

# 毛头鬼伞多糖 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白的影响

吴艳兵<sup>1,2</sup>, 谢荔岩<sup>1</sup>, 谢联辉<sup>1</sup>, 林奇英<sup>1,①</sup>

(1. 福建农林大学植物病毒研究所 生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建 福州 350002;  
2. 河南科技学院资源与环境学院, 河南 新乡 453003)

**摘要:** 对毛头鬼伞(*Coprinus comatus* Muell. ex Fr.) 子实体中的多糖 CCP60a 进行了提取分离及检测, 研究了不同温度条件下 CCP60a 对烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白体外聚合的影响, 并用 Western blotting 法研究了 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白表达的影响。结果表明, 经沸水浸提、乙醇分级沉淀、DEAE Sephadex A-25 离子交换柱层析、Sephadex-6B 凝胶柱层析和抗 TMV 活性跟踪检测可得到均一的多糖 CCP60a。随温度的提高, CCP60a 处理组在 320 nm 处的吸光度值增加幅度明显小于对照组, 表明 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白体外聚合有一定的抑制作用。Western blotting 检测结果显示, CCP60a 可以使 TMV 外壳蛋白的表达明显降低。

**关键词:** 毛头鬼伞; 多糖 CCP60a; 烟草花叶病毒(TMV); 外壳蛋白

中图分类号: Q539; S432.41 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2008)03-0063-04

**Effect of polysaccharide CCP60a from *Coprinus comatus* on TMV coat protein** WU Yan-bing<sup>1,2</sup>, XIE Li-yan<sup>1</sup>, XIE Lian-hui<sup>1</sup>, LIN Qi-ying<sup>1,①</sup> (1. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology of Ministry of Education, Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Department of Resources and Environment, He'nan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(3): 63-66

**Abstract:** The polysaccharide CCP60a was extracted and separated from the fruiting bodies of *Coprinus comatus* Muell. ex Fr. The effect of CCP60a on polymerization of TMV coat protein *in vitro* was studied under different temperatures, and the effect of CCP60a on expression of TMV coat protein was also tested by Western blotting method. The results showed that the homogeneous polysaccharide CCP60a was obtained by the boiling water extraction, ethanol precipitation, DEAE Sephadex A-25 column chromatography, Sephadex-6B gel column chromatography and anti-TMV activity examination. The increasing extent of absorbance value (320 nm) of CCP60a treatment group was smaller than that of the control with increasing of temperature, this showed that CCP60a had an inhibition effect on polymerization of TMV coat protein *in vitro*. The result of Western blotting test also indicated that CCP60a could obviously reduced the expression of TMV coat protein.

**Key words:** *Coprinus comatus* Muell. ex Fr.; polysaccharide CCP60a; tobacco mosaic virus (TMV); coat protein

毛头鬼伞(*Coprinus comatus* Muell. ex Fr.) 又名鸡腿蘑, 是一种营养丰富、肉质细嫩的名贵药兼食用真菌。毛头鬼伞性平味甘, 有益脾胃、清神宁智、增食欲及治疗痔疮等功效<sup>[1]</sup>, 还具有一定的降血糖、降血脂、提高免疫活性和抗肿瘤等生物学功能<sup>[2-5]</sup>。目前, 有关毛头鬼伞对植物病毒抑制作用的研究报道较少<sup>[6-9]</sup>。作者以毛头鬼伞子实体为实验材料, 经沸水浸提、乙醇分级沉淀、DEAE Sephadex A-25 离子交换柱层析、Sephadex-6B 凝胶柱层析和抗

TMV 活性跟踪检测得到均一的多糖 CCP60a, 并对其抗 TMV 外壳蛋白体外聚合和对 TMV 外壳蛋白表达的影响进行了研究, 以期对食用真菌多糖在防治

收稿日期: 2007-11-23

基金项目: 福建省教育厅专项科学基金项目(K04037); 福建省科学技术厅重点资助项目(99-Z-193); 河南科技学院高层次人才资助项目(20070021)

作者简介: 吴艳兵(1980—), 男, 山东东营人, 博士, 讲师, 主要从事生物农药的科研和教学工作。

① 通讯作者 E-mail: lingy908@yahoo.com.cn

植物病毒病害中的应用及研制新型的多糖类抗植物病毒制剂提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试的毛头鬼伞新鲜子实体购于市场;烟草花叶病毒(TMV)和心叶烟(*Nicotiana glutinosa* L.)由福建农林大学植物病毒研究所提供;侵染的寄主为普通烟草(*N. tabacum* L.)K326。

