

• 药剂与工艺 •

蒙古黄芪中核糖核酸酶活性蛋白 AmPR-10 的纯化和性质研究

任晋宏¹, 王永辉¹, 薛慧清^{1*}, 刘 晔¹, Divid Adelson², 陈薛静¹, 李 敏¹, 高 丽¹

1. 山西中医药大学 实验中心, 山西 晋中 030619

2. 阿德莱德大学 生物信息与计算遗传学中心, 澳大利亚 南澳大利亚州 阿德莱德 5005

摘 要:目的 采用全自动智能蛋白纯化系统 AKTA Avant25 建立蒙古黄芪病程相关蛋白 (*Astragalus membranaceus* pathogenesis-related protein-10, AmPR-10) 的稳定快速分离纯化方法, 并分析其理化性质和生物学活性。方法 蒙古黄芪经 Tris-HCl 缓冲液浸提后阴离子交换色谱捕获目标蛋白, 疏水色谱精细分离, 凝胶过滤色谱进一步精细分离得到 AmPR-10。采用 MALDI-TOF/TOF 质谱法测定相对分子质量, 质谱检测后 MS/MS Ion Search 检索鉴定蛋白, 高碘酸-Schiff 法判断是否为糖蛋白, 琼脂糖凝胶电泳分析核糖核酸酶活性及不同影响因素对核糖核酸酶活性的影响。结果 蒙古黄芪粗提液经 Q Sepharose Fast Flow、Butyl Sepharose High Performance 和 SuperdexTM 75 10/300 GL 3 步纯化后可得到电泳纯 AmPR-10; 质谱测定其相对分子质量为 16 801; 蛋白鉴定其属于 PR-10 蛋白家族; 糖蛋白染色显示其不含糖链。AmPR-10 具有显著的核糖核酸酶活性, 且其活性对 NaCl 浓度、pH 值和金属离子的敏感度低, 仅 0.5 mol/L NaCl、pH 9.0、Mg²⁺和 Co²⁺对其有微弱的抑制作用, EDTA 对 AmPR-10 核糖核酸酶活性无影响。结论 离子交换色谱-疏水色谱-凝胶过滤色谱 3 步法纯化 AmPR-10 快速稳定, 可应用于其他中药蛋白质的分离纯化。AmPR-10 可能在蒙古黄芪抵御 RNA 病毒侵染中发挥重要作用。

关键词: 蒙古黄芪; AmPR-10; AKTA Avant25; 纯化; 核糖核酸酶; 活性蛋白; 生物学活性; MALDI-TOF/TOF 质谱法; 高碘酸-Schiff 法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)19-3945-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.008

Research on purification and activity characterization of AmPR-10 ribonuclease from *Astragalus membranaceus*

REN Jin-hong¹, WANG Yong-hui¹, XUE Hui-qing¹, LIU Ye¹, Divid Adelson², CHEN Xue-jing¹, LI Min¹, GAO Li¹

1. Experiment Centre, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Center of Bioinformatics and Computational Genetics, The University of Adelaide, Adelaide 5005, SA, Australia

Abstract: **Objective** To establish a stable and rapid separation and purification method for *Astragalus membranaceus* (Am) pathogenesis-related protein-10 (AmPR-10) using an automatic intelligent protein purification system AKTA Avant 25, and analyze its physiochemical and biological activity. **Methods** Am was extracted by Tris-HCl buffer. The crude extract was captured by anion exchange chromatography, and finely separated by hydrophobic chromatography and gel filtration chromatography. The relative molecular weight of AmPR-10 was measured by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry, the protein identification was determined by mass spectrometry and MS/MS Ion Search, the glycoprotein identification was estimated by periodic acid-Schiff method, and the ribonuclease activity and effect factors were analyzed by agarose gel electrophoresis. **Results** The electrophoretically pure AmPR-10 was obtained by three-step purification of Q Sepharose Fast Flow, Butyl Sepharose High Performance and SuperdexTM 75 10/300 GL from the crude extraction. The relative molecular weight of AmPR-10 was 16 801. AmPR-10 was highly homologous to PR-10 and has no carbohydrate chains. Incubated at 56 °C for 30 min, AmPR-10 exhibited significant ribonuclease activity to total RNA of

收稿日期: 2017-01-18

基金项目: 国家国际合作专项项目 (2013DFA30700); 山西省黄芪资源产业化及产业国际化协同创新中心项目 (HQXTCZX-007)

作者简介: 任晋宏, 硕士, 助教, 研究方向为蛋白质分离纯化、结构及功能研究。Tel: (0351)3179717 E-mail: jhren926@sina.com

*通信作者 薛慧清, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药及天然药物的提取分离及活性研究。

Tel: (0351)3179766 E-mail: xuehuiqing@sina.com

mammalian cells. The activity was insensitive to NaCl, pH value and metal ions, and weakly inhibited by 0.5 mol/L NaCl, pH 9.0, Mg^{2+} and Co^{2+} . The activity was the same at EDTA as high as 20 mmol/L. **Conclusion** The three-step method of exchange chromatography-hydrophobic chromatography-gel filtration chromatography, a stable and rapid separation and purification method of AmPR-10, can be applied for other Chinese herbs. AmPR-10 might play an important role in resistance against virus.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; AmPR-10; AKTA Avant25; purification; ribonuclease; active protein; biologic activity; MALDI-TOF/TOF mass spectrometry; periodic acid-Schiff method

