

# 芝麻菜种子抗菌蛋白的纯化及其抗菌活性

张耀,王财成,袁素素,张玮玮,叶秀娟\*

(福建省福州市福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福州 350002)

**摘要:**本文旨在从芝麻菜种子中分离纯化得到一种具有抗菌活性的蛋白,并对其抗菌活性进行研究。通过 SP-Sepharose 离子交换色谱、Mono S<sup>TM</sup> 5/50CL 和 Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300GL 快速蛋白液相色谱进行分离纯化,经 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析;采用纸片扩散法、荧光染色法,对其抗菌活性和稳定性进行研究。结果表明,从芝麻菜种子中纯化一种抗菌蛋白 ZSU2,经 Tricine-SDS-PAGE 电泳鉴定达到电泳纯,相对分子质量约为 12 kDa;ZSU2 蛋白对小白菜炭疽病菌等 12 种真菌具有较强的抑制作用,抗菌活性在 pH 1~13、温度 0~100 °C 稳定,且具有较强的金属阳离子耐受能力;此外 ZSU2 蛋白能引起菌丝尖端几丁质积累和细胞膜选择透过性的改变。

**关键词:**芝麻菜 抗菌蛋白 分离纯化 抗真菌活性

## Purification of Antibacterial Protein from Arugula (*Eruca sativa* Mill.) Seeds and Its Antifungal Activity

ZHANG Yao, WANG Cai-cheng, YUAN Su-su, ZHANG Wei-wei, YE Xiu-juan\*

(Key Lab of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** This essay was aimed to isolate, purify and characterize the protein with antifungal activity from arugula (*Eruca sativa* Mill.) seeds. The antifungal protein was isolated and purified from the seed of arugula by ion exchange chromatography on SP-Sepharose and followed by fast protein liquid chromatography on Mono S<sup>TM</sup> 5/50 GL and Superdex<sup>TM</sup> 75 GL. Tricine-SDS-PAGE was used to analysis its purity and molecular weight. The antifungal activity and stability were studied by means of paper diffusion and fluorescence staining. The results showed that the antifungal protein (ZSU2) isolated and purified from the seed of arugula exhibited a molecular mass about 12 kDa in Tricine-SDS-PAGE electrophoresis. It had a strong inhibitory effect on 12 kinds of fungi, such as *Colletotrichum higginsianum*. The antifungal activity was stable on pH 1 to 13 and temperature 0 to 100 °C, and had a strong metal cation tolerance. In addition ZSU2 protein could induce chitin accumulation and cell membrane selection through sexual change.

**Key words:** *Eruca sativa* Mill.; antifungal protein; isolation and purification; antifungal activity

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)20-0092-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.20.016

引文格式: 张耀,王财成,袁素素,等.芝麻菜种子抗菌蛋白的纯化及其抗菌活性[J].食品工业科技,2018,39(20):92-97.

抗菌蛋白 (Antimicrobial proteins or peptides, AMPs), 存在于生物体内, 是生物抵御不良外界环境过程中产生的, 具有抗微生物活性的防御性蛋白或肽类, 用于抵挡外来入侵病原体, 是生物天然免疫防御系统的重要组成部分。植物抗真菌活性蛋白, 是植物长期进化过程中, 自身合成的一种植物抵御外界病原真菌的物质, 可以抑制真菌的生长, 甚至消灭真菌<sup>[1]</sup>。目前, 各国研究人员已经从多种植物中分离

纯化多种抗菌蛋白, 包括甘蓝<sup>[2]</sup>、褐色芸豆<sup>[3]</sup>、小红豆<sup>[4]</sup>等植物, 抗菌蛋白主要存在于植物的各种组织器官中, 如茎<sup>[5]</sup>、果实<sup>[6]</sup>、种子<sup>[7]</sup>等。这些抗菌蛋白在一级序列的基础上, 可被分为转脂蛋白、硫堇、植物防御素、Hevein 和 Konttin 型蛋白家族<sup>[8]</sup>。抗菌蛋白通过抑制真菌生理代谢、降解真菌细胞壁、破坏真菌细胞膜、破坏细胞中的核糖体及降解细胞中的核酸, 来保护植物体免受病原菌的侵染<sup>[9-10]</sup>。目前, 对于抗菌

收稿日期: 2018-03-13

作者简介: 张耀(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性物质的分离与纯化, E-mail: zy210210@126.com。

\* 通讯作者: 叶秀娟(1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质与多肽生物化学和天然药物化学, E-mail: xiujuanye2004@gmail.com。

基金项目: 一流植物保护学院建设工程(612014001)。

蛋白的纯化、生物活性、作用机理均有一定的研究报道<sup>[11]</sup>，但相关理论和产业化生产的研究尚有待进一步深入。随着抗菌活性蛋白研究的深入，其应用范围将更加广泛。

