

430-436

9098(13)

珠子参抗真菌糖蛋白的研究

杜良成 王世林 李英 胡运乾 胡忠

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

Q949.763.2

摘要 珠子参 (*Panax japonicus* C.A. Meyer var. *major* (Burk) Wu et Feng) 根茎用盐溶液提取, 透析、两次离子交换层析, 凝胶过滤、分离到两个蛋白质 (ZP-1, ZP-2), 其中, ZP-2 能明显地抑制绿色木霉、麦类赤霉菌丝的生长。经 SDS-PAGE 及 Sephadex G-75 过滤, 测得 ZP-2 的分子量分别为 55 和 66kD, 是由分子量非常相近的两个亚基组成。PAS 反应表明 ZP-2 是一个糖蛋白, 经 GLC 分析, 中性糖含量为 28.91%, 由葡萄糖、甘露糖、岩藻糖、木糖、鼠李糖和半乳糖组成; 糖醛酸含量经 Bitter 的方法测得为 22.76%。用 OPA 柱前衍生氨基酸高压液相色谱法测定 ZP-2 的部分氨基酸组成, 结果表明此蛋白质高含酸性氨基酸。ZP-2 对人红血细胞无凝集活性, 也无几丁酶和 β -1, 3-葡聚糖酶活性。

关键词 珠子参; 糖蛋白; 抗真菌蛋白质

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIFUNGAL GLYCOPROTEIN IN PANAX JAPONICUS VAR. MAJOR

DU Liang-Cheng, WANG Shi-Lin, LI Ying, HU Yun-Qian, HU Zhong

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract Two proteins named ZP-1 and ZP-2 in rhizome of *Panax japonicus* var. *major* were isolated by the procedure including saline solution extraction, dialysis, ion exchange chromatography, and gel filtration. On PSA media, ZP-2 inhibited obviously the growth of mycelia of *Trichoderma viride* and *Fusarium graminearum*. The protein contained two subunits (MW. 27 and 28kD), and its molecular weights were 55 and 66kD respectively determined by SDS-PAGE and Sephadex G-75 filtration. By PAS reaction, it was shown that ZP-2 was a glycoprotein, which contained glucose, mannose, fucose, xylose, galactose, rhamnose, and uronic acids. The contents of neutral sugars and uronic acids were 28.91% and 22.76% respectively. The protein was rich in Asp and Glu, but had no activity of hemagglutination, chitinase, and β -1, 3-glucanase.

Key words *Panax japonicus* var. *major*; Glycoprotein; Antifungal protein

植物中的一些蛋白质具抗真菌活性, 如降解真菌细胞壁的几丁酶和 β -1, 3-葡聚糖

糖酶。植物的病原相关蛋白 (PR 蛋白) 中许多是几丁酶和 β -1,3-葡聚糖酶, 它们可能在植物中的诱导抗性系统中起重要作用⁽¹⁾。核糖体失活蛋白 (RIP) 和富含羟脯氨酸 (HRGP) 的糖蛋白对一些真菌也有抗性^(2,3)。Bohlmann 等人从小麦叶子中分离到一种叫 Thionins 的蛋白质, 它是一类新的壁结合蛋白质, 能抑制多种真菌的生长⁽⁴⁾。一些植物中发现的蛋白酶抑制剂也可能与植物的抗病系统有关⁽⁵⁾。胡忠等人从天麻中分离了对腐生真菌具强烈抗性的 GAFP⁽⁶⁾。这些表明, 植物中可能存在着种类、功能、特性各异的抗真菌蛋白质。对不同植物中抗真菌蛋白质的研究, 将有助于对植物中复杂的抗病系统的认识, 为植物资源的发掘利用提供一定的基础。本文报道云南资源植物珠子参中的抗真菌糖蛋白的分离及其部分特性。