黄芪为豆科蝶形花亚科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *monghoicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 具有补气升阳、固表止汗、脱毒生肌、利水消肿等功效, 是我国著名的常用滋补中药材^[1-3]。据《中国药典》2015年版记载^[4], 黄芪根含黄芪多糖、黄酮、皂苷、微量元素和氨基酸等多种有效成分, 在免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、抗应激、调节血糖和血压、抑制病毒、抗菌等方面具有显著疗效。黄芪化学成分分离及鉴定一直是黄芪研究的热点, 黄芪饮片 miRNA 谱研究也有报道^[5], 然而对于黄芪蛋白质的研究鲜少见到。近年来, 本课题组一直致力于蒙古黄芪蛋白质的分离纯化及药理学研究^[6], 前期研究表明, 蒙古黄芪蛋白质在佐剂性关节炎大鼠模型和实验性变态反应性脑脊髓炎小鼠模型中具有显著的免疫抑制作用^[7-8]。本实验采用全自动智能蛋白纯化系统 AKTA Avant25 从蒙古黄芪中提取、分离、纯化得到 1 个相对分子质量约为 1.6×10^4 的电泳纯蛋白, 并对其理化性质及生物学活性进行了初步探讨。

病程相关蛋白 (pathogenesis-related protein, PR) 是植物受到物理、化学刺激或生物压力时, 如微生物感染、乙烯刺激等, 开启自身防御机制, 上调部分基因表达所编码的蛋白的总称^[9-10]。PR 家族分为 17 类, PR-1 至 PR-17。PR-10 是一类由 154~163 个氨基酸残基组成, 微酸性, 对蛋白酶具有抗性的蛋白, 目前在 70 多种单子叶和双子叶植物中共鉴定得到超过 100 个 PR-10 蛋白。尽管关于 PR-10 的研究非常多, 但是对其功能尚无定论, 仍处于探索阶段^[9-10]。

蒙古黄芪蛋白质 (相对分子质量 1.6×10^4) 经鉴定与 PR-10 蛋白具有高度同源性, 因此命名为蒙古黄芪病程相关蛋白 (*Astragalus membranaceus* pathogenesis-related protein-10, AmPR-10)。同已报道的部分 PR-10 成员, 如 Bet v1、LaPR-10、GaPR-10、SPE、JcPR-10 等一样^[9], AmPR-10 也具有核糖核酸酶活性, 本实验对影响 AmPR-10 核糖核酸酶活性

的因素进行了详细研究, 可为 PR-10 功能确认提供基础研究。

1 材料与仪器

山西道地药材蒙古黄芪采自山西省浑源县黄芪种植基地, 经山西中医药大学植物鉴定教研室尚彩玲副教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *monghoicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。人正常肝细胞 HL7702 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。阴离子交换色谱填料 Q Sepharose Fast Flow (货号 17-0510-01)、疏水色谱填料 Butyl Sepharose High Performance (货号 17-5432-02)、凝胶过滤色谱预装柱 SuperdexTM 75 10/300 GL (货号 17-5174-01) 及 XK16/20 (货号 28-9889-37)、XK26/20 (货号 28-9889-48) 均购自通用电气公司; BCA 蛋白质定量试剂盒 (货号 AR0146) 购自武汉博士德生物工程有限公司; Amicon Ultra-15 10K (货号 UFC901096) 超滤管购自默克密理博公司; 糖蛋白染色试剂盒 (货号 24562) 购自赛默飞世尔科技公司; 总 RNA 提取试剂盒 (货号 9767) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 介子酸 (SA) 基质、磷酸盐缓冲液 (PBS) 等化学试剂均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。AKTATM Avant25 蛋白纯化系统, 美国通用电气公司; Multiskan FC 酶标仪, 美国赛默飞世尔科技公司。

2 方法与结果

2.1 分离纯化

2.1.1 蒙古黄芪粗提液 蒙古黄芪切段、粉碎, 1:10 料液比加入提取缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L NaCl, pH 8.0), 55 °C 恒温水浴浸提 1 h, 布氏漏斗滤过除去纤维、木质部等不溶于水的部分, 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液为蒙古黄芪粗提液^[9]。

2.1.2 Q Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱 Q Sepharose Fast Flow XK26/20 阴离子交换色谱柱为实验室自装柱。依据 $V_{\text{填料}} = \pi r^2 h_{\text{柱高}} / (80\% \times 90\%)$ 计算所需填料体积, 柱子填装参照 GE 说明书, ddH₂O

冲洗5个柱体积备用。柱子相关参数为色谱柱类型：离子交换色谱，填料名称：Q Sepharose Fast Flow，柱子名称：XK 26/20，最大柱前压：0.5 MPa，最大柱压差：0.3 MPa，推荐体积流量：8.0 mL/min，最大体积流量：12.0 mL/min，pH 值范围：2~12。

平衡：用 Buffer QA (25 mmol/L Tris, 10 mmol/L NaCl, pH 8.0) 平衡2个柱体积；上样：采用空气检测自动上样法；洗杂：用 Buffer QA 冲洗6个柱体积， $A_{280} < 100$ mAU；洗脱：0~50% Buffer QB 线性洗脱10个柱体积，100% B 梯度洗脱3个柱体积，每管15 mL 收集。Buffer QB 为25 mmol/L Tris, 1 mol/L NaCl, pH 8.0。SDS-PAGE 检测收集样品，合并含目标蛋白收集管备用。

阴离子交换色谱是依据样品中各种阴离子或阴离子化合物与固定相中阳离子交换剂的结合力不同而进行分离纯化的一类色谱。本实验中，蒙古黄芪粗提液离心后上样 Q Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱柱，带正电荷的杂蛋白因无法与色谱柱结合而首先被冲洗下来，带负电荷的 AmPR-10 与色谱柱结合良好，在7%~15% Buffer QB 之间被洗脱，结合 SDS-PAGE 胶图，收集1B4~2A3 样品进行下一步分离纯化（图1）。

2.1.3 Butyl Sepharose High Performance 疏水色谱
Butyl Sepharose High Performance XK16/20 疏水色谱柱为试验室自装柱。柱子填装步骤同上，柱子相关参数为色谱柱类型：疏水色谱，填料名称：Butyl