芝麻菜(*Eruca sativa* Mill.)，又名臭菜、火箭生菜等，是十字花科芝麻菜属一年生草本植物，原产于东亚与地中海。芝麻菜具有类似芝麻种子的香气、气味辛辣、生长周期短(40~60 d)等特点，欧洲国家常用其叶片做沙拉或清蒸蔬菜；由于其种子含油量高，印度、巴基斯坦等国家将其作为一种重要的油料作物<sup>[12-13]</sup>。在我国，河北、山西、陕西、黑龙江、云南、新疆等地均有芝麻菜种植<sup>[14]</sup>，但其食用者较少。芝麻菜种子可采集供药用，有健胃、止血、利尿、消炎作用<sup>[15]</sup>，和其它十字花科植物相似，芝麻菜种子中富含多种天然植物化学成分，其中包括硫代葡萄糖苷(Glucosinolate)、胡萝卜素、纤维素、维生素C、黄酮类等物质<sup>[16-18]</sup>，其中硫代葡萄糖苷的水解产物异硫氰酸酯(Erucin)对多种肿瘤细胞具有较强的抑制作用<sup>[19]</sup>。

目前，对于芝麻菜的研究主要集中于芝麻菜苷方面，同为十字花科的甘蓝<sup>[2]</sup>、芥菜<sup>[20]</sup>等中，均有纯化出抗菌蛋白，但有关芝麻菜种子中蛋白类抗菌物质的研究未见报道。本文旨在从芝麻菜种子中分离纯化一种抗真菌蛋白，并对其生物活性进行初步探究，为芝麻菜开发新的应用价值提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

芝麻菜种子 哈尔滨市农信种子有限责任公司；小白菜炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*)、烟草炭疽病菌(*Colletotrichum nicotianae*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、玉米小斑病菌(*Helminthosporium maydis*)、芭乐炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、苹果黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)、凸脐蠕孢菌(*Setosphaeria turcica*)、落花生球腔菌(*Mycosphaerella arachidicola*)、稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)、长柄链格孢菌(*Alternaria longipes*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis*) 福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室；SYTOX Green染料 美国 Cambrex 公司；刚果红染料 上海笛柏化学品技术公司；SP-Sepharose 填料、Mono S<sup>TM</sup> 5/50 GL 预装柱、Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300GL 预装柱 美国 GE 公司；其余化学试剂 均为分析纯；透析袋(截留分子量3500 Da) 美国光谱医学公司。

Centrifuge 5860R型高速冷冻离心机 Eppendorf中国有限公司；WP-UP-LH-20型超纯水机 四川沃特尔水处理设备有限公司；AKTA purifiers型蛋白层析系统 美国 GE 公司；LCJ-18S型冷冻干燥机 上海松源华兴科技发展有限公司；DW-25L262型医用低温保存箱 海尔特种电器有限公司；SPH-200F恒温培养摇床 上海世平实验仪器有限公司；DYY-6C型电泳仪器 北京市六一仪器厂；Nikon A1

型激光共聚焦电子显微镜 日本 Nikon 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 抗真菌蛋白的纯化

1.2.1.1 总蛋白的提取 取100 g 洗净芝麻菜种子，用蒸馏水清洗，除去杂质，加入1 L的NH<sub>4</sub>OAc缓冲液(10 mmol/L, pH4.6)，用豆浆机打成匀浆后，置于4℃冰箱过夜。将浸提液在4℃、9000 r/min离心30 min，取上清液经四层纱布过滤，除去一些脂肪等杂质，重复离心、过滤步骤2~3次，收集上清液，得芝麻菜总蛋白提取液。

1.2.1.2 SP-Sepharose 阳离子交换柱层析 预先用NH<sub>4</sub>OAc(10 mmol/L, pH4.6)的上样缓冲液将离子交换柱平衡，取总蛋白提取液上样，上样结束后，继续流上样缓冲液至280 nm吸光值(OD<sub>280</sub>)为0终止，收集流穿峰ZSP0。然后依次用含0.2、0.5、1.0 mol/L NaCl的NH<sub>4</sub>OAc(10 mmol/L, pH4.6)上样缓冲液进行梯度洗脱，并进行峰收集，得ZSP1、ZSP2、ZSP3组分，对各组分进行抗菌活性检测，以小白菜炭疽病菌为指示菌，收集活性组分，并用蒸馏水在4℃透析12 h，截留分子量3500 Da，每3 h换一次蒸馏水，并将透析后的活性成分在-60℃冷冻干燥成干粉，即得芝麻菜抗菌蛋白粗品。

