

技术与方法 Techniques and Methods

芸苔(菜心)茎叶中的几丁质结合蛋白的分离纯化和某些特性分析

詹冬香¹, 黄九九², 庞学群², 王炜军*¹广东天普生化医药股份有限公司, 广州 510520; ²华南农业大学生命科学学院, 广州 510642Isolation and Purification and Some Characteristic Analysis of Chitin-Binding Proteins from Stems and Leaves of *Brassica campestris* L.ZHAN Dong-Xiang¹, HUANG Jiu-Jiu², PANG Xue-Qun², WANG Wei-Jun*¹Techpool Bio-Pharma Co., LTD., Guangzhou 510520, China; ²College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

摘要: 用脱氨再生几丁质亲和层析和羧甲基-纤维素CM52离子交换柱层析从芸苔(菜心)的茎叶中纯化了4种几丁质结合蛋白: CBPa、CBPb、CBPc和CBPd, SDS-PAGE显示CBPa和CBPb的分子量分别为29.04 kDa和30.68 kDa, 凝胶过滤方法测定CBPa和CBPb的分子量分别为29.04 kDa和31.2 kDa, 表明两者都是单体酶。4种CBP蛋白均有几丁质酶活性, 其中CBPa和CBPb还有溶菌酶活性。EDTA对CBPa和CBPb溶菌酶的活性均无影响, 各种类型的几丁质对CBPa和CBPb都有较强的吸附作用, PAS染色法分析表明CBPa和CBPb均为糖蛋白。

关键词: 芸苔(菜心)茎叶; 几丁质结合蛋白; 纯化; 糖蛋白

几丁质结合蛋白(chitin-binding protein, CBP)是一类能与几丁质特异结合的蛋白质(Raikhel和Quatrano 1986), 广泛存在于各种微生物、动物和植物中, 有些在生物体受到伤害、病虫害侵染时会诱导产生。已发现的CBP主要有凝集素、部分几丁质酶、溶菌酶、抗微生物多肽和抗真菌蛋白等(Broeckaert等1989; Watanabe等1990; Kawabata等1996; Liu等2002), 它们主要有抗菌抗虫功能, 有些还参与植物发育调控或作为储存蛋白(Bormann等1999; Conrads-Strauch等1990; Czaplá和Lang 1990; Yang和Tang 1993; Santos等2004)。本文从芸苔(菜心)茎叶中分离到4种几丁质结合蛋白, 并对具有溶菌酶和几丁质酶活性的CBPa和CBPb一些特性进行了初步研究。几丁质酶与植物对病原微生物(特别是真菌类病原)的抗性有关, 是一种病程相关蛋白。本文中方法对研究芸苔属植物中抗病蛋白(几丁质结合蛋白)和共抗病机制可能有某些参考价值。

材料与方 法

芸苔(菜心) (*Brassica campestris* L.)网室栽培60 d左右, 菜心长出花蕊, 即将开花时收割。

溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)购自Sigma公司; CM-Cellulose CM52购自Whatman公司; 考马斯亮蓝 R250/G250购自Fluka公司;

Sephadex G-75购自Pharmacia公司; 脱氨再生几丁质凝胶参照王炜军和徐凤彩(1996)方法自制; 其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。

几丁质结合蛋白的分离纯化按王炜军和徐凤彩(1996)文中方法。取3 kg菜心叶和茎洗净、切碎, 加入4 °C预冷的含0.2 mol·L⁻¹ NaCl的5 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ (3:1, W/W)捣碎, 尼龙布(200目)过滤, 离心(4 °C, 11 000×g, 10 min), 取上清液, 加入200 mL脱氨再生几丁质凝胶, 于4 °C以下搅拌吸附1 h, 然后将脱氨再生几丁质凝胶装入层析柱(4.0 cm×20.0 cm), 先用含0.2 mol·L⁻¹ NaCl的5 mmol·L⁻¹ NaHCO₃洗涤至280 nm光密度小于0.05 ($A_{280} < 0.05$), 再改用0.15 mol·L⁻¹ 醋酸(HAc)洗脱, 流速3 mL·管⁻¹, 6 min·管⁻¹, 收集溶菌酶洗脱液。

