

## 榆黄蘑中一种抗病毒蛋白的纯化及其抗 TMV 和 HBV 的活性\*

付鸣佳, 吴祖建, 林奇英\*\*, 谢联辉

(福建农林大学植物病毒研究所, 福建 福州 350002)

Purification of a Antiviral Protein in *Pleurotus citrinopileatus* and Its Activities against *Tobacco mosaic virus* and *Hepatitis B virus*

FU Ming-jia, WU Zu-jian, LIN Qi-ying\*\*, XIE Lian-hui

(Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** A antiviral protein, YP46-46, was isolated and purified to homogeneity from the mushroom, *Pleurotus citrinopileatus*, by precipitation of 40%-60% saturation of ammonium sulfate followed by DEAE-sepharose FF ion-exchange column chromatography, Sephacryl<sup>TM</sup> S-200 High Resolution molecular sieve chromatography. The protein has a molecular weight of about 27.4kD by SDS-PAGE. The concentration of the protein was 0.24 $\mu$ g/mL when the inhibition rate against *Tobacco mosaic virus* was 50%. Using an assay system based on HepG2.2.2.15 cell line, YP46-46 was studied for its inhibitory ability against *Hepatitis B virus*. The result shows that the concentration of 50% inhibition of HBsAg was 0.08 $\mu$ g/mL, but low effect on HBeAg.

**Key words:** Antiviral protein; *Tobacco mosaic virus*; *Hepatitis B virus*

**摘要:** 采用阴离子交换层析和凝胶层析方法从新鲜食用菌榆黄蘑(*Pleurotus citrinopileatus*)中进行了抗病毒蛋白的纯化, 结果获得了一个纯化蛋白 YP46-46, 经 SDS-PAGE 可确定其分子量为 27.4kD。以半叶法在枯斑寄主心叶烟上检测该蛋白对烟草花叶病毒(TMV)的抑制率, 发现有较好的抗 TMV 活性, 其抑制 TMV 的中浓度为 0.24 $\mu$ g/mL。同时以 HepG2.2.2.15 细胞株为模型, 对所获得的蛋白进行体外抗乙型肝炎病毒效果的评价。结果表明该蛋白对 HBsAg 的 50% 抑制时的浓度为 0.08 $\mu$ g/mL, 但对 HBeAg 效果不大。

**关键词:** 抗病毒蛋白; 烟草花叶病毒; 乙型肝炎病毒

中图分类号: S432.41; R373.2 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)04-0350-04

应用抗病毒蛋白防治植物病毒病和人类的某些病毒病, 已成为病毒病治疗和防治研究的重要内容。目前已经发现多种既可用于抗植物病毒病, 又可治疗人病毒病的蛋白<sup>[1,2]</sup>, 如美洲商陆抗病毒蛋白, 该蛋白可用于防治多种植物病毒病<sup>[3]</sup>和人类病毒病<sup>[4~6]</sup>。目前已经培育出该类蛋白的转基因作物, 在农业生产上用于防治作物的病毒病<sup>[7,8]</sup>; 而将抗病毒蛋白与单克隆抗体等具有导向性的分子结合, 可定向地杀死细胞内的病毒<sup>[2]</sup>。我国为乙型肝炎病

毒(Hepatitis B virus, HBV)感染的高发区, 抗乙肝病毒药物的研究一直受到普遍重视。在药物筛选方面, 许多研究者在非蛋白类药物方面做了不少工作。国内应用蛋白类药物防治 HBV 的研究还不多, 在蛋白类药物筛选方面还存在不少空白。本研究在从榆黄蘑中筛选抗烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)蛋白的同时, 应用 HepG2.2.2.15 细胞株<sup>[9]</sup>筛选抗 HBV 的蛋白类药物。

收稿日期: 2002-02-26, 修回日期: 2002-03-21

\* 基金项目: 教育部骨干教师资助项目。

作者简介: 付鸣佳(1964-), 男, 江西高安市籍, 在读博士生。

\*\* 通讯作者: 林奇英(1936-), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为植物病毒。

Correspondence author. Tel: 0591-3744714, E-mail: lingy908@yahoo.com.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