Western blotting检测用TMV抗血清(一抗)由福建农林大学植物病毒研究所提供;碱性磷酸标记羊抗兔IgG(二抗)为Sigma公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 毛头鬼伞多糖CCP60a的制备 将新鲜的毛头鬼伞子实体清洗干净后用匀浆机破碎,用沸水重复提取3次,合并提取液,浓缩,加无水乙醇沉淀,析出的沉淀冷冻干燥,获得粗多糖。将粗多糖用水溶解后采用Sevag法<sup>[10]</sup>[提取液为氯仿-正丁醇混合液(体积比4:1)]剧烈振荡20 min,离心除去中间层沉淀,重复此过程若干次,直至上清液中无蛋白质为止,浓缩,冷冻干燥后获得多糖CCP。将多糖CCP用水重新溶解后经体积分数40%~80%的乙醇分级沉淀和抗TMV活性跟踪检测得到毛头鬼伞多糖CCP60(即用体积分数60%乙醇沉淀后得到的多糖组分)。

将获得的CCP60上DEAE Sephadex A-25离子交换柱(1.5 cm × 70.0 cm)进行层析,分别用0、0.05、0.10、0.30和0.50 mol · L<sup>-1</sup> NaCl溶液进行梯度分段洗脱,流速10 mL · h<sup>-1</sup>,以每管5 mL分别收集洗脱液,经硫酸-苯酚法<sup>[11]</sup>和抗TMV活性跟踪检测所分离的多糖,再经Sephacrose-6B凝胶柱层析进行鉴定。

抗TMV活性跟踪检测采用枯斑半叶法。在TMV的枯斑寄主心叶烟的一半叶片上摩擦接种TMV与多糖等体积混合溶液,另一半叶片上摩擦接种TMV与清水等体积混合溶液,3 d后统计枯斑数,计算枯斑抑制率。

1.2.2 TMV外壳蛋白的制备 采用Fraenkel-Conrat等的醋酸法<sup>[12]</sup>进行烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白的制备,具体步骤如下:向冷的TMV溶液(5 g · L<sup>-1</sup>)中加入2倍体积冷的冰醋酸溶液(体

分数67%),4 ℃静置60 min(每隔10 min振荡1次),于3 500 r · min<sup>-1</sup>离心20 min;取上清液,用等体积冷水稀释后,在4 ℃条件下用重蒸水透析96 h(首次间隔4 h换水,以后每隔8 h换1次水),至提取溶液白色浑浊后停止透析;于透析后的提取溶液中加入3 mol · L<sup>-1</sup>醋酸钠缓冲液(pH 4.7)3~5滴,4 ℃、10 000 r · min<sup>-1</sup>离心30 min,将沉淀溶于0.033 mol · L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(PBS)中,即得TMV外壳蛋白溶液。于280 nm处用紫外分光光度计进行光谱分析,并对提纯的TMV外壳蛋白进行SDS-PAGE电泳<sup>[13]</sup>和Western blotting检测<sup>[14]</sup>,以确定其相对分子质量和纯度。

1.2.3 CCP60a对TMV外壳蛋白体外聚合影响的实验方法 使用0.033 mol · L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(4 ℃, pH 7.0)配制浓度为0.8 g · L<sup>-1</sup>的TMV外壳蛋白溶液,将CCP60a加入TMV外壳蛋白溶液中,使溶液中CCP60a的最终浓度为0.1 g · L<sup>-1</sup>。分别设置10 ℃、15 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃和40 ℃等7个温度处理,各处理组溶液在水浴锅中充分预热,参照Lauffer的方法<sup>[15]</sup>,以等浓度的TMV外壳蛋白溶液为参照,用紫外分光光度计在320 nm处进行不同温度下的光谱分析。

1.2.4 CCP60a对TMV外壳蛋白表达影响的实验方法 选取5~6叶期、株高相近的普通烟草植株,随机分为3组,每组15株,1组喷施0.1 g · L<sup>-1</sup> CCP60a溶液,另外2组喷施清水,分别作为阴性对照和阳性对照。喷施3 d后,阳性对照和处理组每株烟草分别接种等量同浓度的TMV,阴性对照不接种TMV;接种10 d后,分别摘取每株烟草的心叶,同一组心叶混合,随机称取0.2 g,分别加入2 mL 0.01 mol · L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH 7.2),研磨至匀浆后,12 000 r · min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清液进行SDS-PAGE电泳(分离胶质量体积分数12%,浓缩胶质量体积分数5%);电泳结束后进行转膜和Western blotting检测<sup>[14]</sup>。

