

杏鲍菇抗烟草花叶病毒蛋白的筛选*

付鸣佳 林健清 吴祖健 林奇英** 谢联辉

(福建农林大学植物病毒研究所 福州 350002)

摘 要 采用离子交换层析和凝胶层析方法,从杏鲍菇干样中分离得到多个蛋白组分,经枯斑寄生检测,发现多个蛋白组分都有抗烟草花叶病毒(TMV)的活性,对 TMV 的抑制率均在 70% 以上,高者可达 99%。其中 xb68Ab 已得到了纯化,分子量约为 23.7kD,在心叶烟和苋色藜上它对 TMV 侵染的抑制率分别达到 99.43% 和 98.9%。

关键词 杏鲍菇,抗病毒蛋白,烟草花叶病毒蛋白

中图分类号 S432.4 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2003)01-0029-06

植物病毒病防治一直是一个世界性难题,解决这一难题有多种防治策略,其中之一就是应用抗病毒蛋白。目前发现的抗植物病毒蛋白大多数是植物毒蛋白,许多这类蛋白都属核糖体失活蛋白^[1]。而在食用菌中也发现有多种活性蛋白,曾有报道从香菇中纯化一种抗烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)蛋白 FBP(fruiting body protein),其分子量 23kD,为碱性单亚基蛋白^[2,3]。孙慧等^[4]从杨树菇中分离到一种抗 TMV 的酸性蛋白,分子量为 15.8kD。由于食用菌种类多,是一类非常丰富的资源,可从中筛选出抗病毒蛋白,这无疑具有较大的理论意义和应用前景。为此,本研究从杏鲍菇中进行了抗烟草花叶病毒蛋白的筛选。

1 材料和方法

1.1 材料

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)自然风干样品粉碎备用。以普通烟 K₃₂₆(*Nicotiana tabacum* var. K₃₂₆)作为 TMV 繁殖寄主;以心叶烟(*N. gluttonosa*)苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)作为 TMV 枯斑检测寄主。

凝胶介质 DEAE-SephacroseFF、SuperdexTM 75 Prep Grade 和 SephacrylTM S-200 High Resolution 均为 Pharmacia 公司产品,蛋白标准低分子量标准蛋白为上海博亚生物技术有限公司产品,分子量(kD)为兔磷酸化酶 B(Rabbit phosphorylase B)97.4;牛血清白蛋白(Bovine serum albumin)66.2;兔肌动蛋白(Rabbit actin)43.0;牛碳酸酐酶(Bovine carbonic anhydrase)31.0;胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitor)20.1;鸡蛋清溶菌酶(hen egg white)14.4。

1.2 方法

1.2.1 TMV 的提纯:用 Gooding 方法^[5]经 200nm~300nm 紫外扫描确定纯度和病毒含量。

* 福建省科技厅重点项目(99-Z-193)

** 通讯作者, E-mail: zjwu@pub5.fz.fj.cn, Tel: 0591-3789345

作者简介:付鸣佳(1964-),江西高安市人,现福建农林大学植物病毒研究所攻读博士生。

收稿日期:2002-01-14,修回日期:2002-05-24

1.2.2 杏鲍菇中各抗病毒蛋白组分的获得:方案 1:称杏鲍菇子实体风干粉碎样品 15g, 分别用 200mL 和 100mL 的蒸馏水浸提两次, 每次 10h, 用四层纱布过滤, 合并浸提液, 浸提液 10 000 r/min 离心 10 min, 得上清液 1; 用 40% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 10 000r/min 离心 10 min, 得上清液 2; 再用 40% ~ 80% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 10 000r/min 离心 10 min, 弃上清得沉淀 1。沉淀 1 用蒸馏水溶解, 10 000r/min 离心 10 min, 得上清液 3, 留待上样用。

DEAE-SepharoseFF 装柱 (1.6cm × 15cm), 用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 平衡。

将上清液 3 上样, 用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液洗涤 30 ~ 40min, 然后用 0 ~ 0.5 mol/L 的 NaCl 梯度洗脱, 分部收集流出液, 将收集的各管在 280nm 处测紫外吸收值。以管号和紫外吸收值绘图, 得到 7 个组分 xb1、xb2、xb3、xb4、xb5、xb6 和 xb7。通过抗 TMV 活性检测后, 收集有活性的三个组分 xb2、xb3 和 xb4, 对蒸馏水透析 24h, 换水 3 ~ 4 次, 再用聚乙二醇 (PEG 20 000) 浓缩, 然后分别上 Superdex™75 Prep Grad 柱 (1.6cm × 40cm), 用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) (含 0.15 mol/L NaCl) 洗脱, 得到以下主要的组分 xb2a、xb2b、xb2c、xb3a、xb3b、xb3c、xb3d、xb4a、xb4b 和 xb4c, 将它们分别浓缩透析后, 即为待筛选的杏鲍菇蛋白。

