维普资讯 http://www.cqvip.com

云 南 植 物 研 究 1991; 13 (4): 417—424
Acta Botanica Yunnanica

商陆根中抗真菌蛋白的分离和特性研究*

陶应双　　胡　忠
(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

摘要　从美洲商陆（*Phytolacca americana* L.）夏天采集的 2—4 年生宿根中分离了二种抗真菌蛋白，称为 PAFP-R_1 和 PAFP-R_2。分离程序包括用盐溶液提取，经 CM-Sephadex 离子交换层析、凝胶过滤层析和羟基磷灰石柱层析纯化。在 PGA 培养基上，0.1 mg／ml 蛋白明显抑制木霉菌丝的生长；但对细菌的增殖，即使 1 mg／ml 也无抑制作用。用 SDS-PAGE 测得二者的相对分子量各为 13kD 和 15 kD，单多肽链，等电点约为 5.8。用酚-硫酸法未测出含糖。二种蛋白均高含半胱氨酸（19 mol／mol）。用 Edman 降解法测得二者的 N 末端均为 Ala。秋天采集的根中，这二种蛋白含量均很低，但富含由二条 PAFP-R_1 肽链以双硫键联结的二聚体，它无抗真菌活性，冬天宿根中抗真菌蛋白主要成分是 Mr 为 17kD 的单肽链蛋白。上述蛋白对于人红血球均无凝集活性，因此不是 PWM 的成分。以上结果说明，商陆根中有多种具抗真菌活性的蛋白，成分随季节发生变化，它们都是不含糖，高含半胱氨酸，分子量小于 20 kD 的单肽链蛋白。

关键词　美洲商陆，抗真菌蛋白

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIFUNGAL PROTEINS FROM THE ROOTS OF PHYTOLACCA AMERICANA (POKEWEED)

TAO Ying-Shuang,　　HU Zhong
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*, Kunming 650204)

Abstract　From summer harvested roots of 2—4 years old plants of Pokeweed, two antifungal proteins named PAFP-$R_1$and PAFP-R_2were isolated by using a procedure including extraction with saline solution, purification with ion exchange chromatography on CM-sephadex, gel filtration on sephadex G50 and chromatography on hydroxyapatite. Both proteins at 0.1 mg／ml inhibited obviously the growth of *Trichoderma viride* mycelia on a PGA medium plates, but even at 1 mg／ml did not inhibit the multiplication of bacteria *E. cola* and *B. subtilis*. They are both a single polypeptide with Mr of 13 kD and 15 kD respectively, with a pI of about 5.8 and with Ala as the N-terminus. Both proteins are rich in Cys, i.e, 19 mol／mol,

1990年10月收稿，1991年1月定稿。
* 国家 863 计划资助项目。

维普资讯 http://www.cqvip.com

and in them no carbohydrate was detected by phenol-sulfate reaction. Differing from summer harvested roots, late autumn harvested roots contained much less PAFP-R_1 and R_2, but more dimer of PAFP-R_1 linked by disulfide bonds which is of no antifungal activity. In winter harvested roots, the main antifungal component was found to be a protein of 17 kD. These proteins are all of no hemagglutination activity to human erythrocytes even at 2 mg / ml, they are not the components of pokeweed mitogen (PWM).

Key words *Phytolacca americana* (Pokeweed; Pokeberry); Antifungal proteins

文献中已报告从植物分离出多种蛋白，它们在体外试验显示有抗真菌活性。广为研究的是几丁质酶和 β-1、3-葡聚糖酶，认为它们在作物对真菌病的抗性中起重要作用[1, 2]。核糖体失活蛋白（RIP）和一类富含半胱氨酸的碱性多肽 Thionins 也显示有非专一的抗真菌活性[3, 4]。最近，胡忠等人从天麻（*Gastrodia elata*）球茎中分离出一种 14 kD 的碱性蛋白（GAFP），它能强烈抑制木霉（*Trichoderma viride*）菌丝的生长[5]；还从美洲商陆种子中分离到一种具有较宽抑菌谱、热稳定的 7 kD 碱性多肽（PAFP-S）[6]。它们均不属于水解酶，RIP 及 Thionin。这表明，种类繁多的植物界中，具抗真菌活性的蛋白是多种多样的。发掘和研究多种类型的抗真菌蛋白，对认识蛋白在植物抗真菌病中的作用，并将其基因用于作物抗病性的改良均有意义。本文报告我们对商陆根中抗真菌蛋白的分离和特性的研究结果。

