

京水菜种子SU1抗菌蛋白的纯化、稳定性和抑菌机制

袁素素 秦武洒 叶秀娟*

(福建农林大学植物保护学院, 福州 350002)

摘要: 为拓展抗菌蛋白在新型生物农药上的潜在应用价值,通过SP-Sepharose阳离子交换层析、Mone S阳离子交换层析和Superdex 75凝胶过滤层析从京水菜 *Brassica juncea* var. *multisecta* 种子中纯化得到一种分子量约为30 kD的SU1抗菌蛋白,采用纸片扩散法测定该抗菌蛋白的稳定性和抑菌活性,并采用荧光染色法分析其抗菌机制。结果表明,在pH为1~3和11~13条件下,SU1抗菌蛋白抑菌活性不受影响;40~80℃热处理和100 mmol/L Mn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 和 Cr^{3+} 离子处理后,该抗菌蛋白仍具有抑菌活性,而100 mmol/L Ca^{2+} 离子处理后该抑菌蛋白的抑菌活性消失。此外,乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)溶液处理后SU1抗菌蛋白的抑菌活性消失,再次加入 Cr^{3+} 离子时,其抑菌活性恢复。SU1抗菌蛋白能抑制7种植物病原真菌的生长,可破坏尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 菌丝细胞膜透性和细胞核的完整性,并引起线粒体膜电势增加和菌丝细胞脱氧核糖核酸的分解。

关键词: 京水菜种子; 抗菌蛋白; 纯化; 稳定性; 抑菌机制

Purification, stability and antifungal mechanism of antifungal protein SU1 from *Brassica juncea* var. *multisecta* seeds

Yuan Susu Qin Wusa Ye Xiujuan*

(College of Plant Protection, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China)

Abstract: In order to increase the potential application value of antifungal proteins as new bio-pesticides, a 30-kD antifungal protein SU1 was purified from *Brassica juncea* var. *multisecta* seeds with cation exchange chromatography on SP-Sepharose, cation exchange chromatography on Mono S and gel filtration chromatography on Superdex 75 in this study. The stability and antifungal activity were measured by using filter paper method and antifungal mechanism of the protein SU1 was studied by using fluorescent staining method. The results showed that the antifungal activity of protein SU1 was fully preserved in the pH range of 1–3 and 11–13, temperature range of 40–80℃, and 100 mmol/L Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} and Cr^{3+} ions. In contrast, the antifungal activity of protein SU1 disappeared following exposure to 100 mmol/L Ca^{2+} ions. In addition, its antifungal activity disappeared after treatment with ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) solution, and its antifungal activity was re-instituted following exposure to Cr^{3+} ions again. The antifungal protein SU1 inhibited the growth of seven species of phytopathogenic fungi, permeabilized fungal membrane and disrupted nuclear integrity, disrupted fungal mitochondrial transmembrane potential and upregulated deoxyribonucleic acid (DNA) degradation in *Fusarium oxysporum* hyphae.

Key words: *Brassica juncea* var. *multisecta*; antifungal protein; purification; stability; antifungal mechanism

基金项目: 福建省农业高校产学研合作项目(2018N5005)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xiujuanye2004@gmail.com

收稿日期: 2018-08-20

植物病原真菌会侵染农作物,引起病害发生,直接影响农业的健康发展。尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 在各地广泛分布,可引起植物枯萎病,是世界性的土传真菌病害(起登凤等,2017)。植物真菌病害主要通过化学杀菌剂防治,但伴随着化学农药的长期使用,病原菌的抗药性、食品安全和环境污染等问题越来越严重(赵杨等,2014),迫使人们寻求其替代物。从天然植物中提取抗性物质,将其开发为新型生物农药成为一种新途径(刘晓漫等,2018)。

抗菌蛋白是生物天然免疫防御系统的重要组成部分,能抑制植物病原真菌的生长,具有抗菌谱广、不易引起抗药性、杀菌快和无蓄积毒性等优点,在生物农药的开发上具有巨大的应用潜力(Yan et al., 2015)。目前,已经在植物(Chan & Ng, 2013)、动物(费威等, 2015)、细菌(朱永明等, 2018)和真菌(Wang & Ng, 2004)中发现抗菌蛋白,特别是十字花科植物的地下块茎(Gozia et al., 1993)、叶片(Lam et al., 2000)、茎和根(Huang et al., 2000)、果实(Wang & Ng, 2002)、地下鳞茎(Chu & Ng, 2004)、种子(袁素素等, 2018)中均含有抗菌蛋白。抗菌蛋白可明显抑制病原真菌的侵染,如将巨大曲霉 *Aspergillus giganteus* 抗菌蛋白与灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 孢子混合后接种到天竺叶片,其明显抑制叶片病害的发生(Moreno et al., 2003);将来自地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* 的抗菌蛋白喷洒到黄瓜叶片,可抑制黄瓜疫霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis* 的侵染(Wang et al., 2014)。抗菌蛋白虽然对植物病害有较好的防治效果,但抗菌蛋白来源仍然是限制其应用的主要因素之一,寻找优质抗菌蛋白是促进新型生物农药发展不可或缺的前提和基础。

