

黄芪中一种新的 PR-10 蛋白的纯化和性质

齐笑玮¹ 闫巧娟² 江正强¹ 邓伟¹

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学 工学院, 北京 100083)

摘要 为了进一步研究蒙古黄芪 (*Astragalus mongholicus* Bunge) 中的蛋白质及其功能, 通过金属离子螯合层析、离子交换层析和凝胶过滤得到一种新蛋白 (AmPR-10), 并对其部分性质进行了研究。AmPR-10 在 SDS-PAGE 上的分子质量为 17.2 ku, 凝胶过滤层析测得分子质量为 32.6 ku, 说明其为同源二聚体。糖蛋白染色显示为糖蛋白, 总糖含量为 13.7%, 离子交换色谱法分析其中含有 73% 阿拉伯糖、15% 葡萄糖、微量的果糖和一种未知糖; N-端序列分析结果显示其与病程相关蛋白家族 PR-10 中黄羽扇豆 L1PR10.1C 同源性高达 80%。同时, AmPR-10 具有核糖核酸酶活性, 纯 AmPR-10 的核糖核酸酶比活性为 74.11 U/mg, 这点与一些 PR-10 蛋白类似。

关键词 蒙古黄芪; 病程相关蛋白 PR-10; 纯化; 核糖核酸酶活性

中图分类号 Q 946.1

文章编号 1007-4333(2007)04-0015-04

文献标识码 A

Purification and characterization of a novel pathogenesis-related class-10 protein from *Astragalus mongholicus*

Qi Xiaowei¹, Yan Qiaojuan², Jiang Zhengqiang¹, Deng Wei¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract A novel pathogenesis-related class-10 protein (AmPR-10) from *Astragalus mongholicus* was purified and characterized. The purified protein appeared as a single band with a molecular mass of 17.2 ku on SDS-PAGE and was eluted from a Superdex-75 column with an apparent molecular weight of 32.6 ku. AmPR-10 was a glycoprotein with a neutral carbohydrate content of 13.7%. The carbohydrate was mainly composed of 73.0% arabinose and 15.0% glucose. N-terminal amino acid sequence of AmPR-10 was significantly homology to pathogenesis-related proteins from the PR-10 family. The sequence had 80% identity with L1PR10.1C, a PR-10 protein from *Lupinus luteus*. AmPR-10 had ribonuclease activity of 74.11 U/mg protein, as some other PR-10 proteins.

Key words *Astragalus mongholicus* Bunge; pathogenesis-related class10 proteins; purification; ribonuclease activity

植物在病原体侵染或外界环境压力、化学物质和植物自身激素因素促使下产生由自身编码的具有抵抗作用的蛋白即病程相关蛋白^[1]。20 世纪 70 年代发现烟草中的 4 个病程相关蛋白, 此类蛋白存在于单子叶植物和双子叶植物广大种属中。目前, 根据其相对分子质量、等电点、氨基酸序列、血清学性质和生物学功能等方面性质, 病程相关蛋白被划分为 14 个家族, PR-1 ~ PR-14^[2-3]。

PR-10 蛋白是一类分子质量 16 ~ 19 ku, 等电点

偏酸性并具有抗蛋白酶活性的蛋白^[4], 根据其没有信号肽和结构上的特性判断它们存在于胞液内。几乎所有研究的植物中都发现有 PR-10 蛋白的存在, 例如双子叶植物西芹、豌豆、大豆和马铃薯; 单子叶植物芦笋、百合和水稻^[5]。非植物中还没有发现 PR-10 蛋白的存在。许多研究表明 PR-10 蛋白不仅参与了植物的抗病机制反应, 同时在植物的自身发育中也起作用^[5]。PR-10 蛋白在结构上类似核糖核酸酶^[6], 在目前已报道的 PR-10 家族蛋白中, 发现

收稿日期: 2006-12-26

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (2063029)

