

桑叶凝集素分离纯化及抑菌活性研究

刘鹏举¹, 付志慧², 孙东¹, 关爱莹³, 马镛^{1*}¹ 沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110866; ² 沈阳师范大学数学与系统科学学院, 沈阳 110034;³ 沈阳化工研究院有限公司 新农药创制与开发国家重点实验室, 沈阳 110021

摘要: 采用磷酸缓冲液提取桑叶凝集素, 经硫酸铵分级沉淀法初步纯化、Cellulose DE-52 阴离子柱层析、CM-Sephacrose Fast Flow 阳离子柱层析、Sephadex G-75 分子筛柱层析对其进行逐级纯化, 采用牛津杯法进行抑菌活性测试。结果表明桑叶凝集素经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测显示为单一条带, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其亚基分子量为 35.95、30.35 KD; 该凝集素对供试菌具有较好的抑制作用, 对绿色木霉、苹果落叶病菌、西瓜枯萎病菌及烟草黑胫病菌抑菌直径分别为 20、30、15、18 mm。桑叶凝集素具有较好的抑菌活性, 可为新农药创制领域提供有用的天然产物先导化合物。

关键词: 桑叶凝集素; 抑菌活性; 天然产物先导化合物

中图分类号: Q512

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.022

Separation and Purification of Lectin from *Morus alba* L. and Its Antimicrobial Activity

LIU Peng-ju¹, FU Zhi-hui², SUN Dong¹, GUAN Ai-ying³, MA Di^{1*}¹ College of Biological Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; ² School ofMathematics and System Science, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China; ³ State Key Laboratory of

the Discovery and Development of Novel Pesticide, Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd., Shenyang 110021, China

Abstract: *Morus alba* lectin was firstly extracted with phosphate buffer and followed by a series of purification including ammonium sulfate graded precipitation. Further separation was carried out using Cellulose DE-52 chromatography, CM-Sephacrose Fast Flow chromatography and Sephadex G-75 sieve chromatography. The antimicrobial activity of *M. alba* lectin was finally tested using Oxford Cup method. The results showed that *M. alba* lectin displayed a single band detected with SDS polyacrylamide gel electrophoresis method and presented as 35.95 KD and 30.35 KD molecular weight. The lectin exhibited an inhibitory effect against *Trichoderma viride*, *Alternaria alternata* f. sp. mali, watermelon fusarium wilt and *Phytophthora parasitica* with antibacterial circle diameter of 20, 30, 15 mm and 18 mm, respectively. In summary, *M. alba* lectin exhibited an effective antimicrobial activity and therefore can be used as an useful natural lead compound for discovering and developing novel agrochemicals.

Key words: *Morus alba* lectin; antimicrobial activity; natural lead compound

人类对凝集素的认识最初是从其凝血活性开始的, 但后来的研究发现, 植物凝集素具有广泛的生物学作用, 如植物自身的保护作用^[1]; 抗真菌活性^[2], 如麦胚凝集素(WGA)能抑制绿色木霉(*Trichoderma viride*)孢子发芽及菌丝生长, 棉花抗病品种凝集素粗提物对棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum)孢子萌发的抑制率达 86% 以上; 杀虫活

性, 如雪花莲凝集素(GNA)对具有刺吸式口器的同翅目害虫(如蚜虫、褐飞虱等)、线虫以及咀嚼式害虫都具有杀伤性^[3], 抗病毒活性^[4-6]; 此外, 还对癌细胞具有凝集作用^[7]。

以天然活性物质作为先导化合物包括直接从天然产物中发现农药活性化合物和对天然化合物的化学结构改造或分子修饰, 进而研究开发出全新结构的农药品种, 是新农药研究的有效途径之一^[8,9]。到目前为止以天然产物为先导化合物开发的杀菌剂主要有乙蒜素、恶霉灵、肉桂酸衍生物(烯酰吗琳、氟吗琳)等^[8]。

收稿日期: 2014-03-21 接受日期: 2014-07-18

基金项目: 国家自然科学基金(11201313); 沈阳市重大科技项目;