方案 2 除了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度定为 40% ~ 60% 和 60% ~ 80%, 平衡、上样和洗脱缓冲液为 0.01 mol/L 浓度的 Tris-HCl (pH7.8), NaCl 梯度为 0 ~ 0.6 mol/L, 凝胶层析介质改为 Sephacryl™S-200 High Resolution 外, 其它过程均与方案 1 基本相同。

1.2.3 抗病毒活性检测:采用半叶法接种, 以心叶烟和苋色藜作为 TMV 的枯斑寄主。用蒸馏水与病毒的混合液 (V/V = 1) 接种在枯斑寄主的左半叶上 (病毒含量为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 作为对照; 用等量的蛋白溶液与病毒的混合液 (V/V = 1) 接种在枯斑寄主的右半叶上, 作为处理。每个样品接种 5 ~ 6 片叶, 待出现明显枯斑后, 及时记录枯斑数。

抑制率 % = [1 - (处理的枯斑数/对照的枯斑数)] × 100

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳与蛋白定量:采用 Laemmli 方法^[6], 浓缩胶浓度 3%, 分离胶浓度 12% 或 15%。蛋白的定量是将已纯化的未知浓度的蛋白与已知浓度的牛血清蛋白按一定比例混合后进行 SDS-PAGE, 然后在凝胶成像仪上进行这两个蛋白的面积积分, 根据面积比推算出未知浓度蛋白的含量。

2 结果和讨论

2.1 杏鲍菇中各蛋白组分的获得

根据方案 1, 用 40% ~ 80% 饱和度的硫酸铵沉淀得到的杏鲍菇蛋白粗品, 经 DEAE-SepharoseFF 柱层析后, 大致分为七个组分: xb1、xb2、xb3、xb4、xb5、xb6、xb7 (见图 1), 收集前 6 个组分, 检测其抗 TMV 活性, 从中筛选出对 TMV 有较强抑制作用的三个组分: xb2、xb3、xb4; 再将这三个组分分别浓缩透析后, 经 Superdex™75 Prep Grade 凝胶层析, 分别又可细分为一些组分: xb2a、xb2b、xb2c、xb3a、xb3b、xb3c、xb3d、xb4a、xb4b、xb4c (图 2、3 和 4)。

根据方案 2, 用 40% ~ 60% 和 60% ~ 80% 饱和度的硫酸铵沉淀得杏鲍菇蛋白粗品 xb46 和 xb68。分别经 DEAE-SepharoseFF 柱层析后, xb46 各组分抗 TMV 活性不高, xb68 出现二个主要组分: xb68A 和 xb68B (见图 5)。检测 xb68A 和 xb68B 抗 TMV 活性, 将抑制效果较好的 xb68A 浓缩透析后上 Sephacryl™S-200 High Resolution 柱, 得到较纯的杏鲍菇蛋白组分: xb68Aa、xb68Ab (见图 6)。

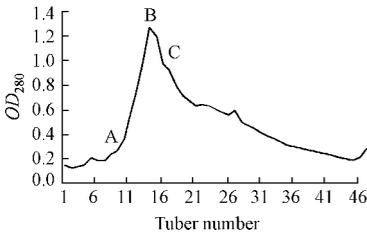


图 1 杏鲍菇蛋白粗品的 DEAE-SephroseFF 柱层析

Fig.1 Ion-exchange chromatography of the protein crude extract on a DEAE-Sephrose column
A. xb2 ; B. xb3 ; C. xb4.

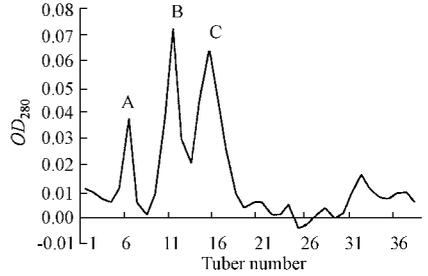


图 2 xb2 的 Superdex 75 凝胶层析图

Fig.2 Gel filtration chromatography of fraction xb2 on Superdex75
a. xb2a ; B. xb2b ; C. xb2c.

