

小黑麦抗真菌蛋白组分的分离纯化和性质研究

那 冰^{1*} 余明琨¹ 龚 隽¹ 吴 襟^{2*}

¹(中国科技大学研究生院,北京 100039)

²(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘 要 以木霉为指示菌,小黑麦中饲 237 种子中的蛋白提取物经过分离纯化后,得到了 3 种主要的抗真菌蛋白组分,经酶活检测鉴定,分别是分子量为 30.5 kD 的 Class II 型几丁质酶,两种分子量为 51kD 和 23 kD 的 β -1,3-葡聚糖酶。其中几丁质酶的最适反应 pH 为 6.0,最适反应温度为 37°C,测定的 N-末端氨基酸序列与大麦几丁质酶的有很高的同源性。在一定条件下,这 3 种蛋白组分都有较强的抗木霉活性,并且有明显的协同作用,同时它们对离体易感小麦叶片上白粉菌有很好的生长抑制作用。

关键词 小黑麦,抗真菌蛋白,分离纯化,几丁质酶, β -1,3-葡聚糖酶

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0561-05

植物抵抗病原有多种方式,合成一些有抗病性的化合物是一种重要方式,在这些有抗病性的化合物中最重要的是一类病原相关蛋白(Pathogenesis-related proteins, PR-proteins)。PR-proteins 是指一类宿主编码的蛋白质,它们主要位于植物细胞间隙中,通常由病原感染所诱导产生,现在被分为 5 个家族。它们的合成也可被一些化学物质所诱导并与宿主对病原的非特异性抵抗有关^[1]。几丁质酶(EC3.2.1.14)是几丁质的水解酶。几丁质又称甲壳素,是 N-乙酰 D-葡萄糖胺(GlcNAc)以 β -1,4 糖苷键连接起来的直链多聚物,它是真菌细胞壁的重要组成部分之一,同时也大量存在于昆虫和动物的甲壳中。多数植物都能产生几丁质酶,但是植物体内迄今尚未发现几丁质的存在,因此几丁质酶被认为与植物的防御反应有关^[2],归类为 PR-proteins 家族 3。 β -1,3-葡聚糖酶(EC3.2.1.39)是 β -葡聚糖的水解酶,属于 PR-protein 家族 2^[1]。由于 β -1,3-葡聚糖以不同形式参与了植物和真菌细胞壁的构建组成,因此凡是涉及它们细胞壁结构和功能改变的过程就涉及 β -葡聚糖酶,如发芽、细胞生长、抵抗病原侵染、开花及结果等^[3]。小黑麦是小麦和黑麦属间杂交,应用多倍体育种和染色体工程方法第一个人工创造的新作

物。它既具有小麦优质高产又具有黑麦的抗寒抗旱尤其是黑麦的抗病性的特点,有很好的应用和研究价值。孙元枢教授培育出的小黑麦中饲 237 已通过品种鉴定并已在国内大面积推广,该品种有很好的抗白粉病特性。而白粉病是一类严重危害麦类高产、稳产的危害菌。因此,在植物生物技术飞速发展的今天,了解抗病植物的抗病机理,寻找具有抗菌活性的蛋白组分,对未来转基因植物的构建和培育将有重要意义。

本研究以木霉为指示菌,追踪小黑麦中饲 237 种子中的抗真菌活性,分离纯化并鉴定了 3 种主要的抗真菌蛋白组分。在了解这些组分间相互作用的基础上,进一步观察了其对小麦白粉病的作用,获得了理想的实验结果。本文对小黑麦抗真菌成分所做的研究工作在国内尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 菌种和材料

绿色木霉购自中国科学院微生物所;混合型白粉菌种购自中国农科院植保所;小黑麦中饲 237 种子由中国农科院作物所孙元枢教授惠赠;小麦铭贤 169 种子由中国农科院植保所段瑕瑜老师惠赠;柱

