

灰树花中一种抗烟草花叶病毒的蛋白质的纯化及其性质*

陈 宁¹⁾ 吴祖建** 林奇英 谢联辉

(福建农林大学植物病毒研究所, 农药生物化学教育部重点实验室, 福州 350002)

摘要 通过硫酸铵分级沉淀、阴离子交换柱层析及凝胶过滤柱层析, 从灰树花子实体中分离到了一种具有抑制烟草花叶病毒(TMV)侵染活性的热稳定蛋白——GFAP. 经常规凝胶电泳和等电聚焦电泳显示为单一条带, 而SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果证明该蛋白质含有两个亚基, 其分子质量分别为34 ku、40 ku. 等电聚焦测定蛋白质pI为3.76, 含糖量约为2%. GFAP的40 ku条带N端氨基酸序列为ACCVPSVTEFENAINSDPVM, 将其与GenBank中的氨基酸序列检索比较后没有发现同源序列, 预示可能为一新的氨基酸序列. GFAP与TMV混合接种心叶烟, 当GFAP浓度为32 mg/L时即可完全抑制浓度为10 mg/L的TMV的侵染, 而4 mg/L的GFAP对浓度为40 mg/L的TMV的抑制率仍可达60%以上.

关键词 灰树花, 抗病毒蛋白, 纯化, 理化性质

学科分类号 Q94

植物病毒病是农业生产上的一类重要病害, 由于病毒对寄主的绝对寄生性, 植物病毒病的防治一直是病毒学研究中的难点和重点. 20世纪60年代就有报道说食用菌的浸提物或深层发酵液有抗植物病毒活性^[1,2], 孙慧等^[3]曾报道过几种食用菌蛋白对烟草花叶病毒的抑制效果, 认为食用菌中的蛋白质具有抑制烟草花叶病毒侵染的作用. 但迄今只有少数食用菌的几种抗病毒蛋白被纯化^[4,5]. 我们从食用菌灰树花中提纯到一种抗TMV侵染的蛋白质, 并对其部分性质进行了研究.

1 材料与方法

1.1 材料

灰树花(*Grifola frondosa*)购于福州市绿健食用菌商行. DEAE-Sepharose、Sepharose-6B为Pharmacia公司产品; 蛋白质电泳分子质量标准为上海生物化学研究所东风生化试剂厂产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS为上海生工生物工程有产品, 其他试剂为分析纯. 烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)由本所纯化, 并保存在-70℃超低温冰箱中.

1.2 方法

1.2.1 灰树花子实体粗提液的制备: 灰树花干子实体粉碎, 蒸馏水浸提10 h, 四层纱布过滤, 10 000 g离心10 min, 上清液中加入固体硫酸铵至

45%的饱和度, 放置过夜. 10 000 g离心10 min, 往上清液中加入硫酸铵使饱和度增至90%, 同上处理, 弃上清, 沉淀物用最小体积的蒸馏水溶解, 对蒸馏水透析脱盐, 浓缩, 以上各步骤均在4℃下进行.

1.2.2 蛋白质的提纯: 将粗提液经离子交换柱层析、凝胶过滤柱层析后得到纯化的灰树花抗病毒蛋白(*Grifola frondosa* antiviral protein, GFAP).

1.2.3 蛋白质含量测定: 按Bradford方法测定, 以牛血清白蛋白作标准对照绘制标准曲线.

1.2.4 含糖量计算: 参照酚-硫酸法^[6]进行, 以葡萄糖为计算标准.

1.2.5 电泳分析: 纯度的鉴定采用聚丙烯酰胺凝胶常规电泳, 分子质量及等电点的测定参考文献[7, 8].

1.2.6 GFAP抗TMV侵染活性测定: 采用半叶法, 用蒸馏水及等体积的系列浓度GFAP蛋白溶液分别与浓度为10 mg/L病毒液等量混合接种在桔斑寄主的左、右半叶上, 每个样品接种5~6片叶,

* 高等学校骨干教师资助计划(2000-65).