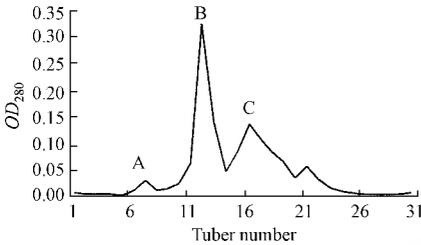


图 3 xb3 的 Superdex75 凝胶层析图

Fig.3 Gel filtration chromatography of fraction xb3 on Superdex75
A. xb3a ; B. xb3b ; C. xb3c ; D. xb3d.

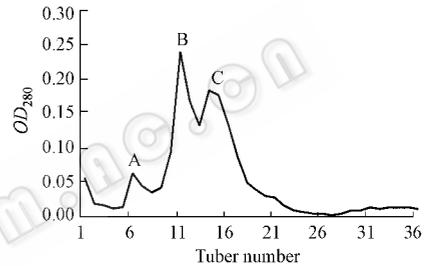


图 4 xb4 的 Superdex75 凝胶层析图

Fig.4 Gel filtration chromatography of fraction xb4 on Superdex75
A. xb4a ; B. xb4b ; C. xb4c.

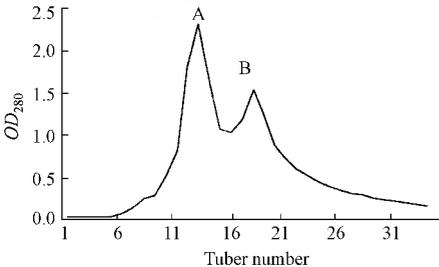


图 5 xb68 的 DEAE-SephroseFF 柱层析图

Fig.5 Ion-exchange chromatography of xb68 on a DEAE-Sephrose column
A. xb68A ; B. xb68B.

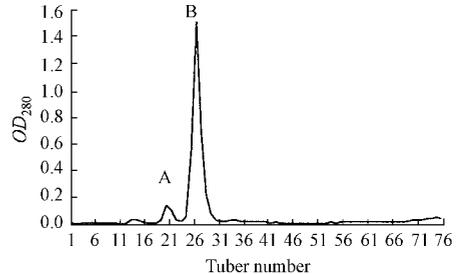


图 6 xb68A 的 Sephacryl™ S-200 high Resolution 凝胶层析图

Fig.6 Gel filtration chromatography of fraction xb68A on Sephacryl™ S-200 High Resolution
A. xb68Aa ; B. xb68Ab.

2.2 杏鲍菇蛋白抑制 TMV 侵染枯斑寄主的活性

表 1 是用 40% ~ 80% 饱和度硫酸铵沉淀得到的蛋白粗品,经 DEAE-SephroseFF 柱层析后得到的蛋白组分,在心叶烟和莧色藜上进行抗 TMV 活性检测所得到的结果。从表 1

可以看出,这些蛋白组分在 TMV 枯斑寄主上均有一定的抑制 TMV 的效果。在心叶烟上,xb2、xb3、xb4 三个组分的抑制效果较好,它们各自的平均抑制率都超过 70%,其中抑制效果最好的是 xb4,它的平均抑制率达到 91.27%;在苋色藜上,xb2、xb3、xb4 三个组分各自的平均抑制率都超过 90%,其中抑制效果最好的是 xb2,它的平均抑制率达到 97.77%。这一研究结果表明,xb2、xb3、xb4 三个组分不论在心叶烟上还是在苋色藜上都表现很强的抑制 TMV 活性。

表 1 杏鲍菇蛋白粗品经 DEAE-SephroseFF 柱层析后得到的蛋白组分抗 TMV 活性

Table 1 The inhibiting activity to TMV from fractions obtained by ion-exchange chromatography of the protein crude extract on a DEAE-SephroseFF column

Local lesion	Average inhibition rates/%						
	host	xb1	xb2	xb3	xb4	xb5	xb6
<i>N. glutinosa</i>		33.54	71.83	70.18	91.27	37.72	42.30
<i>C. amaranticolor</i>	/	/	97.77	96.71	92.98	/	/