材料和方法

1. 材 料

珠子参 (*Panax japonicus* C. A. Meyer var. *major* (Burk) Wu et Feng) 系采自云南丽江地区的野生品种, 取其肉质珠状根茎, 洗净, 置于-70℃备用。

2. 蛋白质的提取及纯化

切碎的珠子参根茎于预冷的 0.3mol/l NaCl 提取液中粉碎, 4℃下抽提过夜 (约 5ml/g 鲜重), 双层纱布过滤, 滤液于 10 000rpm 冷冻离心 15 分钟, 上清液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度达 80% (0℃); 磁力搅拌 1 小时后, 同样离心 10 分钟, 沉淀重溶于 50mmol/l 柠檬酸钠盐缓冲液中 (含 10mmol/l EDTA, 14mmol/l 巯基乙醇, pH5.2), 15 000rpm 冷冻离心 10 分钟, 上清液在 20 倍体积的蒸馏水中透析 24 小时, 同样离心去沉淀, 上清液经浓缩后上样于 Sephadex G-50 柱, 用 10mmol/l 磷酸钠盐缓冲液 (pH6.8) 洗脱, 得 3 个峰, 峰 1 在适当浓缩后上样于经 10mmol/l 磷酸钠盐缓冲液 (pH6.8) 平衡的 CM-Cellulose CM-52 柱, 收集未吸附峰, 调 pH 至 7.5, 上样于经 10mmol/l 磷酸钠盐缓冲液平衡的 DEAE-Cellulose DE-52 柱, 弃去流出液, 用 50mmol/l 磷酸钠盐缓冲液 (pH6.8) 加入 0.1 至 0.4mol/l NaCl 作线性梯度洗脱, 得 4 个峰, 峰 1 和峰 2 (分别称为 ZP-1 和 ZP-2) 经超滤浓缩后分别上样于 Sephadex G-75 柱, 用 10mmol/l 磷酸钠盐 (pH6.8) 缓冲液洗脱, 收集第一峰, 冻干待用。

3. 理化性质测定

SDS-PAGE 参照 Laemmli 的方法⁽⁷⁾, 分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 5%, 分子量标准为 Pharmacia 试剂盒, 含磷酸化酶 b、牛血清白蛋白、卵白蛋白、碳酸酐酶、大豆胰蛋白酶抑制剂和乳白蛋白。非变性 PAGE 采用同样方法, 除了不含 SDS 及分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 3%。

PAS 反应 (Periodic Acid, Schiff's reaction) 按照 Pharmacia Laboratory techniques (Uppsala, Sweden, 1984)。糖醛酸含量的测定根据改进的吡啶法进行⁽⁸⁾。中性单糖的分析参照 Bradbury 的方法⁽⁹⁾。样品降解产物制备为 TMS 衍生物, 气相色谱检测, Se-54 毛细管柱, 30m, 定温 180℃, FID 检测, 根据标准单糖保留时间确定样品糖组成, 以肌醇为内标换算出糖含量, 考虑到该糖蛋白结构较为复杂, 降解分两步进行。首先用 2mol/l 三氟醋酸 (TFA), 110℃, 降解 4 小时, 玻璃纤维纸过滤, 滤液氮气吹干, 得降解产物 FS。过滤后的残渣再经 6mol/l HCl, 100℃, 降解 24 小时, 过滤, 滤液氮气吹干, 得产物 FA。FS 和 FA 分别进行 GLC 分析。

粗蛋白质含量以考马斯亮蓝法测定⁽¹⁰⁾。

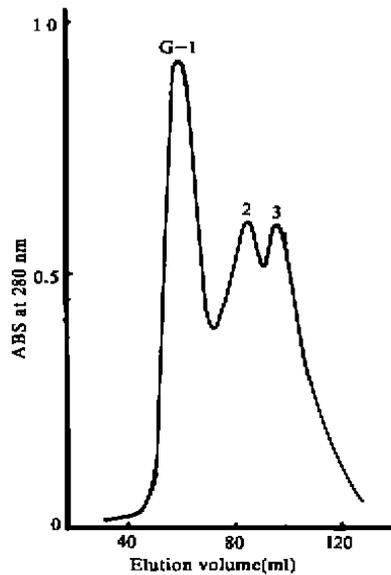


图 1.粗蛋白在 Sephadex G-50 柱上的凝胶过滤
Fig 1. Gel filtration on Sephadex G-50 column of crude proteins, eluted with 10 mmol/l sodium phosphate buffer (SPB) pH 6.8.