将上述洗脱液超滤浓缩至约10 mL, 超滤至体积约5 mL时加入50 mL 20 mmol·L⁻¹的HAc-NaAc缓冲液(pH 5.0), 继续超滤至体积约为10 mL, 放入预先用20 mmol·L⁻¹的HAc-NaAc缓冲液(pH 5.0)平衡过的羧甲基-纤维素(carboxymethyl-cellulose) CM52层析柱(2.0 cm×8.0 cm), 用含0~0.5 mol·L⁻¹ KCl的20 mmol·L⁻¹ HAc-NaAc缓冲液(pH 5.0)进行梯度洗脱, 流速3 mL·管⁻¹, 6 min·管⁻¹, 分别收集各

收稿 2009-04-10 修定 2009-10-13

* 通讯作者(E-mail: wangweijun@scau.edu.cn)。

个蛋白洗脱峰,测定其溶菌酶活性。

测定溶菌酶活性时将溶壁微球菌底物研磨后,用 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HAc-NaAc 缓冲液(pH 5.0)配成光密度为 A_{450} 0.6~0.75 之间的悬浮液。活性在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下测定,取 2.5 mL 底物悬浮液放入比色杯中,加入 0.1 mL 酶液,迅速搅匀,测定其 450 nm 处的光吸收值的变化。以每分钟光吸收值下降 0.001 为一单位酶活性(U)。

测定几丁质酶活性时以胶状几丁质凝胶为底物,参照 Boller 等(1983)文中方法,缓冲液为 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc-NaAc (pH 5.0),以每小时产生 $1 \mu\text{g}$ *N*-乙酰葡萄糖胺所需的酶量作为一个酶活性单位(U)。

蛋白含量测定按 Bradford (1976)的方法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

分子质量测定参照张龙翔等(1985)书中的方法进行 SDS-PAGE,然后求得 CBPa 和 CBPb 的分子质量。参照沈同和张静岩(1990)书中的方法,用葡聚糖 Sephadex G-75 凝胶过滤测定 CBPa 和 CBPb 的分子质量。

作金属离子对 CBPa 和 CBPb 溶菌酶活性影响时,于反应体系中加入终浓度为 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同的金属离子, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 30 min,其间不断振摇、混匀,按照测定溶菌酶活性方法测定酶活性。

作生物多糖对 CBPa 和 CBPb 的吸附作用时,将纯化的 CBPa 和 CBPb 分别用含 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 溶液于室温下透析过夜,备用。分别称取以下物质各 10 mg: 胶状几丁质粉、几丁质粉、脱氨再生几丁质粉、壳聚糖、Sephadex G-75、燕麦木聚糖、可溶性淀粉和纤维素,然后分别加入 0.5 mL 的 CBPa 和 CBPb,不断振摇, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下开放吸附 1 h 后,离心($11\ 000\times\text{g}$, 5 min),取上清液测定溶菌酶活性。按吸附百分率(%)=(吸附前酶液的溶菌酶活性-吸附后酶液的溶菌酶活性)/吸附前酶液溶菌酶活性 $\times 100\%$ 计算。

CBPa 和 CBPb 蛋白糖基化的定性分析参照方德福(1998)书中的高碘酸(periodic acid, PA)染色法, CBPa 和 CBPb 经 SDS-PAGE 后,先以 PA 染色,拍照,脱色后,再用考马斯亮蓝染色。

结果与讨论

1 菜心中 CBPs 的纯化

从菜心的茎叶提取得到粗酶液的溶菌酶活性

为 $208 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,以脱氨再生几丁质凝胶亲和层析后,洗脱液中只出现 1 个蛋白峰(图 1),此峰具有溶菌酶活性。收集此峰洗脱液 27 mL 即为菜心的几丁质结合蛋白,它的蛋白含量为 $255.55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,溶菌酶比活性为 $29\ 200 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