表 2 是用 60% ~ 80% 饱和度的硫酸铵沉淀得到的杏鲍菇蛋白粗品,经 DEAE-SephroseFF 柱层析后得到的组分在心叶烟和苋色藜上进行抑制 TMV 活性检测所得到的结果。从表 2 可以看出,在心叶烟和苋色藜上,xb68A 和 xb68B 对 TMV 表现极强的抑制活性,且抑制效果非常稳定。除 xb68A 在苋色藜上的抑制率低以外,它们的平均抑制率都超过 98%,最高达 100%。由此可见,xb68A 和 xb68B 中存在抗 TMV 活性蛋白。

表 3 是 xb68A 经 S-200 凝胶层析后得到的蛋白组分在心叶烟和苋色藜上进行抑制 TMV 活性检测所得到的结果。从表 3 看出,xb68Ab 在心叶烟和苋色藜上都表现极显著的抑制 TMV 的效果,平均抑制率几乎达到 100%,可见 xb68Ab(蛋白浓度为 0.217mg/mL)具有较强的抑制 TMV 活性。另一个组分 xb68Aa 表现的抑制 TMV 的效果不太稳定,其在心叶烟上的抑制效果明显好于在苋色藜上的抑制效果。

表 2 xb68 经 DEAE-SephroseFF 柱层析后得到的蛋白组分抗 TMV 的活性

Table 2 The activities against TMV of every fraction obtained by ion-exchange chromatography of xb68 on a DEAE-SephroseFF column

Local lesion	Average inhibition rates/%	
	xb68A	xb68B
<i>N. glutinosa</i>	100	96.63
<i>C. amaranticolor</i>	98.27	98.96

表 3 xb68A 经 Sephacryl™ S-200 High Resolution 凝胶层析后得到的蛋白组分抗 TMV 的活性

Table 3 The activities against TMV of every fraction obtained by Gel filtration chromatography chromatography of xb68A on Sephacryl™ S-200 High Resolution

Local lesion	Average inhibition rates/%	
	xb68Aa	xb68Ab
<i>N. glutinosa</i>	100	99.43
<i>C. amaranticolor</i>	32.56	98.90

2.3 各蛋白组分的 SDS-PAGE

图 7 是 xb2、xb3、xb4 的 SDS-PAGE,从图中可以看出,xb2 电泳显示多条蛋白带,分子质量从 10kD 到大于 100kD 不等,图中还显示其中所含蛋白种类非常多,xb3 电泳显示的蛋白带分子量范围和 xb2 的差不多,但所含蛋白种类有所不同,其中在 24kD 左右有主蛋白

带,xb4 电泳表明所含蛋白带的数量要少很多,大约在 21kD 左右有主要蛋白带存在。这一电泳结果表明所获得的 xb2、xb3 和 xb4 均可能有多种蛋白在起作用。

图 8 表明 xb2b 和 xb3b 是由多蛋白组成。xb2b 电泳显示一条主蛋白带,分子量约为 16.8kD,另有一些不清晰的蛋白带。xb3b 电泳显示一条主蛋白带,分子质量约为 23.7kD,此外还存在一些淡的蛋白带,其中也包括 16.8kD。

图 9 表明 xb68Ab 基本得到纯化,它的抗病毒活性是由单一蛋白在起作用,检测表明这个蛋白的分子量为 23.7kD。

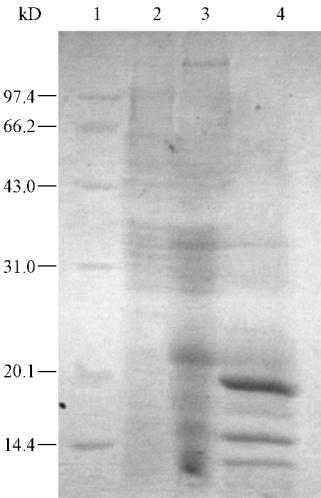


图 7 杏鲍菇 xb2、xb3 和 xb4 的 SDS-PAGE

Fig.7 SDS-PAGE of xb2, xb3 and xb4
1. Protein molecular weight marker;
2. xb4; 3. xb3; 4. xb2.

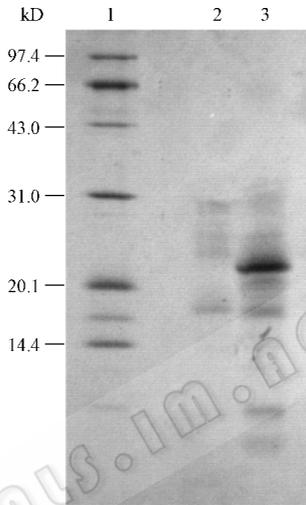


图 8 杏鲍菇 xb2b 和 xb3b 的 SDS-PAGE

Fig.8 SDS-PAGE of xb2b and xb3b
1. Protein molecular weight marker;
2. xb2b; 3. xb3b.

