

研究简报 ·

## 真菌寡糖诱导植物抗性活性成分的分纯化

石瑛, 辛毅, 白雪芳, 杜昱光\*

(中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

### Isolation and Purification of Oligosaccharide Elicitor from A Fungi Strain

SHI Ying, XIN Yi, BAI Xue-fang, DU Yur-guang\*

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract** Oligosaccharides derived from cell wall of fungal DL603 were isolated and purified. The hydrolysis of the fungal DL603 with enzyme G603 was conducted, and ion exchange and gel filtration chromatography were exploited for purification of the products. Biologically active fractions were determined by soybean cotyledon assay. Dionex high performance anion exchange chromatography (HPAEC) analysis showed that the oligosaccharides were purified with certain degree of polymerization, and the highest active fractions consisted of glucosamine, galactose, glucose and mannose.

**Key words** oligosaccharide, induced resistance, active compound, isolation and purification  
中图分类号 Q946

寡聚糖作为一种信号分子,在调节植物的生长、发育以及植物在不同环境中生存能力等方面起着非常重要的作用<sup>[1]</sup>.许多特定结构的寡糖被证明具有诱导植物抗性的作用.对具有诱导抗性作用的葡聚寡糖结构分析表明,其最小活性寡糖单位是由7个葡萄糖残基组成的 $\alpha$ -葡聚糖苷,在一个 $\alpha$ -连接的葡聚糖残基主链上带有两个 $\alpha$ -葡糖残基侧链,而且分支的残基之间有一段主链残基分隔<sup>[2,3]</sup>.这对于大豆植保素的积累是必需的<sup>[4]</sup>,所以诱抗活性寡糖对其结构有特定的要求.

本文对真菌寡聚糖(葡聚寡糖)粗提物进行了制备、分离、提纯和生物活性测定,用Dionex高效阴离子液相色谱层析对纯化的寡聚糖进行了化学组分分析.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

棉花种子中棉19号由陕西省植物保护研究所提供.棉花黄萎病菌种(*V. dahliae*):泾阳菌系由陕西农科院植保所棉病组提供.DL603真菌由本实验室分离保存菌种.真菌细胞壁寡聚糖、G603酶由本实验室提供.25%多菌灵WP:江苏省江阴农药厂,市

购.

### 1.2 寡聚糖粗提物的制备

DL603菌采用逐级放大的方法培养,即在斜面培养基[马铃薯20%,葡萄糖2%,琼脂1.5%(W/V)]中培养4d,液体培养基[马铃薯20%,葡萄糖2%(W/V)]中培养4d,发酵培养基[酵母粉1.6%,葡萄糖2%,NaCl0.3%(W/V)]中培养7d,培养温度均为26℃.将发酵培养得到的菌丝体及培养基混合物在8000g,离心20min,弃去上清液,即得到DL603菌的湿菌丝体.冷冻保存备用.取DL603菌湿菌丝体25g,悬浮于250ml蒸馏水中,加入G603酶250mg,在35℃,磁力搅拌下酶解3h,煮沸10min中

收稿日期:2003-03-10,接受日期:2003-04-29

国家高技术研究发展计划(863计划)项目(No. 2001AA620501, No. 2002AA245131)

\*联系人 Tel:0411-4379061, Fax:04114379061

E-mail: duyg@dicp.ac.cn

石瑛,女,1976年10月生,硕士,助理研究员

Received: March 10, 2003; Accepted: April 29, 2003

Supported by the National High New Technology Development Plan "863"(No. 2001AA620501, No. 2002AA245131)

\* Corresponding author Tel: 0411-4379061, Fax: 0411-4379061

E-mail: shiyg@dicp.ac.cn

止反应.寡聚糖含量的测定采用蒽酮-硫酸法<sup>[5]</sup>.

### 1.3 寡聚糖粗提物诱导棉花抗性

棉种精选后用浓硫酸脱绒,清水冲洗 23 次,晾干后,按实验处理进行浸种.对试验菌种采用麦粒沙土壤接种,接种量为土壤重量 2%.实验处理分为:(1) 0.15%真菌细胞壁寡聚糖 25 mg/L;(2) 0.15%真菌细胞壁寡聚糖 50 mg/L;(3) 0.15%真菌细胞壁寡聚糖 75 mg/L;(4) 25%多菌灵 WP,(5) 清水对照.重复 3 次.发病高峰期调查发病情况.