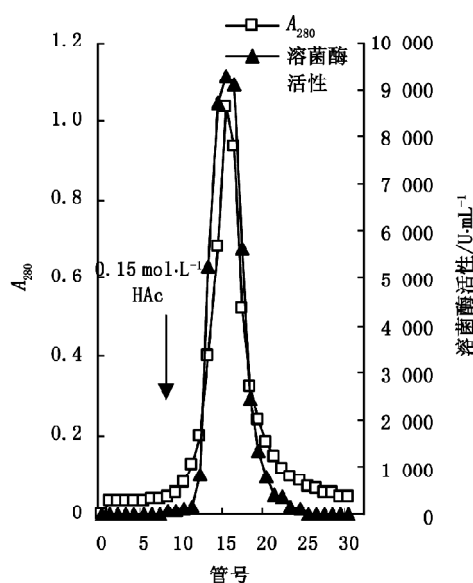


图 1 菜心 CBPs 的脱氨再生几丁质凝胶亲和层析分离

由于用酸碱处理,硫酸铵分步沉淀和凝胶柱过滤等步骤(周泽文等 1994)纯化菜心溶菌酶,效果不佳,比活性仅为 $3\ 414.6 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。因此本文用亲和层析后的酶液经超滤浓缩后,再行 CM-纤维素 CM52 阳离子交换柱层析,分离出 4 个蛋白峰,即 CBPa、CBPb、CBPc 和 CBPd (图 2),经 SDS-PAGE 纯度鉴定, CBPa、CBPb、CBPc 和 CBPd 均显示为单一谱带(图 3),表明这四个组分均达到电泳纯。CBPa 的蛋白含量为 $86.46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,溶菌酶比活性为 $59\ 239 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$; CBPb 的蛋白含量为 $14.56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,溶菌酶比活性为 $137\ 530 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$; CBPc 和 CBPd 的蛋白含量分别为 9.37 和 $12.13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,两者均没有溶菌酶活性。且操作简单易行。

2 菜心中 CBPs 与鸡蛋清溶菌酶(HEWL)的酶活性比较

CBPa 和 CBPb 既有溶菌酶活性又有几丁质酶活性,是一种溶菌酶/几丁质酶双功能酶,而 CBPc 和 CBPd 只有几丁质酶活性(表 1),4 种 CBP 与鸡蛋清溶菌酶(HEWL)相比较均有很高的几丁质酶活性。

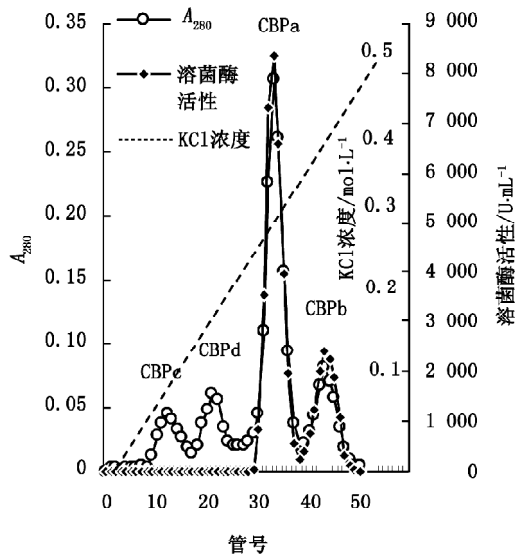


图2 菜心CBPs的CM-纤维素CM52层析分离

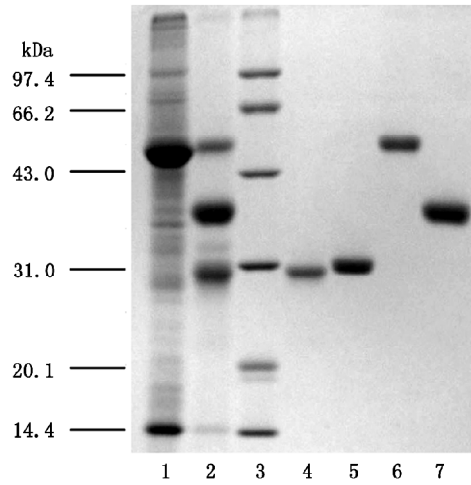


图3 菜心CBPs的SDS-PAGE图谱

1: 粗酶液(20 μg); 2: 亲和层析后酶液(10 μg); 3: 标准蛋白样品; 4: CBPa (2 μg); 5: CBPb (2 μg); 6: CBPc (2 μg); 7: CBPd (3 μg).

