

棕榈花序中抗真菌蛋白质的分离及特性

杜良成 李 英

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

5792.9/0.1

摘要 棕榈花序用盐溶液提取, 硫酸铵沉淀, 透析, DEAE-Cellulose DE-52 离子交换, 超滤, 再经 Ultrogel AcA-44 柱过滤, 上 Bio-Gel P-6 柱后, 分离到一个相对分子量为 25.6 kD 的蛋白质 (TP-1)。TP-1 在浓度低于 1.0 mg/ml 即可明显抑制绿色木霉菌的生长, 对赤霉菌、棉花枯萎菌及稻瘟菌都有抑制作用, TP-1 无几丁酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性, 也无血球凝集活性。但经萘酚法及 PAS 反应证明是一个糖蛋白。氨基酸成分分析表明, TP-1 富含 Asp, Gly, Ala 和 Leu。

关键词: 棕榈, 抗真菌蛋白质, 蛋白

植物中的一些蛋白质参与植物对病原菌的抵抗作用, 如降解真菌细胞壁的几丁酶和 β -1,3-葡聚糖酶, 许多植物病原相关蛋白 (PR 蛋白) 属于这两种酶, 它们在植物的诱导抗性系统中起重要作用 (杜良成和王钧 1990)。另一类抗性蛋白质可能在植物的非诱导抗性系统中起作用, 如核糖体失活蛋白 (RIP) 及细胞壁上的一些富含甘氨酸的蛋白 (GRP) 和富含羟脯氨酸的糖蛋白 (HRGP) 对一些真菌也有抗性 (Roberts 和 Selitrennikoff 1986, Bolwell 1987)。还有一些其生物功能还不清楚的蛋白质, 如 Thionins、GAFP、PAFP、ZP-2 等等 (Bohlmann 等 1988, 胡忠等 1988, Hu 等 1991, 杜良成等 1992), 也具有抗病作用。一些植物中发现的蛋白酶抑制剂也可能参与了植物的抗病系统 (Mosolov 和 Shul'gin 1986)。因此, 植物中存在着功能、特性各异的抗真菌蛋白质, 而在不同植物中其种类可能不同。云南有着丰富的植物资源, 对其

抗性蛋白质的研究, 既可丰富我们对植物中复杂的抗病系统的了解, 同时还有可能有助于寻找到有用的资源蛋白质。对单子叶植物花序中抗真菌蛋白质的分离纯化及其特性的研究尚属首次。

材料与方 法

材料 棕榈 (*Trachycarpus fortunei* W.) 花序采自本所植物园中栽培品种, 去花梗后, 洗净, 置 -70°C 冰箱待用。

蛋白质的提取及纯化 棕榈花序于预冷的 0.1 mol/L 的 NaCl 提取液中高速匀浆, 4°C 下抽提过夜 (约 5 ml/g FW), 双层纱布过滤, 滤液于 $15\ 400\times g$ 冷冻 (4°C) 离心 30 min, 上清液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度达 80% (0°C), 磁力搅拌 1 h 后, 同样离心, 沉淀再溶于 50 mmol/L 的磷酸钠盐缓冲液 (PB, pH 6.8), 在 4°C 下对 20 倍体积的 50 mmol/L 的 PB 透析过夜, 再于 $27\ 000\times g$ 离心 10 min, 上清液用 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.5, 上样于经 50 mmol/L, pH 6.8 的 PB 平衡的 DEAE-Cellulose DE-52 柱, 用平衡缓冲液洗脱, 收集第 2 峰, 超滤 (CO, MW 10 000), 并用 $\text{d-H}_2\text{O}$ (蒸馏水) 洗涤, 浓缩后的大分子部分上样于 $\text{d-H}_2\text{O}$ 平衡的 Ultrogel AcA-44, $\text{d-H}_2\text{O}$ 洗脱, 收集第 2 峰, 冰干后重新溶于 $\text{d-H}_2\text{O}$ 中, 再上样于用 $\text{d-H}_2\text{O}$ 平衡的 Bio-Gel P-6 柱, $\text{d-H}_2\text{O}$ 洗脱, 收集第 1 峰, 即为 TP-1。冰干待用。

理化性质测定 SDS-PAGE 参照 Laemmli (1970) 的方法。分离胶的浓度为 15%, 浓缩胶的浓度为 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。