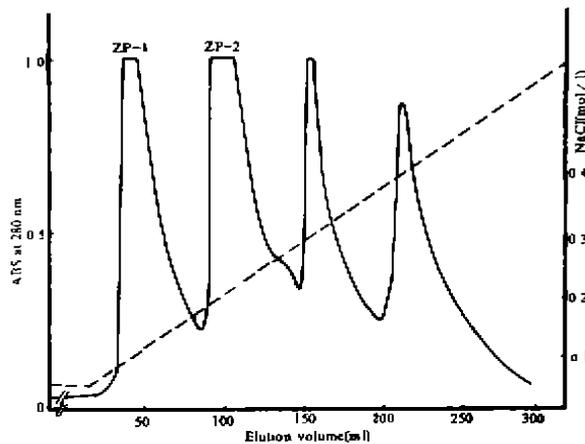


图 2.G-1 的 DEAE-Cellulose DE-52 层析
Fig 2. Chromatography of G-1 on DE-52 column, eluted with 50 mmol/l SPB pH 6.8

峰 1 抗菌活性最好, 是大分子部分 (MW 大于 30 000)。将峰 1 在接近中性时上样于 CM-Cellulose 柱, 大部分蛋白质未被吸附。因此, 尽管用酸性提取液, 珠子参中仍

氨基酸组成分析参照 Jarrett⁽¹¹⁾ 方法, 用邻苯二甲醛和 β -巯基乙醇进行柱前氨基酸衍生, 高压液相色谱分析, Micropak - MCH - 10 柱 (4.6 \times 250mm), 荧光检测, 激发波长 350nm, 发射波长 450nm, 流动相 A 液为甲醇: 0.05mol/l 醋酸钠液 (pH6.8) (80: 20, v/v); B 液为甲醇: 0.05mol/l 醋酸钠液 (pH6.8) (20: 80, v/v)。梯度洗脱, A 液从 10%至 90%, B 液从 90%至 10%, 梯度时间为 45 分钟, 流速 0.5ml/min, 纸带 0.2cm/min。

几丁酶活力根据 Boller 等人的方法⁽¹²⁾, β -1,3-葡聚糖活力根据从还原的昆布糖中释放的葡萄糖量来决定⁽¹³⁾。

凝血活性测定时将样品从 1mg/ml 倍比稀释直至 0.0005mg/ml, 每 20 μ l 样品加入 20 μ l 5%人红细胞悬液 (A, B, AB, O 型均来自云南省人民医院血库)。室温下 2 小时后观察血凝情况, 求得凝血的最低蛋白浓度⁽¹⁴⁾。

4. 抗真菌活性测定

采用直接在 PSA (马铃薯蔗糖琼脂) 培养基上滴加样品的方法。当菌丝长至培养皿面积的 2/3 时, 在菌丝前沿滴加不同浓度的样品液, 置于 28 $^{\circ}$ C 黑暗培养箱中培养, 以出现肉眼能观察到的抑菌圈作为其抗菌标准。

结果和讨论

1. 抗真菌蛋白质的分离

由于已报道的抗真菌蛋白质多为碱性, 采用酸性提取液进行总蛋白质提取。粉碎后的珠子参很易褐化, 影响以后的分离, 用硫酸铵沉下蛋白质后, 重溶的缓冲液中加入抗氧化剂是必要的。提取后每克鲜重珠子参中约含 3mg 蛋白质。粗蛋白质上样于 Sephadex G-50 柱进行分级, 得 3 个峰 (图 1)。