表1 菜心CBPs的4个组分和鸡蛋清溶菌酶的几丁质酶/溶菌酶活性比较

酶	总几丁质酶 比活性/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)	外切几丁质酶 比活性/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)	内切几丁质酶 比活性/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)	溶菌酶比活性/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)	溶菌酶比活性和总几丁质酶 比活性的比值
CBPa	222.26	77.00	145.26	59239	266.53
CBPb	442.81	120.82	321.99	137530	310.58
CBPc	318.59	117.57	201.02	0	0
CBPd	229.58	57.23	172.35	0	0
HEWL	13.90	7.56	6.34	177255	12752.16

3 菜心CBPs的分子量

一般植物中CBP的分子量都在24~40 kDa之间(Howard等1967; Glazer等1969),而且都是单体蛋白。SDS-PAGE分析CBPa和CBPb的亚基分子量分别为29.04和30.68 kDa(图4), Sephadex G-75凝胶过滤测定CBPa和CBPb全酶的分子量分别为29.04和31.2 kDa(图5),表明CBPa和CBPb都为单体酶。萝卜块根中(赖晓芳等2006)中分离到的CBP1和CBP2的分子量分别为26.9和24.8 kDa。

4 金属离子对CBPa和CBPb溶菌酶活性的影响

没有观察到EDTA对CBPa、CBPb的溶菌酶活性有影响,说明这两种酶在各自反应过程中都不需要金属离子的参与。 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Hg^{2+} 对CBPa溶菌酶活性有明显的抑制作用,而 K^{+} 对CBPa溶菌酶活性的影响不明显。 K^{+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 对CBPb溶菌酶活性有一定的抑制作用, Fe^{2+} 和 Hg^{2+} 对

CBPb溶菌酶活性有较强的抑制作用(图6)。

5 生物多糖对CBPa和CBPb的吸附分析

某些CBP结合糖具有一定的专一性,如链霉菌属*Streptomyces reticuli*分泌的CHB2只能特异地结合 α -几丁质,而对其它多糖无结合能力(Kolbe等1998)。马蹄形蟹血球中的抗微生物蛋白S2也只能特异地与几丁质结合,而不与纤维素、甘露聚糖、木聚糖及海带多糖结合(Kawabata等1996)。由图7可知,胶状几丁质、几丁质粉和脱氨再生几丁质对CBPa和CBPb都有较强的吸附能力;而壳聚糖、燕麦木聚糖和纤维素对CBPb有一定的吸附作用,但壳聚糖、燕麦木聚糖和纤维素对CBPa的吸附作用相对较弱;葡聚糖G-75和可溶性淀粉对CBPa和CBPb几乎没有吸附作用。表明两者酶分子中均存在几丁质结合结构域。

6 CBPa和CBPb蛋白糖基化的定性分析

PA染色是根据希夫试剂与糖类物质生成红色

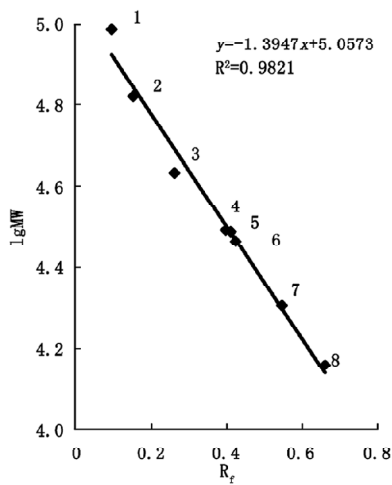


图4 SDS-PAGE分析测定的CBPa和CBPb亚基的分子量
1: 兔磷酸羧化酶B (97.4 kDa; 电泳迁移率0.09659); 2: 牛血清白蛋白(66.2 kDa; 电泳迁移率0.1534); 3: 兔肌动蛋白 (43.0 kDa; 电泳迁移率0.2614); 4: 牛碳酸酐酶(31.0 kDa; 电泳迁移率0.3977); 5: CBPb (电泳迁移率0.4091); 6: CBPa (电泳迁移率0.4261); 7: 胰蛋白酶抑制剂(20.1 kDa; 电泳迁移率0.5455); 8: 鸡蛋清溶菌酶 (14.4 kDa; 电泳迁移率0.6591)。

