titer	红细胞来源 RBC sources	血凝滴度 Hemagglutination titer
人血型 Human blood type	A	2^8	兔 Rabbit	2^{10}
	B	2^8	鸡 Chicken	2^3
	O	2^8	鸭 Duck	2^5
	AB	2^8	鲤鱼 Carp	2^2
鸽 Pigeon		2^4	鲫鱼 Carassius auratus	2^2

表6 脲浓度对 ConA 凝血活力的影响

Table 6 Effects of urea concentration on the hemagglutinating activity of ConA

脲 Urea /mol/L	血凝滴度 Hemagglutination titer(T)							
	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8
0	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	+	+	+	+	+	+	-	-
0.2	+	+	+	+	-	-	-	-
0.4	-	-	-	-	-	-	-	-
0.6	-	-	-	-	-	-	-	-

3 结论

(1)凝集素能与多种细胞结合,并使细胞发生凝集,如红细胞、脾细胞、淋巴细胞、精子等[1]。通常采用血红细胞,检测凝集素的活性。这是一种简单、快捷的方法。但是,用正常的血红细胞检测分布于豆科植物种子的凝集素时,发现大多数种子仅表现出极弱的凝集能力。这给对凝集素的进一步研究带来了困难。为此,笔者试图采用胰蛋白酶来修饰人血(A 型)红细胞,获得较强的凝集效果,以提高凝集活性检测的灵敏度。

(2)作为一种凝集素,ConA 具有与糖专一的、可逆结合的特性。而与ConA 特异结合的糖(D-甘露糖和D-葡萄糖),可利用含有D-甘露糖基和吡喃葡萄糖基以及类似结构残基的天然或修饰的聚糖作亲和吸附剂来分离纯化ConA。

(3)由酸碱稳定性试验可知,在极端pH 值条件下,ConA 产生不可逆变性,活力丧失。因此,在今后进行刀豆凝集素的灭活方面研究时,可采用稀碱溶液浸提,并控制一定的pH 值,从而灭活大部分的ConA 活力。

参考文献

[1] 彭海鹏.防癌食品——刀豆[J].特种经济动植物,2001(3):27.
[2] 孙册,朱政,莫汉文.凝集素[M].北京:科学出版社,1986.
[3] 朱建标,王洪新.洋刀豆的营养价值及开发利用[J].粮食加工与食品

(下转第88 页)

5 展望

小麦种子活力的研究已经取得一定的成就,目前应加强对小麦种子活力测定方法和遗传机制的研究,特别是在分子水平研究桔梗种子活力的遗传决定因素,从理论上提供种子活力保持的可能途径及活力提高的有效措施。种子活力是种子生理学的一个新领域,应把种子生理学与植物发育学、植物分子生物学及植物生理生化上较前沿的理论-胞间信号传导联系起来。从纵横2个方面拓宽种子生理研究内容,必将大大推动种子活力的理论研究和实际应用。

参考文献

[1] YAMANE Y, MUNOZ B C, WARWICK S I, et al. Effects of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: oxygen-evolving activities, fluoresce characteristocs and the denatiuration process[J]. Photosynth Res, 1998, 57: 51-59.

[2] ROBERTS E H. Predicting the storage life of seeds[J]. Seed Sci Tech, 1973(1): 499-514.

[3] 李有春,刘仲齐. 遗传背景对小麦T型杂种种子活力的影响[J]. 1995, 8(1): 13-19.

[4] 姚大年,徐秀红,钱森和,等. 糯小麦种子活力的初步研究[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(5): 690-691.

[5] 马守才,张改生,王军卫,等. 小麦种子活力性状的遗传变异和相关研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(9): 1674-1679.

[6] DAVIDSON K G V, SAWA S, MOORE F D, et al. Maize seed response to successive imbibition/dryback cycles: viability and vigor[J]. Seed Science Research, 1994, (4): 431-437.

[7] EMLJ M, CLERKS H, VRIES B D, et al. Characterization of green seed, an enhancer of abi3-1 in Arabidopsis that affects seed longevity[J]. Plant Physiology, 2003, 132: 1077-1084.

[8] CHURCHILL G A, DOERGE R W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping[J]. Genetics, 1994, 138: 963-971.

[9] 长清海,刘广华. 小麦新品种穗发芽抗性差异的研究[J]. 中国农学通报, 1999, 15(6): 5-8.

[10] 李孟良,时侠清. 小麦不同粒位、粒重及其种子活力研究[J]. 中国农学通报, 2001, 17(1): 14-16.

[11] RATHORE K S. Peroxidase activity and lipid peroxidation in roots of cucumber seedings influenced by derivatives of cinnamic and benzoic acids[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 1996, 18(4): 365-370.

[12] SANCHEZ J A, MUNOZ B C, FRESNEDA J. Combined effects of hardening hydration-dehydration and heat short treatments on the germination of tomato, pepper and cucumber[J]. Seed Sci & Technol, 2001, 29: 691-697.

[13] 李灵芝,陈叔平,卢新雄,等. 非破坏性方法测定小麦种子活力研究[J]. 华北农学报, 2002, 17(2): 75-81.

[14] BLANKMAN S A, CHOWDHURY V K. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean[J]. Plant Physiol, 1991, 96: 868-874.