榆黄蘑 (*Pleurotus citrinopileatus*) 子实体鲜样得自福建农林大学菌草研究所,冻干或贮存于超低温冰箱中备用。

心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 作为筛选和检测用的枯斑寄主,普通烟  $K_{326}$  (*Nicotiana tabacum* var.  $K_{326}$ ) 作为保存繁殖 TMV 的寄主。

阴离子交换介质 DEAE-sepharoseFF 和凝胶层析介质 Sephacryl™ S-200 High Resolution 均购于 Amersham pharmacia biotech 公司。超滤管 Centricon-YM10 为 Millipore 公司产品。

低分子量标准蛋白:兔磷酸化酶 B (Rabbit Phosphorylase B, MW 97 400)、牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, MW 66 200)、兔肌动蛋白 (Rabbit Actin, MW 43 000)、牛碳酸酐酶 (Bovine Carbonic Anhydrase, MW 31 000)、胰蛋白酶抑制剂 (Trypsin Inhibitor, MW 20 100)、鸡蛋清溶菌酶 (Hen Egg White Lysozyme, MW 14 400) 为上海生化所产品。

HepG2.2.2.15 细胞株由福建医科大学免疫室李丹硕士惠赠;用 Eagle's MEM 液培养,内含 10% 的胎牛血清 (杭州江滨生物技术公司产品)、0.03% L-谷氨酰胺、100mg/L G418、100IU/mL 青霉素、100IU/mL 链霉素、100IU/mL 卡那霉素,5% NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 至 7.0。

MTT 干粉为 Fluka 公司产品;HBsAg 和 HBeAg 检测试剂盒为厦门新创科技有限公司产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 TMV 的提纯 采用 Gooding 方法<sup>[10]</sup>,经 200-300nm 紫外扫描确定纯度和病毒含量。

1.2.2 榆黄蘑中的抗病毒蛋白的获得 称取榆黄蘑子实体鲜样 150g,加入 300mL 蒸馏水和 1% 的  $\beta$ -巯基乙醇,捣碎,浸提 4-5h,后经 10 000r/min 离心 10min;上清液 40% - 60% 饱和度的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀,10 000r/min 离心 10min,弃上清得沉淀。将沉淀对蒸馏水溶解,10 000r/min 离心 10min,弃沉淀再得上清液,并以此上清液上 DEAE-SepharoseFF 阴离子交换柱,0-0.5mol/L 的 NaCl 梯度洗脱,收集洗脱峰,浓缩后上 Sephacryl™ S-200 High Resolution 凝胶层析柱,洗脱缓冲液为 0.01mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2) (内含 NaCl 浓度为 0.15mol/L),收集洗

脱峰, Centricon-YM10 脱盐和浓缩,进行活性检测,收集活性成分,即得纯化蛋白 YP46-46。

1.2.3 SDS-PAGE 采用 Laemmli 方法<sup>[11]</sup>,浓缩胶浓度 3%,分离胶浓度 15%。

1.2.4 蛋白浓度的确定 45 $\mu$ L 未知浓度的 YP46-46 蛋白液同 5 $\mu$ L 浓度为 10mg/mL 的牛血清白蛋白液 (做为标准蛋白液) 混合,按 1:1 的比例加入 50 $\mu$ L 加样缓冲液,上样进行 SDS-PAGE (方法同 1.2.3),每孔上样 30 $\mu$ L,三个重复;电泳结束后,经染色、脱色处理,最后在凝胶成像仪上观察拍照,对各加样泳道进行蛋白条带的面积积分,按面积比推算出 YP46-46 蛋白浓度。

1.2.5 YP46-46 蛋白抗 TMV 活性检测 采用半叶法接种,实验在 28 $^{\circ}$ C 温室中进行。以心叶烟作为 TMV 的枯斑寄主。用 0.01mol/L pH7.2 的磷酸缓冲液与浓度为 20 $\mu$ g/mL 病毒液混合 (V/V=1) 接种在枯斑寄主的左半叶上 (病毒含量为 20 $\mu$ g/mL),作为对照;用等量的 YP46-46 蛋白溶液 (缓冲体系为 0.01mol/L pH7.2 的磷酸缓冲液) 与上述相同浓度的病毒液混合 (V/V=1) 接种在枯斑寄主的右半叶上,作为处理。每个样品接种 5-6 片叶,待出现明显枯斑后,及时记录枯斑数。计算公式:

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - (\text{处理的枯斑数} / \text{对照的枯斑数})] \times 100$$

### 1.2.6 YP46-46 蛋白体外抗 HBV 检测

1.2.6.1 抗病毒蛋白 YP46-46 应用于 HepG2.2.2.15 细胞中:用胰蛋白酶将 HepG2.2.2.15 细胞分散成单个细胞悬液,按 10<sup>5</sup> 细胞/孔分别接种于 96 孔培养板,分别加入 100 $\mu$ L 培养液,于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 48h 后换入含 YP46-46 蛋白的培养液,每 3d 换新鲜含 Zb 蛋白培养液,共 4 次,换出的细胞上清液 -20 $^{\circ}$ C 保存,12h 后检测 HbsAg 和 HbeAg 及细胞存活率。

1.2.6.2 细胞存活率测定:参考 Mosmann 的 MTT 法测细胞存活率<sup>[12]</sup>。具体方法是:吸去培养板各孔中的培养液,加入 0.5mg/mL 的 MTT 液,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 培养 4h,加入 0.04mol/L 盐酸化异丙醇充分溶解,570nm 波长测 OD 值。细胞存活率 = (实验孔 OD 值 / 对照孔 OD 值)  $\times$  100%; 50% 毒性浓度 (CD<sub>50</sub>) 为实验孔存活细胞为对照孔 50% 时的药物浓度。

1.2.6.3 YP46-46 蛋白抗 HBV 药效测定 以 HBsAg 和 HBeAg 检测试剂盒检测 YP46-46 蛋白抗

HBV 的药效,检测方法参考说明书。以不含 YP46-46 蛋白培养液同时培养的 2.2.15 细胞上清液的检测结果为对照。抑制率 = [(对照孔 OD 值 - 实验孔 OD 值) / (对照孔 OD 值 - 阴性对照 OD 值)] × 100%; 50% 抑制浓度 (ID<sub>50</sub>) 为 HBsAg 或 HBeAg 抑制率为 50% 时的药物浓度。

1.2.6.4 结果的评价: YP46-46 蛋白抗 HBV 的效果以治疗指数 (TI) 评价, 即  $TI = CD_{50} / ID_{50}$ , 以药物第 9 天时的 TI 为标准, 其中  $TI > 2$  为有效低毒,  $1 < TI < 2$  为低效有毒,  $TI < 1$  为毒性作用。

1.2.7 YP-46-46 的凝集素活性 采用孙册方法<sup>[13]</sup>, 略加修改。第一孔 YP-46-46 蛋白的浓度为 56 μg/mL, 然后倍比稀释, 25 μL/孔, 所用缓冲液为 pH7.2 的 0.02 mol/L PBS (内含 0.2 mol/L 的 NaCl); 每孔加等体积 2% 的兔红细胞, 1h 后肉眼观察和显微镜观察结果。

## 2 结果

### 2.1 抗病毒蛋白 YP46-46 的纯化

榆黄蘑 40% ~ 60% 的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀悬浮液经 DEAE-SephroseFF 阴离子交换柱, 可获得一个主要的蛋白峰 (图 1)。收集该峰进行浓缩后再上 Sephacryl<sup>TM</sup>S-200 High Resolution 凝胶层析柱, 可得三个峰, 其中第三个峰为纯化的 YP46-46 蛋白 (图 2)。

### 2.2 纯化蛋白 YP46-46 的 SDS-PAGE 电泳

纯化的 YP-46-46 经 SDS-PAGE 以后, 只可见一条蛋白带 (图 3), 该蛋白带的分子量为 27 400, 同时说明 YP46-46 蛋白得到纯化。