收稿日期 2002-04-19,修回日期 2002-06-14。

* 通讯作者。 Tel 86-10-62652018, E-mail wujinw5@sina.com.cn

** 中国科技大学研究生院生物学部 97 级硕士研究生,现为美国 Georgia 州立大学生化专业博士生。
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

层析材料 DEAE-Cellulose 为 Whatman 公司产品, CM-Sepharose CL-6B、Sephacryl S-100 和 PVDF 膜、CAPS 均为 Pharmacia 公司产品, Phenylglycine 疏水柱层析材料为自行合成, 电泳试剂 Acr、Bis、SDS、AP、分子量标准和酶测活底物几丁质(Chitin)、昆布多糖(Laminarin)均为 Sigma 公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 木霉孢子液的制备:按参考文献[4]配成孢子浓度为 2×10^7 个/mL 的储存液。

1.2.2 抗木霉活性测定:

(1) 固体培养基法:在文献[4]测活方法的基础上略作改进,在土豆琼脂平板上分别加上 $8 \mu\text{L}$ 适当稀释的待测蛋白样品和浓度为 2×10^7 个/mL 的木霉孢子液样品, 28°C 培养约 24 h 后观察结果。抗木霉活力单位定义为该条件下能抑制木霉菌生长所需的最小蛋白量为一个活力抑制单位(u_1)。

(2) 液体培养基法:参照文献[5],在 1.5mL Eppendorf 管中加入 0.8mL 土豆液体培养基、0.2mL 36% 甘油、 $30 \mu\text{L}$ 浓度为 4×10^5 个/mL 木霉孢子液和 $170 \mu\text{L}$ 待测蛋白样品, 28°C 培养约 24 h 后测 OD_{660} 值。抗木霉活力单位定义为该条件下降低木霉菌正常生长 OD_{660} 值一半所需的最小蛋白量为一个活力抑制单位(u_2)。

1.2.3 抗木霉蛋白组分的分离纯化:按文献[4]方法处理获得小黑麦中饲 237 种子浸提液,向其中缓慢加入硫酸铵至 55% 饱和度,静置 8 h 后, $10\,000$ r/min 离心 20 min 去沉淀,上清液中继续加入硫酸铵至 80% 饱和度,静置 8 h 后, $10\,000$ r/min 离心 20 min 收集沉淀,用少量 pH 7.0, 0.025 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)溶解并用相同缓冲液透析过夜。将透析蛋白液上 DEAE-Cellulose 柱($2.7\text{cm} \times 7.0\text{cm}$),用含 0.05mol/L NaCl 的 PBS 洗脱,收集合并抗木霉蛋白活性峰后,上 CM-Sepharose CL-6B 柱($1.7\text{cm} \times 9.0\text{cm}$),用 $0 \sim 0.2\text{mol/L}$ NaCl 的 PBS 进行直线梯度洗脱,收集抗木霉蛋白活性峰浓缩后上 Sephacryl S-100 分子筛层析柱($1.6\text{cm} \times 80\text{cm}$),将分离获得的抗木霉蛋白活性组分浓缩后溶于硫酸铵浓度为 16% 的 pH 7.4, 0.02 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,上 Phenylglycine 疏水层析柱($1.5\text{cm} \times 1.4\text{cm}$),用 15% ~ 0% 硫酸铵的 Tris-HCl 缓冲液线性梯度洗脱,分别收集抗木霉蛋白活性峰并用重蒸水充分透析,样品经真空冷冻浓缩干燥后置于 4°C 冰箱中备用保存。以上抗木霉活

性测定主要采用固体培养基法,测定结果见表 1。

1.2.4 几丁质酶活性测定:用 Chitin 作底物参照文献[6]进行,用几丁质酶酶反应的标准曲线的初始斜率来进行计算。酶活力单位定义为该条件下,每分钟水解释放出相当于 $1 \mu\text{mol}$ GlcNAc 单体所需的几丁质酶为一个酶活单位(u_3)。