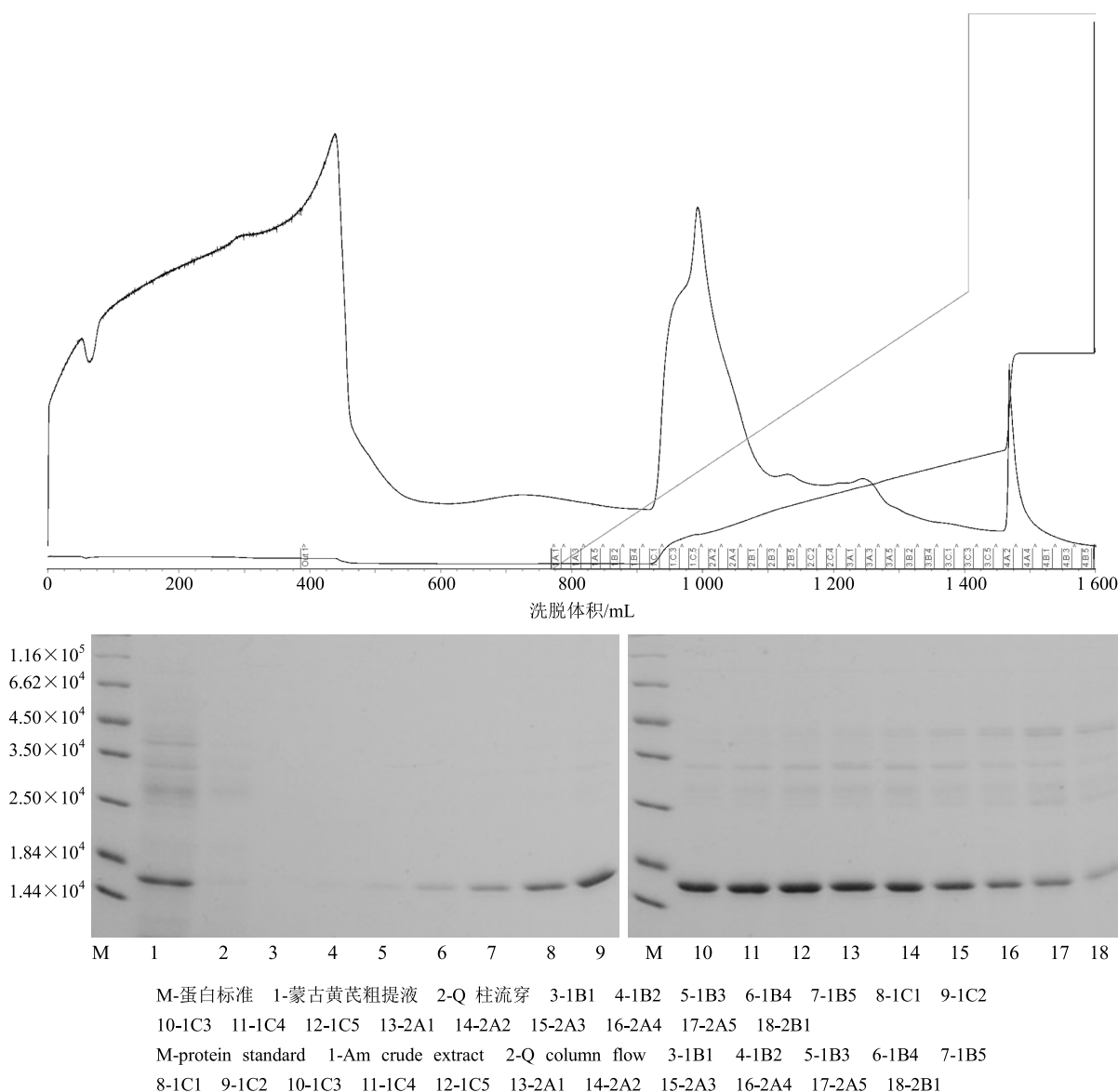


图1 Q Sepharose Fast Flow 色谱图和 SDS-PAGE 图

Fig. 1 Chromatography and SDS-PAGE of Q Sepharose Fast Flow

Sepharose High Performance, 柱子名称: XK 16/20, 最大柱前压: 0.5 MPa, 最大柱压差: 0.3 MPa, 推荐体积流量: 2.5 mL/min, 最大体积流量: 3.5 mL/min, pH 值范围: 3~13。

平衡: 用 Buffer HA (25 mmol/L Tris, 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8.0) 平衡 2 个柱体积; 上样: 采用空气检测自动上样法; 洗杂: 用 Buffer HA 冲洗 6 个柱体积, $A_{280} < 100$ mAU; 洗脱: 0~100% Buffer HB 线性洗脱 6 个柱体积, 100% B 梯度洗脱 3 个柱体积, 每管收集 5 mL。Buffer HB 为 25 mmol/L Tris, pH 8.0。SDS-PAGE 检测收集样品, 合并含目标蛋白

白收集管备用。

疏水色谱是依据生物大分子表面大多含有或强或弱的疏水区域, 在不同环境下, 可与各种疏水填料产生不同强弱的可逆结合而进行分离纯化的色谱。本实验中, 疏水性弱的杂蛋白首先被洗脱, 与疏水填料结合力强的 AmPR-10 在 88%~95% Buffer HB 之间被洗脱下来, 结合 SDS-PAGE 胶图, 收集 4A4~5A1 样品进行下一步分离纯化 (图 2)。

2.1.4 Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶过滤色谱 用超滤管浓缩上一步样品至 500 μL 。平衡: PBS 缓冲液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L