作者简介: 齐笑玮, 硕士研究生; 闫巧娟, 博士, 副教授, 通讯作者, 主要从事生物质资源利用研究, E-mail: yanqj@cau.edu.cn

有体外 RNase 活性的有桦树花粉过敏原 Bet v^[7]、棉花 CaPR-10^[8]、黄羽扇豆 L1PR-10.1C^[9]、辣椒 CaPR-10^[10]和丁茄 SsPR10^[11];但是也有一些 PR-10 蛋白如土豆、西芹和苜蓿中的 PR-10 蛋白没有显示 RNase 活性。

黄芪,系豆科(Leguminosae)蝶形花亚科(Papilionoideae)黄芪属(*Astragalus* L.)膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge.)及蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus*(Fisch) Bge. var. *mongholicus*(Fisch) Hsiao)的干燥根。关于黄芪中有效成分的研究主要集中在多糖、皂甙和黄酮等成分上,黄芪中蛋白质含量很高,但对蛋白的功能性研究很少。本实验室在黄芪中纯化出一个具有抗真菌活性的凝集素基础上^[12],旨在找到新的生物活性蛋白,以期深入研究利用黄芪蛋白资源。

1 材料与方法

1.1 材料

黄芪系北京同仁堂饮片厂提供,为蒙古黄芪干燥根;琼脂糖凝胶 Agarose-4B 为上海东联医药保健品有限公司产品;离子交换层析柱 QAE Sephadex A-25,凝胶层析柱 Sephadex G-50 为瑞典 Pharmacia 公司产品。

1.2 分离纯化步骤

1.2.1 黄芪粗提液 黄芪经粉碎后,加入磷酸缓冲液(20 mmol/L, pH7.2),黄芪与提取缓冲液质量比为 1:6.4 搅拌提取 10 h。4 层纱布过滤提取物,滤液在 10 000 r/min,4℃ 条件下离心 10 min,取上清液。

1.2.2 Zn-Agarose-4B 金属螯合层析 金属螯合层析柱料为参考 Jerker 和 Birgit 的方法^[13]由实验室自制。20 g 凝胶 Agarose-4B(湿重)置入 25 mL 的 2 mol/L 氢氧化钠、12.5 mL 环氧氯丙烷和 12.5 mL 乙腈混合液中,30℃ 下 150 r/min 震荡混匀 24 h,然后用去离子水充分洗涤凝胶,再用 2 mol/L 碳酸钠平衡。平衡好的柱料滤干加至溶有 4 g 亚氨基二乙酸的 40 mL 2 mol/L 碳酸钠溶液中,60℃ 下 150 r/min 震荡混匀 24 h,用去离子水充分洗涤。活化好的柱料装柱,将 1 mg/mL 氯化锌溶液通过层析柱使层析柱饱和,用去离子水充分洗涤,制得金属离子螯合层析柱 Zn-Agarose-4B。

黄芪粗提液在磷酸缓冲液(20 mmol/L, pH7.0)中透析过夜。透析后的样品离心后过预先

用磷酸缓冲液(20 mmol/L, pH7.0)平衡好的层析柱 Zn-Agarose-4B,上样时流速为 12 mL/h,待 A₂₈₀ 0.08 后用 120 mmol/L 咪唑洗脱结合蛋白,洗脱时流速为 1 mL/min,洗至 A₂₈₀ 0.25。将未吸附峰超滤(膜孔径 10 ku, Stirred Cell Model 8050, Millipore)后用磷酸缓冲液(20 mmol/L, pH6.4)透析过夜。

1.2.3 QAE Sephadex A-25 离子交换层析 用磷酸缓冲液(20 mmol/L, pH6.4)平衡 QAE Sephadex A-25 离子柱,将透析后的样品上柱,用缓冲液洗去未结合蛋白,用 50 mmol/L NaCl 洗涤杂蛋白,再用 400 mmol/L NaCl 洗脱,自上样出峰开始收集至洗脱后 A₂₈₀ 0.04。将 400 mmol/L 洗脱峰超滤至 1 mL。

1.2.4 Sephadex G50 凝胶层析 将过离子柱后超滤好的样品上样于柠檬酸-磷酸缓冲液(10~20 mmol/L, pH6.2)平衡好的 Sephadex G50 凝胶柱,控制流速为 5 mL/h,自出峰后收集至 A₂₈₀ 0.02。