1.2.1.3 快速蛋白液相色谱 Mono S<sup>TM</sup> 5/50GL 强阳离子交换层析 按照AKTA pure蛋白纯化系统操作要求，将强阳离子交换柱 Mono S<sup>TM</sup> 5/50GL 与系统连接，用NH<sub>4</sub>OAc(10 mmol/L, pH4.6)上样缓冲液平衡，将上述活性组分溶解于上样缓冲液，过0.22 μm滤膜后上样，上样结束后，继续流上样缓冲液至OD<sub>280</sub>为0，收集流穿峰ZMS0。然后在含0~1 mol/L NaCl的NH<sub>4</sub>OAc(10 mmol/L, pH4.6)上样缓冲液进行线性洗脱，得ZMS1、ZMS2和ZMS3三个洗脱峰。对各组分进行抗菌活性检测，以小白菜炭疽病菌为指示菌，收集活性组分，并透析和冷冻干燥。

1.2.1.4 快速蛋白液相色谱 Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300GL 凝胶柱层析 将凝胶柱 Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300GL 与AKTA pure蛋白纯化系统连接，用NH<sub>4</sub>OAc(10 mmol/L, pH4.6)上样缓冲液平衡，将过完强阳离子交换柱 Mono S<sup>TM</sup> 5/50GL 得到的活性组分溶于上样缓冲液，过0.22 μm滤膜后上样，上样结束后继续流上样缓冲液至OD<sub>280</sub>为0，对吸收峰进行收集，分别为ZSU1、ZSU2、ZSU3。对各组分进行抗菌活性检测，小白菜炭疽病菌为指示菌，收集活性组分，透析并冷冻干燥。

1.2.2 Tricine-SDS-PAGE电泳 将纯化的活性蛋白运用Tricine-SDS-PAGE电泳方法<sup>[2]</sup>进行分析鉴定，分别使用16.5%分离胶，10%夹层胶，4%浓缩胶。电泳条件的起始电压为30 V，进入分离胶后升至80 V。电泳结束后，用考马斯亮蓝染液染色1 h，后用脱色液进行脱色，观察蛋白条带情况。

1.2.3 抑菌活性的检测 运用滤纸片扩散法，将待测的植物病原真菌接菌于含有马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)培养皿中，生长至圆面直径为3 cm，将灭菌的滤纸圆片放在距离菌边缘0.5 cm处，滴加20 μL的待测抗菌蛋白样品(1 mg/mL)在滤纸圆片上，无菌

水为对照 放置在 28 ℃ 恒温培养箱中,继续培养至菌边缘长至滤纸片处,观察有无抑菌活性。

#### 1.2.4 抗菌蛋白的稳定性实验

1.2.4.1 抗菌蛋白的热稳定性 取抗菌蛋白 1 mg 溶解于 1 mL 的 PBS 缓冲液 (pH7.4) 中,等量分装到 4 个 1.5 mL 的离心管中,分别在 40、60、80 和 100 ℃ 条件下水浴加热 15 min,待溶液冷却至室温,在 8000 r/min 离心 5 min,取上清液,以小白菜炭疽病菌为指示菌,检测抑菌活性,分别以 PBS 缓冲液 (pH7.4) 为阴性对照,未处理的抗菌蛋白溶液为阳性对照,设三个重复,记录实验结果。

1.2.4.2 抗菌蛋白的 pH 稳定性 取 1 mL 抗菌蛋白溶液 (1 mg/mL),分别取 pH 为 1、2、3、11、12、13 的 PBS 缓冲液 (pH7.4) 90 μL,加入 10 μL 上述抗菌蛋白溶液混匀,静置 30 min 后,以小白菜炭疽病菌为指示菌,检测抑菌活性,以 PBS 缓冲液 (pH7.4) 为阴性对照,未处理的抗菌蛋白溶液为阳性对照,设三个重复,记录实验结果。

1.2.4.3 抗菌蛋白金属离子稳定性实验 分别用无菌水配制 40、100、200、300 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$  溶液备用。取 20 μL 的抗菌蛋白溶液 (1 mg/mL) 与 20 μL 上述金属盐溶液混合,室温放置 1 h 后,以小白菜炭疽病菌为指示菌,进行抑菌活性检测。分别以不含抗菌蛋白但含 150 mmol/L 金属离子的溶液作为阴性对照,未处理的抗菌蛋白溶液为阳性对照,设三个重复,记录实验结果。