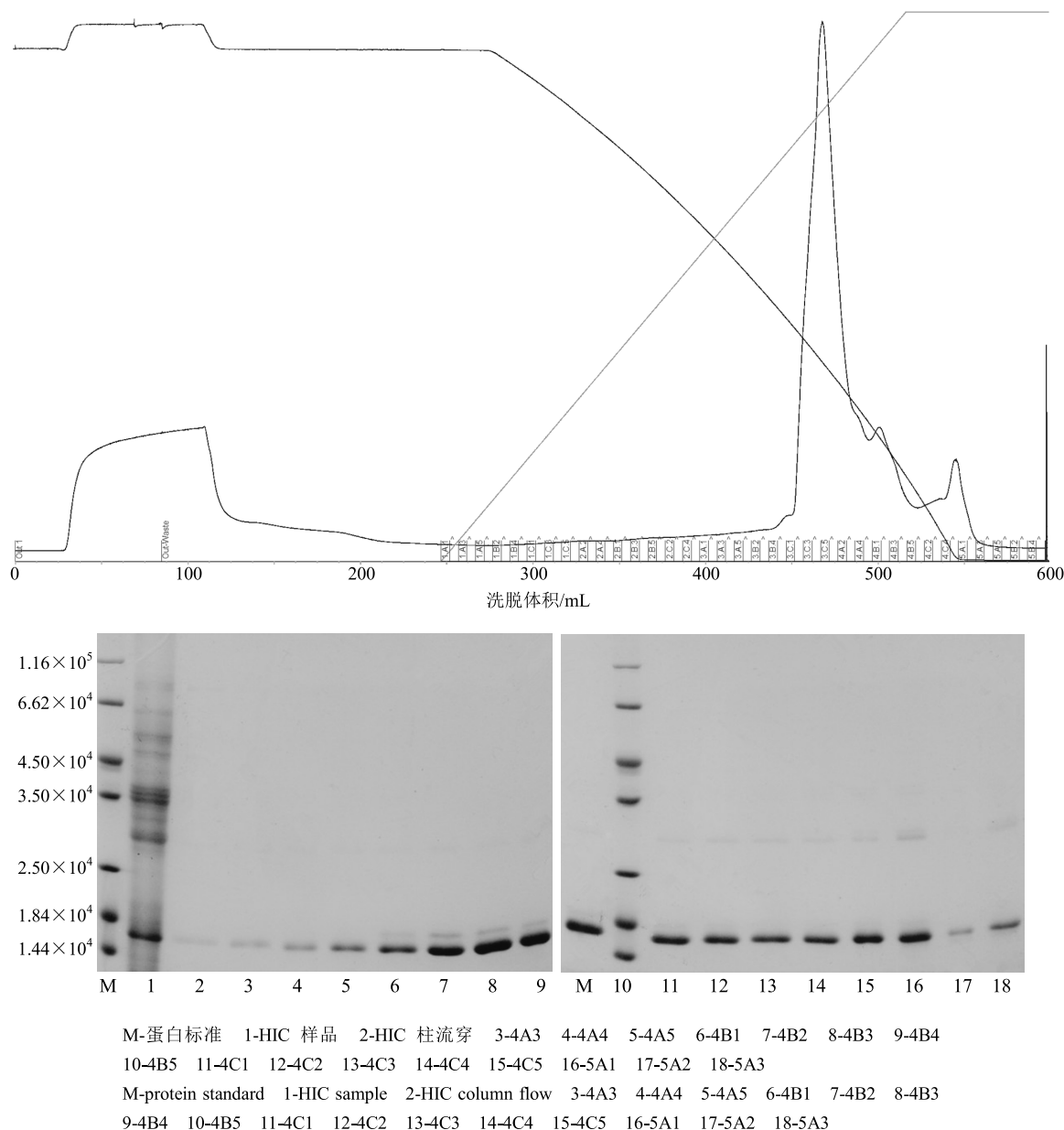


图2 Butyl Sepharose High Performance 色谱图和 SDS-PAGE 图

Fig. 2 Chromatography and SDS-PAGE of Butyl Sepharose High Performance

KH₂PO₄, 2 mmol/L Na₂HPO₄) 平衡 2 个柱体积; 上样: 采用 Loop 环上样; 洗脱: PBS 缓冲液洗脱 2 个柱体积, 每管 500 μ L 收集。SDS-PAGE 检测收集样品。凝胶过滤色谱是依据相对分子质量大小和性状进行分离纯化的一类色谱。Superdex 75 的分离范围为相对分子质量 $3 \times 10^3 \sim 7 \times 10^4$, AmPR-10 的相对分子质量为 16 801, 可用此填料。在本实验中, AmPR-10 在 12~13 mL 处被洗脱出来, 峰型对称, 且 SDS-PAGE 结果显示其可达到电泳纯, 能够满足理化性质及生物学活性的研究 (图 3)。

2.2 理化性质测定

2.2.1 相对分子质量 稀释 AmPR-10 至 1 mg/mL, 取 1 μ L AmPR-10 溶液与等体积 SA 基质混合, 采用 Bruker 公司 UltraFlexIII MALDI-TOF/TOF 质谱仪检测。结果显示, AmPR-10 的相对分子质量为 16 801 (图 4), 与 SDS-PAGE 中所得结果一致。

2.2.2 蛋白鉴定 采用 Thermo Fisher 公司 Q Exactive Mass Spectrometer 进行蛋白鉴定。SDS-PAGE 电泳分离获得目的条带, 胶内酶解后质谱检

测, 液相条件为进样 5 min 后, 先预柱脱盐然后梯度洗脱经 C₁₈ 毛细管柱进行肽段分离, 流动相 A 液为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 液为含 0.1% 甲酸的乙腈, 体积流量 200 nL/min。梯度洗脱程序为 5~60 min, 10%~85% B; 65~85 min, 85% B; 85~95 min, 100% A。质谱条件为正离子模式下, 氮气为雾化气, 氩气为碰撞气, 源温 100 $^{\circ}$ C, 锥孔电压 40 V, 毛细管电压 3 kV, 一级质谱质量扫描范围为 m/z 350~1 500, 二级质谱质量扫描范围为 m/z 50~2 000, DDA 模式对肽段自动进行 MS/MS 测定。数据采用 Matrixscience 公司 Mascot 软件进行 MS/MS Ion Search 检索。

结果显示, AmPR-10 与 PR-10 蛋白具有高度同源性, 但 PR-10 蛋白家族依据其序列同源性及其理化性质共分为 6 亚类, 需进一步得到 AmPR-10 的完整氨基酸序列后才能明确其详细亚类。