### 1.4 寡聚糖的纯化和活性组分的鉴定

**1.4.1 SP-Sephrose 层析分离寡聚糖** 采用 SP-Sephrose (美国 Pharmacia 公司)强阳离子交换柱层析分离.层析柱体积为 15 cm ×1.5 cm,平衡液为 0.17 mol/L 醋酸,寡聚糖上样量为 20 mg,梯度洗脱液为 0、0.1、0.3、0.6 mol/L NaCl,溶于 0.17 mol/L 醋酸中.每种浓度的洗脱体积均为 15 ml,分装体积为 0.8 ml/管.用考马斯亮蓝法<sup>[6]</sup>测定蛋白质及寡聚糖浓度,大豆子叶法测定生物活性<sup>[7]</sup>.

**1.4.2 Bio Gel P-6 层析分离寡聚糖** SP-Sephrose 层析分离具有生物活性的组分可经 Bio Gel P-6 (美国 Bio-Rad 公司)凝胶过滤层析进一步纯化.层析柱

体积为 100 cm ×1.0 cm,寡聚糖上样量为 3 mg,洗脱液为 0.17 mol/L 醋酸.分装体积为 2.0 ml/管.寡聚糖浓度及生物活性测定方法同上.

**1.4.3 高效阴离子层析 (HPAEC) 测定活性寡聚糖的纯度及成分** 层析系统包括 250 mm CarboPac PA-1 (美国 Dionex 公司)分析层析柱、P200II 双二元高压梯度泵(大连依利特公司)和脉冲安培检测器(美国 ESA 公司).从经过 Bio Gel P-6 层析分离的各寡聚糖峰中取样 20 ng,加样后离子交换层析洗脱.进一步从具有生物活性的寡聚糖峰中取样 20 ng,加入 200 μl 2 mol/L 三氟乙酸,在 120 °C 条件下水解 3 h,加样后用离子交换层析洗脱.

## 2 结果

### 2.1 寡聚糖粗提物对棉花抗病性的影响

实验结果表明:0.75%真菌细胞壁寡聚糖对棉花黄萎病有较好的防治效果,25 mg/L、50 mg/L、75 mg/L 处理防效分别为 47.67%、62.72%、76.74%,均高于阳性对照药剂 25%多菌灵的防效 36%(Table 1).由此结果可知,真菌细胞壁寡聚糖对棉苗有较高的诱导抗病活性.

**Table 1** The Induction of oligosaccharides from fungi to cotton wild disease

Treatment	25 mg/L		50 mg/L		75 mg/L		Average (%)	
	DI	BEfect	DI	BEfect	DI	BEfect	DI	BEfect
25 mg/L	19.54	50.61	17.83	48.90	18.88	42.74	18.75	47.64
Oligosaccharide 50 mg/L	12.76	67.75	14.43	58.64	13.34	59.54	13.51	62.27
75 mg/L	8.20	79.27	7.38	78.85	9.41	71.46	8.33	76.74
25%Carbendazim ,Dilution ×600	20.29	48.71	20.53	28.26	23.44	28.91	22.92	36.00
Water control	39.56	—	34.89	—	32.97	—	35.81	—

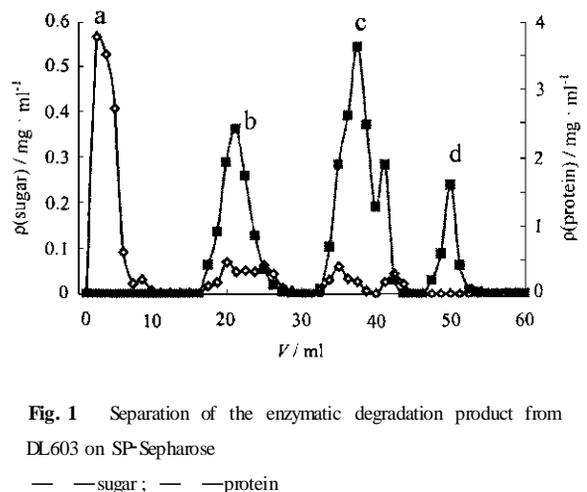
### 2.2 寡聚糖活性组分的分离检测

将 DL603 菌酶解产物进行离子交换层析,产物中大部分的寡聚糖在洗脱的第一阶段即 NaCl 浓度为 0 时被洗脱.由 DL603 菌降解得到的寡聚糖中碱性糖的含量较低,再用 0.1、0.3 及 0.6 mol/L NaCl 溶液进行洗脱时,蛋白质及多肽被洗脱,仅检测到少量的寡聚糖.离子交换层析达到了 DL603 菌降解产物中的寡聚糖与蛋白质及肽类分离的目的(见 Fig. 1).