## 2 结果和分析

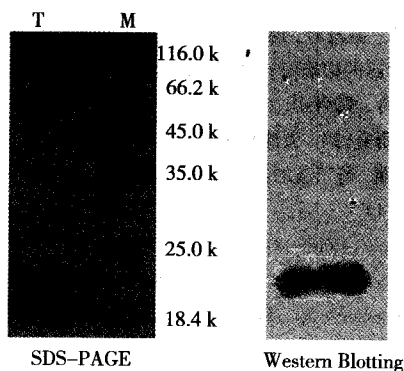
### 2.1 毛头鬼伞多糖CCP60a的鉴定

毛头鬼伞子实体粗多糖经乙醇分级沉淀和抗TMV活性检测得到毛头鬼伞多糖CCP60,将得到的CCP60上DEAE Sephadex A-25离子交换柱,分别

用  $0 \sim 0.50 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$  进行分段洗脱, 洗脱液经硫酸-苯酚法检测得到 1 个水洗脱峰和 2 个盐洗脱峰, 分别命名为 CCP60a、CCP60b 和 CCP60c, 经抗 TMV 活性跟踪检测得到抗 TMV 活性较高的多糖组分 CCP60a (即水洗脱收集组分 1~30, 第 1 个洗脱峰), 多糖 CCP60a 浓度为  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时对 TMV 的枯斑抑制率达到 89.07%, 获得的毛头鬼伞多糖 CCP60a 经 Sepharose-6B 凝胶柱层析鉴定为单一对称峰, 证明 CCP60a 为均一多糖组分。

## 2.2 TMV 外壳蛋白的纯度检测

对经醋酸法提纯的烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白进行紫外可见光谱分析, 在 280 nm 处有 1 个特征吸收峰, 这是蛋白质的特征吸收峰, 且只有 1 个主要吸收峰, 没有其他杂质峰存在, 说明所提取的 TMV 外壳蛋白纯度较好。经 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 的进一步检测 (图 1), 确定 TMV 外壳蛋白的相对分子质量大约为 20 000, 且纯度较高, 可以进行下一步的实验研究。



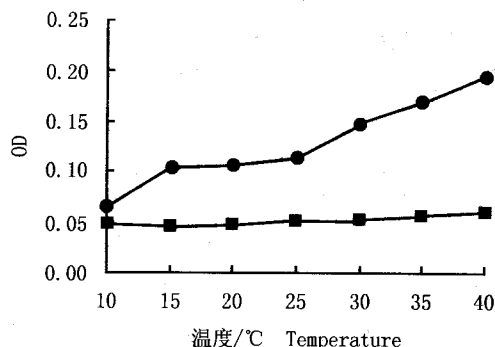
T: TMV 外壳蛋白 TMV coat protein; M: Ladder marker.

图 1 TMV 外壳蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测结果  
Fig. 1 Results of SDS-PAGE and Western blotting of TMV coat protein

## 2.3 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白体外聚合的影响

体外条件下, 在  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  的  $0.033 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中, TMV 外壳蛋白多以单体或寡聚体的形式存在, 随着温度的升高, TMV 外壳蛋白首先聚合成 20 S 聚合体, 然后进一步聚合成螺旋形管状堆砌体。毛头鬼伞多糖 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白体外聚合影响的检测结果见图 2。由图 2 可见, 在  $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  的温度范围内, 随温度的升高, 加入 CCP60a 的处理组及清水对照组在 320 nm 处吸光度

值增大, 但处理组在 320 nm 处的吸光度值增加幅度较缓, 且远远小于对照组的吸光度值。Lauffer 等的研究表明, 在 320 nm 处外壳蛋白的吸光度值与其自身的聚合程度成正比<sup>[15]</sup>, 且 TMV 外壳蛋白的体外聚合程度与温度变化也成正比关系。因此, CCP60a 能明显抑制 TMV 外壳蛋白的体外聚合, 说明 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白的聚合有较强的干扰作用, 不利于病毒粒子的进一步装配, 且未被装配的病毒核酸不能有效地在寄主体内进行长距离传播, 进而影响病毒的进一步发展。



—●—对照 CK; —■—CCP60a 处理组 CCP60a treatment group.

图 2 毛头鬼伞多糖 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白体外聚合的影响  
Fig. 2 Effect of polysaccharide CCP60a from *Coprinus comatus* Muell. ex Fr. on polymerization of TMV coat protein *in vitro*

## 2.4 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白表达的影响

毛头鬼伞多糖 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白表达影响的 Western blotting 检测图谱见图 3。由图 3 可以看出, 与阳性对照相比, CCP60a 处理组烟草与病毒特异性抗体结合的蛋白带颜色较淡, 说明毛头鬼伞多糖 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白的表达有较明显



1. 阳性对照 Positive control; 2. CCP60a 处理组 CCP60a treatment group; 3. 阴性对照 Negative control.

