

## 苦瓜籽中抗真菌蛋白 MAP13 的分离纯化与表征

陈 贝, 时祥柱, 汪少芸, 叶秀云, 饶平凡

(福州大学生物工程研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 将苦瓜籽粗提液分别经阴离子色谱柱、阳离子色谱柱交换后, 得到一个具有抗真菌活性的蛋白 MAP13。该蛋白经鉴定达到电泳纯, 相对分子量为 12.7 kDa。经还原剂处理后, 电泳结果表明该蛋白由分子量分别为 7 和 6 kDa 的两个亚基组成, 亚基之间通过二硫键连接。体外抑菌实验表明该蛋白对苹果轮纹病菌、瓜果腐霉病菌和棉花枯萎病菌具有较强的抑制作用。

关键词: 苦瓜籽; 纯化; 抗真菌活性

中图分类号: TQ465.6

文献标识码: A

### Isolation and characterization of the antifungal protein from bitter melon seeds

CHEN Bei, SHI Xiang-zhu, WANG Shao-yun, YE Xiun-yun, RAO Ping-fan

(Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract** An antifungal protein was isolated from bitter melon seeds by extraction with PBS buffer, an ion exchange chromatography column (DEAE-650C) and cation exchange chromatography column (CM-650C). It was identified to be homogeneous by SDS-PAGE, and the relative molecular weight was estimated to be about 12.7 kDa. It was composed of two subunits linked by a disulfide bond, whose molecular weights were 6 and 7 kDa, respectively. It showed antifungal activity against *Physalospora piricola*, *Fusarium oxysporum* and *Pythium aphanidematum*.

**Keywords** bitter melon seeds; isolation; antifungal activity

近年来的研究发现, 从苦瓜种子中提取的各种蛋白质具有抑制真核细胞核糖体的蛋白质合成、抗肿瘤、抗艾滋病等活性<sup>[1, 2]</sup>。但对苦瓜籽中的有效活性成分目前还不完全清楚, 在小分子蛋白及多肽方面的研究比较少。1999 年美籍华裔生物学家罕娜宣布从药用苦瓜种子中提取了“降糖多肽蛋白”。2002 年傅明辉等<sup>[3]</sup>从苦瓜籽中分离出分子量小于 10 kDa 的核糖体失活蛋白具有一定的抗氧化活性。2003 年 Manasi Telang 等<sup>[4]</sup>从苦瓜籽中提取得到抑制棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 和斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 生长的蛋白酶抑制剂, 其中 BGPI-1 和 BGPI-2 是分子量分别为 3.5 和 3.0 kDa 的短肽。本研究采用离子交换色谱法, 从苦瓜籽粗提液中纯化出一种具有抗真菌活性的小分子蛋白 MAP13, 并对其部分生物活性进行了表征。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

苦瓜籽 (奚光增教授惠赠), 真菌 (香港中文大学及福建农林大学惠赠), 灌注色谱工作站 (BioCAD 700E, PE 公司), DEAE-650C 柱 (1.5 cm × 20 cm, 日本 TOSOH 公司), CM-650M 柱 (1.5 cm × 6.8 cm, 日本 TOSOH 公司), 高速冷冻离心机 (Beckman 公司), 冷冻干燥机 (ALPHA 1-2 LD)。所用试剂均为分析纯。

收稿日期: 2005-12-09

作者简介: 陈 贝 (1977-), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 叶秀云, 教授。

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (C0310008)

### 1.2 方法

苦瓜籽粗提取液制备: 参考王宾香等<sup>[5]</sup>的方法, 稍作修改. 150 g 去壳苦瓜籽磨碎后, 加入 300 mL 2 mmol/L pH 7.2 (含 0.15 mol/L NaCl) PBS 缓冲液, 于 4 °C 搅拌浸提 4 h 后, 经 4 层纱布过滤后再于 4 °C 离心 ( $1 \times 10^4$  r/min, 10 min) 2 次, 取上清液即为粗提液.

小分子蛋白的分离纯化: 将粗提液经 DEAE-650C 柱, 收集穿透峰, 经 CM-650M 柱重新吸附后, 用 2 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.2), 0~60 mmol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱. 过 DEAE-650C 柱时流速为 1.0 mL/min, 过 CM-650M 柱时流速为 2.0 mL/min.

垂直板状十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 参考 Laemmli 方法<sup>[6]</sup>, 浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 12.5%.

Tricine-SDS-PAGE: 参考王旭等<sup>[7]</sup>的方法, 浓缩胶浓度为 4% (质量浓度, 下同), 中间胶浓度为 10%, 分离胶浓度为 16.5%.