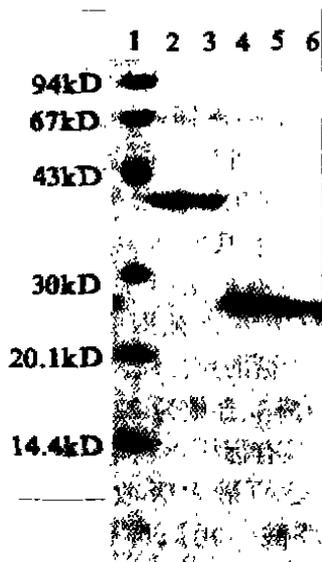


图 3. 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig 3. SDS-PAGE of proteins.

1. MW Markers; 2. & 3. ZP-1; 4. & 5. ZP-2;
6. Crude proteins

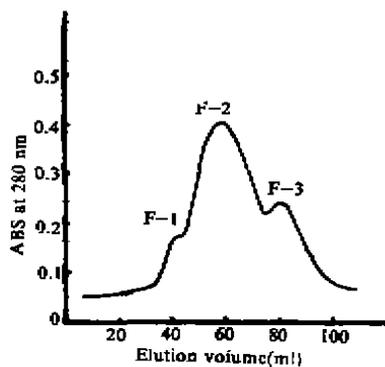


图 5. ZP-2 的 Sephadex G-75 凝胶过滤

Fig 5. Gel filtration on Sephadex G-75 column
of ZP-2, eluted with 10 mmol/l SPB pH 6.8.

Sephadex G-75 上洗下的第一峰是 ZP-2, 其后分别为卵白蛋白及 α -乳白蛋白 (图 6)。

因此, ZP-2 的分子量是三者中最大的。由于 ZP-2 和卵白蛋白的洗脱峰很靠近, 根据计算, 分子量为 66 000。因此 ZP-2 是二聚体, 而非多聚体。



图 4. 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig 4. Native-PAGE of proteins.

1. Crude proteins; 2. ZP-2

有大量酸性蛋白质。将酸性部分调至 pH 7.5, 以便更好的吸附阴离子交换柱, 经 NaCl 线性梯度洗脱, 得 4 个峰 (图 2)。

部分收集的峰 1 (ZP-1) 及峰 2 (ZP-2) 的后半峰在 SDS-PAGE 上分别显示单带及两条紧靠在一起的带 (图 3)。

但在非变性凝胶电泳上, ZP-2 则是一条带 (图 4)。

这说明 ZP-2 含两种亚基, 其分子量分别为 27 000 及 28 000。为了进一步证实以上结果, 将 ZP-2 与卵白蛋白 (MW 45 000, Sigma) 和 α -乳白蛋白 (MW 142 000, Sigma) 一起混合上样于 Sephadex G-75 柱 (柱长 90cm, Φ 1.2cm), 得 3 个峰 (图 5)。

部分收集各个峰, 各取一管进行紫外吸收光谱测定, 与标准卵白蛋白、 α -乳白蛋白、及 ZP-2 的吸收光谱进行对比, 证明

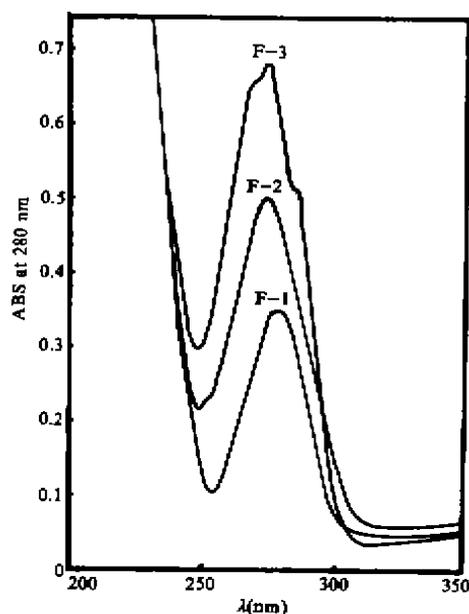


图 6. F-1, 2, 3 的紫外吸收光谱

Fig 6. UV spectrum of F-1, 2, 3, in 10 mmol/l SPB pH 6.8. F-1; ZP-2; F-2; Ovalbumin; F-3; α -Lactalbumin.