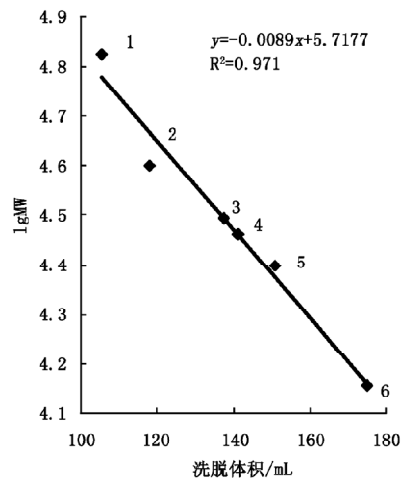


图5 Sephadex G-75凝胶过滤分析测定的CBPa和CBPb全酶的分子量

1: 牛血清白蛋白(66.2 kDa; 洗脱体积 105.5 mL); 2: 辣根过氧化物酶(40.0 kDa; 洗脱体积 118.0 mL); 3: CBPb (洗脱体积 137.5 mL); 4: CBPa (洗脱体积 141.0 mL); 5: α -胰凝乳蛋白酶 (25.0 kDa; 洗脱体积 151.0 mL); 6: 鸡蛋清溶菌酶(14.4 kDa; 洗脱体积 175.0 mL)。

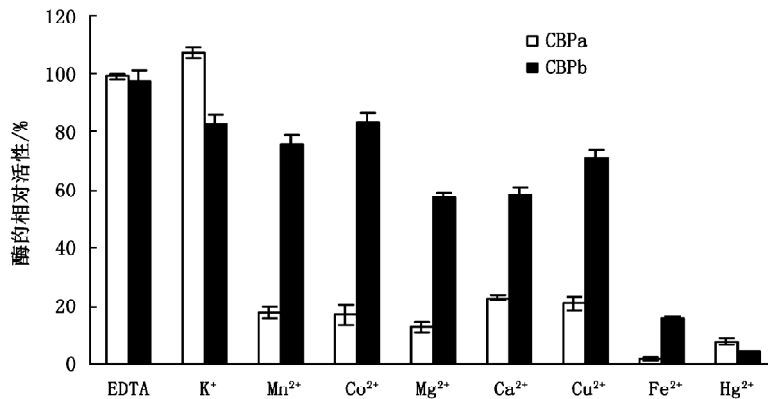


图6 不同金属离子对CBPa和CBPb溶菌酶活性的影响

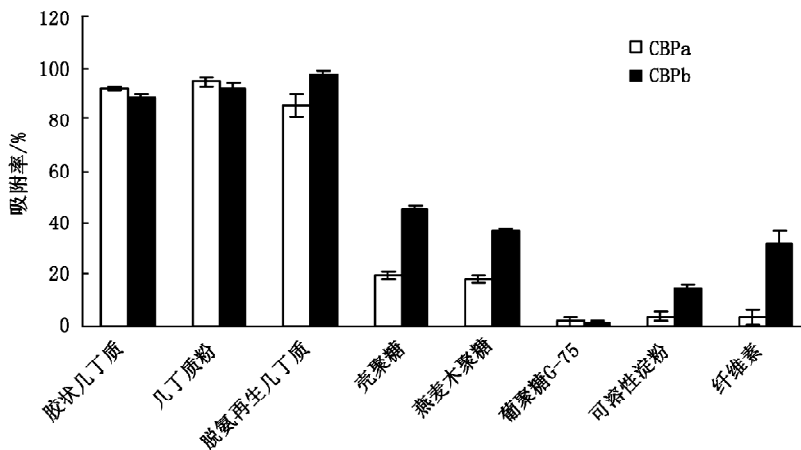


图7 生物多糖对CBPa和CBPb的吸附作用

的希夫碱的原理鉴定糖类物质的方法。PA染色法可与常规的考马斯亮蓝染色法联合应用于 SDS-PAGE 凝胶染色。通过 PA 染色后, 凝胶上的糖蛋白条带呈红色。CBPa 和 CBPb 经 SDS-PAGE 再用 PA 染色呈显阳性, CBPa 和 CBPb 对应的蛋白条带呈现出来(图 8), 说明 CBPa 和 CBPb 都为糖蛋白。迄今未见有植物中具有几丁质酶活性的几丁质结合蛋白属于糖蛋白的研究报道, 只有认为凝集素是糖蛋白的报告。

