

毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)中一种碱性蛋白的纯化及其活性

吴丽萍 吴祖建 林奇英* 谢联辉

(福建农林大学植物病毒研究所 福州 350002)

摘要 用离子交换层析(CM-sepharose FF)和凝胶层析(Superdex™ 75)方法,从新鲜食用菌毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)子实体中分离纯化出一碱性蛋白 γ_3 。经 SDS-PAGE 初步确定其分子量约为 14.4kD。活性检测结果显示:当其浓度为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对烟草花叶病毒(TMV)在心叶烟枯斑寄主上的侵染抑制率达 83.0%。 γ_3 对兔血凝集活性滴度为 2⁵,对人血凝集活性滴度为 26,其浓度分别为 1.562 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.781 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。利用胃癌细胞株 MGC-803 检测 γ_3 体外抗肿瘤活性,其 IC₅₀ 为 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。 γ_3 N-端序列为 NRDVAACARFIDDFCDLTLP,为一新的蛋白序列。在 SWISS-PORT 上登录号为 P83477。

关键词 分离纯化 烟草花叶病毒 凝集素 抗肿瘤

中图分类号 S432.41 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2003)06-0793-06

食用菌中富含蛋白质、氨基酸、维生素及微量元素,从其中分离和纯化的物质,表现出很强的抗肿瘤、免疫调节、抗病毒、抗细菌和抗其它寄生物,还有治疗糖尿病、心血管病和高胆固醇症的作用。目前,已经从糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)、口蘑(*Tricholoma mongolicum*)和斑玉蕈(*Hypsizygus marmoreus*)中分离到多个蛋白,它们能抑制鼠白血病细胞、细胞单核细胞和巨噬细胞等肿瘤细胞的增殖^[1-5];从金针菇(*Flammulina velutipes*)、皱盖罗鳞伞(*Rozites caperata*)、水粉蕈(*Clitocybe nebularis*)和 *Lyophyllum shimeji* 等食用菌中分离得到能抑制艾滋病病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)-1、单纯疱疹病毒和流感病毒等的活性蛋白^[6-8]。食用菌蛋白抗病毒活性研究主要集中在抗动物病毒方面,抗植物病毒蛋白研究则报道不多,仅有几个抗植物病毒蛋白从香菇(*Lentinus edodes*)、杨树菇(*Agrocybe aegerita*)、榆黄蕈(*Pleurotus citrinopileatus*)等食用菌中得到提纯^[9-11]。

本文从毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)中分离出一种具有抗病毒、抗肿瘤活性的碱性蛋白。毛头鬼伞俗名为鸡腿蘑或鸡腿菇,入药能益胃、清神、治痔,其中含有的抗肿瘤碱性蛋白尚未见报道,毛头鬼伞提取到抗植物病毒蛋白也是首次报道。

1 材料和方法

1.1 材料

毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)子实体鲜样购自福州市市场,存放于-70℃超低温冰箱中备

基金项目 教育部骨干教师资助项目(2000-65)

* 通讯作者。Tel 86-591-3789345 ;Fax 86-591-3769704 ;E-mail linqy@fjau.edu.cn

作者简介 吴丽萍(1975-),女,江西人,硕士,研究方向为植物病毒学。E-mail wuliping000@sina.com

收稿日期 2002-11-20,修回日期 2003-06-10

用。

烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)保存于本实验室,检测抗 TMV 活性所用枯斑寄主为心叶烟(*Nicotiana glutinosa*),普通烟 K₃₂₆(*N. tabacum* var. K₃₂₆)作为保存和繁殖 TMV 的寄主,番茄青枯菌(*Ralstonia solanaceae*)和水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas canpestris* pv. *oryzae*)由福建农林大学植物病理实验室提供;人胃癌细胞株 MGC-803 由厦门大学陈瑞川老师提供,所用培养基为 RPMI1640(Gibco BRL),内含 10% 的小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司),100 μ g/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、MTT 干粉为 Fluka 公司产品;人新鲜血液由福州空军医院免疫室的刘小朋主任提供。

CM-sepharose Fast Flow 和 Superdex™ 75 均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;超滤离心管 Centricon-YM10(浓缩范围为 10~100kD)为 Millipore 公司产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、十二烷基硫酸钠(SDS)等购于上海生工生物工程技术有限公司;低分子量标准蛋白为上海生物化学研究所产品;其它生化试剂为国产分析纯。