** 通讯联系人.

¹⁾ 厦门出入境检验检疫局, 厦门

Tel: 0591-3722825, Fax: 0591-3769704

E-mail: wuzujian@126.com

收稿日期: 2003-08-06, 接受日期: 2003-10-13

待出现明显枯斑后, 及时记录枯斑数, 取平均值。
抑制率/% = $[1 - (\text{处理的枯斑数} / \text{对照的枯斑数})] \times 100^{[9]}$ 。

1.2.7 40 ku 亚基 N 端氨基酸序列分析: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后去除浓缩胶。将凝胶和硝酸纤维素 (NC) 滤膜分别在转移缓冲液中浸泡 20 min, 采用 Bio-Rad 公司的 Mini Trans-Blot Cell 装置, 以 200 mA 稳流 1 h 将蛋白质从凝胶电转移到 NC 膜上。将滤膜置于 100% 甲醇中润湿几秒后在染色液中浸泡 1min, 50% 甲醇脱色至蛋白质条带清楚显现并在超纯水中漂洗后自然晾干。40 ku 亚基 N 端氨基酸序列测定由湖南师范大学蛋白质化学研究室完成。

1.2.8 TMV 的提纯和定量: 按 Gooding 方法^[10]提纯, 略加修改。经 200 ~ 300 nm 紫外扫描确定其纯度及浓度。

1.2.9 温度对 GFAP 抗 TMV 侵染活性的影响: 将 7 份纯化的 GFAP 用蒸馏水稀释至 4 mg/L, 分别在 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、98℃ 水浴处理 10 min, 取出后立即放在冷水中冷却, 与等量的 10 mg/L 提纯 TMV 混合后立即半叶法接种心叶烟, 计算抑制率。

2 结 果

2.1 GFAP 的分离和纯化

2.1.1 离子交换柱层析: 蛋白质浓缩后, 装入透析袋, 4℃ 下在 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液中充分透析。透析后的样品上样于经 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液充分平衡的 DEAE-Sephrose (1.6 cm × 15 cm) 层析柱, 用 200 ml 含 0 ~ 1 mol/L NaCl 作线性梯度洗脱, 经 280 nm 紫外检测 (图 1), 收集各蛋白质吸收峰,

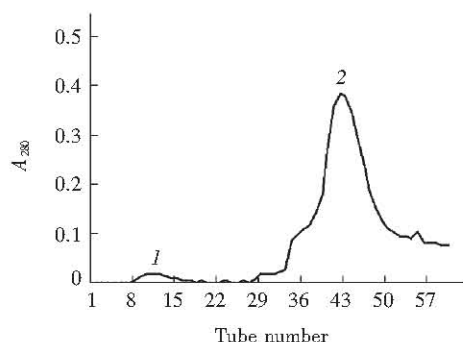


Fig. 1 Ion exchange chromatography of protein crude extract on DEAE-Sephrose column

并用半叶法测定其抗 TMV 侵染的活性。结果发现, 图 1 中的峰 2 (40 ~ 47 管) 含抗 TMV 活性的蛋白质, 合并 40 ~ 47 号管进行下一步的纯化。

2.1.2 凝胶过滤柱层析: 经离子交换柱层析分离后的活性级分经脱盐、浓缩, 4℃ 下在 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.2) 的缓冲液中充分透析, 上样于经同种缓冲液充分平衡的 Sepharose 6B (1.6 cm × 70 cm) 层析柱, 然后用缓冲液淋洗, 经 280 nm 紫外检测, 结果见图 2。收集各蛋白质吸收峰, 并测定其抑制 TMV 侵染的活性。结果发现图 2 中的峰 3 (28 ~ 32 管) 具有抗 TMV 侵染的活性。合并 28 ~ 32 管, 4℃ 下在蒸馏水中透析 48 h, 其间换水 2 ~ 3 次, 再用聚乙二醇 20000 浓缩, 得到灰树花抗病毒蛋白 (Grifola frondosa antiviral protein, GFAP)。

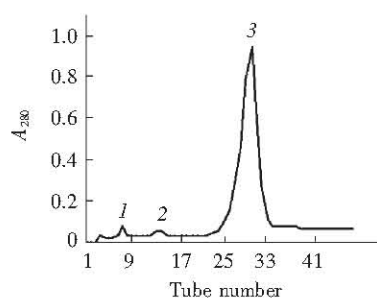


Fig. 2 Gel filtration chromatography on Sepharose 6B

2.2 纯度、分子质量、等电点、含糖量测定

从聚丙烯酰胺凝胶常规电泳图 (图 3) 和等电聚焦凝胶电泳图 (图 4) 中可以看出, 染色后, 纯

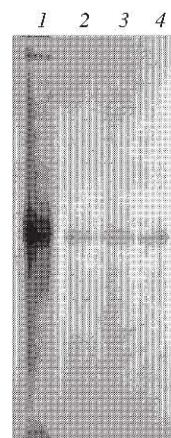


Fig. 3 The native polyacrylamide gel electrophoresis
1: Purified by DEAE-Sephrose; 2-4: Purified by Sepharose 6B.