2. 抗真菌蛋白质的特性

分离的 ZP-1 对真菌抗性很弱, ZP-2 则表现较好的抗性。在 PSA 平板培养基上, 10 μ l 的 1mg/l ZP-2 溶液即对绿色木霉、麦类赤霉菌丝的生长有明显的抑制作用 (图 7)。这表明 ZP-2 对腐生和寄生真菌都有抑制作用。考虑到相对于其它抗真菌蛋白质, ZP-2 分子量较大, 我们进行了 PAS 测定, 结果 ZP-2 在 PAGE 板上被染成一条红带, 表明 ZP-2 是一个含糖的蛋白质。经改进的味唑法测定, 其中糖醛酸含量为 22.76%, 反应产物经光谱扫描, 具有标样半乳糖醛酸所示的特征峰 (520nm 处的最大吸收峰), 说明 ZP-2 中确有糖醛酸。用肌醇作内标, 经 GLC 分析, 测得 ZP-2 的中性糖含量为 28.9%。两步降解产物 FA 和 FS 的中性糖组成较大差异 (表 1)。2mol/l 三氟醋酸的降解物 (FS) 中含 5 种糖, 且绝大部分是葡萄糖; 经 6mol/l HCl 降解后 (FA) 有 6 种糖 (多出半乳糖), 虽然仍有大量葡萄糖, 但其它 5 种单糖的总量已超过中性糖量的一半。以上

结果表明, ZP-2 为含糖量较高的糖蛋白, 具有较复杂的结构, ZP-2 分子外围主要是葡萄糖, 蛋白质降解后 (6mol/l HCl), 裸露出的内核部分, 其糖组成更复杂。因此, 用 SDS 法和凝胶过滤法分别测得的分子量相差较大, SDS 法测得的分子量应比实际分子量小。



图 7 ZP-2 对真菌菌丝生长的抑制

Fig 7. Inhibition of mycelia growth of fungi by ZP-2 (1 mg/ml). A. *Trichodema viride* B. *Fusarium graminearum*; 1. 10 μ l of 10 mmol/l APB pH 6.8; 2. 10 μ l of ZP-2 in 10 mmol/l SPB pH 6.8; 3. 15 μ l of ZP-2 in 10mmol/l SPB pH 6.8; 4. 20 μ l of ZP-2 in 10 mmol/l SPB pH 6.8

表 1. ZP-2 降解物中中性糖的组成(%)
Table 1. Composition of neutral sugars in hydrolytic ZP-2(%)

样 品 Samples	葡萄糖 Gluc	甘露糖 Mann	岩藻糖 Fuc	木 糖 Xyl	半乳糖 Galact	鼠李糖 Rhamn
FS	93.61	1.32	1.65	2.76	no	0.66
FA	47.61	13.91	10.50	9.98	9.36	8.63

用 OPA 柱前氨基酸衍生高压液相色谱分析 ZP-2 的部分氨基酸组成, 结果表明 ZP-2 中含有大量酸性氨基酸, Asp 和 Glu 的含量均超过 10%。由于邻苯二甲醛不与脯氨酸或羟脯氨酸反应, 与半胱氨酸及赖氨酸反应不完全, 色氨酸在 6mol/l HCl 水解 24 小时后, 大部分被破坏, 因此, 表 2 只列出了 ZP-2 的部分氨基酸组成。

表 2. ZP-2 的部分氨基酸组成(%)
Table 2. Composition of partial amino acids of ZP-2 (%)

Amino Acids	%	Amino Acids	%
Asp	10.22	Glu	10.93
Asn	12.74	Ser	4.04
Thr	6.41	His+Gly	13.48
Ala	3.86	Tyr	7.24
Arg	3.67	Met+Val	8.88
Phe	5.91	Ile	3.37
Leu	8.88	Lys	trace

表 3. ZP-2 的几丁酶和 β -1,3-葡聚糖酶活力测定
Table 3. Assaying for activities of chitinase and β -1, 3- glucanase in ZP-2.