#### 1.2.5 抗真菌蛋白的作用机理

1.2.5.1 蛋白菌丝尖端几丁质积累检测 小白菜炭疽病菌接菌于马铃薯液体培养基 (PDB) 中,150 r/min,28 ℃ 摆床培养至  $\text{OD}_{600}$  为 1 时,吸取菌悬液,稀释 10 倍,加入抗菌蛋白溶液,继续摇床培养 1 d,离心得菌丝,多余抗菌蛋白用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 清洗,然后接菌在 PDA 培养基上,28 ℃ 恒温培养 7 d,PBS 缓冲液 (pH7.4) 处理菌丝为对照。在 1.5 mL 离心管中,分别加抗菌蛋白溶液和 PBS 缓冲液 (pH7.4),在靠近培养皿边缘处挑取菌块加入离心管,28 ℃ 培养 1 d,用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 清洗,加入刚果红 (Congo red) 染料,黑暗、室温条件下着色 30 min,PBS 缓冲液 (pH7.4) 反复冲洗去除多余染液,挑取真菌菌丝制成玻片,运用激光共聚焦电子显微镜进行观察,激发波长 543 nm,发射波长 560~635 nm。

1.2.5.2 细胞膜选择透过性检测 无菌条件下,在两个 1.5 mL 离心管 (灭过菌) 加入 900 μL PDB 液体培养基,挑取活化指示菌菌块放入培养基中,28 ℃ 培养 2 d,分别向上述两个离心管中加入抗菌蛋白溶液和 PBS 缓冲液 (作对照),28 ℃ 培养 12 h,用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 清洗,加入荧光绿 (SYTOX Green) 染料,黑暗条件下着色 30 min,PBS 缓冲液 (pH7.4) 洗去多余染液,制备玻片,运用激光共聚焦扫描荧光显微镜进行观察,激发波长 504 nm,发射波长 523 nm。

#### 1.3 数据处理

所有数据均取 3 次重复实验的平均值,采用 Excel、Word 软件进行数据分析和作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 芝麻菜抗菌蛋白的纯化

芝麻菜种子经破碎、离心和过滤得到总蛋白提取液,经 SP-Sepharose 阳离子交换色谱进行纯化,在 280 nm 检测洗脱液吸光度,得到的色谱图如图 1 所示。通过抑菌实验,发现在含有 0.5 mol/L  $\text{NaCl}$  的  $\text{NH}_4\text{OAc}$  缓冲液 (10 mmol/L, pH4.6) 洗脱出的 ZSP3 洗脱峰具有抗真菌菌活性,收集 ZSP3 组分,并透析和冷冻干燥,得到 ZSP3 蛋白干粉。

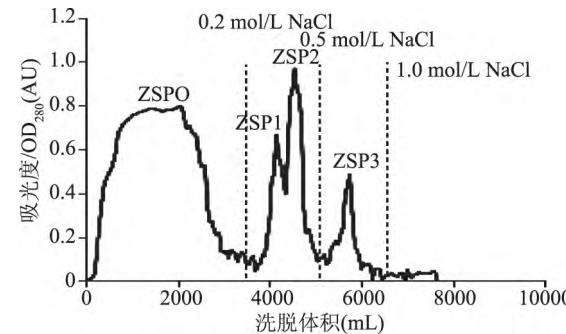


图 1 芝麻菜种子抗菌蛋白的 SP-Sepharose 离子交换色谱图

Fig.1 Ion exchange chromatography of the antifungal protein from arugula seeds on SP-Sepharose

在 AKTA pure 蛋白纯化系统中,将 ZSP3 蛋白干粉溶解于  $\text{NH}_4\text{OAc}$  缓冲液 (10 mmol/L, pH4.6) 中,经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上样至 Mono S<sup>TM</sup> 5/50GL 离子交换色谱柱中,通过含 0~1 mol/L  $\text{NaCl}$  的  $\text{NH}_4\text{OAc}$  缓冲液 (10 mmol/L, pH4.6) 线性洗脱,得到 ZMS1、ZMS2 和 ZMS3 三个洗脱峰 (图 2)。通过抑菌实验,测得 ZMS1 具有抗真菌活性,收集 ZMS1 峰组分,并透析和冷冻干燥,得 ZMS1 蛋白干粉。

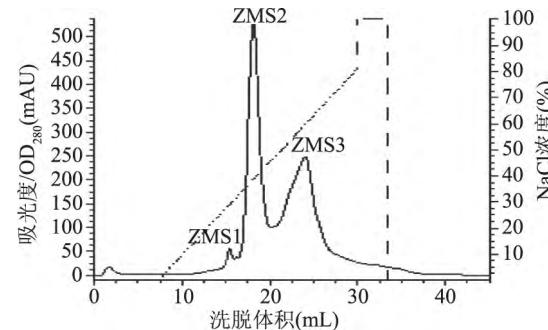


图 2 芝麻菜种子抗菌蛋白的 Mono S<sup>TM</sup> 5/50GL 离子交换色谱图

Fig.2 Ion exchange chromatography of the antifungal protein from arugula seeds on Mono S<sup>TM</sup> 5/50GL