沈阳农业大学校青年基金

* 通讯作者 E-mail: md1971@163.com

本文选取资源丰富成本低廉的桑叶为试验材料,依次采取硫酸铵初步纯化、Cellulose DE-52 阴离子柱层析、CM-Sepharose Fast Flow 阳离子柱层析、Sephadex G-75 分子筛柱层析对桑叶凝集素进行分离纯化,采用牛津杯抑菌试验法对其进行绿色木霉、苹果落叶病菌、西瓜枯萎病菌及烟草黑胫病菌等病菌的抑菌活性测定。期待通过本研究以评价凝集素在农业领域中作为抗菌剂应用的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

桑叶生药材购于沈阳中街同仁堂药店,粉碎后塑料袋密封备用。RPMI-1640 培养基为 GIBCO 公司产品。供试菌株:绿色木霉(*Trichoderma viride*)、烟草赤星病菌(*Alternaria longipes*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、苹果落叶病菌(*Alternaria alternata* f. sp. mali)、水稻恶苗(*Fusarium moniliforme*)、西瓜枯萎(*Watermelon Fusarium wilt*)、烟草黑胫(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)、玉米弯孢病菌[*Curvularia lunata* (Wakker) Boed]、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、玉米小斑病菌(*Bipolaria maydis*)、甜瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*),本试验的真菌来自于沈阳农业大学土地与环境学院微生物学实验室及生物科学技术学院的酶工程实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 桑叶凝集素的提取与纯化

1.2.1.1 硫酸铵分级沉淀法初步纯化 MAL

在冰水浴条件下向粗提液加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 达 20% 饱和度^[12],4 °C 下过夜,离心(8000 rpm),弃沉淀取上清,在冰水浴条件下向上清液加入固体硫酸铵达 50% 饱和度,4 °C 下过夜,再离心(同前),收集沉淀溶于蒸馏水中,对蒸馏水透析, Ba^{2+} 离子检测透析是否完全,取 3 mL 留作电泳,其余部分再对 PBS(0.01 mol/L, pH7.0) 充分平衡透析。

1.2.1.2 Cellulose DE-52 离子交换柱层析

将预溶胀的 Cellulose DE-52 用去离子水浸泡 2~3 h,用抽气泵充分抽气后装柱(2.6 × 30 cm),自然状态下充分沉降后,用 0.01 mol/L pH 7.0 PBS 平衡洗涤直至基线稳定平行。量取硫酸铵分级沉淀后的透析液 3 mL,低温离心(4000 rpm, 10 min, 4 °C)后,取 2 mL 上样。待样品液完全进入胶面后依次采用 0.01 mol/L pH7.0 PBS NaCl 浓度为 0~1000 mmol/L 进行分段洗脱,流速为 1.5 mL/min,检测器

量程为 0.1A,收集 A280 > 0.02 各峰,2% 兔血细胞凝血检测,将活性管合并,去离子水透析,冷冻干燥浓缩。

1.2.1.3 CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱

将预溶胀的 CM Sepharose Fast Flow 用去离子水浸泡 2~3 h,用抽气泵充分抽气后装柱(2.6 × 30 cm),自然状态下充分沉降后,用 0.01 mol/L pH 5.8 PBS 平衡洗涤直至基线稳定平行,量取 Cellulose DE-52 柱层析分离的凝集素样品浓缩液,低温离心(4000 rpm, 10 min, 4 °C)后,取 2 mL 上样。待样品液完全进入胶面后依次采用 0.01 mol/L pH5.8 PBS NaCl 浓度为 0~1000 mmol/L 进行分段洗脱,流速为 1.5 mL/min,检测器量程为 0.1A,收集 A280 > 0.02 各峰,2% 兔血细胞凝血检测,将活性管合并,去离子水透析,冷冻干燥浓缩。

1.2.1.4 Sephadex G-75 凝胶过滤柱层析

取 10 g Sephadex G-75 凝胶干粉加入 150 mL 0.01 mol/L pH7.0 PBS 缓冲液浸泡 72 h,充分溶胀后抽气泵抽气装柱(1.6 × 40 cm),充分沉降后,用 0.01 mol/L pH7.0 PBS 平衡洗涤直至基线稳定平行,将经 CM Sepharose Fast Flow 分离得到的活性样品 2 mL 上样,0.01 mol/L pH7.0 PBS 进行洗脱,收集 A280 > 0.02 各峰,2% 兔血细胞凝血检测,将活性管合并,去离子水透析,冷冻干燥得 MAL 纯品。

1.2.1.5 MAL 纯度检测

采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行 MAL 纯度检测,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 15%。