1.2.5 β -1,3-葡聚糖酶活测定:用 Laminarin 作底物参照文献[7]进行。活力单位定义为在该条件下每分钟产生 $1 \mu\text{mol}$ 葡萄糖的 β -1,3-葡聚糖酶为一个酶活单位(u_4)。

1.2.6 蛋白质电泳分析和蛋白质印迹转移:分别参照文献[8]中 SDS-凝胶电泳方法和蛋白质印迹转移法进行。

1.2.7 蛋白分子量的测定:用 SDS-PAGE 和 Sephacryl S-100 凝胶柱层析法测出。

1.2.8 N-末端序列分析:由中国科学院遗传所用 Applied Biosystems Model 476A 序列测试仪测定。

1.2.9 离体叶段法测定分离蛋白组分抗白粉病作用:取小麦铭贤 169 二叶期 3cm 长叶段,用 0.1% Triton X-100 处理后,铺于含 $60 \mu\text{g/mL}$ 防腐剂的苯丙咪唑的琼脂板上,涂抹 0.1% Triton X-100 并吸去多余液体。在不同叶片上分别涂抹 $20 \mu\text{L}$ $50 \mu\text{g/mL}$ 的抗木霉蛋白组分,BSA 溶液和 Tris-HCl 缓冲液后,再分别均匀撒上白粉菌孢子, 16°C 每天 16h 光照下于培养箱中培养 8 ~ 10d 后观察结果。

2 结 果

2.1 抗真菌蛋白的分离纯化结果

按 1.2.3 中的处理方法,小黑麦中饲 237 种子浸提液中的蛋白组分经硫酸铵沉淀、DEAE-Cellulose 柱层析、CM-Sepharose CL-6B 柱层析、和 Sephacryl S-100 分子筛柱层析等步骤的分离纯化后,获得分子量差异较大的两个抗木霉蛋白组分 1 和 2。其中组分 1 分子量大但有微弱的抗木霉活性,通过酶活测定分析,有 β -1,3-葡聚糖酶酶活性($1581u_4/\text{mg}$);分子量小的组分 2 通过 Phenylglycine 疏水柱层析进一步分离又获得疏水性有差别的两个抗木霉活性组分 3 和 4,疏水性强的蛋白组分 3 抗木霉活性很高,通过酶活测定分析,有几丁质酶酶活性($133u_3/\text{mg}$);疏水性弱的组分 4 抗木霉活性低,通过酶活测定分析,有 β -1,3-葡聚糖酶酶活性($640u_4/\text{mg}$)。分离纯化各步蛋白含量和抗木霉活性见表 1。

表 1 小黑麦抗真菌蛋白组分的分离纯化

Table 1 Purification of the antifungal proteins from Triticale seed

Purification step		Total protein/mg	Total activity/u ₁	Specific activity(u ₁ /mg)	Recovery/%
Crude extract		4200	756000	180	100
55% ~ 80% A.S.		1100	385000	350	51
DEAE-Cellulose		900	360000	400	48
CM-Sephacryl		45	360000	8000	48
Sephacryl S-100	1	4.1	/	/	/
	2	15.7	298000	19000	39
Phenylglycine	3	10.3	206000	20000	27
HIC	4	2.6	/	/	/

2.2 小黑麦几丁质酶的性质

组分 3 蛋白样品经 SDS-凝胶电泳分析,银染表明为一条带,其质量为 30.5 kD(图 1);该蛋白带进行印迹转移后作 N-末端序列分析,结果和已报道大麦几丁质酶 N-末端序列有很高的同源性,但和大豆的序列有较大的差异^[5]。具体比较如下:

小黑麦几丁质酶 N-末端序列: S-V-S-S-I-I-H-A-Q-F-D-R-M-L-L

大麦几丁质酶 N-末端序列: S-V-S-S-I-V-S-R-A-Q-F-D-R-M-L-L

大豆几丁质酶 N-末端序列: D-L-S-A-L-I-S-R-T-S-F-D-Q-M-L-K

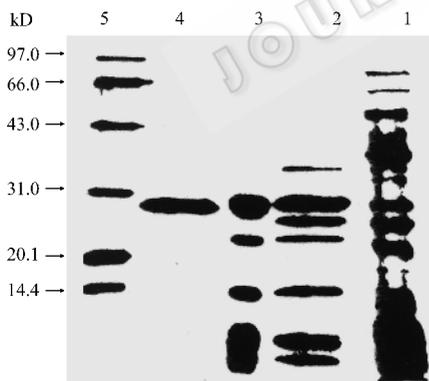


图 1 抗真菌蛋白组分中几丁质酶分离纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of chitinase during the purification of antifungal proteins

1. 55% ~ 80% A.S ; 2. CM-Sephacryl ; 3. Sephacryl S-100 ; 4. Phenylglycine HIC ; 5. Protein markers

同时该蛋白样品的酶活分析表明,组分 3 中几丁质酶的活性与抗木霉活性相平行,即几丁质酶的酶活越高,抗木霉活性越大,反之亦然;同时,固体平板上几丁质酶对木霉菌丝顶端生长的抑制情况如图 2 所示:A.正常对照中木霉菌丝自由伸展;B.添加几

丁质酶后木霉菌丝成梳齿状,顶端生长明显受到抑制。以上结果都充分说明小黑麦抗木霉活性蛋白主要成分是其产生的几丁质酶。经测定,该酶的最适反应温度为 37℃,最适反应 pH 为 6.0,与小黑麦正常生理环境条件相符合。

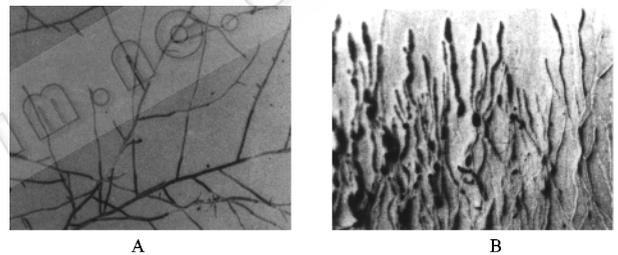


图 2 纯化的小黑麦几丁质酶对木霉菌丝顶端生长的抑制
Fig.2 Inhibition of *Trichoderma* mycelial growth by the purified chitinase from Triticale

A. Normal growth ; B. Inhibition of growth by chitinase

2.3 两种小黑麦 β -1,3-葡聚糖酶的性质

组分 1 和 4 蛋白样品通过酶活测定分析,均测出有 β -1,3-葡聚糖酶活性,经 Sephacryl S-100 凝胶柱层析法测定,组分 1 和组分 4 中的 β -葡聚糖酶分子量分别约为 51 kD 和 23 kD。

2.4 几丁质酶与 β -1,3-葡聚糖酶抗木霉活性的协同效果

将组分 1 和 4 中的 β -1,3-葡聚糖酶混合后用固体培养基法进行抑菌测定,抑菌活力很低,通过液体培养基法进行测定,却表现出明显的活力。而几丁质酶在 2 种方法上都能表现出很好的抗木霉活力。实验结果还表明,等量的小黑麦几丁质酶在液体法测定中要比 β -1,3-葡聚糖酶抗木霉活力高,并且二者具有明显的协同作用。活力测定结果如表 2 所示。固体法和液体法中都测定的双酶等量混合液的抗木霉活力为 100%。

表 2 小黑麦几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的抗木霉活性Table 2 Effect of chitinase and β -1,3-glucanase from Triticale on growth inhibition of *Trichoderma*

Growth inhibition	Buffer	β -1,3-glucanase (2 μ g/mL)	Chitinase (2 μ g/mL)	β -1,3-glucanase + Chitinase (2 μ g/mL)
Solid culture method	0	0	95%	100%
Liquid culture method	0	25%	39%	100%