将 ZMS1 蛋白干粉溶解于  $\text{NH}_4\text{OAc}$  缓冲液 (10 mmol/L, pH4.6) 中,经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上样至 AKTA pure 蛋白纯化系统中的 Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300GL 凝胶色谱柱,得到 ZSU1、ZSU2 和 ZSU3 三种组分 (图 3)。经抑菌实验测得 ZSU2 组分具有抗菌活性,即 ZSU2 组分为目标活性组分,本文章命名为 ZSU2 蛋白。收集目标组分,透析干燥,并复制备,以备后续研究。

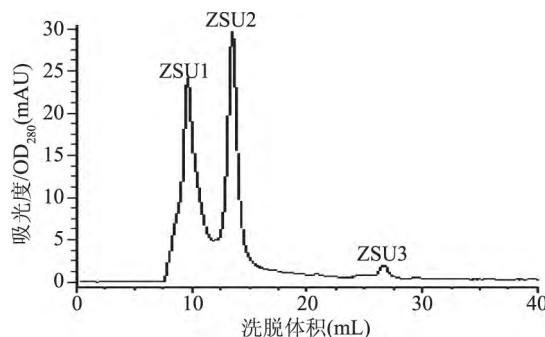


图3 芝麻菜种子抗菌蛋白的

Superdex™ 75 10/300GL 凝胶过滤色谱图

Fig.3 Gel filtration chromatography of the antifungal protein from arugula seeds on Superdex™ 75 10/300GL

## 2.2 Tricine-SDS-PAGE 电泳

采用 Tricine-SDS-PAGE 电泳方法检测 ZSU2 蛋白的纯度以及分子量大小,由图 4 结果中可知 ZSU2 蛋白为单一条带,分子量大小约为 12 kDa 左右,与油菜种子(9412 Da)<sup>[21]</sup>中纯化的抗菌蛋白分子量相近。

## 2.3 抑菌活性检测

采用滤纸片扩散法,若样品对真菌具有抑制作用,则滤纸片周围菌丝生长受到抑制,出现半圆形的月牙状抑菌圈。图 5 的实验结果表明 ZSU2 对苹果

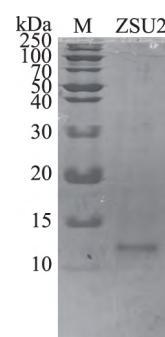


图4 芝麻菜抗菌蛋白 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 Tricine-SDS-PAGE of

the antifungal protein from arugula seeds

注: ZSU2: 芝麻菜抗菌蛋白 ZSU2; M: 蛋白分子质量标准。

黑腐皮壳菌、凸脐蠕孢菌、玉米小斑病菌、落花生球腔菌、芭乐炭疽病菌、稻瘟菌、禾谷镰刀菌、灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌、小白菜炭疽菌和长柄链格孢菌 12 种植物病原真菌具有较强抑制活性,对拟盘多毛孢和烟草炭疽病菌抑制活性较弱。ZSU2 蛋白对植物病原真菌具有广谱抗性。油菜<sup>[22]</sup>、芥蓝<sup>[23]</sup>和菜薹<sup>[7]</sup>等多种十字花科植物种子的抗菌蛋白对多种植物病原菌具有抑制活性,十字花科许多种子抗菌蛋白具有广谱抗性的共性。