京水菜 *Brassica juncea* var. *multisepta* 是十字花科芸薹属白菜亚种的新品种,国内外对京水菜的研究主要集中于植株的生长、品质、产量(曹毅等, 2009;周荣等, 2010)和栽培技术(张晓霞等, 2015),而关于其种子抗菌蛋白的报道较少。前期筛选试验发现京水菜种子中具有抗菌蛋白活性组分,是很好的抗菌蛋白供体,本研究运用柱层析纯化技术获取抗菌蛋白,采用纸片扩散法测定该抗菌蛋白的稳定性和抑菌活性,采用荧光染色法分析其抗菌机制,以期为该抗菌蛋白研发为新型生物农药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原真菌和植物:芭乐炭疽病菌 *Colletotri-*

chum gloeosporioides、稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌 *F. solanif*、烟草炭疽病菌 *C. micotianae* 和小白菜炭疽病菌 *C. higginsianum* 均由福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室提供。京水菜种子购于武汉青禾农业生态开发有限公司。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 000 mL;马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)液体培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL。

试剂及仪器:SP-Sepharose 阳离子填料、Mone S 预装柱、Superdex 75 预装柱,美国 GE 公司;SYTOX Green 荧光绿,美国 Cambrex 公司;罗丹明 123 (rhodamine 123, Rh-123),美国 Sigma 公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI)染料,北京索莱宝科技有限公司;全基因组提取试剂盒,日本 TaKaRa 公司;其它试剂均为国产分析纯。分子截留量为 3 500 D 的透析袋,美国光谱医学公司;AKTA purifier 蛋白纯化系统,美国 GE 公司;Nikon A1 激光共聚焦电子显微镜,日本 Nikon 公司;Centrifuge 5860R 高速冷冻离心机, Eppendorf 中国有限公司;DYY-6 电泳仪,北京六一仪器厂;WP-UP-LH-20 超纯水机,四川沃特尔水处理设备有限公司;LCJ-18S 冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;SPH-200F 恒温培养摇床,上海世平实验仪器有限公司;DW-25L262 医用低温保存箱,青岛海尔特种电器有限公司;LDZM 立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;UV-1600 紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 京水菜种子 SU1 抗菌蛋白的纯化

称取 150 g 京水菜种子,加入 10 mmol/L NH_4OAc (pH 4.5)缓冲液 1 L,置于 4℃ 冰箱 12 h,用豆浆机磨成匀浆,于 8 000 r/min 下离心 20 min,取上清液备用,依次采用 SP-Sepharose 阳离子交换层析、Mone S 强阳离子交换层析和 Superdex 75 凝胶过滤层析进行纯化。

SP-Sepharose 阳离子交换层析:配制 10 mmol/L NH_4OAc (pH 4.5)缓冲液,将 SP-Sepharose 阳离子交换层析柱清洗,并用缓冲液平衡。将上清液缓慢上样于 SP-Sepharose 阳离子交换层析柱中,上样结束后,继续用 10 mmol/L NH_4OAc (pH 4.5)缓冲液洗脱不吸附蛋白,至吸光值 $\text{OD}_{280\text{ nm}}=0$ 时,不吸附蛋白完

全洗脱干净为止,得到不吸附蛋白组分P0,依次分别用含0.2、0.5和1.0 mol/L NaCl的10 mmol/L NH_4OAc (pH 4.5)缓冲液对吸附蛋白进行洗脱,检测波长为280 nm的吸光值,分别得到吸附蛋白组分P1、P2和P3。以尖孢镰刀菌为指示菌,并参照Ye et al.(2011)纸片扩散法分别检测蛋白组分P0、P1、P2和P3的抑菌活性,并收集活性组分,用蒸馏水透析后冷冻干燥。

Mone S强阳离子交换层析:运用AKTA purifier蛋白纯化系统,配制10 mmol/L NH_4OAc (pH 4.5)缓冲液,预先清洗并平衡Mone S强阳离子交换层析柱,柱子流速为1 mL/min。用10 mmol/L NH_4OAc (pH 4.5)缓冲液溶解活性蛋白干粉后上样,每次上样量小于50 mg/mL,上样结束后,继续用缓冲液洗脱至吸光值 $\text{OD}_{280\text{ nm}}=0$,得到不吸附蛋白组分S0,依次用含0~0.3、0.3和0.3~1.0 mol/L NaCl的10 mmol/L NH_4OAc (pH 4.5)缓冲液进行线性盐梯度洗脱,得到吸附蛋白组分S1和S2。以尖孢镰刀菌为指示菌,分别检测蛋白组分S0、S1和S2的抑菌活性,收集活性组分,透析并冷冻干燥。

Superdex 75凝胶过滤层析:运用AKTA purifier蛋白纯化系统,配制10 mmol/L NH_4HCO_3 (pH 9.2)缓冲液,预先清洗并平衡Superdex 75凝胶过滤层析柱,柱子流速为0.5 mL/min。将活性蛋白干粉溶解于10 mmol/L NH_4HCO_3 (pH 9.2)缓冲液中,每次上样量小于5 mg/mL,上样结束后,继续用10 mmol/L NH_4HCO_3 (pH 9.2)缓冲液洗脱,测波长为280 nm处的吸光值,得到蛋白组分SU1、SU2和SU3。以尖孢镰刀菌为指示菌,分别检测蛋白组分SU1、SU2和SU3的抑菌活性,收集活性组分,透析后冷冻干燥,最终得到目的蛋白SU1抗菌蛋白。

1.2.2 京水菜种子SU1抗菌蛋白分子量的测定

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法测定京水菜种子SU1抗菌蛋白的分子量(袁素素等,2018)。配制15%分离胶和4%浓缩胶,加入标准蛋白marker和适量京水菜种子SU1抗菌蛋白样品,开始用30 V恒压电泳,待SU1抗菌蛋白样品进入分离胶后,将电压调至80 V,直至蛋白样品距离凝胶底部约1 cm时关闭电源,取出凝胶,考马斯亮蓝染液中染色3 h,在含有10%冰醋酸(体积比)和10%甲醇(体积比)的脱色液中脱色,记录试验结果。