蛋白质浓度测定: 采用福林酚法测定<sup>[8]</sup>.

抗真菌活性鉴定<sup>[9]</sup>: 将该蛋白冷冻干燥后用 2 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.2) 配制成 2.4 g/L 的样品液待用. 采用菌丝生长抑制法检测样品抗真菌活性. 将真菌接种于  $\phi$  9 cm 的 PDA (马铃薯葡萄糖琼脂培养基) 平板中央, 28 °C 培养 2~3 h, 在菌苔周围距离菌苔边缘 0.5 cm 处放置 3 个已灭菌牛津杯, 杯内注入样品液 (2.4 g/L) 各 0.100 和 0.200 mL, 再补充无菌 2 mmol/L 的 PBS 缓冲液至 0.200 mL, 继续培养 1~2 h, 观察抑菌情况, 以仅添加 PBS 缓冲液为阴性对照. 所用真菌包括苹果轮纹病菌 (*Phytophthora piricola*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、瓜果腐霉病菌 (*Pythium aphanidematum*)、菜豆根腐病菌 (*Fusarium solani*) 和花生褐斑病菌 (*Mycosphaerella arachidicola*).

## 2 结果与讨论

### 2.1 抗真菌蛋白 MAP13 的分离与纯化

苦瓜籽粗提取液稀释后上样到 DEAE-650C 阴离子交换柱上, 在 2 mmol/L PBS (pH 7.2) 缓冲体系中用 0~1 mol/L NaCl 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 280 nm 检测, 得到 1 个穿透峰和 2 个洗脱峰, 穿透峰 D 具有抗真菌的活性.

将收集到的穿透峰 D 上 CM-650M 柱. 用 0~60 mmol/L NaCl 梯度洗脱, 所用缓冲液为 2 mmol/L 的 PBS (pH 7.2). 图 1 为经 CM-650M 柱的色谱图. 其中峰 1 具有抗真菌活性. 收集峰 1 后用重蒸水进行透析, 冻干后得到 14.2 mg 的终蛋白.

### 2.2 抗菌蛋白的纯度鉴定及分子量测定

活性峰峰 1 经 SDS-PAGE 电泳检验, 为一条带, 说明其已达到电泳纯 (见图 2).

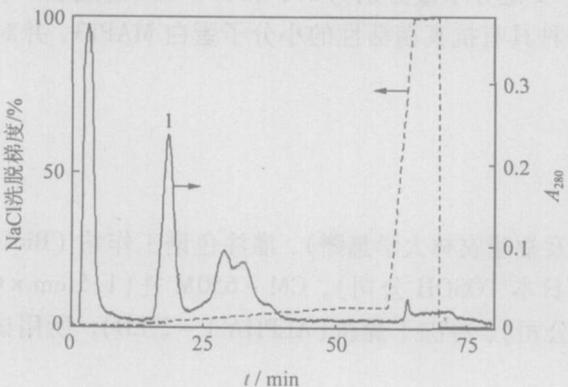


图 1 苦瓜籽粗提液在 CM-650M 柱上的色谱图

Fig. 1 Fractionation of the crude extract of bitter melon seeds on a CM-650M column

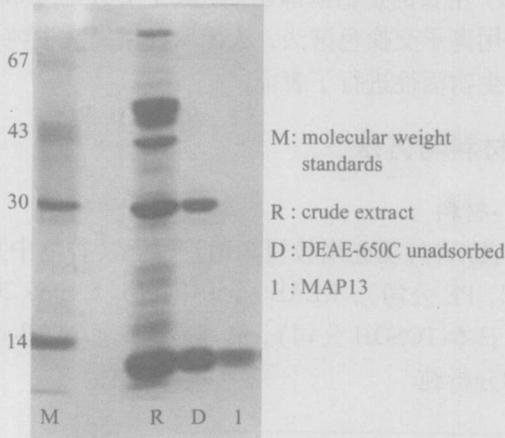


图 2 MAP13 的 SDS-PAGE 图 (单位: kDa)

Fig. 2 SDS-PAGE of MAP13 (unit: kDa)

由图 2 可知, MAP13 蛋白的分子量低于 14 kDa。为了较准确测定其分子量, 采用 Tricine-SDS-PAGE (图 3)。样品分 2 组, 分别为添加还原剂 DTT (二硫苏糖醇) 和不添加 DTT。在电泳胶上测量标准蛋白和染料 (前沿) 移动距离, 计算出迁移率, 以相对分子质量的对数对迁移率作图, 绘制出标准蛋白的标定曲线 (图 4)。结果显示该蛋白的分子量为 12.7 kDa。添加 DTT 后, 该蛋白的二硫键断裂, 拆分为 2 个分子量不同的亚基, 分别为 7 和 6 kDa。