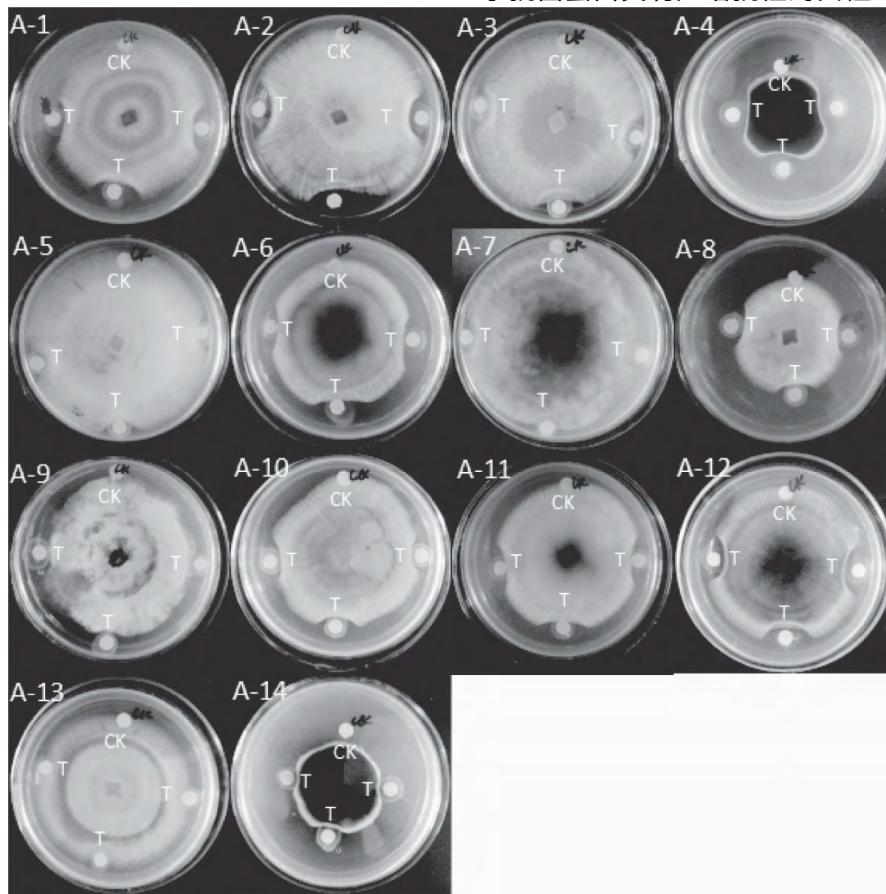


图5 芝麻菜抗真菌蛋白抑菌活性

Fig.5 Inhibitory activity of the antifungal protein from arugula seeds

注: A-1: 苹果黑腐皮壳菌; A-2: 凸脐蠕孢菌; A-3: 玉米小斑病菌; A-4: 落花生球腔菌; A-5: 芭乐炭疽病菌; A-6: 稻瘟菌; A-7: 禾谷镰刀菌; A-8: 尖孢镰刀菌; A-9: 拟盘多毛孢; A-10: 茄病镰刀菌; A-11: 灰葡萄孢菌; A-12: 小白菜炭疽病菌; A-13: 烟草炭疽病菌; A-14: 长柄链格孢菌; CK: PBS 缓冲液; T: 20 μL 芝麻菜抗真菌蛋白溶液。

## 2.4 芝麻菜抗菌蛋白稳定性

将处理后的样品 10000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液分别检测其抑菌活性。由图 6A 可以发现, 芝麻菜抗菌蛋白在 40、60、80 和 100 ℃ 条件下水浴加热处理 15 min 后, 与未处理的芝麻菜抗菌蛋白样品在小白菜炭疽病菌平板上, 均有月牙状抑菌圈出现, 且大小基本相同, 而 PBS 缓冲液对照则无抑菌圈出现, 说明芝麻菜抗菌蛋白在热处理后抑菌活性基本保持不变, 也表明起抗菌作用的 ZSU2 蛋白具有良好的热稳定性。

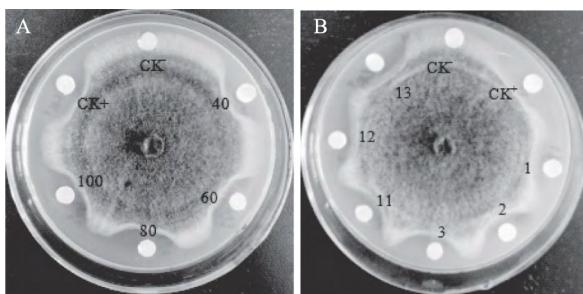


图 6 温度和 pH 对抗菌蛋白抑菌活性的影响

Fig.6 Effect of temperature and pH

on antibacterial activity of antimicrobial protein

注: A. 热稳定性实验, A 中 40、60、80、100 分别对应 40、60、80、100 ℃ 水浴处理下蛋白加样点; B. pH 稳定性实验, B 中 1、2、3、11、12、13 代表相应 pH 处理的蛋白加样点; 图 A~B 中, CK<sup>+</sup>: 20 μL 未处理抗菌蛋白溶液; CK<sup>-</sup>: 20 μL PBS 缓冲液。

将芝麻菜抗菌蛋白分别经不同 pH 条件处理, 测定其对 pH 的稳定性。从图 6B 中可以看出, 芝麻菜抗菌蛋白在 pH1~3 和 pH11~13 的条件下处理后, 与未处理的芝麻菜抗菌蛋白样品在小白菜炭疽病菌平板上均有月牙状抑菌圈出现, 且大小基本相同, 而 PBS 缓冲液对照则无抑菌圈出现, 说明芝麻菜抗菌蛋白具有良好的耐酸耐碱活性, 即能在极端 pH 的环境中保持较好的稳定性。

将芝麻菜抗菌蛋白分别经过 20、50、100 和 150 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$  金属盐溶液处理, 得到结果如表 1,  $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  浓度在 20~150 mmol/L 时,  $\text{Fe}^{3+}$  浓度在 20~100 mmol/L 时, 芝麻菜抗菌蛋白具有良好的抗菌活性,  $\text{Fe}^{3+}$  浓度达到 150 mmol/L 时, 芝麻菜抗菌活性明显减弱。说明芝麻菜抗菌蛋白具有较好的金属离子稳定性。