1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质的测定

SDS-PAGE 采用 125 mg/mL 分离胶,蛋白带采用考马斯亮蓝 R250 染色。

蛋白质含量测定采用 Lowry 法,以牛血清白蛋白为标准。

1.4 AmPR10 理化性质的测定

1.4.1 相对分子质量 采用凝胶过滤层析法, Superdex 75 层析柱,预先用柠檬酸-磷酸缓冲液(10~20 mmol/L, pH6.2)平衡,流速为 0.25 mL/min。所用标准蛋白为牛血清白蛋白(68.0 ku),鸡卵白蛋白(45.0 ku),胰凝乳蛋白酶原 A(25.7 ku),细胞色素 C(12.3 ku)。

1.4.2 糖蛋白染色和糖含量 糖蛋白染色采用高碘酸-Schiff (PAS)方法。

总糖含量测定采用苯酚-硫酸法,以葡萄糖为标准。

糖蛋白水解条件为:0.4 mL 蛋白质质量浓度为 3.6 mg/mL 的 AmPR-10 水溶液中加入 0.1 mL 三氟乙酸,烧接密封在安瓿管中,置于沸水浴煮沸 2 h,取出水解样品在真空干燥器中将三氟乙酸完全挥发掉后将样品溶解在 0.2 mL 二蒸水中。

糖组分分析采用离子交换色谱法(HPAEC),将水解样品 10 μL 上样于色谱仪(Dionex BioLC system Model 2500, USA),固定相为 PA10 色谱柱

(Dionex Corp.), 流动相为 0.05 mmol/L NaOH, 流速为 1.0 mL/min。

1.4.3 N-端序列测定 纯蛋白进行 SDS-PAGE 后转移到醋酸纤维膜上, 委托北京大学生命科学院采用 Edman 降解法, PROCISE 氨基酸测序仪 (Applied Biosystem, USA) 测定其 N-末端氨基酸序列。

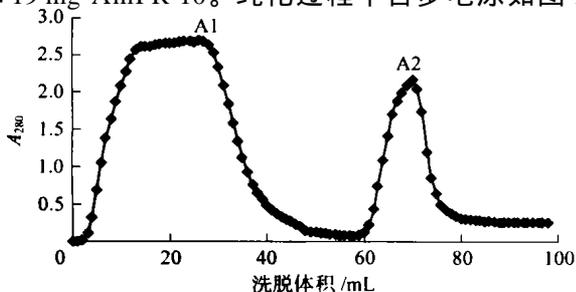
1.5 核糖核酸酶活性的测定

以酵母 tRNA 为底物参照周向军等人的方法^[8], 200 μg tRNA 溶于 400 μL MES 缓冲液 (100 mmol/L, pH 6.0), 加入 100 μL 样品在 56 °C 保温 30 min 后加入预冷的 4 mol/L LiCl 1 mL, 在冰水浴放置 3 h 后 10 000 r/min 冷冻离心 20 min, 取上清液 1 mL 加入二蒸水 2 mL 测定 A_{260} 。酶活定义为在反应条件下 30 min 后使 A_{260} (光径 1 cm) 增加 1 个单位所需要的酶量为 1 个酶活性单位, U。

2 结果分析

2.1 AmPR-10 的分离纯化

10 g 黄芪粗提液透析后离心上柱 Zr-Agarose-4B 收集未结合与洗脱蛋白 (图 1), 未结合蛋白峰 A1 和 120 mmol/L 咪唑洗脱峰 A2 的最高值处样品核糖核酸酶比活性分别为 12.57 U/mg 和 1.88 U/mg, SDS-PAGE 显示 AmPR-10 在未结合蛋白峰流出。收集峰 A1 样品处理后上离子柱 QAE Sphadex A-25 检测 (层析曲线图未列出), Q4 峰值处有最高酶比活性为 41.18 U/mg, SDS-PAGE 显示 AmPR-10 主要集中在 Q3 和 Q4 处。收集 Q3 和 Q4 处样品, 超滤上柱 Sphadex G50 (层析曲线图未列出), G1 峰值处核糖核酸酶比活性为 7.78 U/mg, G2 峰值处为 74.11 U/mg, SDS-PAGE 显示 G2 处 AmPR-10 达到电泳纯。10 g 黄芪经分离纯化得到 4.19 mg AmPR-10。纯化过程中各步电泳如图 2,