材料和方法

1. 材料

美洲商陆（*Phytolacca americana*）栽培在昆明植物研究所，2—4 年龄。1989 年夏季（6 月）、秋季（9 月）和冬季（12 月）分别自地里挖出肉质宿根，洗净，去褐色表皮层，置 −15℃ 备用。

2. 蛋白的提取和纯化

三个不同季节采集的根均按以下程序进行分离。将根切碎，加入 10 倍量 0.5 mol / l 的氯化钠溶液，用高速组织捣碎器匀浆、4℃ 放置过夜。匀浆液经纱布过滤去渣，滤液于 1000 rpm 冷冻离心 20 min，上清液置 3.5 kD 透析袋中于低温下对蒸馏水透析 36 h。离心去沉淀，上清液调 pH5.5，上样于经 20 m mol / l 柠檬酸缓冲液（pH 5.0）平衡的 CM-sephadex C50 柱作层析。弃去流出液，用 50 m mol / l 磷酸缓冲液（PB，pH7.0）和 PB 中加 0.5 mol / l 氯化钠的二种溶液进行二步洗脱，分别得到 C_1 和 C_2 二个组分（图 1）。C_1 组分作适当超滤浓缩后在 Sephadex G50 柱上进行凝胶过滤层析，洗脱液为 0.1 mol / l NH_4HCO_3 溶液。由夏季根材料得到三个洗脱峰，顺序为 C_1S_1，C_1S_2，C_1S_3（图 2）。将 C_1S_2 组分对蒸馏水透析后、上羟基磷灰石（HA）柱作层析，用 0—0.20 mol / l 磷酸缓冲液进行线性梯度洗脱，得 4 个洗脱峰、$C_1S_2H_1$、$C_1S_2H_2$，$C_1S_2H_3$、$C_1S_2H_4$（图 3）。上述所有各蛋白组分均经脱盐后冻干，供抗菌活性检测和理化性质测定。

3. 理化性质测定

维普资讯 http://www.cqvip.com

SDS-PAGE 为 15%胶浓度，Lamemmli 缓冲系统。低分子量标准蛋白为上海生化所产品，另加入细胞色素 C（Mr＝12.4 kD）。供 SDS-PAGE 的蛋白样品制备时，溶解液分 SDS 和 SDS 加巯基乙醇二种作对比，以便确定是否是由双硫键联结的聚合体。

蛋白的等电点聚焦电泳用盘状聚丙烯酰胺胶（5%），加入 pH3.5—10 的 Ampholine（LKB），150V 电泳 10 小时，电泳后凝胶加 15% TCA 固定显色。

氨基酸组成分析按常规用 6 mol／l HCl 水解，水解液调 pH8 放置 4h，再调到 pH2 在日立 835 型氨基酸自动分析仪分析，以提高半胱氨酸测定的准确度。色氨酸参照 Spies 方法[7]测定，2mol／l NaOH 水解 2h，加入适量 5% $SnCl_2$ 以减少色氨酸的破坏。水解液中色氨酸用对二甲基氨基苯甲酸试剂比色测定。

蛋白质的 N 末端氨基酸用未变性蛋白经 Edman 降解得到 PTH 氨基酸，后者用反相 HPLC 鉴定。

用酚-硫酸比色法测检蛋白样品中糖含量。

4. 抗菌活性检测

对细菌繁殖的抑制活性测定按 Okada 方法[8]。收集悬浮培养中处于对数生长期的大肠杆菌和枯草杆菌细胞，重悬于 0.1 mol／l PB（pH 6.4），细胞浓度 2.5×10^8 个／ml 左右。加入 LB 细胞培养基及不同浓度的蛋白样品，37℃保温 2—3h，立即测定 A 650nm，对照不加蛋白的 PB 液。比较 A 值变化计算细菌增殖被抑制情况。