1.2.3 京水菜种子SU1抗菌蛋白抑菌活性的测定

参照Ye et al.(2011)纸片扩散法检测京水菜种

子SU1抗菌蛋白的抑菌活性。将芭乐炭疽病菌、稻瘟病菌、灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌、烟草炭疽病菌和小白菜炭疽病菌分别接种于PDA平板中央,置于28℃恒温条件下培养3~7 d,待菌落直径约为3 cm时,将无菌滤纸圆片放置在距离菌落边缘0.5 cm处,用移液枪在纸片上加15 μL SU1抗菌蛋白溶液,以等体积磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)为阴性对照,28℃下继续培养12~24 h,直到菌落边缘长至滤纸片边缘时,观察并记录试验结果。

1.2.4 京水菜种子SU1抗菌蛋白的稳定性测定

热稳定性:用PBS缓冲液配制1.0 mg/mL京水菜种子SU1抗菌蛋白溶液,在1.5 mL离心管中加入1.0 mg/mL SU1抗菌蛋白溶液50 μL ,分别在40、50、60、70和80℃水浴条件下处理30 min,以PBS缓冲液为阴性对照,以尖孢镰刀菌为指示菌,参照1.2.3方法测定抑菌活性。

pH稳定性:在1.5 mL离心管中加入1.0 mg/mL京水菜种子SU1抗菌蛋白溶液50 μL ,冷冻干燥后分别加入pH为1.0、2.0、3.0、11.0、12.0、13.0的PBS缓冲液20 μL ,25℃室温放置30 min,于8 000 r/min下离心10 min,取上清液,以PBS缓冲液为阴性对照,以未处理的SU1抗菌蛋白溶液为阳性对照,以尖孢镰刀菌为指示菌,参照1.2.3方法测定抑菌活性。

离子稳定性:用无菌水配制浓度为100 mmol/L Mg^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 K^{+} 和 Zn^{2+} 金属离子溶液,备用。分别吸取1.0 mg/mL京水菜种子SU1抗菌蛋白溶液50 μL 放入到11个离心管中,冷冻干燥,然后向离心管中分别加入50 μL 上述金属离子溶液,25℃室温放置1 h,以只加50 μL 无菌水的SU1抗菌蛋白溶液为阳性对照,以尖孢镰刀菌为指示菌,参照1.2.3方法测定抑菌活性。

SU1抗菌蛋白、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)与金属离子的相互作用:用无菌水配置10 mmol/L EDTA溶液备用。称取1 mg SU1抗菌蛋白溶解到1 mL无菌水中,以1:1体积比分别加入EDTA溶液和SU1抗菌蛋白溶液,充分振荡混匀,4℃静置12 h,于8 000 r/min下离心10 min,取上清液,以尖孢镰刀菌为指示菌,参照1.2.3方法检测抗菌活性。然后继续在SU1抗菌蛋白和EDTA的混合液中,按照1:1体积比,分别放入100 mmol/L Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 和 Cr^{3+} 金属离子溶液,充分振荡,4℃静置12 h,8 000 r/min离心10 min,取上清液,以尖孢镰刀菌为指示菌,参

照1.2.3方法测定抑菌活性。

1.2.5 京水菜种子SU1抗菌蛋白的抑菌机制

尖孢镰刀菌菌丝细胞膜透性、线粒体膜电位和细胞核完整性检测:参考Ghosh et al.(2015)方法,运用荧光染色法检测。检测中使用SYTOX Green、Rh-123和DAPI荧光染料,SYTOX Green是一种核酸染料,能够透过细胞膜使受损的细胞核酸着色,不能穿过完整的细胞膜;Rh-123是一种可通过细胞膜染活细胞线粒体的荧光染料,广泛用于检测线粒体膜电位;DAPI是一种细胞核染料,可以透过完整的细胞膜与DNA结合发出蓝色荧光。将尖孢镰刀菌接种于PD液体培养基中,于28℃、150 r/min下培养48 h,分别吸取900 μ L含菌丝的PD液体培养基放入到6个离心管中,处理组取3个离心管,每个分别加入2 mg/L京水菜种子SU1抗菌蛋白溶液100 μ L,对照组取3个离心管,每个试管分别加入PBS缓冲液100 μ L,继续摇床培养4 h,用PBS缓冲液反复清洗处理组和对照组菌丝数次,至培养基被清洗干净,菌丝于500 μ L PBS缓冲液中重悬浮,1个处理组和1个对照组为1组,分为3组,分别向其中加入SYTOX Green、Rh-123和DAPI荧光染料2 μ L,在整个染色阶段,离心管于28℃、黑暗环境下放置30 min,用PBS缓冲液清洗多余染液,制成玻片,在共聚焦显微

镜下观察菌丝的着色结果。

尖孢镰刀菌菌丝细胞DNA分解试验:按照全基因组提取试剂盒说明书提取尖孢镰刀菌DNA,于-20℃条件下保存,备用。将真菌DNA分装于4个1.5 mL离心管中,每管300 μ L,向其中3个离心管中加入4.0 mg/mL京水菜种子SU1抗菌蛋白溶液100 μ L,使SU1抗菌蛋白终浓度为1 mg/mL,分别在25℃条件下放置24、48、72 h,以未加SU1抗菌蛋白且放置72 h的尖孢镰刀菌DNA为阴性对照,进行1.0%琼脂糖凝胶电泳,检测尖孢镰刀菌DNA的分解情况。