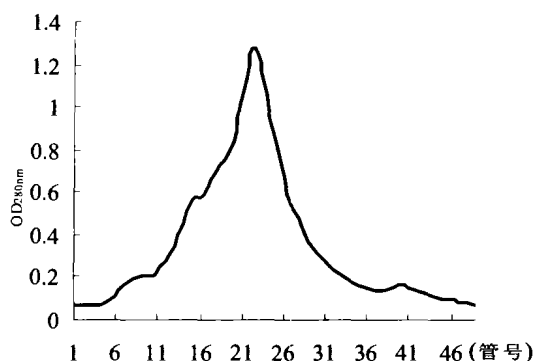


图 1 榆黄蘑粗汁液过 DEAE-SephroseFF 阴离子交换柱  
Fig.1 Ion-exchange chromatography of the protein crude extract on a DEAE-Sephrose column

### 2.3 YP-46-46 蛋白的抗 TMV 活性

以初始浓度为 1.751 μg/mL 的 YP-46-46 蛋白进行倍比稀释, 心叶烟为检测对象, 检测了 YP-46-46 对 TMV 的抑制活性 (表 1)。从表 1 可看出 YP-46-46 蛋白的抑制中浓度大约为 0.240 μg/mL。在此浓度以下, 该蛋白对 TMV 的抑制率急剧下降。

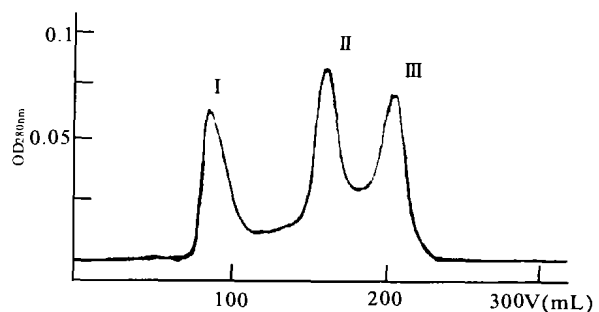


图 2 YP46-46 在 Sephacryl<sup>TM</sup>S-200 凝胶层析柱上的纯化  
Fig.2 YP46-46 purified by Sephacryl<sup>TM</sup>S-200  
III peak was yp46-46 protein.

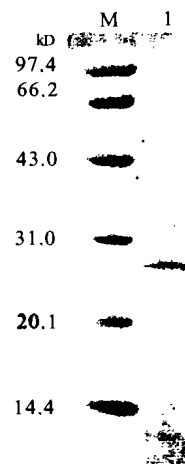


图 3 YP46-46 的 SDS-PAGE  
Fig.3 SDS-PAGE of YP46-46  
M, Protein marker; 1, YP46-46 protein

表 1 YP46-46 的抗 TMV 的活性

Table 1 Activities against TMV of YP46-46

YP46-46 浓度 (μg/mL)	0.976	0.488	0.244	0.122
抑制率 (%) (Inhibition)	86.8	63.1	53.0	0

### 2.4 YP-46-46 蛋白对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率

以初始浓度为 9.23 μg/mL 的 YP-46-46 蛋白进行 5 倍稀释, 设重复。从表 2 可看出 YP-46-46 蛋白对 HBsAg 有一定的抑制作用, 但在检测对 HBeAg 的抑制作用时发现效果不理想; 同时从实验中还可看出, 抑制 HBsAg 时  $TI > 2$ , 为有效低毒。

表 2 YP46-46 对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制效果

Table 2 Inhibitory effects of YP46-46 on HBsAg and HBeAg

YP46-46 的浓度 Conc. of YP46-46 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HBsAg (%)	HBeAg (%)	细胞存活率 (%) Rate of survival cell (%)
1.92	65.2	12.6	42.8
0.38	63.3	1.20	49.2
0.08	52.1	11.5	62.0
ID <sub>50</sub>	0.08		
CD <sub>50</sub>	0.38		
TI	4.75		

### 2.5 YP-46-46 蛋白的凝集素活性

经血凝滴度检测, 观察后发现该蛋白的凝集素滴度在 2<sup>7</sup>, 此时的蛋白工作浓度为 0.219 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 表明该蛋白确有凝集素活性。