抗真菌活性的测定参照 Roberts[3]和胡忠等[6]的方法，用木霉（*T. viride*）作检测菌，培养在 PGA 平板上。蛋白样品一般配成 2mg／ml 的 PB 液（pH 6.5），成倍稀释，分别点样，求得引起肉眼能观察到菌丝生长被抑制的蛋白最低浓度，为抗真菌活性。

5. 凝血活性测定

蛋白溶于 PBS（pH6.8）中，2mg／ml，作一系列成倍稀释，各取 50μl 加入凝血板小孔中，每孔再分别加入 50μl 含 2%人血型 A 的红血球悬液，室温下 3h，观察血凝情况，求得引起凝血的最低蛋白浓度。

结果和讨论

1. 夏季宿根中二种抗真菌蛋白的分离和特性

夏季宿根中具抗真菌活性的蛋白在 C_1 组分，在 pH5.5 时，能交换于阳离子交换剂，在 pH7.0 时即被洗脱，可见是偏酸性的蛋白（图 1）。C_1 组分在 Sephadex G50 柱上排出的成分，即分子量大于 30kD 的 C_1S_1 没有抗菌活性。分子量最小的 C_1S_3 有抗真菌活性，若取该峰后 4／5，即得电泳纯样品，称为 PAFP-R_1（图 2）。C_1S_2 成分较杂，用离子交换层析分离效果差，而在羟基磷灰石柱上得以很好分离（图 3），其中 $C_1S_2H_3$ 具抗真菌活性，称为 PAFP-R_2，其量小于 PAFP-R_1。二者在 SDS-PAGE 上为单一带，相对分子量（Mr）各为 13 和 15 kD，单多肽链（图 4），等电点为 5.8-6.0。二者的氨基酸成分见表 1，特点是高含半胱氨酸，1／2 Cystine 为 19mol／mol，其次为 Glx，Gly 和 Asx。二者的紫外光谱相似（图 5），波长 325 nm 吸收峰表明它们富含双硫键。不经变性处理的 PAFP-R_1 和 PAFP-R_2 用 Edman 降解法

维普资讯 http://www.cqvip.com

即可测出 N 一末端氨基酸，均为 Ala（图 6）。可能 PAFP-R_1 和 PAFP-R_2 之间有同源性。这二种蛋白在琼脂培养基薄层板上点样 5μl 的 0.1mg／ml 溶液即可明显抑制木霉菌丝的生长（图 7）；而在悬浮培养液中 1mg／ml 对大肠杆菌和枯草杆菌的增殖也没有抑制作用。

表 1 PAFP-R_1 及 PAFP-R_2 的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of PAFP-R_1 & PAFP-R_2

	PAFP-R_1		PAFP-R_2	
	mol／mol	W／W(%)	mol／mol	W／W(%)
Asx	11.64	12.44	12.87	10.95
Thr	3.00	2.88	4.35	3.30
Ser	5.67	4.76	5.87	3.93
Glx	14.24	16.76	19.85	18.59
Gly	14.91	8.95	21.73	10.39
Ala	2.56	1.83	3.83	1.60
Cys	19.19	18.58	19.09	14.24
Val	3.96	3.72	3.98	2.97
Met	1.14	1.36	1.64	1.56
Ile	0.16	0.16	0.32	0.25
Leu	3.85	4.04	4.29	3.85
Tyr	2.87	4.15	6.70	7.72
Phe	1.89	2.25	2 26	2.38
Lys	4.06	4.81	3.49	3.29
His	3.19	3.96	3.45	3.41
Arg	4.29	5.95	5.51	6.12
Pro	4.03	3.71	3.97	2.91
Trp	1.00	1 63	2.00	2.59

表 2 商陆根几个蛋白组分的抗真菌活性和凝血活性

Table 2 Antifungal activity and hemagglutination activity of the Protein fractions from pokeweed roots

Fractions	Antifungal activity (mg／ml)	Hemagglutination activity (μg／ml)
C_1S_1	2	8
$C_1S_2^*$	2	500
$C_1S_2H_3$ (PAFP-R_2)	0 1	＞1000
C_1S_3 (PAFP-R_1)	0.1	＞1000
C_2	2	＞1000

* from late autum harvested roots. others from summer harvested roots.