1992-03-16 收到, 1992-07-15 修回。

中国科学院“基因及蛋白质的资源研究特别启动费”和昆明植物研究所“所长择优基金”资助。

PAS 反应(Periodic Acid, Schiff's reaction)按照 Pharmacia Laboratory Techniques(1984)的方法。氨基酸组成按常规的酸水解法进行,水解物上 835 Hitachi 氨基酸分析仪。根据各种氨基酸及氮的测定值计算出各种氨基酸及氮的含量。色氨酸用碱解法测定(Spies 1967)。

几丁酶和 β -1,3-葡聚糖酶活力的测定按杜良成等(1992)的方法进行。

凝血活性测定时将样品从 1 mg/ml 作倍比稀释直至 0.0005 mg/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 h 后观察血凝情况。

抗真菌活性测定 采用直接在 PDA 培养基上滴加样品的方法。当菌丝长至培养皿面积的 $\frac{2}{3}$ 时,在菌丝前沿滴加不同浓度的样品液,置于 28 C 黑暗培养箱中培养,以出现肉眼能观察到的抑菌圈为其抗菌标准。

结果与讨论

抗真菌蛋白质的分离

为了尽可能多地将蛋白质抽提出来,采用了较高浓度的盐进行提取。棕榈花序的匀浆物呈极深的褐色,如果直接上凝胶过滤进行分级,很不容易分开,采用 DEAE-Cellulose DE-52 进行离子交换,则将绝大部分的有色物质除去,并将蛋白质分成几个组分(图 1)。

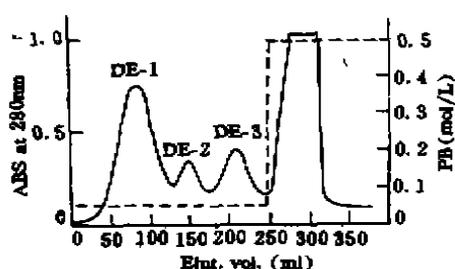


图 1 棕榈蛋白质粗提物的 DEAE-Cellulose DE-52 柱层析

Fig. 1 Chromatography of crude protein from palm on DEAE-Cellulose DE-52 column (28 cm \times 2.8 cm), eluted with 50 mmol/L sodium phosphate buffer (PB), pH 6.8, 4.5 ml/min

根据抗性检测,收集第 2 峰继续分离。经超滤后,除去了大部分小分子物质,上样于 Ultrogel AcA-44 进行过滤分级,出现 3

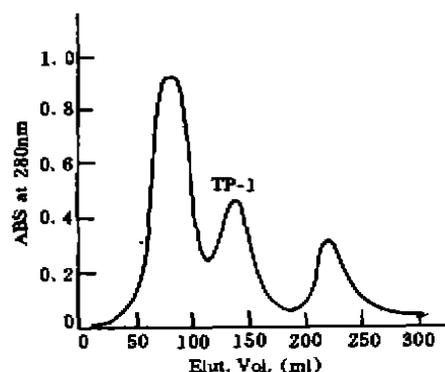


图 2 DE-2 在 Ultrogel AcA-44 柱上的凝胶过滤
Fig. 2 Gel filtration on Ultrogel AcA-44 column (62 cm \times 0.8 cm) of DE-2, eluted with distilled-H₂O, 1.0 ml/min

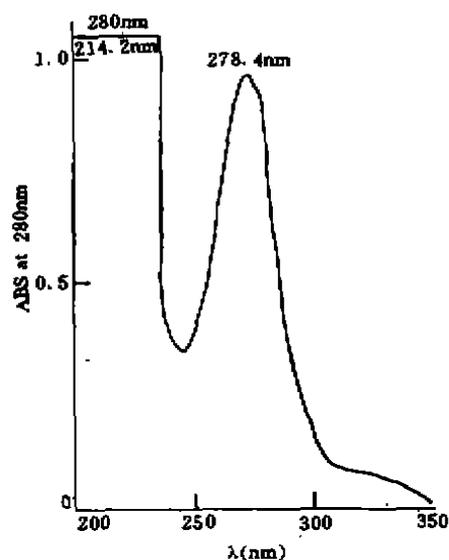


图 3 TP-1 的 Bio-Gel P-6 柱纯化

Fig. 3 Purification of TP-1 on Bio-Gel P-6 column (30 cm \times 0.8 cm), eluted with distilled-H₂O, 1.5 ml/min

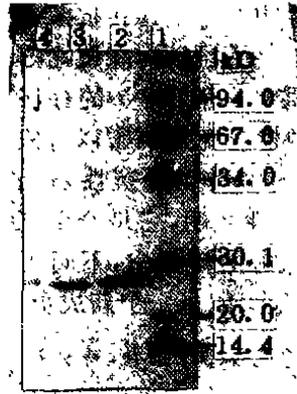


图 4 TP-1 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig. 4 SDS-PAGE of TP-1
1. MW markers, 2~4. TP-1.