2 结果与分析

2.1 京水菜种子SU1抗菌蛋白纯化

京水菜上清液依次过SP-Sepharose阳离子交换层析(图1-A)、Mono S强阴离子交换层析(图1-B)和Superdex 75凝胶过滤层析(图1-C)后,并检测柱层析不同蛋白组分的抑菌活性,结果表明蛋白组分P2、S2和SU1对尖孢镰刀菌有抑菌活性,而蛋白组分P0、P1、P3、S0、S1、SU2和SU3对尖孢镰刀菌均无抑制活性,其中SU1蛋白组分为目的蛋白,将其命名为SU1抗菌蛋白。

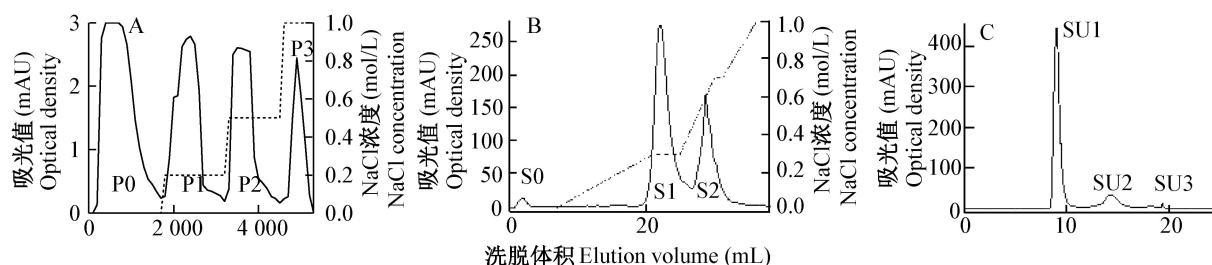


图1 京水菜种子SU1抗菌蛋白的柱层析纯化过程

Fig. 1 Chromatographic purification of antifungal protein SU1 from *Brassica juncea* var. *multisecta* seeds

A: SP-Sepharose阳离子交换层析; B: Mono S强阴离子交换层析; C: Superdex 75凝胶过滤层析。实线:吸光值;虚线:NaCl浓度。P0、S0:不吸附蛋白组分;P1、P2和P3:0.2、0.5和1.0 mol/L NaCl缓冲液洗脱吸附蛋白组分;S1、S2:0.3 mol/L NaCl缓冲液和0.3~1.0 mol/L线性梯度NaCl缓冲液洗脱吸附蛋白组分;SU1、SU2和SU3:不同体积洗脱蛋白组分。A: Cation exchange chromatography on SP-Sepharose column; B: strong cation exchange chromatography on Mono S column; C: gel filtration chromatography on Superdex 75 column. Solid line: optical density; dotted line: NaCl concentration. P0, S0: Fraction containing unadsorbed proteins; P1, P2, P3: fraction containing adsorbed proteins eluted with 0.2, 0.5 and 1.0 mol/L NaCl in buffer; S1, S2: fraction containing adsorbed proteins eluted with 0.3 mol/L NaCl and a linear gradient of 0.3–1.0 mol/L NaCl in buffer; SU1, SU2 and SU3: elution of proteins fraction in different elution volumes.

2.2 京水菜种子SU1抗菌蛋白的分子量

经SDS-PAGE电泳法测定,SU1抗菌蛋白含有一条蛋白条带,其分子量约为30 kD(图2)。

2.3 京水菜种子SU1抗菌蛋白的抑菌活性

通过纸片扩散法对京水菜种子SU1抗菌蛋白

的抑菌活性进行检测,发现其对芭乐炭疽病菌、稻瘟病菌、灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌、烟草炭疽病菌和小白菜炭疽病菌7种植物病原真菌均具有抑制活性,表明京水菜种子SU1抗菌蛋白具有广谱的抗菌活性(图3)。

2.4 京水菜种子SU1抗菌蛋白的稳定性

40、50、60、70 和 80℃ 不同温度处理后, SU1 抗菌蛋白溶液对尖孢镰刀菌仍有较强的抑菌活性(图 4-A), 表明京水菜种子 SU1 抗菌蛋白的热稳定较好。不同 pH 处理后, 当 pH 为 1~3 和 11~13 时, 京水菜种子 SU1 抗菌蛋白对尖孢镰刀菌仍有抑制活性(图 4-B), 表明在强酸、强碱环境下京水菜种子 SU1 抗菌蛋白的抑菌活性仍有较好的稳定性。100 mmol/L Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 和 Cr^{3+} 离子溶液处理后, 京水菜种子 SU1 抗菌蛋白对尖孢镰刀菌的抑制活性无明显变化, 而 100 mmol/L Ca^{2+} 离子溶液处理后, SU1 抗菌蛋白对尖孢镰刀菌的抑制活性消失, 表明京水菜种子 SU1 抗菌蛋白的金属离子稳定性较好。

5 mmol/L EDTA 处理后, 京水菜种子 SU1 抗菌蛋白对尖孢镰刀菌的抑制活性消失(图 4-C)。在京水菜种子 SU1 抗菌蛋白与 EDTA 的混合液中再加入金属离子时, 只有加入 50 mmol/L Cr^{3+} 金属离子后,

京水菜种子 SU1 抗菌蛋白对尖孢镰刀菌的抑制活性恢复, 而加入 50 mmol/L Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 K^{+} 金属离子后, 京水菜种子 SU1 抗菌蛋白对尖孢镰刀菌仍无抑制活性, 表明京水菜种子 SU1 抗菌蛋白、EDTA 和 Cr^{3+} 金属离子三者之间形成新配合物, 从而发挥抑菌作用。

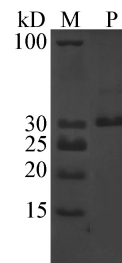


图2 京水菜种子SU1抗菌蛋白的电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis analysis of antifungal protein SU1 from *Brassica juncea* var. *multisecta* seeds

M: 蛋白分子量marker; P: 京水菜种子SU1抗菌蛋白。

M: Protein molecular weight marker; P: antifungal protein SU1 from *Brassica juncea* var. *multisecta* seeds.