## 3 讨论

在从食用菌中筛选抗植物病毒蛋白时, 我们对榆黄蘑进行了粗测, 发现确实存在抗植物病毒成分。以榆黄蘑的 40% - 60% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀悬浮液过 DEAE-SephroseFF 阴离子交换柱, 可见一个主要的蛋白峰; 收集该峰浓缩后上 Sephacryl<sup>TM</sup>S-200 High Resolution 凝胶层析柱, 收集第三峰的后一部分, 浓缩后经 SDS-PAGE 可确定一条分子量为 27.4kD 的单一蛋白带, 表明该蛋白基本纯化, 该蛋白暂时定名为 YP46-46 蛋白。将该纯化蛋白定量后进行抗植物病毒检测, 发现有较好的抗植物病毒活性, 其抑制中浓度为 0.240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 但是在此浓度以下, 抗病毒活性很快下降, 由此可推测在此浓度时存在一个抑制 TMV 的临界点。

以此纯化蛋白进行抗 HBV 的初步检测, 发现有抑制 HBsAg 的作用; 但在所测浓度范围内, 对 HBeAg 作用不明显或者说基本无作用。从目前研究的一些抑制 HBV 的药物来看, 大多数药物都是分子量不很大的大分子或低分子量化合物<sup>[14-16]</sup>, 这一类药物易被细胞吸收, 因此作用较为均匀。而本实验所纯化的 YP46-46 蛋白分子量为 27.4kD, 是否多亚基还未测定; 同时发现该蛋白有血凝活性, 可以预测在肿瘤细胞上或许有结合该蛋白的受体存在, 使得该蛋白进入细胞的情况较为复杂或者完全不能进入细胞中, 药物的作用显然受到影响, 因此这也正是本实验需要深入研究的方面。此外, 在研究中发现蛋白浓度较低的情况下, 细胞毒作用还是比较强的(见表 2), 尽管抑制 HBsAg 时的 TI > 2。综

合这些情况, 应用某些蛋白类药物在 HepG2.2.2.15 细胞株上检测抗 HBV 的药效, 在评价指标和给药方式上都值得商榷和研究。

### 参考文献

- [1] Verma H N, Baranwal V K, Srivastava S. Antiviral substance of plant origin[A]. Plant Virus Disease Control[C]. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 1998, 684.
- [2] Barbieri L, Battelli M G, Stirpe F. Ribosome-inactivating protein from plants[J]. Bioch Biophy Acta, 1993, 1154:237 - 282.
- [3] Chen Z C, White R F, Antoniw J F, et al. Effect of pokeweed antiviral protein(PAP) on the infection of plant virus[J]. Plant Pathology, 1991, 40: 612 - 620.
- [4] Ussery M A, Irvin J D, Hardesty B. Inhibition of poliovirus replication by a plant antiviral peptide[J]. Ann N Y Acad Sci, 1977. 284: 431 - 440.
- [5] Zarlino J M, Moran P A, Haffer O, et al. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4<sup>+</sup> cells by monoclonal antibodies[J]. Nature, 1990, 347: 92 - 95.
- [6] Aron G M, Irvin J D. Inhibition of herpes simplex virus multiplication by the pokeweed antiviral protein[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1980, 17: 1032 - 1033.
- [7] 张海燕, 田颖川, 周奕华, 等. 将高陆抗病毒蛋白(PAP)cDNA 导入油菜获得抗病转基因植株[J]. 科学通报, 1998, 43: 2534 - 2537.
- [8] Lodge J K, Kaniewski W K, Tumer N E. Broad spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993, 90: 7089 - 7093.
- [9] Sells M A, Chen M L, Acs G, et al. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84:1005 - 1009.
- [10] Gooding G V jr, Hebert T T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities[J]. Phytopathology, 1967, 57:1285.
- [11] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 22:680 - 685.
- [12] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65:55 - 63.
- [13] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987, 341 - 344.
- [14] 米 抒, 傅希贤, 张国庆, 等. 用 2.2.15 细胞株筛选抗乙型肝炎病毒药物的研究[J]. 中华医学杂志, 1992, 72:612 - 615.
- [15] 傅希贤, 张乃临, 张国庆, 等. 试用 2215 细胞进行乙肝病毒药物试验的初步结果[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1992, 6:143 - 146.
- [16] 吴 婷, 黄 海, 周 珮. 恩拉霉素抗乙型肝炎病毒的体外实验[J]. 中国病毒学, 1998, 13:45 - 49.