1.2.1.6 MAL 分子量测定

MAL 分子量测定采用 SDS-PAGE 法^[10]。

1.2.2 抑菌活性测定

培养基制备(PDA):马铃薯 200 g 去皮切成小块水煮 30 min,四层纱布过滤,滤液中加入蔗糖 20 g、琼脂 18 g,充分溶解,121 °C 灭菌 20 min, pH7.2 左右。

牛津杯法抑菌活性测定:取已活化的菌制成 1×10^6 个/mL 菌悬液,取 100 μL 菌悬液均匀涂布于培养皿内平板培养基上,待菌悬液完全渗入培养基后将牛津杯轻轻压在培养基上,向牛津杯中加入 MAL(1 mg/mL) 20 μL ,将培养皿盖好于 28 °C 培养 48~72 h,观察抑菌情况,以生理盐水做空白对照,每组做两个重复。测量每组的抑菌直径,测量 6 次取平均值。

2 实验结果

2.1 桑叶凝集素的提取与纯化

2.1.1 Cellulose DE-52 离子交换柱层析

桑叶凝集素粗提液经饱和度为 20% ~ 50% 硫酸铵分级沉淀并透析后过 Cellulose DE-52 离子交换柱。结果如图 1 所示。

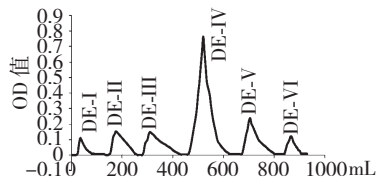


图 1 MAL 经 Cellulose DE-52 离子交换层析洗脱曲线

Fig. 1 Anion exchange chromatography of crude sample on Cellulose DE-52

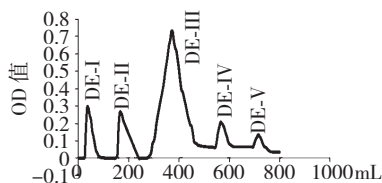


图 2 DE-IV 经 CM Sepharose Fast Flow 柱层析洗脱曲线

Fig. 2 Anion exchange chromatography of DE-IV on CM Sepharose Fast Flow

由图 1 可以看出,桑叶凝集素粗提液经 Cellulose DE-52 离子交换层析,不同 NaCl 浓度进行分段洗脱得到 6 个峰,第一个峰为穿透峰,后 5 个峰为洗脱峰。当 NaCl 浓度为 500 mM 时洗脱得到峰 DE-IV,经检测具有凝集活性。DE-III、DE-V 活性相对

于 DE-IV 而言较弱,因此将峰 DE-IV 进行浓缩,对 pH5.8 0.01 mol/L PBS 进行充分透析,准备过 CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱。

2.1.2 CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱

将收集的峰 DE-IV 经 CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱进行分段洗脱,使其进一步分离纯化,结果如图 2 所示。峰 DE-IV 可以吸附到 CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱上,并在 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时开始被洗脱下来。经检测,在层析所得的 5 个峰中,峰 CM-III 具有凝集活性。

2.1.3 Sephadex G-75 凝胶过滤层析

将 CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱分离后收集的 CM-III 样品液过 Sephadex G-75 凝胶柱。结果见图 3。Sephadex G-75 凝胶柱层析得到单一峰,经检测有凝集活性,说明桑叶凝集素粗提液经离子交换及凝胶过滤层析得到单一组分,冷冻干燥后即得桑叶凝集素纯品。

2.1.4 MAL 纯化结果

在 Cellulose DE-52 离子交换层析、CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤层析等纯化步骤后,对总蛋白含量、总活力、比活力、纯化倍数、回收率进行跟踪检测,及时考察所采用纯化工艺的合理性和可行性。结果如表 1。

结果说明,桑叶凝集素经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀后比活力提高并不是很大,蛋白质损失率也较小,回收率为 85%。但经过 Cellulose DE-52 离子交换层析后,MAL 粗体液被纯化了 5.3 倍且比活力也有了较大的提高,而且回收率仍能保持在 70%。最后经过分子筛层析后活力回收率为 40%,纯化倍数为 11.9 倍。