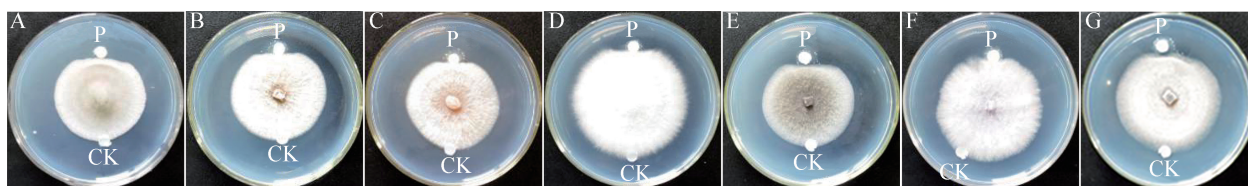


图3 京水菜种子SU1抗菌蛋白对7种植物病原真菌的抑菌活性

Fig. 3 Antifungal activity of antifungal protein SU1 from *Brassica juncea* var. *multisecta* seeds against seven species of phytopathogenic fungi

A~G: 分别为芭乐炭疽病菌、稻瘟病菌、灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌、烟草炭疽病菌和小白菜炭疽病菌; P: 京水菜种子SU1抗菌蛋白; CK: PBS缓冲液。A~G: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *C. micotianae*, *C. higginsianum*, respectively; P: antifungal protein SU1 from *Brassica juncea* var. *multisecta* seeds; CK: PBS buffer.

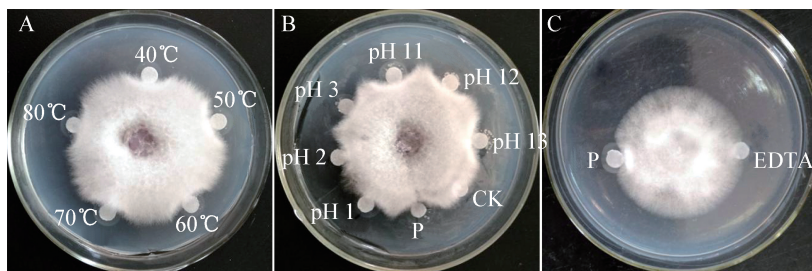


图4 京水菜种子SU1抗菌蛋白的热稳定性(A)、pH稳定性(B)和EDTA稳定性(C)

Fig. 4 Thermal stability (A), pH stability (B) and EDTA stability (C) of antifungal protein SU1 from *Brassica juncea* var. *multisecta* seeds

P: 京水菜种子SU1抗菌蛋白; CK: PBS电泳缓冲液; EDTA: 5 mmol/L 乙二胺四乙酸溶液。P: Antifungal protein SU1 from *Brassica juncea* var. *multisecta* seeds; CK: PBS buffer; EDTA: 5 mmol/L ethylene diamine tetraacetic acid solution.

2.5 京水菜种子SU1抗菌蛋白的抑菌机制

2.5.1 尖孢镰刀菌细胞膜透性改变

京水菜种子SU1抗菌蛋白处理组中尖孢镰刀

菌菌丝内部可见明显的绿色荧光, 而对照组菌丝内未见绿色荧光(图 5-A), 表明京水菜种子 SU1 抗菌蛋白对尖孢镰刀菌作用时, 其菌丝细胞膜的完整性

被破坏,引起细胞膜透性的改变,从而阻止菌丝生长。

2.5.2 尖孢镰刀菌线粒体膜电位改变

京水菜种子 SU1 抗菌蛋白处理组中尖孢镰刀菌菌丝内部可见明显的红色荧光,而对照组菌丝内未见荧光(图 5-B),表明京水菜种子 SU1 抗菌蛋白对尖孢镰刀菌作用时,其菌丝内线粒体膜电位升高,从而抑制该菌丝的生长。

2.5.3 尖孢镰刀菌菌丝细胞核完整性改变

对照组尖孢镰刀菌菌丝内部细胞核被着色,单个细胞核的蓝色荧光清晰可见,近似圆形,规律分布于菌丝内,而京水菜种子 SU1 抗菌蛋白处理组菌丝内部蓝色荧光碎片化地分布于菌丝内,未见圆形结构的细胞核,细胞核已分解(图 5-C),表明京水菜种子 SU1 抗菌蛋白可以破坏尖孢镰刀菌细胞核的完整性,从而对尖孢镰刀菌的生长产生抑制作用。