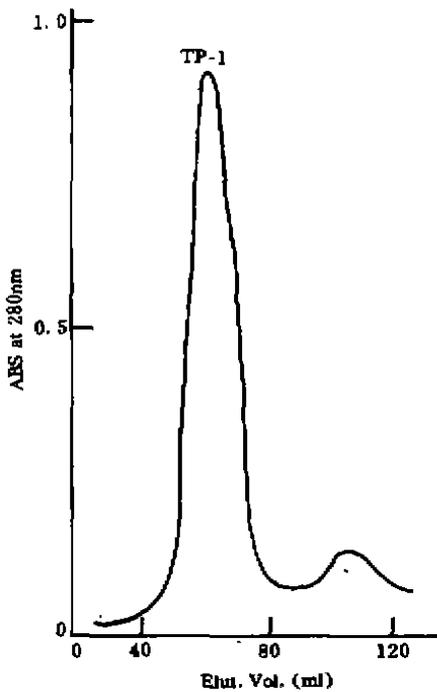


图 5 TP-1 的紫外吸收光谱
Fig. 5 The UV-spectrum of TP-1
In 10 mmol/L sodium phosphate buffer (PB), pH 6.8.

个峰(图 2)。其第 2 峰再用 Bio-Gel P-6 纯化(图 3),其第 1 峰的紫外光谱具蛋白质的典型吸收,在 SDS-PAGE 上为单一条带,

其分子量为 25.6 kD(图 4,5)。

TP-1 的特性

由于已分离的大部分抗真菌几丁酶和 β -1,3-葡聚糖酶其分子量在 20~30 kD 之间,TP-1 的分子量正好在这个范围,但经测定,TP-1 既无几丁酶,也无 β -1,3-葡聚糖酶活性。

电泳后的 TP-1,置于 PAS 反应液中,被染成一条红带,表明其中含糖;再用萘酚染色,进一步证实了 TP-1 是一个糖蛋白。考虑到许多糖蛋白具有凝集素的功能,将 TP-1 从浓度为 0.0005~1 mg/L 对人 4 种血型的红细胞进行凝集反应,但均无血凝现象。

TP-1 经酸水解后,检测到 17 种氨基酸,加上可能的 Asn, Gln 及碱解测得的 Trp,可能 20 种氨基酸都存在于 TP-1 中,其中以 Asp, Gly, Ala, Leu 最多,含量均在 10% 以上(表 1)。值得注意的是,TP-1 的水解物中含大量的氮(占 17.4, w/w, 表中未

表 1 TP-1 的氨基酸组成

Amino acid	Content (%)	
	w/w	mol/mol
Asx	16.2	17.7
Thr	0.5	0.6
Ser	0.1	0.2
Glx	1.9	1.9
Gly	7.2	13.9
Ala	10.1	16.5
Cys	2.6	1.6
Val	6.8	8.4
Met	0.3	0.3
Ile	5.2	5.8
Leu	12.5	13.9
Tyr	2.1	1.7
Phe	5.4	4.7
Lys	2.8	2.7
His	1.1	1.0
Arg	2.1	1.7
Pro	5.7	7.2
Trp	2.0	2.5

列出),除了一部分可能是由 Asn 和 Gln 释放外,推测大部分是由于该蛋白质含有葡糖胺一类的物质。

TP-1 的抗真菌活性

TP-1 对绿色木霉有很强的抗性,当浓度在 0.1 mg/ml 时即可抑制其菌丝的生长(图 6),对一些作物的病原菌如麦类赤霉菌、棉花枯萎菌及稻瘟菌都有抗性(表 2)。因此它是一个对腐生和寄生真菌都有抗性的蛋白质。