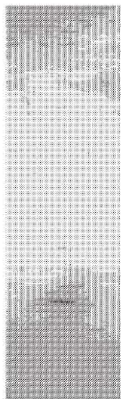


Fig. 4 Isoelectric focusing of GFAP

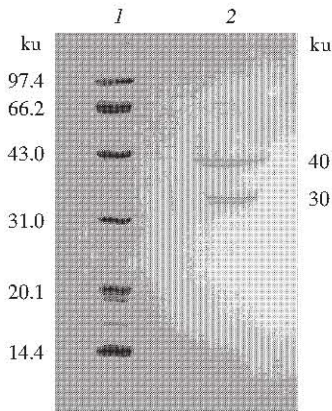


Fig. 5 Molecular mass of GFAP by SDS-PAGE

1: Protein molecular mass marker; 2: GFAP.

化样品显示一条均一的蛋白质条带, 说明 GFAP 已达到电泳纯. 经等电聚焦电泳测定 (图 4), pI 为 3.76, 说明 GFAP 是一种酸性蛋白. 从 SDS-PAGE (图 5) 中可以看出, GFAP 具有两个亚基, 其分子质量分别为 34 ku、40 ku. 由酚-硫酸法测得含糖量约为 2%.

2.3 温度对 GFAP 抗 TMV 侵染活性的影响

将温度对抑制率作图 (图 6), 从图 6 中可以看出, 在 80℃ 水浴 10 min 后 GFAP 仍可保持约 80% 的活性, 这和未经热处理的蛋白抗 TMV 活性接近, 而经 90℃ 和 98℃ 水浴 10 min 后, 抗 TMV 的活性才迅速下降, 这说明 GFAP 为一个热稳定性蛋白.

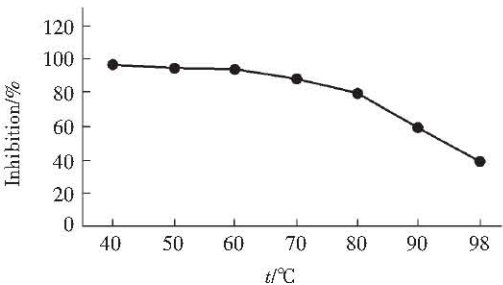


Fig. 6 Thermal stability of GFAP

2.4 GFAP 抗 TMV 侵染活性测定

将浓度为 1 g/L 的 GFAP 纯蛋白按倍比稀释成 $2^{-2} \sim 2^{-9}$ g/L, 分别与浓度为 10 mg/L 的 TMV 等量混合, 半叶法接种心叶烟, 计算抑制率. 结果见表 1.

Table 1 The minimum effective concentration of GFAP at 10 mg/L

ρ (GFAP) / (g · L ⁻¹)	0.25	0.125	0.063	0.032	0.016	0.008	0.004	0.002
Inhibiting ratio/%	100	100	100	100	98.8	96.3	82.8	42.6

从表 1 可以看出, 当 GFAP 浓度为 32 mg/L 时即可完全抑制浓度为 10 mg/L TMV 的侵染, 而 GFAP 浓度为 4 mg/L 时, 对 10 mg/L TMV 的侵染抑制率仍可达 80% 以上.

将浓度为 4 mg/L 的 GFAP 蛋白分别与 20 mg/L、

30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L 的 TMV 等量混合, 半叶法接种心叶烟, 计算抑制率. 结果见表 2.

从表 2 可以看出, 4 mg/L 的 GFAP 对浓度为 40 mg/L TMV 的抑制率仍可达 60% 以上.

以上结果说明 GFAP 是一种有效的抗 TMV 侵染的蛋白.

2.5 GFAP 的 40 ku 亚基 N 端氨基酸序列分析

GFAP 的 40 ku 亚基 N 端氨基酸序列为: ACCVPSVTEFENAINSDPVM. 经 GenBank 蛋白质序列检索, 没有找到同源序列.