[15] 胡晋. 种子引发及其效应[J]. 种子, 1998, 94(2): 33-35.

[16] 陈莉,徐明霞,卢俊春. 小麦种子储藏技术[J]. 上海农业科技, 2004(5): 89-90.

[17] ZHU Y L, WU T, FAN Z M. Explant culture and regeneration plant of Platycodon grandiflorum[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2000, 28(1): 93-94.

[18] 杨列亮,马廷惠. 小麦种子超干储藏的研究[J]. 枣庄师专学报, 2001(2): 123-124.

[19] 朱世东. 自由基清除剂处理蔬菜衰老种子的生理效应[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(4): 390-394.

[20] 黄祥富,蒋明兰,廖军. PEG渗调对苦瓜种子活力和膜脂过氧化的影响[J]. 种子, 1999(2): 7-9.

[21] 吴才军,范淑英,罗赣丰. 辣椒种子活力保持和提高的研究[J]. 江西农业大学学报, 1999, 21(4): 505-508.

[22] 左广成. 电解水对种子萌发和生长的影响[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2005, 7(2): 9-10.

[23] 陈云,梁建生,刘立军,等. 低聚壳聚糖对小麦种子萌发以及幼苗生理生化特性的影响[J]. 耕作与栽培, 2003(3): 28-29.

[24] 张晓艳,李宇歌. PEG渗透处理对老化种子活力的影响[J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2005(2): 50-52.

[25] 汤菊香,冯艳芳. KH_2PO_4和青霉素对小麦老化种子发芽及幼苗生长的影响[J]. 种子, 2001, 116(4): 19-25.

[26] 汤海军,周建斌,王春阳. 矮壮素浸种对不同小麦品种萌发生长及水分利用效率的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(5): 29-34.

[27] 刘萍,齐付国,丁义峰,等. 青霉素和氨苄青霉素对小麦种子萌发及幼苗生理生化的影响[J]. 华北农学报, 2004, 19(3): 66-68.

[28] 刘建新,赵国林. 骆驼蓬提取物浸种对小麦幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(9): 175-176.

[29] 林匡飞,徐小清,郑利,等. Se对小麦种子发芽与根伸长抑制的生态毒理效应[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5): 885-889.

[30] 李广领,汤菊香. 铈元素和Zn^{2+}对小麦老化种子发芽及幼苗生长的影响[J]. 种子, 2005, 24(4): 21-25.

[31] 马丽苹,张敏,康怀. Cr^{6+}对小麦种子萌发及生长的影响[J]. 安徽农学通报, 2004, 10(6): 27-28.

[32] 乔奇,张振臣,靳秀兰,等. DDT和多菌灵对小麦种子生活力以及小麦生长的影响[J]. 河南农业科学, 2005(6): 101-103.

[33] 张慧丽,曲力涛,李景文,等. $NaHCO_3$对小麦种子萌发特性的影响[J]. 塔里木农垦大学学报, 2001, 13(2): 8-11.

[34] 赵旭,王林权,周春菊,等. 盐胁迫对不同基因型冬小麦发芽和出苗的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(4): 108-112.

[35] 邵云,姜丽娜,李春喜,等. Cu^{2+}对小麦种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 河南农业科学, 2005(1): 13-16.

[36] 夏丽华,依艳丽,刘孝义. 磁场处理对几种种子活力的影响[J]. 松辽学刊: 自然科学版, 2000(1): 11-13.

[37] 乔春林,刘滨疆. 空间电场对小麦种子发育的影响[J]. 种子, 2002(12): 39-40.

[38] 周小云,计巧灵,刘亚萍. 低能离子注入对小麦种子发芽及幼苗生理生化的影响[J]. 生物技术, 2005, 15(2): 69-72.

[39] 周小云,刘亚萍,计巧灵. 离子束注入对小麦幼苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响[J]. 新疆大学学报: 自然科学版, 2005, 22(2): 194-196.

[40] 张晓艳,李宇歌. PEG渗透处理对老化种子活力的影响[J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2005, 2: 50-52.

[41] 程水明,夏国军,王化岑. 适·甲柳种衣剂在小麦上的应用效果[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(6): 979.

[42] 张建平,孙芳,李玉中. 腐植酸对冬小麦种子的生理调节作用[J]. 中国农业气象, 2005, 26(3): 174-176

(上接第82页)

机械, 2002(3): 52-53.

[4] 单良,姚惠源. 麦胚凝集素红细胞凝集活性检测方法的改进[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(1): 49-53.

[5] LAVELLE E C, GRANT G, PUSZTAI A, et al. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice[J]. Immunology, 2000, 99(1): 30-37.

[6] KISHINEVSKY B D, LAWI J. Detection of lectin in nodulated peanut and soybean plants[J]. Planta, 1988, 176: 10-18.

[7] 查果,曾群辉,索朗斯珠. 山茱萸凝集素的测定及其提取方法的比较[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(8): 17-18.

[8] WONG J H, NG T B. Isolation and characterization of glucose/mannose/rhamnose specific lectin from the knife bean Canavalia gladiata[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics 2005, 439: 91-98.

[9] 王幸,马秋枝,刘强. 大豆凝集素的分离纯化和血凝活性研究[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(6): 57-60.