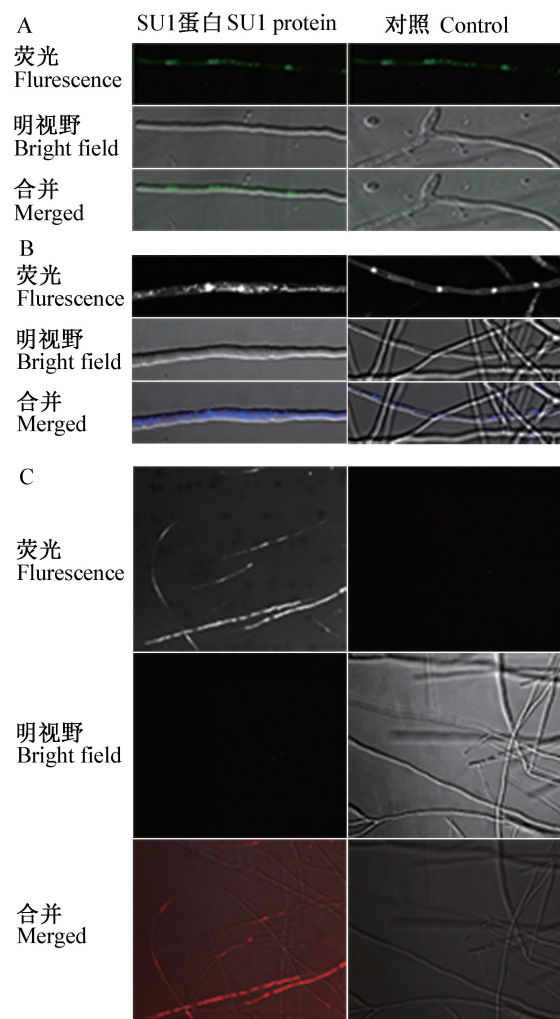


图 5 尖孢镰刀菌菌丝荧光染色共聚焦电镜图

Fig. 5 Fluorescence microscope images of *Fusarium oxysporum* hyphae stained with fluorescent dyes

A~C: SYTOX Green、Rh-123 和 DAPI 荧光染色。A~C: Stained with SYTOX Green, Rh-123 and DAPI.

2.5.4 尖孢镰刀菌菌丝细胞DNA分解

对照组尖孢镰刀菌 DNA 条带清晰可见,没有拖尾现象;京水菜种子 SU1 抗菌蛋白处理 24 h 后,尖孢镰刀菌 DNA 条带仍清晰可见,出现拖尾现象;京水菜种子 SU1 抗菌蛋白处理 48 h 后,尖孢镰刀菌 DNA 条带模糊,拖尾现象严重;京水菜种子 SU1 抗菌蛋白处理 72 h 后,基本看不到尖孢镰刀菌 DNA 的电泳条带(图 6)。表明随着京水菜种子 SU1 抗菌蛋白处理时间的延长,尖孢镰刀菌 DNA 被分解程度越来越严重,京水菜种子 SU1 抗菌蛋白可以分解尖孢镰刀菌 DNA,推测京水菜抗菌蛋白可能是一种脱氧核糖核酸酶,通过分解菌丝 DNA,从而发挥抗菌活性。

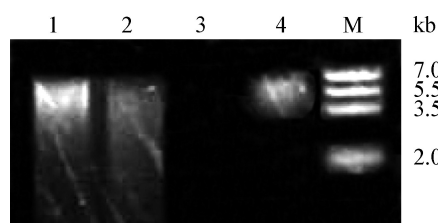


图 6 尖孢镰刀菌 DNA 的分解结果

Fig. 6 Degradation results of *Fusarium oxysporum* DNA

1~3: 分别经 SU1 抗菌蛋白处理 24、48 和 72 h; 4: 未经 SU1 抗菌蛋白处理; M: DNA 分子量 marker。1~3: Treated with antifungal protein SU1 for 24, 48 and 72 h; 4: untreated with antifungal protein SU1; M: DNA molecular weight marker.

3 讨论

十字花科植物存在丰富的抗菌蛋白,分子量大小各不相同,京水菜种子 SU1 抗菌蛋白分子量与十字花科植物紫甘蓝种子抗菌蛋白分子量 30 kD 相近(Ye et al., 2011),而比芥蓝种子抗菌蛋白分子量 5.9 kD(Lin & Ng, 2008)、油菜种子抗菌蛋白 campe-sin 分子量 9.4 kD(Lin et al., 2009)和紫菜薹种子抗菌蛋白分子量 13 kD(袁素素等, 2018)大。

抗菌蛋白的稳定性较强,如 Lin & Ng(2008)报道在 20~80℃ 温度条件下处理 10 min 和在 pH 2~3 和 10~11 下处理 30 min,芥蓝种子抗菌蛋白仍具有抑菌活性;孙卉和师俊玲(2010)报道枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 抗菌蛋白对抗扩展青霉 *Penicillium expansum* 具有抑制活性,经浓度 50 mmol/L Na^+ 和 Mg^{2+} 金属离子处理后该抗菌蛋白抑菌活性增强,而经浓度 50 mmol/L Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{3+} 金属离子处理后其抑菌活性消失;钟青萍等(2002)研究结果表明 10~50 mmol/L K^+ 金属离子处理对纳豆抗菌蛋白抑菌活性的影响较小,而 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 金属离子均对其抑菌活性有一定的抑制作用,表明不同来

源抗菌蛋白对金属离子的稳定性不同。本研究结果表明,经过EDTA处理后SU1抗菌蛋白的抑菌活性消失;而钟青萍等(2002)研究结果表明,经过EDTA处理后纳豆抗菌蛋白能促进其对痢疾志贺氏菌 *Shigella dysenteriae* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的抑制作用,EDTA处理后2种抗菌蛋白抑菌活性的差异可能与真菌、细菌的细胞壁结构不同有关。马肖依(2011)研究结果表明,EDTA基青霉烷酸衍生物可与 Mn^{2+} 、 Gd^{3+} 和 Fe^{3+} 金属离子形成配合物,这些配合物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 *Escherichia coli* 和白色念珠菌 *Monilia albicans* 均有抑制活性,而本研究结果显示,在京水菜种子SU1抗菌蛋白与EDTA的溶液中加入 Cr^{3+} 后,尖孢镰刀菌的抑制活性恢复,可能是此过程中形成了新的配合物。