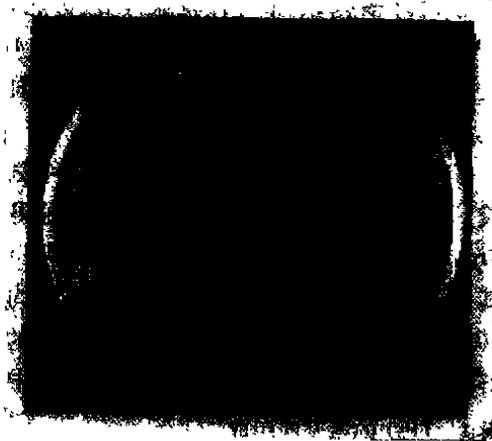


图 6 TP-1 对绿色木霉菌丝生长的抑制
Fig. 6 Inhibition of mycelial growth of *Trichoderma viride* by TP-1 (10 μ l)
1. PB 10 mmol/L pH 6.8; 2. TP-1 0.1 mg/ml in PB; 3. TP-1 1.0 mg/ml in PB; 4. TP-1 1.5 mg/ml in PB.

表 2 TP-1 对一些作物病原真菌的抑制作用
Table 2 The inhibiting activity of TP-1 (10 μ l) on crop fungal pathogens

Pathogen	Conc. of TP-1 (mg/ml)					
	0.15	0.30	0.60	1.20	2.50	5.00
<i>Fusarium graminearum</i>	+	+	++	++	+++	+++
<i>Fusarium vasinfectum</i>	-	+	+	+	++	++
<i>Pycularia oryzae</i>	-	-	-	-	+	++

Diameter of antifungal well; below 0.5 cm (+); between 0.5~1.0 cm (++); over 1.0 cm (+++); no activity (-).

单子叶植物花序中存在抗菌蛋白尚未见报道。花作为生殖器官,在植物的生长和发育中起着重要作用,TP-1 的存在可能与保证这个重要器官免遭病害以行使其正常功能有关,即在其非诱导抗性系统中起作用。TP-1 的特性表明,它是一个富含酸性氨基酸及甘氨酸的糖蛋白,不同于已知的抗菌蛋白质,很可能是一个新成员。

致谢 本所胡忠先生给予指导,易永生同志帮助拍照。

参考文献

- 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
- 杜良成,王世林,李 英等。珠子参抗真菌糖蛋白的研究。云南植物研究 1992, 14: 87
- 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
- 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: 1559
- Bolwell GP. 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
- Hu Z, Liu XZ, Huang QZ *et al.* Isolation, characterization and amino acid sequencing of an anti-fungal protein from the seeds of *Phytolacca americana*. In Du YC (ed), Peptides, Biology and Chemistry. Science Press, Beijing, China 1991, p 3
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteria phage T4. *Nature* 1970, 227: 680
- Mosolov VV, Shul'gin MN. Protein inhibitors of microbial proteinases from wheat, rye and triticale. *Planta* 1986, 187: 595
- Pharmacia Laboratory Separation Division. Specific detection procedures; Carbohydrates. In Polyacrylamide gel electrophoresis-laboratory techniques. Uppsala, Sweden 1984, p 54
- Roberts WK, Seltrennikoff CP. Isolation and par-

tial characterization of two antifungal proteins from barley. *Biochim Biophys Acta* 1986, **880**, 161

Spies JR. Determination of tryptophan in proteins. *Anal Chem* 1967, **39**, 1412

Isolation and Characterization of An Antifungal Protein from Inflorescence of *Trachycarpus fortunei* W

DU Liang-Cheng and LI Ying

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

A protein named TP-1 from inflorescence of *Trachycarpus fortunei* W. was isolated through a procedure including saline solution extraction, salting-out by ammonium sulfate, dialysis, ion exchange chromatography, ultrafiltration, and gel filtration on Ultrogel AcA-44 and Bio-Gel P-6. The protein's molecular weight was 25.6 kD determined by SDS-PAGE. On PDA media, it inhibited the growth of mycelia of *Trichoderma viride* at concen-

tration of 1.0 mg/ml. TP-1 also had inhibitive activity against mycelial growth of some crop fungal pathogens, but no activity of chitinase, β -1, 3-glucanase, or hemagglutination. By PAS reaction and anthrone test, it was indicated that TP-1 was a glycoprotein. Analysis of the composition of amino acids showed that TP-1 was rich in Asp, Gly, Ala, Val and Leu.

Key words: *Trachycarpus fortunei*, antifungal protein