维普资讯 http://www.cqvip.com

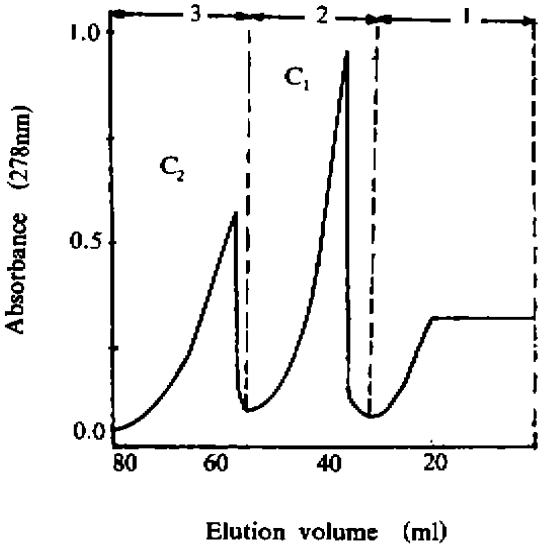

图1 总蛋白在CM-Sephadex C-50上的离子交换层析

Fig 1. Chromatography of total proteins on CM-Sephadex C-50.

1. 20 mol/l citric buffer (pH 5.0); 2. 50 mol/l phosphate buffer (pH 7.0); 3. 50 mol/l phosphate buffer plus 0.5 mol/l NaCl

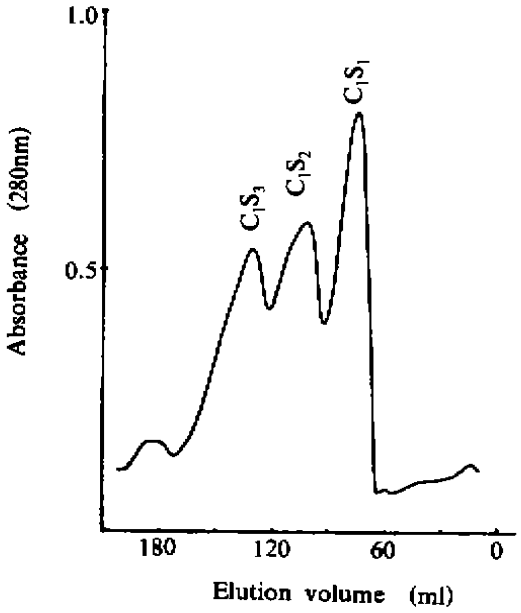

图2 C_1组份在Sephadex G-50上凝胶过滤层析

Fig 2. Gel filtration on Sephadex G-50 of C_1 fraction, eluted with 0.1 mol/l NH_4HCO_3

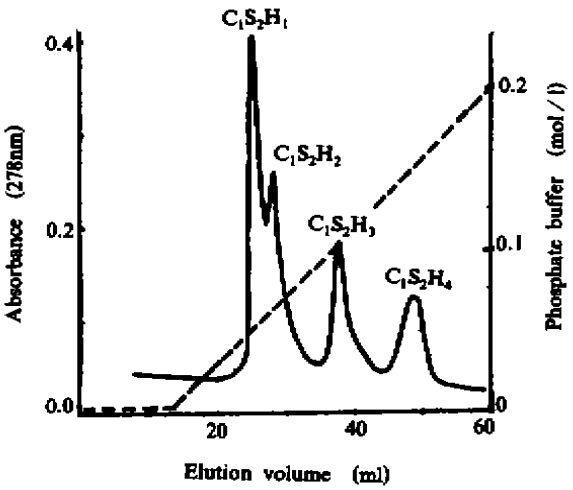

图3 C_1S_2的羟基磷灰石柱层析图

Fig 3. Chromatography of Fraction C_1S_2 on HA column. A gradient elution was carried out with 0—0.20 mol/l phosphate buffer.