离子交换层析收集液(分 a、b、c、d 4 个组分)进行生物活性测定.测定结果表明:组分 a 的活性明显高于对照组及其它部分,说明活性成分主要集中在 a 部分中(见 Fig. 2).

### 2.3 寡聚糖活性组分的纯化及检测

将离子交换层析后得到的活性组分进行凝胶过滤层析,根据糖分子在碱性条件下所带负电荷的多



**Fig. 1** Separation of the enzymatic degradation product from DL603 on SP-Sephrose  
—○—sugar; —■—protein

少,使用阴离子柱进行分离.寡聚糖的混合物进一步按照其分子量的大小分离得到 a、b、c、d、e、f、g、h 8

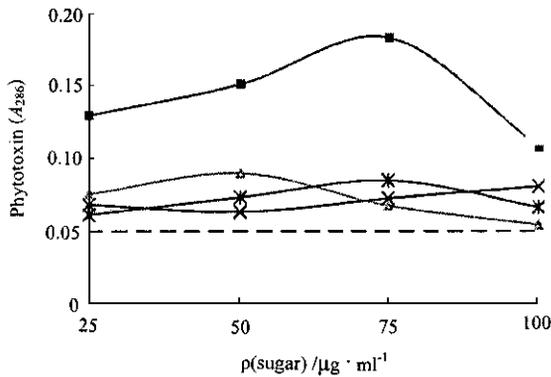


Fig. 2 Activities of the eluates by SP-Sepharose  
— a; — b; — x — c; | d; - - - - Control

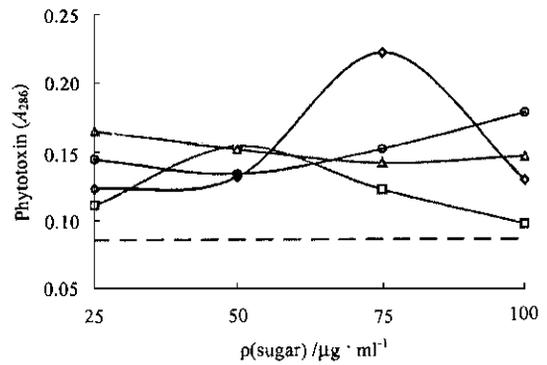


Fig. 5 Induced activity of oligosaccharides (fraction c, e, f, g and h)  
— o — c; — e; — f; — g + h; - - - - Control

个组分(见 Fig. 3). 寡聚糖生物活性测定表明: 8 个组分活性最高的存在于凝胶过滤层析后得到的 c 组分中(见 Fig. 4, Fig. 5). c 组分寡聚糖浓度在 75 μg/ml 时, 其生物活性达到最高峰, 然后随着浓度的增加, 活性降低. 寡聚糖的活性作用有一个最适浓度, 高于此浓度就会产生抑制作用. c 组分的最适浓度 75 μg/ml 和大田试验的结果基本吻合.

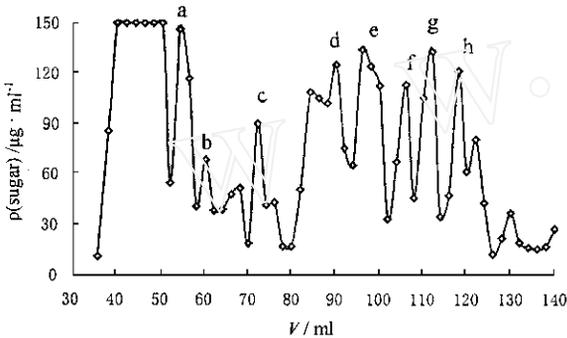


Fig. 3 Separation of the active portion on BioGel P-6

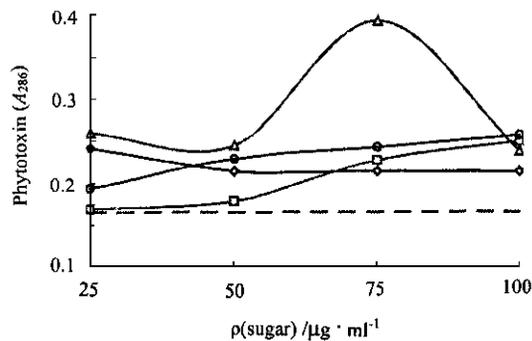


Fig. 4 Induced activity of oligosaccharides (fraction a, b, c and d) in different DP  
— o — a; — b; — c; — d; - - - - Control