表 1 ZSU2 蛋白金属离子稳定性

Table 1 Metal ion stability of ZSU2 protein

ZSU2 蛋白溶液中金属离子浓度( mmol/L)	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$
0	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+
150	-	+	+	+	+

注: +: 对小白菜炭疽病菌有抑制活性; -: 对小白菜炭疽病菌无抑制活性。

## 2.5 抗菌蛋白的抗真菌机理

采用刚果红和荧光绿染色, 激光共聚焦显微镜观察的方法, 检测抗菌蛋白处理后, 小白菜炭疽病菌丝尖端几丁质的积累量和菌丝细胞膜透性的变化, 以等量 PBS 缓冲液处理的小白菜炭疽病菌菌丝作对照, 判断抗菌蛋白是否通过真菌菌丝尖端几丁质积累和改变细胞膜透性, 从而抑制真菌的生长。实验结果如图 7~图 8。

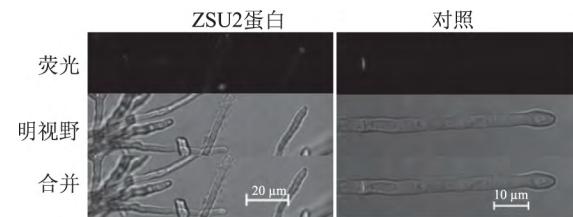


图 7 小白菜炭疽病菌刚果红染色共聚焦电镜图

Fig.7 Fluorescence micrope images of

*Colletotrichum higginsianum* hyphae stained with Congo red

刚果红( Congo red) 染料能够结合菌丝细胞壁上的几丁质, 从而将菌丝染色。本研究采用小白菜炭疽病菌为指示菌, 由图 7 可知 ZSU2 蛋白处理组菌丝尖端染色明显强于对照组, 即经过 ZSU2 蛋白处理的小白菜炭疽病菌菌丝尖端出现了几丁质的积累, 说明芝麻菜种子抗菌蛋白可能是通过菌丝尖端几丁质积累, 从而使菌丝生长受阻, 进而起到抑菌作用。

荧光绿( SYTOX Green) 是一种核酸染料, 能够轻松透过质膜受损的细胞使核酸染色, 不能穿过完整的活的细胞膜。由图 8 可知, ZSU2 蛋白处理组菌丝内有绿色荧光出现, 而对照组菌丝内无任何荧光, 说明 ZSU2 蛋白抑制小白菜炭疽病菌时, 小白菜炭疽病菌丝选择透过性增大, 细胞膜完整性被破坏, 从而使得荧光染料进入菌丝细胞内而显示绿色荧光, 对照组菌丝细胞膜未受到影响而不着色。在对紫甘蓝种子抗菌蛋白抑制落花生球腔菌 (*Mycosphaerella arachidicola*) 时, 抗菌蛋白同样引起细胞选择透过性的改变<sup>[16]</sup>。因而推测 ZSU2 蛋白可导致小白菜炭疽病菌菌丝细胞膜选择透过性的改变, 进而抑制菌丝的生长。

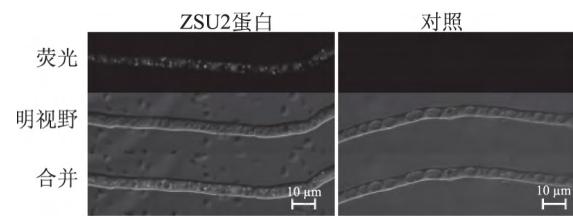


图 8 小白菜炭疽病菌荧光绿染色共聚焦电镜图

Fig.8 Fluorescence micrope images of

*Colletotrichum higginsianum* hyphae stained with SYTOX Green

## 3 结论

本研究通过破碎离心过滤、SP-Sephadex 柱层析、Mono S<sup>TM</sup> 5/50GL 柱层析和 Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300GL 柱层析等步骤, 从芝麻菜种子中分离纯化出一种抗菌蛋白 ZSU2。对 ZSU2 蛋白进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳鉴定, 对比发现, 经凝胶过滤柱层析后

得到的 ZSU2 蛋白达到电泳纯,且相对分子质量约为 12 kDa。通过纯化的 ZSU2 蛋白对苹果黑腐皮壳菌、凸脐蠕孢菌、玉米小斑病菌、落花生球腔菌、芭乐炭疽病菌、稻瘟菌、禾谷镰刀菌、灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌、小白菜炭疽菌和长柄链格孢菌共 12 种植物病原真菌的抑菌实验证明,ZSU2 蛋白具有广谱的抗真菌活性。根据温度、pH 和金属离子的稳定性实验,可知 ZSU2 蛋白具有良好的耐热、耐酸碱和金属阳离子耐受能力,对环境的适应能力较好。通过刚果红、荧光绿染色,激光共聚焦电子显微镜观察表明,经 ZSU2 蛋白处理的真菌菌丝尖端几丁质积累增加、细胞膜透性增大,细胞膜完整性被破坏,从而可能抑制了真菌菌丝的生长。