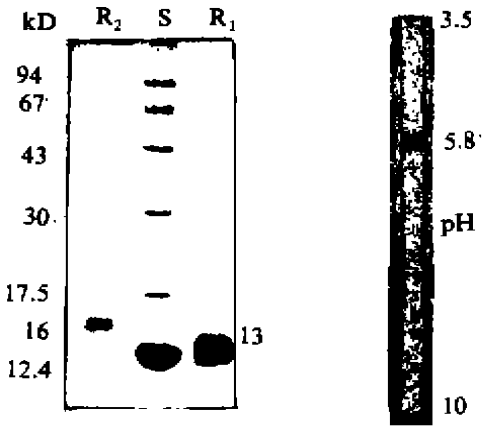

图4 PAFP-R_1和PAFP的相对分子量和等电点测定

Fig 4. Determination of the relative molecular weight (Mr) of PAFP-R_1 and PAFP-R_2 by SDS-PAGE, and the isoelectric point (PI) of PAFP-R_1 by IF-PAGE.

维普资讯 http://www.cqvip.com

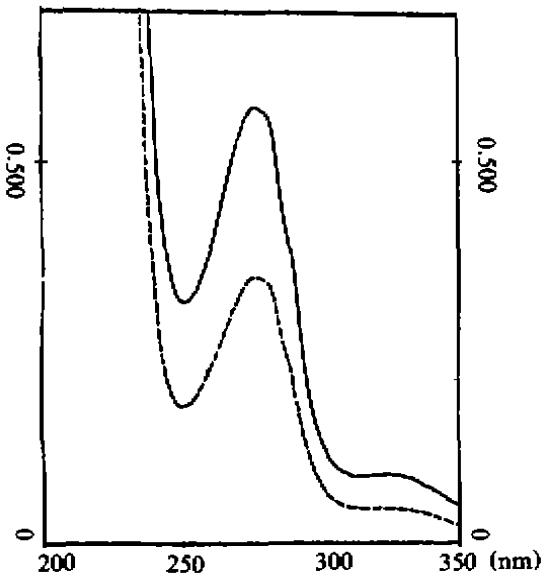

图5 PAFP-R_1 和 PAFP-R_2 的紫外光谱

Fig 5. UV Spectrum of PAFP-R_1(——) and PAFP-R_2(----) in 0.1 mol/l PB (pH 5.2)

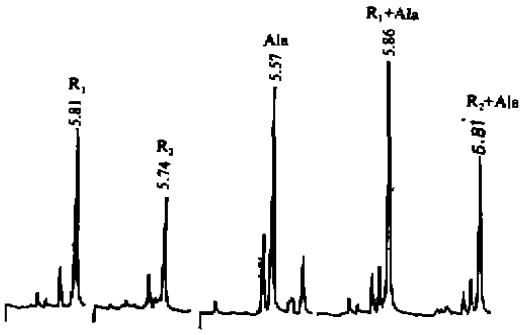

图6 PAFP-R_1& PAFP-R_2 N-末端 PTH 的 HPLC 层析图谱

Fig 6. High performance liquid chromatography of standard PTH-Ala and PTH-aa from the N-terminus of PAFP-$R_1$and PAFP- R_2 by Edman degradation.