1.2 TMV 的提纯

按 Gooding 方法^[12]提纯。经 200~300nm 紫外扫描确定其纯度及浓度。

1.3 蛋白的分离纯化和条件优化

取毛头鬼伞鲜样若干,加入 2 倍体积蒸馏水浸提 4~5h,10000r/min 离心 25min,收集上清液,用 PBS 液($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH7.2)调上清液使 PBS 液最终浓度为 0.01mol/L;以此混合液上 CM-sepharose Fast Flow 离子交换柱(上样前用相同浓度 PBS 平衡),缓冲液洗涤交换柱后用 0~0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱,收集洗脱峰浓缩透析得 A 和 B 液;B 液过 Superdex™ 75 凝胶层析柱,用相同浓度缓冲液(内含 0.15mol/L NaCl)洗脱,收集洗脱峰,聚乙二醇 20000 浓缩,透析脱盐。检测浓缩液抗 TMV 活性并收集具活性部分,即得纯化蛋白 y3。

优化方法:搅碎后立即离心并上样,毋需浸提可减少杂蛋白,浓缩后得 C 液。

1.4 蛋白的分子量、浓度和含糖量的测定

采用 SDS-PAGE 方法^[13]测定分子量,浓缩胶浓度为 4%,分离胶浓度为 15%。Bradford 法^[14]确定蛋白浓度,考马斯亮蓝 G-250 比色。测定待测样品的 OD₄₉₀ 值,查标准曲线得到糖的浓度,根据 Bradford 法所测蛋白浓度,推算出蛋白质含糖量^[15]。

1.5 N-端序列分析

由湖南师范大学生命科学院测定。

1.6 y3 蛋白对 TMV 侵染抑制率测定

采用半叶法,用 0.01mol/L PBS 液(pH7.2)及等体积的 y3 蛋白溶液分别与浓度为 20 μ g/mL 病毒液等量混合接种在枯斑寄主的左、右半叶上,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,取平均值。

$$\text{抑制率}\% = [1 - (\text{处理的枯斑数} / \text{对照的枯斑数})] \times 100$$

1.7 对植物病原细菌抑菌试验

供试样品对病原细菌的生长抑制作用采用抑菌圈法,取浓度为 10⁷~10⁸/mL 的菌液 100 μ L,加入 7mL 牛肉胨培养基制成带菌培养基,然后在培养基上打孔,孔内加入供试样品提取液,观察抑菌圈的大小,并记录对菌株的抑制作用。抑制率计算方法如下:

抑制率% = [(菌圈直径 - 打孔器直径) / 菌圈直径] × 100

1.8 y3 蛋白体外抑制肿瘤细胞生长测定(MTT 测定法)^[16]

细胞接种于 96 孔培养板,培养过夜后加入样品处理 24h,对照组加等量培养基, PBS 洗涤后每孔加 100 μ L 含 0.2mg/mL MTT 的 PBS 液, 37 $^{\circ}$ C 温育 4h, 去除 MTT 液, 加 200 μ L 碱化二甲亚砜(DMSO)(90% DMSO, 10% 0.1 mol/L 甘氨酸-NaOH, pH9.8), 37 $^{\circ}$ C 温育 30min, 测定 OD₅₇₀ 值。设 3~6 个重复, 取平均值。按下式计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率:

肿瘤细胞生长抑制率% = [1 - (实验组 OD 值 / 对照组 OD 值)] × 100

抗肿瘤药物活性以 IC₅₀ 衡量, IC₅₀ 是抑制率为 50% 时的样品浓度。

1.9 y3 蛋白凝集素活性测定

参考文献 [17] 略加修改。在血凝板中每孔加入 25 μ L 红细胞缓冲液(0.02mol/LPBS 液 - 0.2mol/L 氯化钠, pH7.2), 取样品 25 μ L 作倍比稀释, 震荡血凝板, 同时每孔加 25 μ L 2% 红细胞悬液, 继续震荡 1min, 室温或 4 $^{\circ}$ C 静置 1.5~2h, 显微镜下观察结果。用凝集素样品的稀释倍数即效价表示其活性。