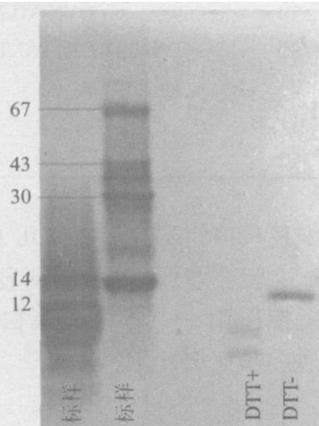


图 3 Tricine-SDS-PAGE 图 (单位: kDa)

Fig. 3 The result of Tricine-SDS-PAGE (unit: kDa)

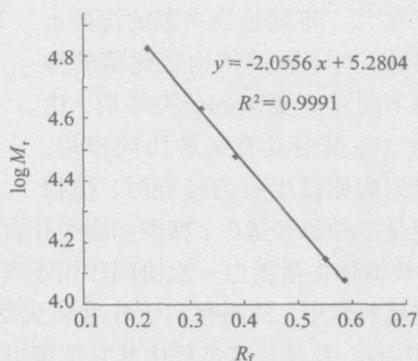


图 4 Tricine-SDS-PAGE 电泳确定分子量

Fig. 4 Molecular weight determined by Tricine-SDS-PAGE

### 2.3 抗真菌活性

实验以苹果轮纹病菌 (*Physalospora piricola*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、瓜果腐霉病菌 (*Pythium aphanidematum*)、菜豆根腐病菌 (*Fusarium solani*) 和花生褐斑病菌 (*Mycosphaerella arachidicola*) 为研究对象, 研究了该蛋白的抗真菌活性。结果表明该蛋白对苹果轮纹病菌、瓜果腐霉病菌和棉花枯萎病菌有较强的抑制活性 (图 5), 对菜豆根腐病菌和花生褐斑病菌的抑制活性不明显。这一结果说明该抗菌蛋白可能作为植物天然的防御蛋白, 在防止植物受一些致病菌侵染上起到一定的作用。

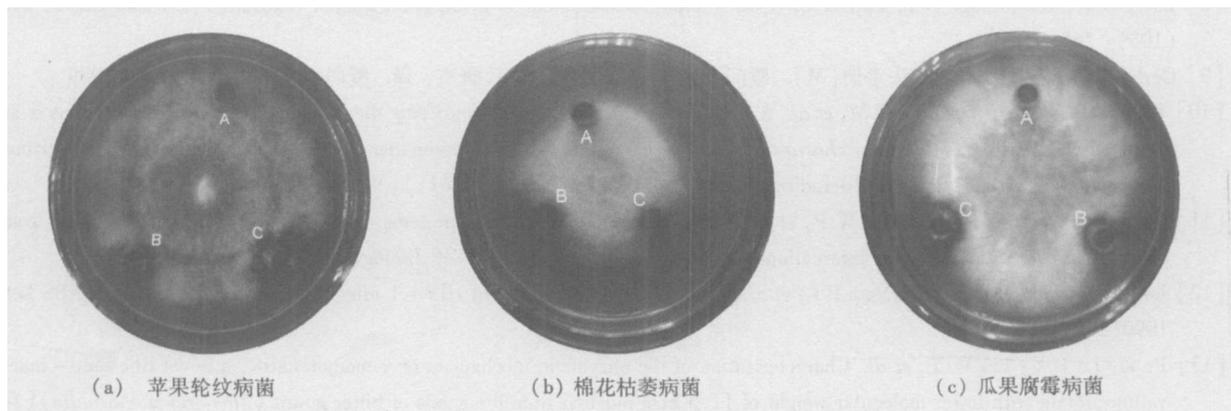


图 5 苦瓜籽抗真菌蛋白的抑菌活性

Fig. 5 Inhibitory activity of the antifungal protein from bitter melon seeds

### 2.4 讨论

蛋白 MAP13 对苹果轮纹病菌 (*Physalospora piricola*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、瓜果腐霉病菌 (*Pythium aphanidematum*) 的生长表现出明显的抑制效果。已知苦瓜籽中的  $\alpha$ -MMC、 $\beta$ -MMC 与 MAP30 均具有抗菌活性<sup>[5, 14]</sup>。本实验纯化得到的 MAP13 有助于更加全面、系统地研究苦瓜籽中活

性蛋白(表 1)之间的相互关系及协同作用机理.