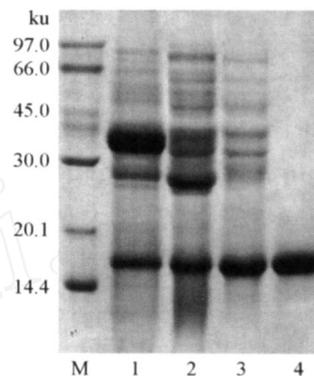


A1: 未整合蛋白峰; A2: 120 mmol/L 咪唑洗脱蛋白峰

图 1 黄芪粗提液金属离子螯合柱 Zr-Agarose-4B 层析

Fig. 1 Chromatography of AmPR-10 on Zr-Agarose-4B column

SDS-PAGE 测定其分子质量为 17.2 ku。



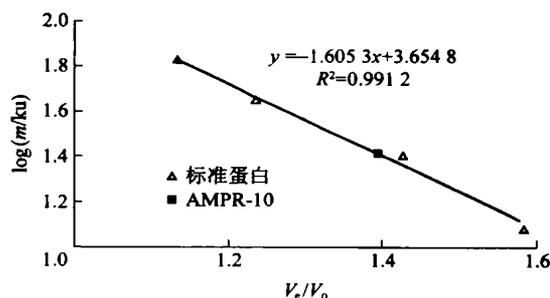
M: 标准蛋白; 1. 粗提液; 2. Agarose-Zn 金属离子螯合层析; 3. QAE Sphadex A-25 离子层析; 4. Sphadex G50 凝胶过滤层析; 5. AmPR-10 糖蛋白染色

图 2 纯化 AmPR-10 各步的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of the purification steps of AmPR-10

2.2 AmPR-10 的理化性质

2.2.1 相对分子质量的测定 电泳纯 AmPR-10 在 Superdex 75 凝胶层析柱上显示单一峰, 计算其 $V_e/V_0 = 1.39$ 如图 3, 求出其相对分子质量为 32.6 ku, 由于在 SDS-PAGE 上考马斯亮蓝 R250 染色显示其为单一蛋白带, 相对分子质量为 17.2 ku, 因此 AmPR-10 是由 17.2 ku 的亚基组成的同源二聚体。



V_e , 标准蛋白洗脱体积; V_0 , 蓝色葡聚糖 2000 洗脱体积

图 3 凝胶过滤层析 Superdex 75 测 AmPR-10 的分子质量

Fig. 3 Molecular mass estimation of AmPR-10 by gel filtration on Superdex 75

2.2.2 糖蛋白染色和糖组分分析 经高碘酸-Schiff 染色法证明, AmPR-10 为糖蛋白 (图 2)。苯酚-硫酸法测定其总糖含量为每 1 mg 蛋白中含糖量为 0.137 mg。离子交换色谱法分析糖组分, 其中阿拉伯糖 73.0% (质量分数), 葡萄糖 15.0% (质量分数), 其余为微量的果糖和一种未知糖。