表 1 MAL 的纯化结果

Table 1 Results of MAL purification

步骤 Steps	总蛋白 Total protein(mg)	总活力 Total activity(U)	比活力 Specific activity($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	纯化倍数 Purification fold	回收率 Recovery(%)
粗提液提取	784.8	73619.0	93.8	1.0	100
20% ~ 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	589.6	62576.2	106.1	1.1	85
Cellulose DE-52	10.40	51533.3	495.5	5.3	70
CM Fsat Flow	45.6	40490.5	888.3	9.5	55
Sephadex G-75	26.5	29447.6	1113.3	11.9	40

2.1.5 MAL 纯度检测结果

将分离纯化后的凝集素纯品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,检测其纯度。如图 4 所示。

2.1.6 MAL 分子量测定结果

将纯化的桑叶凝集素进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,测定其分子量,结果如图 5 所示。推断出 MAL

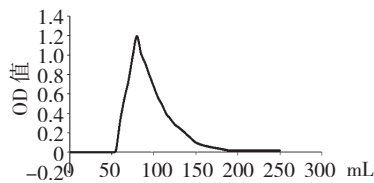


图3 CM-III 经过 Sephadex G-75 凝胶过滤柱层析洗脱曲线

Fig. 3 Gel filtration chromatography of CM-III on Sephadex G-75



图4 MAL PAGE 电泳结果

Fig. 4 Result of MAL PAGE

由两个不同亚基组成。利用凝胶成像系统测出亚基的迁移率,再根据标准蛋白分子量曲线计算出2种

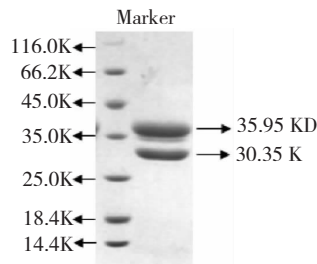


图5 MAL SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 5 Result of MAL SDS-PAGE

亚基的分子量分别为 35.95 KD、30.35 KD。

2.2 桑叶凝集素对真菌的抑制效果

选取绿色木霉、烟草赤星病菌等 11 种真菌,就桑叶凝集素对真菌的抑制作用进行抑菌试验。试验结果如表 2 及图 6 所示。

从图 6 可见,桑叶凝集素对供试菌中的绿色木霉、苹果落叶病菌、西瓜枯萎病菌及烟草黑胫病菌起到抑制作用。对苹果落叶病菌的抑制最强,抑菌直径达 30 mm,对烟草黑胫病菌的抑制能力较弱。

表 2 桑叶凝集素对真菌的抑制作用

Table 2 Antifungal activity of MAL

菌种名称 Strains of bacteria / fungi	抑菌直径 Inhibition diameter(mm)	菌种名称 Strains of bacteria / fungi	抑菌直径 Inhibition diameter(mm)
绿色木霉 <i>T. viride</i>	20.0	西瓜枯萎病菌 <i>Watermelon F. wilt</i>	15.0
烟草赤星病菌 <i>A. longipes</i>	0.0	烟草黑胫病菌 <i>P. nicotianae</i>	18.0
啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	0.0	玉米弯孢病菌 <i>C. lunata</i> (Wakker) Boed	0.0
苹果落叶病菌 <i>A. alternata</i> f. sp. mali	30.0	黑曲霉 <i>A. niger</i>	0.0
水稻恶苗 <i>F. moniliforme</i>	0.0	玉米小斑病菌 <i>B. maydis</i>	0.0
甜瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	0.0		

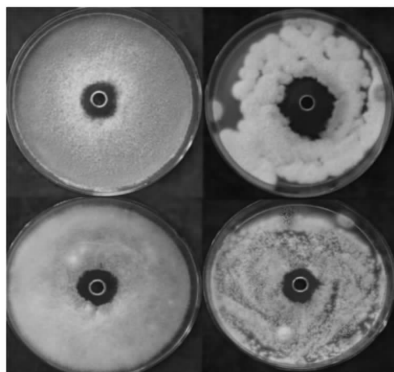


图6 MAL对绿色木霉(A)、苹果落叶病菌(B)、西瓜枯萎病菌(C)、烟草黑胫病菌(D)的抑制结果

Fig. 6 The inhibition of MAL to *Trichoderma viride*(a)、*Alternaria alternata* f. sp. mali (B)、*Watermelon Fusarium wilt*(C)、*P. nicotianae*(D)