PAFP-R_1 及 PAFP-R_2 和商陆种子中的 PAFP-S 相比较，均是富含半胱氨酸、分子量小，末端为 Ala 的单多肽链，但 PAFP-S 是碱性蛋白（pI=10）。迄今报道的抗真菌蛋白多为碱性，碱性蛋白易于穿透细胞膜而进入细胞，但 Roberts 等[9] 用碱性蛋白 BSA、Pancreatic ribonuclease 及 Protamine 对木霉（*T. reesei*）试验，即使 50μg/disc 也未见它们有抗真菌活性。可见碱性不是抗真菌蛋白的先决条件，PAFP-R_1 和 R_2 就是酸性蛋白。

2. 抗真菌蛋白组分的季节变化

晚秋采集的宿根中，只有 C_1S_2 峰，没有 C_1S_3 峰（图 2）. SDS-PAGE 分析表明，晚秋宿根的 C_1S_2 组分主要是 Mr 为 24 kD 的二聚体（图 8），经 SDS 加足够巯基乙醇还原变性即得到 Mr 为 12 kD 的亚基，可见亚基是通过双硫键联结的。这种二聚体的紫外光谱与 PAFP-R_1 相同，推论它的亚基就是 PAFP-R_1。二聚体无抗菌活性，在对蒸馏水透析时易形成沉淀，用 Edman 降解测不出 N-末端。

冬季宿根也没有 C_1S_3 蛋白组分（图 2），其 C_1S_2 组分的 SDS-PAGE 谱（图 8）显示主要成分是 Mr 为 17 kD 的单链蛋白，还有 18 和 19 kD 的蛋白，纯化的 17 kD 蛋白有弱的抗真菌活性。可见，商陆根中具抗真菌活性的蛋白成分多，且随季节而变化，但都是 Mr 小于 20 kD，含半胱氨酸高的单肽链。

3. 各蛋白组分的凝血活性

表 2 是夏秋季根中几种蛋白组分抗真菌活性和凝血活性的比较。PAFP-R_1 有较强抗真菌活性，没有凝血活性；二聚体 C_1S_2（秋季）无抗菌活性，凝血活性很弱（0.5mg/ml）；分子量大于 30 kD 的 C_1S_1 无抗菌活性，凝血活性强（8μg/ml）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

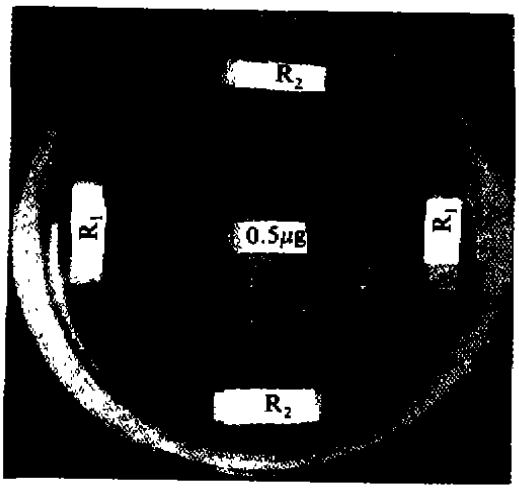

图 7　PAFP-R_1 和 PAFP-R_2 对木霉 (*T. viride*) 菌丝生长的抑制．每点 0.1 mg／ml 溶液 5μl，即 0.5 μg 蛋白

Fig 7. Inhibition of *T viride* mycelia growth by PAFP-R_1 and PAFP-R_2. On each spot loaded 0.5μg protein (0.1 mg／ml, 5μl)

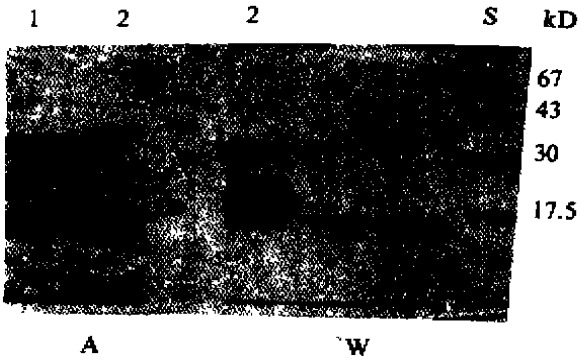

图 8　商陆晚秋的宿根(A)和冬季宿根 (W) 蛋白 C_1S_2 组分的 SDS-PAGE 图谱

Fig 8. SDS-PAGE patterns of the proteins fraction C_1S_2 from late autumn roots (A) and winter roots (W). S: Standard proteins. Protein Samples was treated with SDS only (1), or with SDS plus β-mecraptoethanol(2).