### 参考文献

- [1] 朱立成,罗辉,曾铂等.慈姑中抗真菌蛋白分离纯化初步研究[J].井冈山大学学报,2013,34(4):33-36.
- [2] Ye X J ,Ng T B ,Wu Z J ,et al. Protein from Red Cabbage (*Brassica oleracea*) seeds with antifungal, antibacterial, and anticancer activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(18): 10232-10238.
- [3] Chan Y S ,Wong H ,Fang F ,et al. An antifungal peptide from *Phaseolus vulgaris* cv.brown kidney bean [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2012, 44(4): 307-315.
- [4] 赵立娜,何庆燕,汪少芸.小红豆抗菌蛋白的分离纯化及其功能活性[J].食品工业科技,2017,38(24):95-99.
- [5] Chilos G ,Caruso C ,Caporale C ,et al. Antifungal activity of a bowman-birk-type trypsin inhibitor from wheat kernel [J]. Journal of Phytopathology, 2000, 148(7-8): 477-481.
- [6] Fujimura M ,Minami Y ,Watanabe K ,et al. Purification, characterization and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, F $\alpha$ -AMP1 and F $\alpha$ -AMP2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(8): 1636-1642.
- [7] Lin P ,Ng T B. Brassiparin, an antifungal peptide from *Brassica parachinensis* seeds [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(2): 554-563.
- [8] McManus A M ,Nielsen K J ,Marcus J P ,et al. MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a greek key  $\beta$ -barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 293(3): 629-638.
- [9] 郑灿伟,宾金华.植物抗真菌蛋白的抗菌机制[J].植物生理学通讯,2008,44(5):989-996.
- [10] Touch V ,Hayakawa S ,Commins T. Natural antimicrobial proteins: A review of current challenges and solutions for food applications [J]. Asian Journal of Food and Agro-Industry, 2009, 2(1): 1-16.
- [11] Hosseini E S ,Moniri R ,Goli Y D ,et al. Purification of antibacterial CHAP K protein using a self-cleaving fusion tag and its activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2016, 8(4): 1-9.
- [12] Jirovetz L ,Smith D ,Buchbauer G. Aroma compound analysis of *Eruca sativa* (Brassicaceae) SPME headspace leaf samples using GC, GC-MS, and olfactometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(16): 4643-4646.
- [13] 李昕悦,杨润强,王沛,等.芝麻菜种子萌发过程中芽苗生长和硫苷代谢[J].食品工业科技,2018,39(2):51-55,60.
- [14] 李磊,杨霞,周昇昇.植物化学物芝麻菜素的研究进展[J].食品科学,2012,33(19):344-348.
- [15] 吴建朋.芝麻菜种子中硫代葡萄糖苷(Glucoerucin)的分离纯化工艺研究[D].北京:北京化工大学,2013.
- [16] Miller H E ,Rigelhof F ,Marquart L ,et al. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables [J]. Journal of the American College of Nutrition, 2000, 19: 312-319.
- [17] Kim D O ,Padilla-Zakour O I ,Griffiths P D. Flavonoids and antioxidant capacity of various cabbage genotypes at juvenile stage [J]. Journal of Food Science, 2004, 69: 685-689.
- [18] Guo J T ,Lee H L ,Chiang S H ,et al. Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2001, 9: 96-101.
- [19] Melchini A ,Costa C ,Traka M ,et al. Erucin, a new promising cancer chemopreventive agent from rocket salads, shows anti-proliferative activity on human lung carcinoma A549 cells [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47: 1430-1436.
- [20] Park C J ,Park C B ,Hong S S ,et al. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris* [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 44(2): 187-197.
- [21] Lin P ,Xia L ,Ng T B. First isolation of an antifungal lipid transfer peptide from seeds of a brassica species [J]. Peptides, 2007, 28(8): 1514-1519.
- [22] Lin P ,Xia L ,Wong J H ,et al. Lipid transfer proteins from *Brassica campestris* and mung bean surpass mung bean chitinase in exploitability [J]. Journal of Peptide Science, 2007, 13(10): 642-648.
- [23] Lin P ,Ng T B. A novel and exploitable antifungal peptide from kale (*Brassica oleracea*) seeds [J]. Peptides, 2008, 29(10): 1664-1671.

全国中文核心期刊  
轻工行业优秀期刊