2.2.3 N-端氨基酸序列 Edman 降解法测出纯蛋白的 N-端 15 个氨基酸序列为 GVISFNEETIST-VAP, 将其与数据库中其他 PR-10 蛋白的 N-端 15 个氨基酸序列对比表明 AmPR-10 为一种新的 PR-

10 蛋白,与黄羽扇豆 L1PR-10.1C 同源性最高为 80%。

3 讨论和结论

1) 本实验建立了一种高效的纯化方法,经过三步分离纯化从 10 g 黄芪中得到 4.19 mg AmPR-10 蛋白。N-端氨基酸序列分析显示 AmPR-10 为病程相关蛋白第 10 家族的新成员,与黄羽扇豆 L1PR-10.1C 同源性高达 80%。这是首次从黄芪属 (*Astragalus* L.) 分离纯化出 PR-10 蛋白。与其他大多数 PR-10 蛋白不同的是 AmPR-10 是含有 2 个 17.2 ku 亚基的二聚体,目前发现的 PR-10 蛋白只有 SPE16 被确定为具有相同大小的亚基 16 ku 的二聚体^[4]。桦树花粉过敏原 Bet v 被报道可能是单体或者是二聚体^[7],这种二聚体形式是否与其生物活性有关也待进一步验证。高碘酸-Schiff 法糖蛋白染色显示 AmPR-10 已被糖基化,总糖含量在 13.7% (质量分数),含有以阿拉伯糖为主的 4 种单糖。有关 PR-10 蛋白的糖基化未见报道。这种糖基化修饰也可能与 AmPR-10 的生物活性有关,但是具体关系有待进一步研究。

2) 有关 PR-10 蛋白的生物活性一直以来主要在核糖核酸酶活性、抗蛋白酶活性和抗菌活性方面有报道^[4]。大多数 PR-10 蛋白与核糖核酸酶具有很高的序列同源性,并且有一些 PR-10 蛋白家族成员已被验证具有体外核糖核酸酶活性,但大多都是采用凝胶电泳检测的方法。本实验对 AmPR-10 的核糖核酸酶活性进行了定量测定。纯化后的 AmPR-10 核糖核酸酶比活性在 74.11 U/mg。

总之,本研究从蒙古黄芪中分离纯化出一种 PR-10 的新成员 AmPR-10,该蛋白为糖基化的同源二聚体,还具有核糖核酸酶活性,为深入研究该蛋白的结构和功能提供依据,并且可能在植物基因育种方面有潜在应用。

参 考 文 献

- [1] 王勇刚. 植物诱导抗病与病程相关蛋白[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, 28(2): 177-182
- [2] Van Loon L C, Pierpoint W S, Boller T, et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins [J]. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12: 245-264
- [3] Van Loon L C, Van Strien E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1999, 55: 85-97
- [4] Warner S A J, Gill A, Draper J. The developmental expression of the asparagus intracellular PR protein (AoPR) gene correlates with sites of phenylpropanoid biosynthesis [J]. Plant J, 1994, 6: 31-43
- [5] Walter M H, Liu J W, Wunn J, et al. Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (YPR-10) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous stimulus-dependent expression [J]. Eur J Biochem, 1996, 239: 281-293
- [6] Moiseyev G P, Fedoreyeva L I, Zhuravlev Y N, et al. Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins [J]. FEBS Lett, 1997, 407: 207-210
- [7] Bufe A, Spangfort M D, Kahlert H, et al. The major birch pollen Bet v 1 shows ribonuclease activity [J]. Planta, 1996, 199: 413-415
- [8] Zhou Xiangjun, Lu Shun, Xu Yanhua, et al. A cotton cDNA (*GaPR-10*) encoding a pathogenesis-related 10 protein with in vitro ribonuclease activity [J]. Plant Sci, 2005, 162: 629-636
- [9] Biesiadka J, Bujacz G, Sikorski M M, et al. Crystal structures of two homologous pathogenesis-related proteins from yellow lupine [J]. Mol Biol, 2002, 319: 1223-1234
- [10] Park C J, Kim K J, Shin R, et al. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway [J]. Plant J, 2004, 37: 186-198
- [11] Liu Xiaojun, Huang B B, Lin Juan, et al. A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress- and pathogen-inducible [J]. Plant Physiol, 2006, 163: 546-556
- [12] Yan Qiaojuan, Jiang Zhengqiang, Yang Shaoqing, et al. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity [J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 442: 72-81
- [13] Jerker P, Birgit O. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions [J]. Biochemistry, 1983, 22: 1621-1630
- [14] Wu Fang, Li Yikun, Chang Shaojie, et al. Purification, characterization and preliminary crystallographic studies of a PR-10 protein from *Pachyrrhizus erosus* seeds [J]. Acta Cryst, 2002, D58: 2165-2167