抗菌蛋白具有广谱抗性,如紫甘蓝种子抗菌蛋白能抑制落花生球腔菌 *Mycosphaerella arachidicola*、玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica* 和玉米小斑病菌 *Bipolaris maydis* 的生长(Ye et al., 2011);芥蓝种子抗菌蛋白对尖孢镰刀菌、玉米小斑病菌、落花生球腔菌和苹果树腐烂病菌 *Valsa mali* 有抑制作用(Lin & Ng, 2008)。关于抗菌蛋白的抑菌机制方面的研究已有较多报道,如Chan & Ng(2013)研究结果表明东北红豆抗菌蛋白作用于落花生球腔菌时,会导致菌丝细胞膜透性的改变,从而出现菌丝被SYTOX Green染料着色的情况,且随着抗菌蛋白浓度的增加,荧光亮度逐渐增强;Ghosh et al.(2015)研究结果显示大蒜凝集素抗菌蛋白能引起立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 线粒体膜电势的增加,经DAPI染色后,随处理时间的延长,蓝色荧光越来越模糊,碎片化现象越来越明显,表明细胞核完整性被破坏越来越严重。本研究结果也进一步印证了此抑菌机制——抗菌蛋白在细胞器水平上影响真菌菌丝细胞的细胞膜、线粒体和细胞核的正常结构和代谢过程,从而发挥抑菌活性。

一种蛋白可兼具脱氧核糖核酸酶、抑菌和抗癌活性,如Wang & Ng(2001)自龙须菜种子中纯化得到一种分子量为30 kD的脱氧核糖核酸酶,该酶既能水解鲱鱼精子DNA,又能抑制灰葡萄孢菌的生长,但对尖孢镰刀菌和落花生球腔菌无抑制活性;Tomar et al.(2014)研究结果表明,南瓜2S清蛋白具有抗癌、脱氧核糖核酸酶和抗菌活性,通过丫啶橙荧光染色法和DNA分解试验发现,该蛋白能引起细胞凋亡,对超螺旋DNA和线性DNA都有分解作用,同时能抑制尖孢镰刀菌的生长,抗菌蛋白发挥抑菌活

性一般与其自身具有的脱氧核糖核酸酶活性密切相关。

将抗菌蛋白的理论研究应用到实际农业生产中还存在很多困难和问题,如由于抗菌蛋白的来源问题所导致的生产费用昂贵,此外,抗菌蛋白的储存、田间防治效果和对人类健康的潜在危害等问题都有待解决。本研究虽然纯化得到京水菜种子SU1抗菌蛋白,并对其稳定性、抗菌活性和抗菌机制进行了研究,但是缺少对尖孢镰刀菌深层抑菌机理和田间实际应用的研究。后续需进一步探讨京水菜种子SU1抗菌蛋白的贮藏条件、其对尖孢镰刀菌深层抑菌机理和植物病害的田间防治效果。此外,在京水菜种子SU1抗菌蛋白和EDTA的溶液中加入 Cr^{3+} 金属离子后,抑菌活性恢复的过程中是否有配合物的形成,需要进一步证实。

参 考 文 献 (References)

- Cao Y, Li CM, Luo X, Cao JY. 2009. Effects of different fertilizer combinations on the growth, yield and quality of *Brassica juncea* var. *multisecta* L. H. Bailey. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 31(2): 48–51 (in Chinese) [曹毅, 李春梅, 罗鑫, 曹健义. 2009. 不同肥料搭配对京水菜生长、产量及品质的影响. *西南大学学报 (自然科学版)*, 31(2): 48–51]
- Chan YS, Ng TB. 2013. Northeast red beans produce a thermostable and pH-stable defensin-like peptide with potent antifungal activity. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 66(3): 637–648
- Chu KT, Ng TB. 2004. First report of a glutamine-rich antifungal peptide with immunomodulatory and antiproliferative activities from family Amaryllidaceae. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 325(1): 167–173
- Fei W, Li H, Ma LY, Pei C, Kong XH. 2015. Structure characteristics and antibacterial activities of histone-derived antibacterial peptides in aquatic animal. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 44(4): 9–13 (in Chinese) [费威, 李慧, 马龙洋, 裴超, 孔祥会. 2015. 水生动物组蛋白衍生抗菌肽的结构特征和抗菌活性研究进展. *河南农业科学*, 44(4): 9–13]
- Ghosh P, Roy A, Hess D, Ghosh A, Das S. 2015. Deciphering the mode of action of a mutant *Allium sativum* leaf agglutinin (mASAL), a potent antifungal protein on *Rhizoctonia solani*. *BMC Microbiology*, 15: 537
- Gozia O, Ciopraga J, Bentia T, Lungu M, Zamfirescu I, Tudor R, Roseanu A, Nitu F. 1993. Antifungal properties of lectin and new chitinases from potato tubers. *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences: Serie III, Sciences de la vie*, 316(8): 788–792
- Huang X, Xie WJ, Gong ZZ. 2000. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Letters*, 478(1/2): 123–126
- Lam YW, Wang HX, Ng TB. 2000. A robust cysteine-deficient chitin