Table 2 The maximal repressed concentration of TMV at 4 mg/L GFAP

ρ (repressed TMV) / (mg · L ⁻¹)	20	30	40	50
Inhibiting ratio/%	88.9	77.8	63.9	14.0

3 讨 论

已有多种抗植物病毒蛋白从植物中提纯出来, 并已用于抗病毒植物基因工程的研究. 从食用菌中提纯的抗植物病毒的蛋白质还很少. Kobayashi 等^[4]从香菇中提纯出一种抗 TMV 侵染的蛋白质——FBP, 是一种碱性单亚基蛋白质, 分子质量为 22 ku, 含糖量低于 0.1%. 孙慧等^[5]从杨树菇中提纯到一种抗 TMV 侵染酸性蛋白-AAVP, 分子质量为 15.8 ku, 也是单亚基蛋白质. FBP 和 AAVP 中都没有 Cys. 我们从灰树花的子实体中提纯出这种抑制 TMV 侵染的蛋白质——GFAP, 含糖量为 2%, 含有两个亚基, 为酸性蛋白, 其等电点与 AAVP 相近. 从 GFAP 的 40 ku 亚基 N 端氨基酸序列分析结果中可以看出, GFAP 中含有 Cys. GFAP 是一种热稳定性蛋白质, 它可以耐受 80℃ 高温. 从灰树花中提纯出抗病毒蛋白尚属首次报道. GFAP 的 40 ku 亚基 N 端氨基酸序列在 GenBank 中没找到同源序列.

参 考 文 献

- 1 王晶英, 郑雅莺, 张建元, 等. 食用菌代谢产物研究及其在农业上的应用. 中国食用菌, 1997, 16 (2): 6~7
Wang J Y, Zheng Y Y, Zhang J G, et al. Edible Fungi of China, 1997, 16 (2): 6~7
- 2 王先彬, 王启燕. 香菇培养物水浸液对烟草花叶病毒 (TMV)

侵染心叶烟的抑制作用. 微生物学报, 1986, 26 (4): 363~365

Wang X B, Wang X Y. Acta Microbiological Sinica, 1986, 26 (4): 363~365

- 3 孙 慧, 吴祖建, 林奇英, 等. 微生物农药及其产业化. 北京: 科学出版社, 2000. 199~206

Sun H, Wu Z J, Lin Q Y, et al. Microorganism Pesticide and Industrialization. Beijing: Science Press, 2000. 199~206

- 4 Kobayashi N, Hiramatsu A, Akatsuka T. Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *lentinus edodes*. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51 (3): 883~890

- 5 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

Sun H, Wu Z J, Xie L H, et al. Acta Biochemical et Biophysica Sinica, 2001, 33 (3): 351~354

- 6 鲁子贤. 蛋白质和酶学研究方法 (第一册). 北京: 科学出版社, 1989. 37~39

Lu Z X. Study Methods of Protein and Enzymology. Beijing: Science Press, 1989. 37~39

- 7 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 武汉: 武汉大学出版社, 1994. 331~335

Zhao Y F. Principle and Application of Biochemistry Technology. Wuhan: Wuhan University Press, 1994. 331~335

- 8 Leammli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 74. Nature, 1970, 227: 680~685

- 9 Baranwal V K, Verma H N. Localized resistance against virus infection by leaf extract of *Celosia cristata*. Plant Pathology, 1992, 41: 633~638

- 10 Gooding G V jr, Hebert T T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. Phytopathology, 1967, 57 (11): 1285

Purification and Partial Characterization of a Protein Inhibitor of Tobacco mosaic virus Infection From The Maitake (*Grifola frondosa*) *

CHEN Ning¹⁾, WU Zu-Jian **, LIN Qi-Ying, XIE Lian-Hui

(Key Laboratory of Pesticide and Biochemistry, Ministry of Education,
Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract A heat stable protein, named GFAP, was isolated and purified from the fruiting bodies of edible fungus *Grifola frondosa* by a procedure of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, and ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose column and gel filtration on Sepharose-6B column. According to PAGE and IEF, GFAP had a single band with pI 3.67. And it consisted of two subunits of 34 ku and 40 ku when encountered by SDS-PAGE. GFAP is identified as a glycoprotein containing 2% sugar. The N-terminal amino acid sequence of the 40 ku subunit is ACCVPSVTEFENAINSDPVM, which has no homology with other sequences in GenBank. GFAP possesses the inhibitory activity against the infection of Tobacco mosaic virus. When mixed with TMV (10 mg/L) and inoculated in local lesion host, *Nicotiana glutinosa*, GFAP was able to completely inhibit the infection of TMV, and with TMV (40 mg/L), it still had an infection effect of higher than 60% at the concentration of 4 mg/L.

Key words Maitake, antiviral protein, purification, characterization

* This work was supported by Foundation for University Key Teacher by The Ministry of Education (2000-65).

** Corresponding author. ¹⁾Xiamen Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, China.

Tel: 86-591-3722825, Fax: 86-591-3769704, E-mail: wuzujian@126.com

Received: August 6, 2003 Accepted: October 13, 2003