2.2.3 糖蛋白染色 采用 Thermo Scientific 糖蛋白染色试剂盒进行糖蛋白染色, 具体操作步骤为取出电泳后 SDS-PAGE 凝胶, 加入 100 mL 50% 甲醇溶

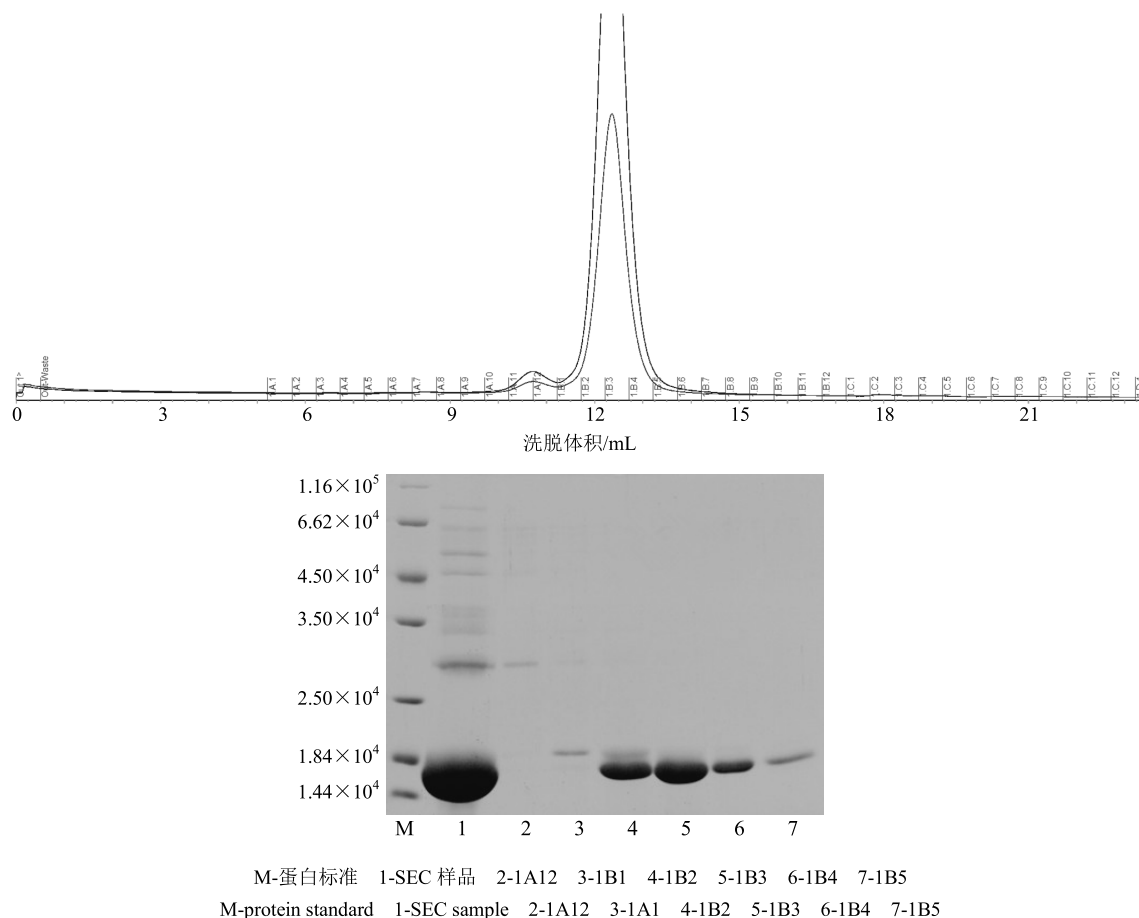


图 3 Superdex™ 75/300 GL 色谱图和 SDS-PAGE 图

Fig. 3 Chromatography and SDS-PAGE of Superdex™ 75/300 GL

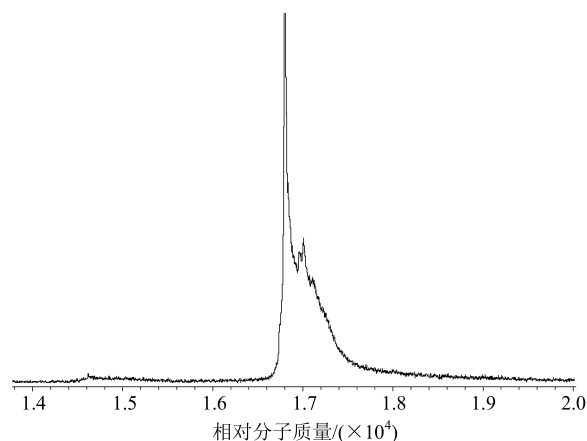


图4 AmPR-10 相对分子质量

Fig. 4 Molecular mass determination of AmPR-10

液, 摇床固定 10 min; 倾出甲醇溶液, 100 mL 3% 乙酸溶液震荡洗涤 10 min, 重复 1 次; 倾出乙酸溶液, 加入 25 mL 氧化剂, 摇床震荡 15 min; 倾出氧化剂, 100 mL 3% 乙酸溶液震荡洗涤 5 min, 重复 2 次; 倾出乙酸溶液, 加入 25 mL 糖蛋白染色液, 摇

床震荡 15 min; 倾出染色剂, 加入 25 mL 还原剂, 摇床震荡 5 min; 倾出还原剂, 3% 乙酸溶液洗涤; 倾出乙酸溶液, 加入蒸馏水, 可看到洋红色条带。