图 3 毛头鬼伞多糖 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白表达的影响  
Fig. 3 Effect of polysaccharide CCP60a from *Coprinus comatus* Muell. ex Fr. on expression of TMV coat protein

的抑制作用。

### 3 讨 论

游离的 TMV 核酸对寄主的侵染活性只有完整病毒颗粒侵染活性的 1%，部分被外壳蛋白包被的病毒粒子对寄主的侵染活性也明显低于完整的病毒颗粒，同时，未被装配的病毒核酸不能有效地在寄主体内进行长距离传播<sup>[16]</sup>。因此，病毒核酸与外壳蛋白相互作用，并装配成完整病毒颗粒使病毒保持正常的侵染活性，是病毒在寄主体内远距离传播及使病毒核酸免遭水解酶进攻的必需环节和重要环节。作为病毒装配的第一步，病毒的外壳蛋白必须先形成一定程度的多聚体，而后再与病毒核酸进行进一步组装，使之形成完整的病毒颗粒。如果抗病毒制剂对病毒外壳蛋白的聚合过程有干扰作用，则有可能对后续的组装步骤产生影响，进而对病毒在寄主体内的远距离传播和病毒的侵染活性产生抑制作用，从而达到抗病毒的效果。本研究结果表明，毛头鬼伞多糖 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白的体外聚合具有较强的抑制作用，说明 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白的聚合过程有较强的干扰作用，不利于病毒粒子的进一步装配，而未被装配的病毒核酸不能在寄主体内进行有效的长距离传播，从而影响病毒的进一步繁殖。

植物病毒的外壳蛋白在病毒的整个生命过程中起着非常重要的作用，如病毒的外壳蛋白与寄主的受体作用导致过敏反应或系统侵染等。TMV 外壳蛋白对烟草花叶病毒发病起到了决定性作用，TMV 外壳蛋白存在于叶绿体中，能特异地结合到光合系统 II (PSII) 上，阻止电子传递链中的电子传递，使光解水生成的氧原子不能生成氧气释放出来，大量的氧原子使叶绿素降解，从而破坏叶绿体的结构和功能<sup>[17]</sup>。抗病毒制剂作用于病毒外壳蛋白合成的任何一个步骤都可以干扰病毒在植物体内的繁殖。通过前期的抑制病毒复制实验和本研究中的 Western blotting 检测结果可以看出，毛头鬼伞多糖 CCP60a 能降低感染 TMV 寄主体内的病毒浓度，但 CCP60a 是否作用于 TMV 病毒外壳蛋白的合成过程或 TMV

病毒粒子的组装过程尚不清楚，有待进一步的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 暴增海. 鸡腿蘑的研究现状与展望[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1997, 11(1): 58-62.
- [2] 刘艳芳, 张劲松. 鸡腿蘑药理活性概述[J]. 食用菌学报, 2003, 10(2): 60-63.
- [3] 李师鹏, 安利国, 张红梅. 鸡腿蘑多糖对昆明小鼠血清溶菌酶活性影响的研究[J]. 中国食用菌, 2001, 20(4): 36-38.
- [4] 李师鹏, 苏蕾. 鸡腿蘑多糖的提取及其免疫活性和抗肿瘤活性的研究[J]. 中国商办工业, 2000(1): 44-45.
- [5] 崔旻, 张好建, 安利国. 鸡腿蘑多糖对肿瘤生长的抑制作用[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(3): 287-290.
- [6] 吴丽萍, 吴祖建, 林奇英, 等. 毛头鬼伞(*Coprinus comatus*) 中一种碱性蛋白的纯化及其活性[J]. 微生物学报, 2003, 43(6): 793-798.
- [7] 吴丽萍, 吴祖建, 林奇英, 等. 一种食用菌提取物  $\gamma$ 3 对烟草花叶病毒的钝化作用及其机制[J]. 中国病毒学, 2004, 19(1): 54-57.
- [8] 吴艳兵, 谢荔岩, 谢联辉, 等. 毛头鬼伞多糖抗烟草花叶病毒 (TMV) 活性研究初报[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 338-341.
- [9] 吴艳兵, 谢荔岩, 谢联辉, 等. 毛头鬼伞多糖对烟草酶活性和同工酶谱的影响[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 29-33.
- [10] 齐慧玲, 魏绍云, 王继伦, 等. Sevag 法去除蛋白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工, 2000(3): 20-21.
- [11] 张灿坤. 苦丁茶的原植物及商品调查[J]. 中药材, 1994, 17(3): 14.
- [12] Fraenkel-Conrat H, Williams R C. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1955, 41: 690-698.
- [13] 李建武, 肖能庚, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [14] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [15] Lauffer T T, Smith C E. Polymerization-depolymerization of tobacco mosaic virus protein[J]. Biochem, 1967, 6: 2457-2464.
- [16] 吴云峰. 植物病毒学原理与方法[M]. 西安: 西安地图出版社, 1999.
- [17] Reinero A, Beachy R N. Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves[J]. Plant Mol Boil, 1986, 6: 291-301.