3 分析与讨论

桑叶凝集素在经过硫酸铵分级沉淀之后过 Cel-luose DE-52 阴离子柱,分离之后得到 6 个洗脱峰,其中峰 DE- I 为穿透峰,经 2% 兔血检测无凝集活性。其余为氯化钠分段洗脱峰,其中 DE-IV 凝集活性较高,而 DE- II、VI 无活性,峰 DE- III、V 活性较低。峰 DE-IV 样品液经透析除盐和浓缩后过 CM Sepharose Fast Flow 离子交换柱,得 5 个峰,其中 CM- II、CM- III,具有凝血活性。但 CM- II 活性较弱,说明凝集素主要存在于 CM- III 部分中。CM- III 经 Sephadex G-75 柱层析分离后得到一个峰,具有凝集活性,说明凝集素已得到纯化,冻干后即得到桑叶凝集素纯品。

研究表明,该凝集素的分离纯化工艺稳定、合理可行。对绿色木霉、苹果落叶病菌、西瓜枯萎病菌、烟草黑胫等病菌具有较好的抑制作用。因此,对其结构进行鉴定,作为先导化合物用于开发新的农用杀菌剂将具有一定的应用前景。

参考文献

- 1 Sun C(孙册). The basic principle of lectins function and the oligosaccharide structure of glycoprotein. *Chemistry of Life*, 1994,2:36.
- 2 Chen HW(陈皓文), Sun PX(孙丕喜), Song QY(宋庆云). Exogenous lectins, powerful weapon of aquatic animals against the enemy. *J Oceanogr Huang Hai & Bo Hai Seas*(黄渤海海洋), 1995,13(3):61.
- 3 Powell KS, Gatehuse AMR, Damme EJM van, et al. Different antimetabolic effects of realated lectins towars nymphae stages of Nilapavata lugens. *Entomol Exp Appl*, 1995,112:1511-1540.
- 4 Balzarini J, Neyts J, Schols D, et al. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine) n-specific plant lectin from

Urtica dioica are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. *Antiviral Res*, 1992,18:191-207.

- 5 Jiang XX(姜晓旭), Tang XH(唐锡华). Physiological roles of lectins in plants. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1989,4:7-11.
- 6 Liu SZ(刘士庄). The research of relationship between cotton lectin and cotton blight. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1989,22(4):49-53.
- 7 Aub JC, Tieslau C, Lankester A. Reactions of normal and tumor cell to enzymes L wheatgerm lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc Natl Acad Sci*, 1963,50:613-619.
- 8 Liu CL(刘长令). The New Pesticide Research and Development of Corpus. Beijing:Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2002. 66-78.
- 9 Zhang YB(张一宾). Pesticide discovery methods- a review. *Agrochemicals*(农药), 2006,45:364-367.
- 10 Huang LB(黄丽波), Shen WZ(沈伟哉), Li YL(李药兰), et al. The extraction and purification of the red algae eucheuma lectin. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2007,17:406-408.

(上接第 461 页)

- 2 Yang XJ(杨晓杰), Fu XP(付学鹏), Liu ZD(刘泽东). Study on the anti-fatigue function of dandelion polysaccharide. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008,19:2686-2687.
- 3 Fu XP(付学鹏), Yang XJ(杨晓杰). Extraction and determination of the polysaccharides from Dandelion. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2007,23(5):37-39.
- 4 Bi FY(毕福永). Biochemistry and Molecular Biology Experiment Course (生物化学及分子生物学实验教程). Hefei: Anhui Science and Technology Press, 2006. 310.
- 5 Chen LH(陈莉华), Long JG(龙进国), Tan LY(谭林艳), et al. Extraction and purification of polysaccharides from Hong

Guo ginseng and the comparison of antioxidant activity. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013,25:170-073.

- 6 Luan J(栾洁), Chen YL(陈雅琳), Chu ZY(储智勇), et al. Cordyceps fruiting body impact on antifatigue and hypoxia capacity in mice. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2013,24:47-48.
- 7 Peng L(彭亮), Qin HY(覃辉艳), Zhao P(赵鹏), et al. Influences of herba cistance tea on the ability of anti-fatigue and anoxia endurance in mice. *Mod Pre Med* (现代预防医学), 2011,38:2362-2364.
- 8 Li B(李冰), Wang JF(王静凤), Fu J(傅佳), et al. Anti-fatigue effect of sea cucumber *Stichopus japonicus* in mice. *Food Sci* (食品科学), 2010,31:244-247.