糖蛋白染色原理为通过氧化糖蛋白中的顺式二元糖基团形成醛基, 然后与染色试剂形成希夫碱键而产生品红色条带。试剂盒中带有阴性对照和阳性对照, 阴性对照为大豆胰蛋白酶抑制剂, 相对分子质量为 2×10^4 , 不含糖链; 阳性对照为辣根过氧化物酶, 相对分子质量为 4×10^4 , 是由酶蛋白和铁卟啉结合而成的糖蛋白, 含糖量 18%。图 5 中第 1 泳道为 AmPR-10, 图 5-A 考马斯亮蓝染色在 1.7×10^4 左右有蓝色条带, 而图 5-B 糖蛋白染色无条带, 说明 AmPR-10 不含有糖链, 不是糖蛋白; 第 2 泳道为阴性对照, 图 5-A 考马斯亮蓝染色在 2×10^4 左右有蓝色条带, 图 5-B 糖蛋白染色无条带; 第 3 泳道为阳性对照, 图 5-A 考马斯亮蓝染色在 4×10^4 左右有蓝色条带, 图 5-B 糖蛋白染色在 4×10^4 左右有洋红色条带。

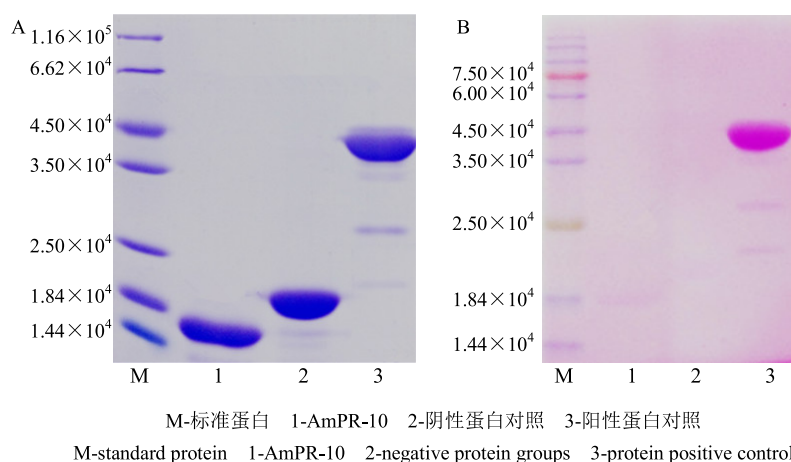


图5 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色 (A) 和糖蛋白染色 (B)

Fig. 5 Coomassie blue staining (A) and glycoprotein staining (B) of SDS-PAGE

2.3 核糖核酸酶活性测定

2.3.1 总 RNA 提取 采用 TaKaRa 柱式总 RNA 提取试剂盒提取 HL7702 细胞总 RNA, 具体操作步骤参照试剂盒说明书。采用分光光度法测定 RNA 浓度, 及 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 值。图 6 为从 HL7702 细胞中提取得到的总 RNA, 分光光度法测得其质量浓度为 $125.5 \mu\text{g/mL}$, A_{260}/A_{280} 为 2.01, A_{260}/A_{230} 为 2.38。 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 值可说明 RNA 的纯度, A_{260}/A_{280} 应在 2.0~2.2, 若小于 2.0 说明存在蛋白或有机物污染, 若大于 2.2 说明 RNA 已水解为单核苷酸。 A_{260}/A_{230} 应在 2.0~2.4, 若小于 2.0 说明存在乙