Chitinase*		β -1,3-Glucanase*	
ZP-2	Snailase**	ZP-2	Laminarinase**
0	1.50	0.05	1.34

* Chitinase: ABS at 585nm in 0.2ml 1mg protein / ml samples. Glucanase: ABS at 620nm in 20ul 1mg protein / ml samples. ** Snailase and laminarinase as standard samples were from Sigma Co.

由于 ZP-2 是一个具抗真菌活性的分子量较大的糖蛋白, 而在小麦中已经证明麦胚凝集素 (WGA) 并无抗真菌活性, 起作用的是几丁酶^[15], 因此, 有必要对 ZP-2 进行一定的功能分析。当 ZP-2 的浓度从 0.0005mg/ml 至 1mg/ml, 对人 4 种血型的红细胞悬液均无凝集作用。比较 ConA, WGA, RCA, 它们的凝血浓度均在 0.001mg/ml 以下, 可以认为 ZP-2 并无血凝集活性。对 ZP-2 进行几丁酶和 β -1, 3-葡聚糖酶活性测定, 结果证明 ZP-2 并无这两种酶活性 (表 3)。所以, ZP-2 不同于小

麦中的情况。ZP-2是由分子量在30 000左右的两条链组成,这与双链核糖体失活蛋白(如Ricin、Abrin)类似,但其中糖含量很高,糖组成复杂,无凝集活性,也无水解酶活性。一般抗真菌蛋白多为碱性蛋白质,而ZP-2中酸性氨基酸含量很高。因此,ZP-2的抗菌机理可能比较特殊,还需有待对其结构与功能的关系进行深入研究。

致谢 本研究得到昆明植物所所长择优基金的资助。

参考文献

- (1) 杜良成, 王钧. 病原相关蛋白及其在植物抗病中的作用. *植物生理学通讯* 1990; (4): 1—6
- (2) Roberts W K, Selitrennikoff C P. Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley. *Biochim Biophys Acta* 1986; **880**: 161—170
- (3) Bolwell G P. Elicitor induction of the synthesis of a novel lectin-like arabinosylated hydroxyprotein-rich glycoprotein in suspension cultures of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 1987; **172**: 184—191
- (4) Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, et al. Leaf-specific thiolins 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**(6): 1559—1565
- (5) Mosolov V V, Shul'gin M N. Protein inhibitors of microbial proteinases from wheat, rye and triticale. *Planta* 1986; **167**: 595—600
- (6) 胡忠, 杨增民, 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
- (7) Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteric phage T4. *Nature* 1970; **227**(5259): 680—685
- (8) Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 1962; **4**: 330—334
- (9) Bradbury A G W, Halliday D J, Medcalf D G, et al. Separation of monosaccharides as trimethylsilylated alditols on fused-silica capillary columns. *J Chromatography* 1981; **213**: 146—150
- (10) Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248—254
- (11) Jarrett H W, Cooksy K D, Ellis B, et al. The separation of O-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns. *Anal Biochem* 1986; **153**: 189—198
- (12) Boller T, Gehri A, Mauch F, et al. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 1983; **157**: 22—31
- (13) March F, Hadwiger L, Boller T. Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1, 3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol* 1984; **76**: 607—611
- (14) 孙册, 朱政, 莫汉庆. 凝集素. 北京: 科学出版社, 1986: 20—22
- (15) Schlumbaum A et al. Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 1986; **324**: 365—367