2 结果

2.1 y3 蛋白的纯化

样品搅碎后置冰箱浸提, 然后离心并经过 CM-sepharose FF 阳离子交换柱洗脱后可得到两个吸收峰 A 和 B (图 1), A、B 两峰互相交叉, 经 SDS-PAGE 及 PAGE 方法可检测到多种蛋白。B 液中一种蛋白与 y3 蛋白分子量非常接近, 采用 Superdex™ 75 凝胶层析柱无法将其提纯, 还需要进一步纯化。而采用优化方法, 样品粉碎后毋需浸提直接离心并经过离子交换柱洗脱可得到一个主峰 C (图 1), 虽然跟前者比较采用等量材料时其洗脱峰中所含蛋白量偏低, 但是 C 液经 SDS-PAGE 及 PAGE 方法仅可检测到含两个蛋白, 且其分子量相差大, 收集 C 液经过 Superdex™ 75 凝胶层析柱即可得到纯化蛋白 y3 (图 2、图 3)。因此采用优化方法虽然得率较低, 但是简化了纯化步骤。

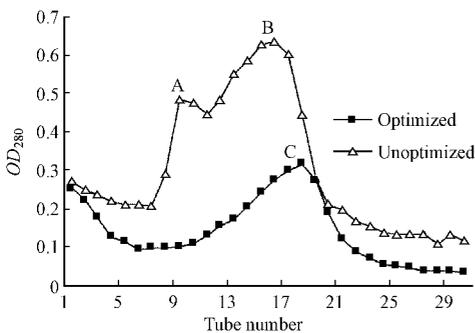


图 1 鸡腿菇初提液过 CM-sepharose FF 阳离子交换柱

Fig. 1 Ion-exchange chromatography of the protein crude extract on a CM-sepharose column

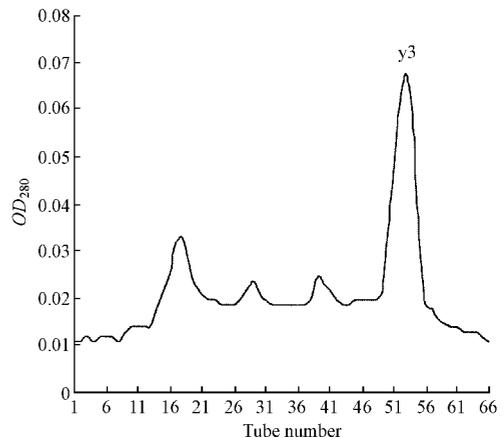


图 2 y3 在 Superdex™ 75 凝胶层析柱上的纯化

Fig. 2 y3 purified by Superdex™ 75

molecular sieve chromatograph

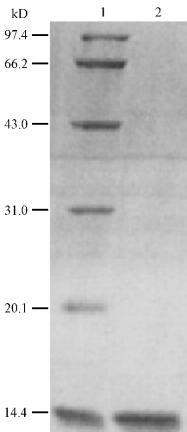


图3 y3的 SDS
-PAGE

Fig. 3 y3 SDS-PAGE
of y3
1. Marker 2. Protein y3.

2.2 纯化蛋白 y3 的 SDS-PAGE

收集 Superdex™ 75 凝胶层析柱洗脱液 y3 经 SDS-PAGE 后得一条蛋白带(图3),说明已纯化,其分子量约 14.4kD。由于电泳条带接近原点,对其分子量的估计可能存在较大误差。并且极有可能偏小。需要通过质谱或其它方法进一步确定分子量。

2.3 y3 蛋白 N-端氨基酸序列及含糖量检测结果

y3 蛋白 N-端氨基酸序列由湖南师范大学生命科学院测定,其序列为 NRDVAACARFIDDFCDLTP, GenBank 中没找到其同源序列,可能为一新的蛋白序列,在 SWISS-PORT 上登录号为 P83477。经酚-硫酸法检测各收集管中的含糖量,结果表明各收集管的 OD_{490} 与其 OD_{280} 相对应,说明在蛋白上结合有糖基。另用此方法检测出 y3 蛋白含糖量高达 30%,说明 y3 为一糖蛋白。