## 2.4 寡聚糖活性组分分析

### 2.4.1 不同聚合度分析 确定了不同聚合度的寡

聚糖生物活性组分后, 在没有寡聚糖标准品的情况下, 根据高压液相色谱 (HPAEC) 检测, 谱图各个峰的保留时间及峰面积的大小对 P-6 柱层析后各收集液的主要成分及其含量, 判断寡聚糖分子聚合度的大小(见 Fig. 6). 比较各谱图可以看出, 除了流动相 HAc, 在各个色谱图中有一个相同的峰外, 各图中主要成分的保留时间均不相同, 说明它们是不同的聚合度的寡聚糖分子. 在各谱图中出峰较早的部分, 主要是聚合度较小的单糖、二糖. 比较峰面积, Bio Gel P-6 柱层析洗脱体积较大的组分 f 和组分 g, 单糖、二糖含量较高. 比较 Fig. 6A 和 Fig. 6G, c-1 峰的保留时间与 d-1、d-2 较相近, 而 c-2 峰则表现出明显的不同. 生物活性测定结果表明, c-2 峰所代表的寡聚糖分子是活性最高的成分.

4.2.2 组成分析 用 2 mol/L 的三氟乙酸对活性组分寡聚糖进行水解, 反应 3 h 将其完全水解为单糖, 再通过 HPLC 分析其组成. HPAEC 分析的结果表明, 活性最高的 c (c<sub>1</sub>、c<sub>2</sub>) 组分由 4 种单糖构成, 对照标准单糖的 HPLC 谱图, 活性寡聚糖的单糖组成为氨基葡萄糖, 半乳糖, 葡萄糖和甘露糖. 由峰面积归一化计算可确定, 氨基葡萄糖 半乳糖 葡萄糖 甘露糖 = 1 2 5 2 (摩尔比) (Fig. 8).

## 3 讨论

寡糖的分离纯化及结构的高度复杂性和检测分析的困难, 一直是糖化学家在寡糖分析中的一个难题. 因此选择合适的方法对生物降解得到的寡糖混合物进行分离纯化, 具有一定的创新. 由于寡聚糖粗提物分子中糖基组成基本相同, 寡聚糖生物活性的大小主要与寡聚糖的聚合度有关. 为了寻找具有高活性的寡聚糖组分, 本实验应用寡聚糖分离纯化与