- ase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 279(1): 74–80
- Lin P, Ng TB. 2008. A novel and exploitable antifungal peptide from kale (*Brassica alboglabra*) seeds. Peptides, 29(10): 1664–1671
- Lin P, Wong JH, Xia LX, Ng TB. 2009. Campesin, a thermostable antifungal peptide with highly potent antipathogenic activities. Journal of Bioscience & Bioengineering, 108(3): 259–265
- Liu XM, Cao AC, Wang QX, Yan DD, Ouyang CB, Li Y. 2018. Current situation of bio-pesticide registration, extension and application in China. Plant Protection, 44(5): 101–107 (in Chinese) [刘晓漫, 曹堃程, 王秋霞, 颜冬冬, 欧阳灿彬, 李园. 2018. 我国生物农药的登记及推广应用现状. 植物保护, 44(5): 101–107]
- Ma XY. 2011. Synthesis and properties of metal complexes of EDTA and DTPA derivatives of 6-aminopenicillanic acid. Master Thesis. Guangzhou: Guangdong University of Technology (in Chinese) [马肖依. 2011. EDTA、DTPA 氨基青霉素衍生物的合成及其金属配合物性能研究. 硕士学位论文. 广州: 广东工业大学]
- Moreno AB, Del Pozo AM, Borja M, Segundo BS. 2003. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 93(11): 1344–1353
- Qi DF, Zou LP, Zhou DB, Feng RJ, Gao ZF, Zhang XY. 2017. Isolation, identification of strain GA1-2 and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Plant Protection, 44(5): 809–816 (in Chinese) [起登凤, 邹良平, 周登博, 冯仁军, 高祝芬, 张锡炎. 2017. GA1-2 菌株的分离鉴定及其对香蕉尖孢镰刀菌的抑菌效果. 植物保护学报, 44(5): 809–816]
- Sun H, Shi JL. 2010. Antifungal characteristics of *Bacillus subtilis* CCTCC M207209 against *Penicillium expansum*: extraction, stability, and application of the antifungal substances in the liquid culture. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 38(1): 201–208 (in Chinese) [孙卉, 师俊玲. 2010. 枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 抗扩展青霉特性研究——活性物质的提取、稳定性与应用. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 38(1): 201–208]
- Tomar PPS, Nikhil K, Singh A, Selvakumar P, Roy P, Sharma AK. 2014. Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 448(4): 349–354
- Wang HX, Ng TB. 2001. Isolation of a novel deoxyribonuclease with antifungal activity from *Asparagus officinalis* seeds. Biochemical and Biophysical Research Communications, 289(1): 120–124
- Wang HX, Ng TB. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. Phytochemistry, 61(1): 1–6
- Wang HX, Ng TB. 2004. Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. Peptides, 25(1): 1–5
- Wang ZX, Wang YP, Zheng L, Yang XN, Liu HX, Guo JH. 2014. Isolation and characterization of an antifungal protein from *Bacillus licheniformis* HS10. Biochemical and Biophysical Research Communications, 454(1): 48–52
- Yan J, Yuan SS, Jiang LL, Ye XJ, Ng TB, Wu ZJ. 2015. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology, 99(12): 4961–4981
- Ye XJ, Ng TB, Wu ZJ, Xie LH, Fang EF, Wong JH, Pan WL, Wing SS, Zhang YB. 2011. Protein from red cabbage (*Brassica oleracea*) seeds with antifungal, antibacterial, and anticancer activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(18): 10232–10238
- Yuan SS, Qin WS, Zhang WW, Wang CC, Ye XJ. 2018. Purification of antifungal protein from *Brassica campestris* L. seeds and analysis of antifungal activity and stability. Journal of Henan Agricultural Sciences, 47(10): 69–74 (in Chinese) [袁素素, 秦武洒, 张玮玮, 王财成, 叶秀娟. 2018. 紫菜薹种子抗菌蛋白的分离纯化及其抑菌活性和稳定性研究. 河南农业科学, 47(10): 69–74]
- Zhang XX, Xie MC, Nan BD, Shuai NN, Qin YT. 2015. Effects of different sowing date and planting density on the growth and yield of *Brassica juncea* var. *multisecta* L. H. Bailey. Modern Agricultural Science and Technology, (1): 105–106 (in Chinese) [张晓霞, 顾敏昌, 南炳东, 帅娜娜, 秦一统. 2015. 不同播期与种植密度对京水菜生长及产量的影响. 现代农业科技, (1): 105–106]
- Zhao Y, Miao ZY, Li Y, Bai YJ. 2014. Research progress on controlling against tomato gray mold. China Plant Protection, 34(7): 21–29 (in Chinese) [赵杨, 苗则彦, 李颖, 白元俊. 2014. 番茄灰霉病防治研究进展. 中国植保导刊, 34(7): 21–29]
- Zhong QP, Xie JJ, She SW. 2002. Stabilities of antimicrobial protein produced by *Bacillus natto*. China Food Additives, (4): 42–45 (in Chinese) [钟青萍, 谢俊杰, 余世望. 2002. 纳豆菌抗菌蛋白的稳定性. 中国食品添加剂, (4): 42–45]
- Zhou R, Wang Y, Ren JJ, Wen SZ, Lai LM. 2010. Effects of photoperiod and GA treatment on floral buds differentiation of water cabbage (*Brassica japonica* Sieb). Seed, 29(6): 75–77 (in Chinese) [周荣, 王艳, 任吉君, 文素珍, 赖李明. 2010. 光周期和 GA 处理对京水菜花芽分化的影响. 种子, 29(6): 75–77]
- Zhu YM, Li S, Dong WJ, Jiang JP, Zhu BC. 2018. Optimization of fermentation conditions for production of extracellular antibacterial protein by anti-diarrhea probiotics strain T-70-1. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, (13): 1–7 (in Chinese) [朱永明, 李森, 董伟洁, 姜军坡, 朱宝成. 2018. 抗腹泻益生菌 T-70-1 胞外产抗菌蛋白发酵条件的优化. 黑龙江畜牧兽医, (13): 1–7]

(责任编辑: 张俊芳)