2.5 小黑麦几丁质酶与 β -1,3-葡聚糖酶的抗白粉病作用

白粉菌是一种专性寄生菌,只能在活体组织上生长,不能用培养基培养。因此我们采用若干小麦离体叶段,随机平均分为4组,如前面方法所述,分

别涂抹好测定样品,然后接种白粉菌,培养观测记录每个叶片上的菌落数,取每组平均值,结果由表3可见。这显示了极低量的小黑麦几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶都能具有明显的抗白粉病活性。

表 3 小麦离体叶段法测定几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的抗白粉病作用Table 3 Powdery mildew growth inhibition on detached susceptible wheat leaves by chitinase and β -1,3-glucanases from Triticale

	BSA	Tris-HCl buffer	Chitinase	β -1,3-glucanase
Average amount of powdery mildew on every detached susceptible wheat leave	10	10	0	1

3 讨 论

1911年 Bernard 首次在蜗牛中发现几丁质酶^[9]。80年代初,由于发现植物体内的几丁质酶可能参与植物防卫反应,使几丁质酶研究成为一个热点。1994年,Leo等^[10]对不同来源的植物几丁质酶氨基酸序列比较分析,将几丁质酶分为5类,即 Class I-V类几丁质酶。其中 Class I类几丁质酶大多为碱性蛋白,N末端有富含半胱氨酸的几丁质结合区,而 Class II类几丁质酶大多为酸性蛋白,其主要结构的氨基酸序列与 Class I几丁质酶相似,但N末端缺少富含半胱氨酸的几丁质结合区,一般存在于植物细胞间隙中,是植物防卫反应的主要机制。主要有烟草几丁质酶、大麦几丁质酶等。从本文报道的小黑麦几丁质酶的N末端序列氨基酸组成情况基本可以推测该几丁质酶属于 Class II类。

研究表明,植物几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶对植物真菌病害的防治机理主要是由于对真菌细胞壁的破坏作用。真菌胞壁的主要成分是几丁质和 β -葡聚糖,它的形成取决于真菌对自身几丁质和 β -葡聚糖合成和降解的精细平衡。当这一平衡被外加的几丁质酶和 β -葡聚糖酶破坏时,真菌胞壁的合成就受损,从而导致菌丝膨胀、破裂、死亡,最终表现为真

菌生长受抑制。此外有报道,植物细胞还会产生一种核糖体失活蛋白,也有很好的抗真菌作用^[5]。它主要是通过和几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶的协同作用,渗入到真菌胞内,特异性地抑制其核糖体活力,从而控制真菌靶蛋白的合成速率,抑制真菌病害的繁殖和生长。这些都表明植物的抗真菌作用是一个各方因素协同、综合的复杂过程。

相比之下,几丁质酶比 β -1,3-葡聚糖酶有更好的抑菌效果,特别在固体培养基法中对木霉新生菌丝延伸的抑制作用上,几丁质酶尤为明显。这主要的原因是由于新生菌丝以顶端生长方式延伸时,顶端最先合成的成分是几丁质,常裸露在外,更容易受到几丁质酶的降解,导致新生菌丝的胞壁被破坏,菌丝生长显著降低。

小麦白粉病是世界各麦区的主要病害之一,它是由高度专性寄生菌——禾白粉菌小麦专化型 (*Erysiphe/Blumeriagraminisf. sp. tritici*) 侵染寄主体表皮细胞造成的。吸器作为禾白粉菌等寄生真菌从寄主体内获取养分的唯一器官,它在植物细胞内的出现,往往是病菌成功侵染的标志,而几丁质正是吸器壁的主要成份,植物几丁质酶必然对吸器有很强的抑制作用。如 Shapira等^[11]将重组的几丁质酶通过灌溉施用于温室中的大豆、棉花,结果发现几丁质酶使