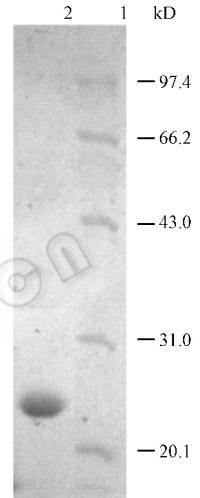


图 9 xb68Ab 的 SDS-PAGE

Fig.9 SDS-PAGE of xb68Ab
1. Protein molecular weight marker; 2. xb68Ab.

2.4 讨论

杏鲍菇是福建省栽培十分丰富的一种食用菌,比较容易获得。对杏鲍菇干样的浸提液进行硫酸铵分步沉淀以后,设计了不同的方法进行抗病毒蛋白的分离,结果发现有不同种的蛋白在起着抗 TMV 的作用。通过枯斑寄主测定,这些蛋白组分对 TMV 的平均抑制率均可达 70% 以上,高者可达 99%。在纯化过程中,发现一个抑制 TMV 较好的蛋白 xb68Ab,其分子量为 23.7kD,并已得到纯化,但它的生化特性和抗 TMV 的机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Verma H N, Baranwal V K, Srivastava S. Antiviral Substance of Plant Origin. In: Hadidi A, et al. ed. Plant Virus Disease Control. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1998. 154 ~ 162.
- [2] Kobayashi N, Hiramatsu A, Akatsuka T. *Agric Biol Chem*, 1987, **51**(3): 883 ~ 890.
- [3] Hiramatsu A, Kobayashi N, Osawa N. *Agric Biol Chem*, 1987, **51**(3): 897 ~ 904.

- [4] 孙 慧, 吴祖建, 谢联辉, 等. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(3): 351 ~ 354.
- [5] Gooding G V Jr, Hebert T T. *Phytopathology*, 1967, 57(11): 1285.
- [6] Laemmli U K. *Nature*, 1970, 22: 680 ~ 685.

Screening of Proteins Anti-Tobacco Mosaic Virus in *Pleurotus eryngii*

Fu Mingjia Lin Jianqing Wu Zujian Lin Qiyang Xie Lianhui

(Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Proteins were obtained by ion-exchange chromatography and gel filtration from the dry sample of *Pleurotus eryngii*. In terms of detection on local lesion host, these components were confirmed to be anti-TMV and their inhibition rates reach more than 70%, or even 99%. The protein named xb68Ab of MW 23.7kD was purified by ion-exchange chromatography and gel filtration. its inhibition rate against TMV are 99.43% and 98.9% on *Nicotiana glutinosa* and *Chenopodium amaranticolor*, respectively.

Key words: *Pleurotus eryngii*, Antiviral protein, Tobacco mosaic virus

2003 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

会议名称	筹办单位	时间	人数	地点	联系人
2003 年中国微生物学会学术年会暨第八届三次全体理事会	中国微生物学会	11 - 12 月	250	待定	尹 畅 010 - 62554677
第六届全国真菌学学术研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	4 月 1 - 3 日	50 - 80	南京	刘维达 liumyc@hotmail.com
第三届全国微生物与免疫学学术会议	中国微生物学会医学微生物与免疫学专业委员会	4 月	100	杭州	关显智 0431 - 5645911 - 6574
全国调味品学术研讨会	中国微生物学会酿造学会	5 月	100	待定	张林 顾甘泉 010 - 69504653
第五届四体病和弓形虫病学术研讨会	中国微生物学会《人兽共患病杂志》编辑部	5 月上旬	70	厦门	于恩庶 0591 - 7552018
第二届全国微生物肥料技术研讨和产品展示会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	5 月 28 - 30 日	80	无锡	李 俊 010 - 68918702
第四届全国酶工程学术讨论会	中国微生物学会酶工程专业委员会	7 月	70	无锡	黎高翔 010 - 62643074
中德环境微生物及多样性研讨会	中国微生物学会协办	8 月 5 日—12 日	90	北京	肖昌松 010 - 62554677
第八届全国微生物学教学研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会协办	8 月	80	湖南	夏立秋 0731 - 8872298
环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	8 - 9 月	80	成都	李顺鹏 025 - 4396314
生物催化前沿基础研究学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	8 月/10 月	70	济南/威海	曲音波 陈冠军 0531 - 8564429