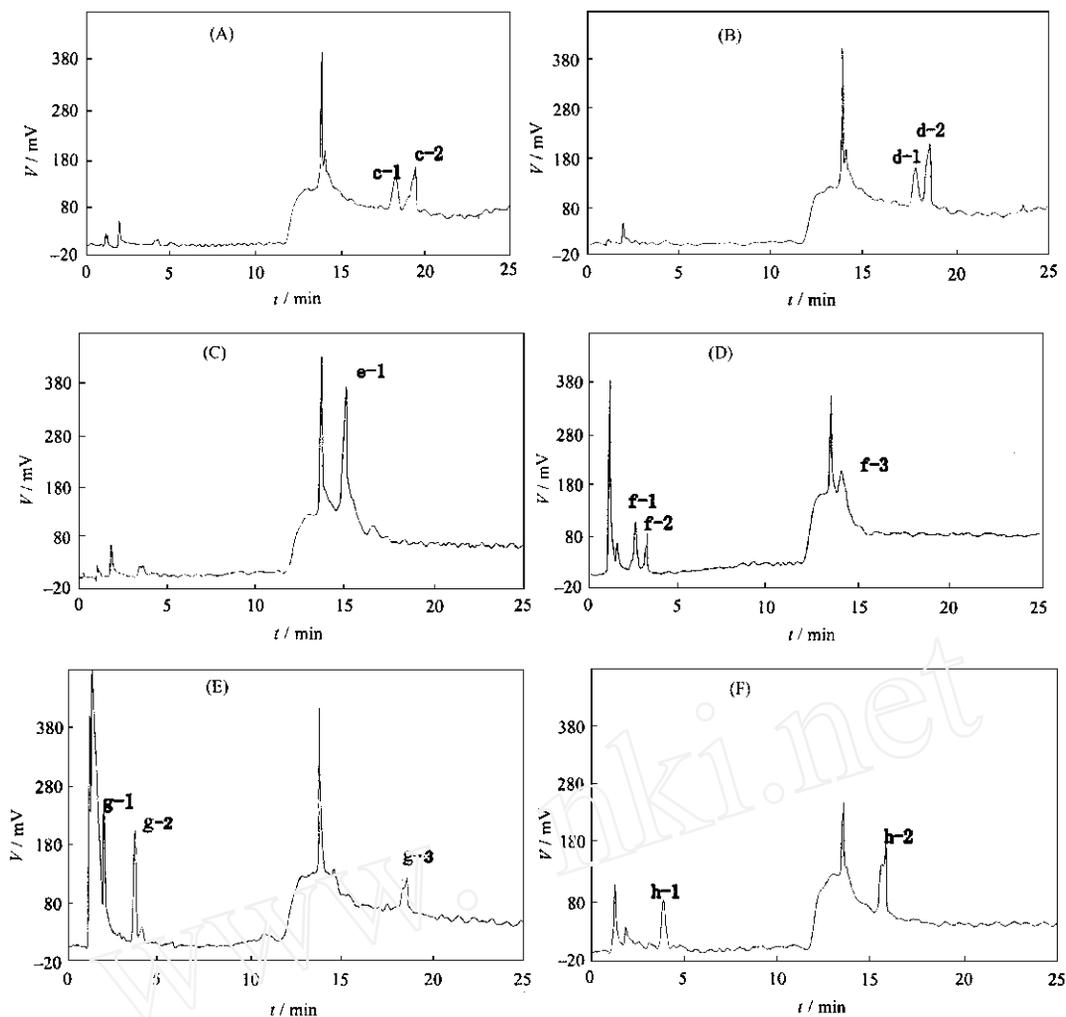


Fig. 6 HPAEC chromatography of the c、d、e、f、g、h peak from Bio Gel P-6

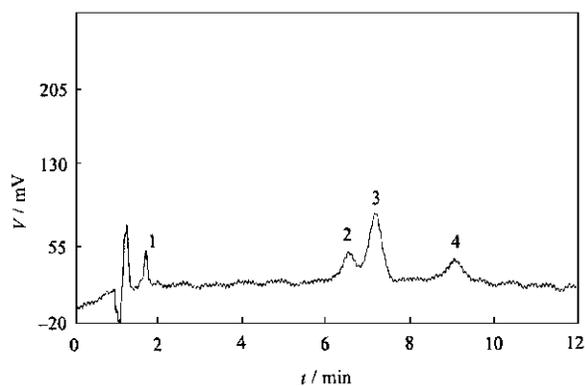


Fig. 7 HPAEC chromatography of component of the c-peak from Bio Gel P-6

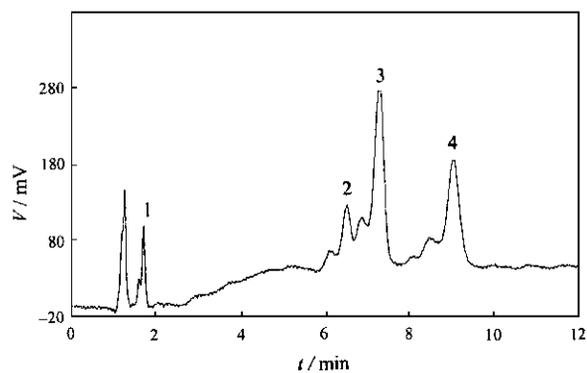


Fig. 8 HPAEC chromatography of the standard  
1. Gucosamine ; 2. Galactose ; 3. Guucose ; 4. Mannose

生物活性测定相结合的方法,采用凝胶过滤-离子交换层析的方法,分离出具有较高生物活性的寡聚糖组分.经 HPLC 分析证实,该组分只含有 2 种聚合度的寡聚糖分子.