研究表明,不同类型的具抗菌作用的物质如过氧化氢酶、裂解酶、次生代谢物质以及抗菌蛋白和抗菌肽等在植物中广泛存在<sup>[15]</sup>.不同植物来源的抗菌蛋白和抗菌肽,对不同的植物致病菌的抑制效果也不同<sup>[16]</sup>.更多的研究表明,植物体内的抗菌蛋白具有某种协同作用,当植物受到病原微生物的侵染时,植物

免疫反应是多种酶和蛋白、糖类和脂类化合物协同作用的结果.如某些植物防御蛋白如几丁质酶、葡聚糖酶,与核糖体失活蛋白一起协同作用于真菌时,其抑制真菌的能力就会增加,因为前两种酶具有破坏真菌细胞壁的作用,从而有利于核糖体失活蛋白进入真菌细胞发挥作用<sup>[17]</sup>.小分子蛋白的抗真菌机理、生化特性,及其与苦瓜籽中其它抗菌组分的协同作用还有待进一步研究.

表 1 苦瓜籽中的活性蛋白组

Tab 1 Active proteome from bitter melon seeds

活性蛋白	$M_r$ /kDa	N-端氨基酸序列
$\alpha$ -momorcharin <sup>[10]</sup>	29	DVSFRLSGA DPR SYGMFKD
$\beta$ -momorcharin <sup>[10]</sup>	29	DVNFDLSTATAKTYTKFIED
$\delta$ -momorcharin <sup>[11]</sup>	30	DVNFGLA
MAP30 <sup>[12]</sup>	30	DVNFDLSTATAKTTTKFIED
$\epsilon$ -momorcharin <sup>[11]</sup>	24	
$\gamma$ -momorcharin <sup>[13]</sup>	11.5	
MAP13	12.7	

参考文献:

[1] 叶国杰, 钱瑞卿, 卢保元, 等. 苦瓜籽蛋白的分离纯化及其性质研究 [J]. 化学学报, 1998(56): 1135-1144

[2] 孟延发, 孟雪琴, 张雪梅, 等. 苦瓜籽核糖体失活蛋白的基本性质研究 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2000, 36(4): 80-86

[3] 傅明辉, 田洁. 苦瓜籽核糖体失活蛋白的分离纯化及抗氧化活性的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(3): 134-136

[4] Telang M, Srinivasan A, Patankar A, et al. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* [J]. Phytochemistry, 2003(63): 643-652

[5] 王宾香, 时祥柱, 郭春腾, 等. 阴阳离子交换色谱串联分离纯化苦瓜籽核糖体失活蛋白 [J]. 色谱, 2004, 22(5): 543-546

[6] Laemmli U K, Favre M. Gel electrophoresis of proteins [J]. J Mol Biol, 1973(80): 575-599

[7] 王旭, 何冰芳, 李霜, 等. Tricine-SDS-PAGE 电泳分析小分子多肽 [J]. 南京工业大学学报, 2003, 25(2): 79-81

[8] Loery O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent [J]. J Biol Chem, 1951(193): 265-275

[9] Gerhardt P. 普通细菌学方法手册 [M]. 厦门大学生物系微生物学教研室, 译. 厦门: 厦门大学出版社, 1989

[10] Fong W P, Poon Y T, Wong T M, et al. A highly efficient procedure for purifying the ribosome-inactivating proteins  $\alpha$ - and  $\beta$ -momorcharins from *Momordica charantia* seeds: *n*-terminal sequence comparison and establishment of their *n*-glycosidase activity [J]. Life Sciences Including Pharmacology Letters, 1996, 59(11): 901-909

[11] Tse-Paul M F, Ng T B, Fong W P, et al. New ribosome-inactivating proteins from seeds and fruits of the bitter gourd *Momordica charantia* [J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 1999(31): 895-901

[12] Lee-Huang S, Huang P L, Nara P L, et al. MAP30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication [J]. FEBS Lett, 1990(272): 12-18

[13] Pu Z, Lu B Y, Liu W Y, et al. Characterization of the enzymatic mechanism of  $\gamma$ -momorcharin: a novel ribosome-inactivating protein with low molecular weight of 11.5 kDa purified from the seeds of bitter gourd (*Momordica charantia*) [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996(229): 287-294

[14] Lee H, Huang S, Paul L, et al. Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon [J]. Gene, 1995, 161(2): 151-156

[15] 王琼, 何清君. 植物抗菌肽研究进展 [J]. 四川师范学院学报: 自然科学版, 2000, 21(2): 141-145

[16] Ng T B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins [J]. Peptides, 2004(25): 1215-1222

[17] 王莉江, 安成才, 陈章良. 核糖体失活蛋白在植物中的作用 [J]. 生物技术通报, 2000(2): 1-4