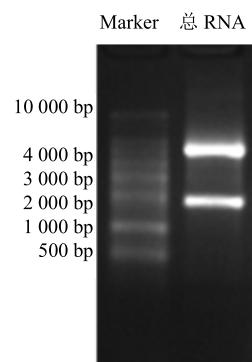


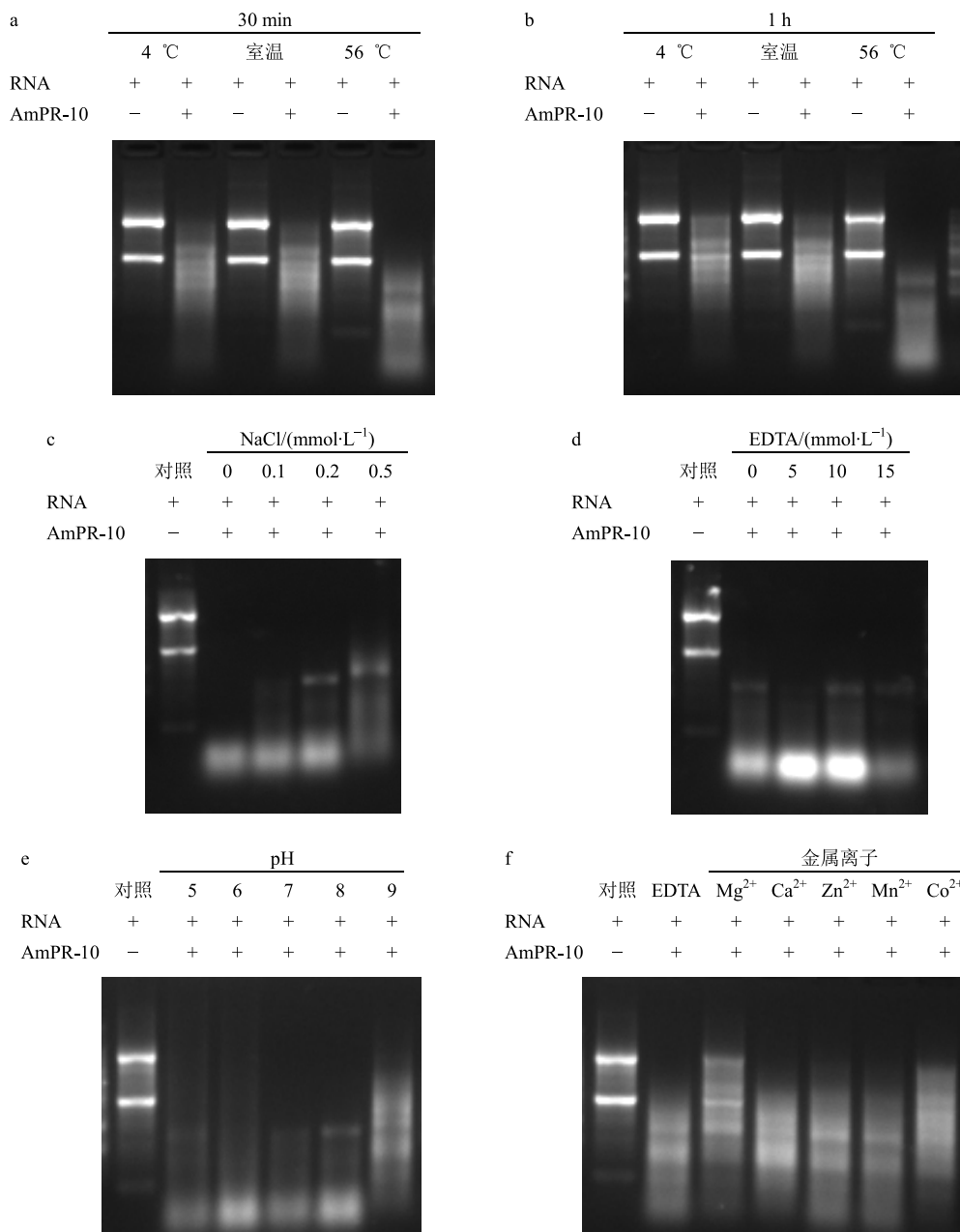
图6 HL7702 细胞总 RNA

Fig. 6 Total RNA of HL7702 cells

醇、异硫氰酸胍等残留,若大于 2.4 说明需用乙醇、乙酸盐沉淀 RNA。本实验提取得到的总 RNA 质量极佳,可用于核糖核酸酶活性的测定。

2.3.2 核糖核酸酶活性测定 分别稀释 AmPR-10 和总 RNA 至 1 mg/mL, 每个 EP 管中加入 3 μ L 的 AmPR-10 和 5 μ L 的总 RNA, 以 AmPR-10 缓冲液

为对照, 分别于 4 $^{\circ}$ C, 室温和 56 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min 和 1 h, 孵育结束后苯酚-氯仿法抽提除去 AmPR-10, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 降解程度。依据以上实验确定的孵育温度和时间, 检测不同 NaCl 浓度、不同 EDTA 浓度、不同 pH 值及不同 2 价金属离子对 AmPR-10 活性的影响。结果见图 7。



a、b-反应温度及反应时间对 AmPR-10 核糖核酸酶活性的影响 c-NaCl 浓度对 AmPR-10 核糖核酸酶活性的影响 d-EDTA 对 AmPR-10 核糖核酸酶活性的影响 e-不同 pH 值对 AmPR-10 核糖核酸酶活性的影响 f-金属离子对 AmPR-10 核糖核酸酶活性的影响 +表示加入 -表示未加入

a, b-sensitivity of RNase activity of AmPR-10 to temperature and time c-sensitivity of RNase activity of AmPR-10 to NaCl concentration d-sensitivity of RNase activity of AmPR-10 to EDTA e-sensitivity of RNase activity of AmPR-10 to pH f-sensitivity of RNase activity of AmPR-10 to metal ions + mean join in - mean not join in

图 7 AmPR-10 核酸酶活性
Fig. 7 RNase activity of AmPR-10

图 7-a 结果显示, AmPR-10 在 4 °C、室温和 56 °C 条件下均具有核糖核酸酶活性, 且随孵育温度升高, 活性增强, 在 56 °C 条件下核糖核酸酶活性最显著。孵育时间比较实验结果显示, AmPR-10 与总 RNA 孵育 30 min 和孵育 1 h 的效果相差甚微。因此确定实验条件为 56 °C, 恒温孵育 30 min。

随着 NaCl 浓度的升高, AmPR-10 的核糖核酸酶活性表现出一定的抑制作用, 但当反应体系中的 NaCl 浓度达到 0.5 mol/L 时, AmPR-10 仍保留部分核糖核酸酶活性, 说明 AmPR-10 的核糖核酸酶活性对盐浓度的敏感度低, 如图 7-c 所示。

随着 EDTA 浓度的升高, AmPR-10 的核糖核酸酶活性无变化, 即使 EDTA 浓度达到 20 mmol/L, AmPR-10 仍具有良好的核糖核酸酶活性。因 EDTA 可与金属离子络合形成络合物, 所以若酶活性中心存在金属离子, EDTA 的加入可使酶失活。在本实验中, EDTA 不影响 AmPR-10 的核糖核酸酶活性, 可推测金属离子不是 AmPR-10 发挥活性所必须的, 如图 7-d 所示。

反应体系 pH 值分别为 5、6、7、8 时, AmPR-10 均具有良好的核糖核酸酶活性, 当反应体系的 pH 值为 9 时, AmPR-10 的核糖核酸酶活性被部分抑制, 可见 AmPR-10 的核糖核酸酶活性的作用 pH 值范围很广, 如图 7-e 所示。

本实验分别探究了 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 对 AmPR-10 核糖核酸酶活性的影响, 结果显示, Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 对 AmPR-10 核糖核酸酶活性基本无影响, Mg^{2+} 和 Co^{2+} 对 AmPR-10 核糖核酸酶活性有轻微抑制作用, 如图 7-f 所示。

3 讨论

目前蒙古黄芪蛋白质在氨基酸序列、等电点、结构等方面数据匮乏^[12], 因此, 建立蒙古黄芪蛋白质提取、分离、纯化工艺需经长时间摸索和多次反复实验。本课题组首先采用单因素考察和正交试验优选得到 AmPR-10 的最佳提取条件为 Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液, 1:10 料液比, 55 °C 提取 1 h^[6]。之后, 因蒙古黄芪粗提液成分复杂, 第 1 步采用离子交换色谱捕获目标蛋白, 分别试了 SP Sepharose FF, DEAE Sepharose FF 和 Q Sepharose Fast Flow 3 种填料, 因 AmPR-10 与 Q Sepharose Fast Flow 结合力强, 流穿较少, 所以选定 Q Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱进行粗分离。第 2 步采用疏水色谱, 分别试了 Butyl-s FF、Octyl FF、Phenyl FF (high sub)、