参考文献 (References)

- 1 Umenoto N, Kakitani M, Iwamatsu A. The structure and function of a soybean beta-D-glucan elicitor-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(3): 1 029 ~ 1 034
- 2 Ayers A R, Ebel J, Finelli F, Berger N, Albersheim P. Host-pathogen

- interactions. . Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol*, 1976, **57**:751 ~ 759
- 3 Hahn M G, Albersheim P. Host-pathogen interactions. . Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant Physiol*, 1978, **62**:107 ~ 111
- 4 Sharp J K, Valent B, Albersheim P. Purification and partial characterization of a  $\beta$ -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J Biol Chem*, 1984, **59**:11 312 ~ 11 320
- 5 无锡轻工业学院编. 食品分析. 北京:轻工业出版社(Wuxi institute of light industry, *Food Analysis*. Beijing: Light Industry Press), 1983:163
- 6 Asryants R A, Duszenlova I D, Nagradova N K. Determination of sepharose-bound protein with coomassie brilliant blue G250, *Anal Biochem*, 1985, **151**:571 ~ 574
- 7 Albersheim P, Valent B S. Host-pathogen interactions in plants, plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *J Cell Biol*, 1978, **78**:627 ~ 634

## 为在国际蛋白质组学研究上占有一席之地 记中国蛋白质组学首届学术大会

中国蛋白质组学首届学术大会是在非典流行刚结束后,很短的时间内(8月4日开始筹备,9月18日开会,1个半月),召开的会议。这是我会根据国际前沿研究的进展和我国学科发展的需要,也是为了跟上国际蛋白质组学的同步发展,在该领域占有一席之地的举措。会议共进行了2天,参加会议的200多位中外专家,学者就当前国内外,特别是国内的蛋白质组学研究的现状、存在的问题和将来发展趋势作了广泛深入的讨论,这将对我国蛋白质组学今后研究的方向有一定指导意义。

众所周知,蛋白质组研究作为功能基因组学的重要支柱,是当今生命科学领域的前沿,已经成为21世纪生物技术和生物医药产业领域的战略制高点。蛋白质组研究不仅可实现与基因组的对接与确认,直接揭示生命活动规律和本质特点、人类重大疾患(病原体)致病的物质基础以及发生与发展的病理机制;而且可广泛推动和促进生命科学基础学科以及分析科学、信息科学、材料科学等应用学科的发展;对提高我国生物学原始创新能力,重大疾病防治能力和国民健康水平以及新药研发能力,对促进生物医药产业乃至国民经济的发展具有重大的战略意义。世界各主要国家都相继投入巨资,建立专业化的、高通量的蛋白质组研发中心和基地,启动相应的研究计划和项目,研究进展日新月异。

我国是较早倡导和开展蛋白质组学的主要国家之一。自1997年以来,国家自然科学基金委、国家科技部以及有关地方和部门相继启动了一批与蛋白质组学密切相关的重大研究项目。在上述课题的资助和有关部门的支持下,国内已有若干蛋白质组中心或重点实验室相继成立,如军事医学科学院蛋白质组研究中心、中国科学院上海生科院蛋白质组学研究中心、湖南师范大学蛋白质组研究中心、中国医学科学院蛋白质组研究中心、高等院校蛋白质组学研究院、复旦大学蛋白质组研究中心等。蛋白质组生物信息学的研究队伍和技术体系初步形成,如军事医学科学院生物信息学研究中心、中科院上海生科院生物信息学中心、北京华大基因信息研究中心、北京大学生物信息学中心、清华大学生物信息学研究所等。中国科学院生物物理所、北京大学、清华大学、中国科学技术大学等单位在结构蛋白质组研究领域取得了可喜的进展。蛋白质相互作用的技术方法和相关仪器设备在国内很多科研机构中都有成功的应用。我国在国际核心刊物发表了系列论著,得到国际学术界的首肯。蛋白质组学是我国生命科学领域与世界主要发达国家基本保持同步的不可多得的阵地之一,不进则退,我们必须抓住机遇,迎接挑战。

经过中国生物化学与分子生物学会第八届二次和三次常务理事会议研究决定,筹备成立蛋白质组学专业委员会和中国人类蛋白质组组织(CHUPO)委员会,上报主管单位中国科协和登记单位民政部。现今,两个委员会都已选举产生。我们坚信在这两个委员会的共同努力下,紧密团结并组织广大科技工作者,坚持科学精神,发挥科学上的自由思想,同时又脚踏实地的努力工作,坚持不懈,不断创新,一定能为我国人类蛋白质组学工作做出贡献。