2.4 y3 蛋白抗 TMV 及抗病原细菌检测结果

经半叶法测定当 y3 浓度约为 $12.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,在枯斑寄主心叶烟上对 TMV 的侵染抑制率达 83.0%。y3 蛋白与其他抗植物病毒蛋白活性比较结果显示其抑制 TMV 活性明显高于 AAVP,但低于 FBP 及 YP46-46。经检测 y3 蛋白对番茄青枯菌及水稻白叶枯病菌无抑制作用(表1)。

表1 y3 与其它抗植物病毒蛋白对 TMV 抑制率比较

Table 1 Inhibitory effects of different proteins on TMV

Author	Mushroom	Protein	Molecular weight /kD	Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Inhibition rate on TMV/%
Sun H	<i>Agrocybe aegerita</i>	AAVP	15.8	200	84.3
Kobayashi	<i>Lentinus edodes</i>	FBP	23.0	6300	50.0
Fu M J	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	YP46-46	27.4	0.24	50.0
Wu L P	<i>Coprinus comatus</i>	y3	14.4	12.5	83.0

2.5 y3 蛋白的凝集素和抗肿瘤活性检测结果

经血凝滴度检测到该蛋白对兔血的凝集素滴度在 2^5 , 此时的蛋白浓度为 $1.562\mu\text{g}/\text{mL}$; 对人 A、B、O 和 AB 4 种血型的凝集素滴度在 2^6 , 此时的蛋白浓度为 $0.781\mu\text{g}/\text{mL}$ 。表明该蛋白具一定凝集素活性,同时用 MTT 法检测其抗肿瘤活性 IC_{50} 为 $12\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论

约有 30% ~ 50% 的食用菌中含有凝集素^[18],但是目前从食用菌中获得的凝集素不多,对其生化特性及功能研究不够深入,食用菌凝集素是否类同于植物凝集素或应归属于植物凝集素的哪一类尚未涉及,其功能研究也仅集中在抗肿瘤活性及提高免疫力等方面,对其是否具有类似植物凝集素的其他功能研究还未展开。

植物病毒是影响农作物产量和质量病原物,有的能通过植物表面微伤口直接侵染作物,有的需通过病毒介体如蚜虫、褐飞虱、叶蝉等昆虫导入植物体内。植物凝集素能有

效防治这类介体昆虫。研究结果表明 γ_3 蛋白是一凝集素,能抑制植物病毒(如 TMV)侵染,如果进一步研究发现其具有抗虫功能,则利用 γ_3 蛋白基因所产生的转基因作物不仅可以直接抗植物病毒,还能通过抑制传毒昆虫达到抗病毒的目的。这就能有效克服目前转基因作物抗病毒谱窄的缺点,目前抗病毒转基因所利用的基因大多为病毒基因。

γ_3 蛋白具有一定凝集素活性,这可能与其所含糖基有关,显微镜下观察 γ_3 蛋白对胃癌细胞 MGC-803 具有裂解作用,它对肿瘤细胞造成裂解是否由于糖基识别细胞表面并使蛋白发生作用?这也是一值得探讨的问题。在实验中发现 γ_3 蛋白对细菌无抑制作用,其等电点偏碱性,这与商陆核糖体失活蛋白(Phytolacca Antiviral Protein, PAP)的活性相似,目前已从食用菌中提取到多种核糖体失活蛋白,它们与植物源核糖体失活蛋白生化特性相差很远。 γ_3 是否为核糖体失活蛋白还有待进一步证实。 γ_3 蛋白在 GenBank 中没找到同源序列,这预示其为一抗病毒、抗肿瘤蛋白新资源。 γ_3 的 N-端序列测定为其基因的克隆和转化打下了很好的基础,进一步研究它的其他活性和生化特性对基因工程具有重要意义。此工作正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Wang H X, Ng T B. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus translation-inhibitory and ribonuclease activities. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 **276**(2): 587 ~ 593.
- [2] Yu L G, Fernig D G, White M R, et al. Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. *J Biol Chem* 1999 **274**(8): 4890 ~ 4899.
- [3] Wang H X, Ng T B, Liu W K, et al. Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Int J Pept Protein Res* 1995 **46**(6): 508 ~ 513.
- [4] Wang H X, Ooi V E, Ng T B, et al. Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Pharmacol Toxicol* 1996 **79**(6): 318 ~ 323.
- [5] Lam S K, Ng T B, Hyspin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 **285**(4): 1071 ~ 1075.
- [6] Wang H, Ng T B. Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. *Life Sci* 2001 **68**(18): 2151 ~ 2158.
- [7] Piraino F, Brandt C R. Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata*. *Antiviral Res* 1999 **43**(2): 67 ~ 78.
- [8] Lam S K, Ng T B. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Arch Biochem Biophys* 2001 **93**(2): 271 ~ 280.
- [9] Kobayashi N, Hiramatsu A, Akatuka T. Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinula edodes*. *Agricultural and Biological Chemistry* 1987 **51**(3): 883 ~ 890.
- [10] 孙 慧, 吴祖建, 谢联辉, 等. 杨树菇 (*Agrocybe aegerita*) 中一种抑制 TMV 侵染的蛋白质纯化及部分特性. *生物化学与生物物理学报* 2001 **33**(3): 351 ~ 354.
- [11] 付鸣佳, 吴祖建, 林奇英, 等. 榆黄蘑中一种抗病毒蛋白的纯化及其抗 TMV 和 HBV 的活性. *中国病毒学* 2002, **17**(4): 350 ~ 353.
- [12] Gooding G V jr, Hebert T T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathology* 1967 **57**(11): 1285.
- [13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 **22**: 680 ~ 685.
- [14] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000. 42 ~ 47.
- [15] 李如亮主编. 生物化学实验. 武汉: 武汉大学出版社, 1998. 57 ~ 58.
- [16] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immu-*