商陆根富含凝集素 (PWM)，它对人的 T、B 淋巴细胞分裂有强的刺激作用，商品 PWM 对人 A 型血球凝集活性为 <8μg／ml [10]，其组成较复杂，主要是分子量大的多聚体，而且随季节而变化 [11, 12]。显然本文中的 C_1S_1 便是 PWM。Schlumbaum 等人 [1] 用多种凝集素试验证明，若将混杂在商品中几丁质酶去除，凝集素自身无抗真菌活性，商陆凝集素也是这样，它无抗真菌活性。

参 考 文 献

1 Schlumbaum A, Mauch F, Volegi U, et al. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 1986; **324**: 365—367

2 Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T. Antifungal hydrolases in pea tissue Ⅱ. Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and B-1, 3-glucanase. *Plant Physiol* 1988; **88**:936—942

3 Roberts W K, Selitrennikoff C P. Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley *Biochem Biophycs Acta* 1986; **880**: 161—170

4 Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, et al. Leaf specific thionins of barley a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *EMBO J* 1988; **7**: 1559—1565

5 胡忠，杨增明，王钧．天麻球茎中一种抗真菌蛋白的分离和部分特性．云南植物研究 1988; **10**: 373—380

6 Hu Z, Liu X Z, Huang Q Z, et al. Isolation, characterization and amino acid seqnencing of an antifungal protein from the seeds of *Phytolacca americana*.In: Proceedings of the chinese symposium on polypeptide. Beijing: Science Press, 1990;

7 Spies J R. Determination of tryptophan in proteins. *Anal Chem* 1967; **39**: 1412—1416

8 Okada M, Natori S. Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolyph of *Scarcophaga peregrina*(flesh-fly) larvae. *Biochem J* 1983; **211**: 724—727

9 Roberts W K, Selitrennikoff C P. Plant proteins that inactivate foreign ribosomes. *Bioscience Reports* 1986; **6**: 19

维普资讯 http://www.cqvip.com

—29

10 Sigma Chemical Company. Price List, L9378, Phytolaca americana mitogen (PWM). 1989

11 Waxdal M J. Isolation, characterization and biological activities of five mitogens from pokeweed. *Biochemistry* 1974; **13**: 3671—3677

12 Bodger M P, Mc Given A R, Fitzerald P H. Mitogenic proteins of pokeweed I. Purification, characterization and mitogenic activity of two proteins from *Phytolacca octantra*. *Immunology* 1979; **37**: 785—792

* * * * *

五指莲重楼一新变种

周汉华 武孔云 陶 然

(贵阳中医学院)

A NEW VARIETY OF PARIS AXIALIS

ZHOU Han-Hua, WU Kong-Yun, Tao Ran

(*Guiyang College of Traditional Chinese Medicine*, Guiyang)

关键词 五指莲重楼; 红果五指莲

Key words *Paris axialis; P. axialis* var. *rubra*

红果五指莲 新变种

Paris axialis H. Li var. **rubra** H. H. Zhou, K. Y. Wu et R. Tao, var. nov.

A typo differt fructu maturo rubro, arillo luteo-rubro, segmentis interioribus perianthiorum ea exteriora subaequilongis.

Guizhou (贵州): Shuicheng (水城), 1 X 1990, H. H. Zhou (周汉华) 9031 (Typus KUN); ib. 3 Ⅶ 1990, H. H. Zhou 9013; ib. 25 Ⅳ 1990, H. H. Zhou 9008.

本变种与原变种的主要区别，在于果实成熟时为红色，假种皮为橙红色，花瓣与花萼近等长。

致谢: 本文承蒙李恒先生指导及审阅，还得到贵州师范大学屠玉麟教授和贵州科学院陈谦海研究员的大力支持，一并致谢。