Phenyl FF (low sub)、Butyl HP、Phenyl HP 和 Butyl FF 7 种填料, 因 Butyl HP 的分离效果好, 且峰型对称, 所以选择 Butyl HP 疏水色谱进行第 2 步精细分离。第 3 步采用凝胶过滤色谱, Superdex™ 75 10/300 GL 预装柱分辨率高, 同时可实现缓冲液置换, 所以最后 1 步选择 Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶过滤色谱得到能够满足理化性质测定、活性分析, 甚至晶体结构解析要求的目标蛋白。本实验采用自动化智能蛋白纯化系统 AKTA Avant25, 结合不同类型色谱柱特点, 建立了离子交换色谱-疏水色谱-凝胶过滤色谱 3 步法纯化蒙古黄芪蛋白质的方法路线, 从提取到分离纯化到电泳纯 AmPR-10 可在 36 h 内完成, 且方法的稳定性高, 多次重复实验结果一致。此方法可应用于建立其他中药材蛋白质的提取和分离纯化路线。

质谱蛋白鉴定结果表明 AmPR-10 与 PR-10 蛋白具有高度同源性, MALDI-TOF 质谱法测得其相对分子质量为 16 801, 糖蛋白染色鉴定其不含糖链。本课题组已测定了蒙古黄芪转录组, 下一步预通过质谱蛋白鉴定数据与蒙古黄芪转录组数据进行对比从而获得 AmPR-10 的完整氨基酸序列, 且纯化得到的 AmPR-10 纯度高、峰型对称, 预采用 X-ray 衍射法对其进行三级结构解析。

PR-10 蛋白在植物中广泛分布, 因此推测其具有重要的生物学功能, 已有研究表明 PR-10 在降解 RNA^[13]、抑制木瓜蛋白酶活性^[14]、抗菌抗病毒^[15]、植物防冻^[16]、蛋白存储、配体结合等方面具有一定活性, 但确切功能尚无定论^[9]。本实验对 AmPR-10 的核糖核酸酶活性进行了研究, 结果表明 AmPR-10 可降解哺乳动物细胞总 RNA, 且 NaCl 浓度、pH 值和金属离子对 AmPR-10 的核糖核酸酶活性的影响甚微, 仅在 0.5 mol/L NaCl、pH 9.0、 Mg^{2+} 和 Co^{2+} 存在的条件下对其活性有轻微影响, 20 mmol/L EDTA 对 AmPR-10 的核糖核酸酶活性完全无影响, 推测其作为病程相关蛋白家族的一员, 在不同的生态环境中, 可能通过降解病毒 RNA 的方式帮助植物抵御病毒的侵袭, 下一步预对 AmPR-10 的抗病毒活性进行研究, 并期望从三级结构中获得与功能相关的信息。

参考文献

- [1] Auyeung K K, Han Q B, Ko J K. *Astragalus membranaceus*: A review of its protection against inflammation gastrointestinal cancer [J]. *Am J Chin Med*,

- 2016, 44(1): 1-22.
- [2] 熊一峰, 万燕晴, 李 科, 等. 山西恒山地区蒙古传统黄芪和移栽黄芪的质量差异研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 1635-1643.
- [3] 刘德旺, 龚苏晓, 朱雪瑜, 等. 蒙古黄芪药材、生饮片及其炮制品质量差异性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 905-910.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 沈朝斌, 蔡 红, 郁 兰. 黄芪饮片 miRNA 谱及热力学的稳定性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3079-3085.
- [6] 陈秀红, 魏砚明, 任晋宏, 等. 蒙古黄芪中 2 种具有免疫活性的可溶性粗蛋白的提取工艺优选 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2641-2649.
- [7] 赵俊云, 杨向竹, 季新燕, 等. 黄芪糖蛋白诱导佐剂性关节炎大鼠体内细胞凋亡的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1204-1207.
- [8] 章培军, 郭敏芳, 张丽江, 等. 黄芪糖蛋白小鼠 EAE 的作用研究 [J]. 山西大同大学学报: 自然科学版, 2012, 28(5): 42-44.
- [9] Fernandes H, Michalska K, Sikorski M, *et al.* Structural and functional aspects of PR-10 [J]. *FEBS J*, 2013, 280(5): 1169-1199.
- [10] Sliwiak J, Dolot R, Jaskolski M. Crystallographic and CD probing of ligand-induced conformational changes in a plant PR-10 protein [J]. *J Struct Biol*, 2016, 193(1): 55-66.
- [11] 齐笑玮, 闫巧娟, 江正强, 等. 黄芪中一种新的 PR-10 蛋白的纯化和性质 [J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(4): 15-18.
- [12] Li J, Qu Z P, Adelson D, *et al.* Long read reference genome-free reconstruction of a full-length transcriptome from *Astragalus membranaceus* reveals transcript variants involved in bioactive compound biosynthesis [J]. *Cell Discov*, 2017, 17031(3): 1-13.
- [13] Krishnaswamy S, Baral P K, James M N, *et al.* Site-directed mutagenesis of histidine 69 and glutamic acid 148 alters the ribonuclease activity of pea ABR17 (PR10.4) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(9): 958-962.
- [14] Chwastyk M, Jaskolski M, Cieplak M. Structure-based analysis of thermodynamic and mechanical properties of cavity-containing proteins case study of plant pathogenesis-related proteins of class 10 [J]. *FEBS J*, 2014, 281(1): 416-429.
- [15] Casanal A, Zander U, Munoz C, *et al.* The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis metabolic intermediates [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(49): 35322-35332.
- [16] Sliwiak J, Dauter Z, Jaskolski M. Crystal structure of Hyp-1, a hypericum perforatum PR-10 protein, in complex with melatonin [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 668(7): 1-10.