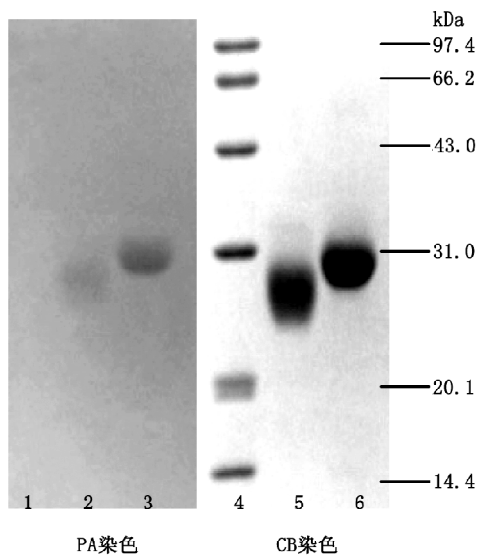


图 8 CBPa 和 CBPb 的 PA 和 PA-CB 染色法分析

1、4: 标准蛋白样品; 2、5: CBPa (4 µg); 3、6: CBPb (4 µg)。

参考文献

- 赖晓芳, 蔡发国, 王炜军, 马丽清, 钟月仙, 徐凤彩(2006). 萝卜块根中两个具溶菌酶活性的几丁质结合蛋白的纯化及其特性. 植物生理与分子生物学报, 32: 445~450
- 王炜军, 徐凤彩(1996). 脱氨再生几丁质凝胶纯化溶菌酶. 华南农业大学学报, 17: 59~63
- 周泽文, 李明启(1994). 菜心溶菌酶的提纯及酶学性质. 生物化学杂志, 10: 367~370
- Boller T, Gehri A, Mauch F, Vögeli U (1983). Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta*, 157: 22~31
- Bormann C, Baier D, Hörr I, Raps C, Berger J, Junq G, Schwarz H (1999). Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tü901 that interferes with growth polarity. *J Bacteriol*, 181 (24): 7421~7429
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method of quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem*, 72: 248~254
- Broekaert WF, Van Parijs J, Leyns F, Joos H, Peumans WJ (1989). A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, 245 (4922): 1100~1102
- Conrads-Strauch J, Maxwell Dow J, Milligan DE, Parra R, Daniels MJ (1990). Induction of hydrolytic enzymes in *Brassica campestris* in response to pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Plant Physiol*, 93: 238~243
- Czapla TH, Lang BA (1990). Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Economic Entomol*, 83 (6): 2480~2485
- Kawabata S, Nagayama R, Hirata M, Shiqenaqa T, Aqarwala KL, Saito T, Cho J, Nakajima H, Takaqi T, Iwanaqa S (1996). Tachycitin, a small granular component in *horseshoe crab henocytes*, is an antimicrobial protein with chitin-binding activity. *J Biochem*, 120 (6): 1253~1260
- Kolbe S, Fischer S, Becirevic A, Hinz P, Schremp FH (1998). The *streptomyces reticuli* α -chitin-binding protein CHB2 and its gene. *Microbiol*, 144 (5): 1291~1297
- Liu Ren-shui, Hu Huang, Qiang Yang, Liu Wang-Yi (2002). Purification of α -sarcin and an antifungal protein from mold (*Aspergillus giganteus*) by chitin affinity chromatography. *Protein Exp Purif*, 25: 50~58
- Santos IS, Da Cunha M, Machado OLT, Gomes VM (2004). A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterisation and immunolocalisation. *Plant Sci*, 167 (6): 1203~1210
- Raikhel NV, Quatrano RS (1986). Localization of wheat-germ agglutinin in developing wheat embryos and those cultured in abscisic acid. *Planta*, 168 (4): 433~440
- Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K, Tanaka H (1990). Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J Bacteriol*, 172 (7): 4017~4022
- Yang R, Tang X (1993). Tissue-specific accumulation of rice endosperm chitin-binding protein (ES-CBP) in developing seeds and its degradation in germinating seeds. *Acta Phytophysiol Sin*, 19 (2): 195~203