病原菌 *S. roffsigii* 的吸器迅速消失,使植株发病率降低了 62%。虽然目前还未见有任何几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶降解小麦白粉菌吸器的直接证据,但我们可以推测该小黑麦几丁质酶对白粉菌的生长抑制作用,除了对其菌丝的前期生长抑制外,几丁质酶对其重要营养器官-吸器的明显破化也是重要的原因。

随着几丁质酶抗真菌机理的认识和植物基因工程技术的飞速发展,近来更深一步的工作则是 M. Bliffeld 等^[12]将大麦种子中的几丁质酶基因转入小麦获得了对白粉病有高抗性的小麦植株,它从另一个角度更加证明了植物几丁质酶在抗白粉病方面起的重要作用。预计未来,我们能获得该小黑麦几丁质酶的完整基因序列,并转入优质高产小麦品种中,希望构建出有良好应用前景和经济价值的转基因抗病植株,同时对其抗真菌机理也将会有更深入的认识和了解。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hubb J M, Linthorst. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Review in Plant Sciences*, 1991, **10**(2): 123 ~ 150
- [2] LAN H Y (蓝海燕) CHEN Z H (陈正华). Advances in plant chitinase research. *Life Sciences Research* (生命科学) , 1998, **2**(3): 163 ~ 171
- [3] Simmons C R. The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -glucosases and 1,3;1,4- β -D-glucanases. *Critical Review in Plant*

Sciences, 1994, **13** 325 ~ 387

- [4] Walden K Roberts, Claude P Selitrennikoff. Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley. *BBA*, 1986, **880** :161 ~ 170
- [5] Robert Leah, Henrik Tommerup, Ib Svendsen *et al.* Biochemical and molecular characterization of three Barley seed proteins with antifungal properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266** (3): 1564 ~ 1573
- [6] Michel legrand, Serge Kauffmann, Pierrette Geoffroy *et al.* Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** :6750 ~ 6754
- [7] Serge Kauffmann, Michel Legrand, Pierrette Geoffrey *et al.* Biological function of ' pathogenesis-related ' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO Journal*, 1987, **6** (11) 3209 ~ 3212
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, Beijing: Science Press (科学出版社), 1993
- [9] Flach J, Pilet P-E, Jolles P. What is new in chitinase research? *Experientia*, 1992, **48** :701 ~ 716
- [10] Leo S M, Marion A G, Jan A V K *et al.* A new class of tobacco endochitinase homologous to bacterial exochitinase displays antifungal activity. *Plant Journal*, 1994, **5**(4): 469 ~ 480
- [11] Shapira R, Ordentlich A, Chet I *et al.* Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *E. coli*. *Phytopathology*, 1989, **79** :1246 ~ 1249
- [12] Bliffeld M, Mundy J, Potrykus I, Futterer J. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theor Appl Geget*, 1999, **98** : 1079 ~ 1086

Purification and Characterization of Antifungal Proteins in Triticale Seed

NA Bing¹ YU Ming-Kun¹ GONG Jun¹ WU Jin^{2*}

¹(Graduate School, University of Science and Technology of China, Beijing 100039, China)

²(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Using *Trichoderma* as an indicative fungus, three antifungal proteins in Triticale Zhongsi 237 seed were purified and characterized. These protein components were considered to be a new Class II chitinase and two kinds of β -1,3-glucanases. Chitinase molecular mass was 30.5 kD and enzyme activity was maximal at pH 6.0 and 37°C. Two β -glucanases molecular masses were 51kD and 23kD. N-terminal amino acid sequences of Triticale chitinase share high homology with barley chitinase. In some conditions, the chitinase and β -glucanases all had strong antifungal activity and were able to inhibit *Trichoderma* growth synergistically. Moreover, the chitinase and β -1,3-glucanases were able to inhibit powdery mildew growth on detached susceptible wheat leaves.

Key words Triticale, antifungal protein, purification, chitinase, β -1,3-glucanase