nol Methods ,1983 **65** (1):55 ~ 63.

- [17] 孙 册 . 凝集素活力及纯度鉴定的一般方法 . 见 张惟杰 . 复合多糖生化研究技术 . 上海 : 上海科学技术出版社 , 1987 . 341 ~ 344 .
- [18] 王贺祥 , 黄荣春 , 吴子斌 , 等 . 霉菌凝集素 . 中国食用菌 , 1997 , **16** (1) 3 ~ 4 .

Purification and Activities of an Alkaline Protein from Mushroom *Coprinus comatus*

Wu Liping Wu Zujian Lin Qiying* Xie Lianhui

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

Abstract : An Alkaline protein $\gamma 3$ can be purified from the fruiting bodies of mushroom *Coprinus comatus* by means of CM-sepharose FF ion-exchange column chromatography and Superdex™ 75 High Resolution molecular sieve chromatography. The protein has a molecular weight of about 14.4kD by SDS-PAGE. Some activities of $\gamma 3$ have been detected , and the result is the following : the inhibition rate against Tobacco Mosaic Virus is 83.0% when the concentration of $\gamma 3$ is 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. $\gamma 3$ is able to agglutinate rabbit and human erythrocytes at the concentration of 1.562 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.781 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Using an assay system based on mach cancer cell line MGC-803 , $\gamma 3$ was studied for its inhibitory ability against celles multiplication , and the IC_{50} is 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The N-terminal sequence is NRDVAACARFIDDFCDLTP , which has no homology with other sequences in Genbank.

Key words : Purification , Tobacco Mosaic Virus , Lectin , Anti-tumor

Foundation item : The Project for University Key Teacher by the Education Ministry of China (2000-65)

* Corresponding author . Tel : 86-591-3789345 ; E-mail : linqy@fjau.edu.cn

Received date : 11-20-2002

《微生物学报》第八届编辑委员会名单

主 编 : 李季伦 院 士 中国农业大学生物学院
 副主编 : 谭华荣 研究员 中国科学院微生物研究所
 陆德如 研究员 第二军医大学遗传研究所
 王敖全 研究员 中国科学院微生物研究所
 曲音波 教 授 山东大学生命科学学院
 徐建国 研究员 中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所
 编 委 (按姓名拼音排序 , * 2003 年 7 月新增补)

蔡永峰	陈永青	程 池	东秀珠	范云六
郭 俊	胡福泉	胡远扬	黄 力	陆承平
闵 航	钱世钧	邵一鸣	盛 军	唐 宏
田 波	王 平	* 王华明 (USA)	谢 红	杨苏声
翟中和	* 张耀平 (USA)	郑天凌	朱宝泉	诸葛健

编 辑 : 王晋芳 王 敏