

棉花黄萎病菌毒素的分离提纯 及致萎活性测定

甘 莉 吕金殿

(陕西省植物保护研究所)

摘 要 经超滤, Con. A-Sepharose 4B 亲和层析, 从棉花黄萎病菌的 Czapek's 培养液中, 分离纯化致萎毒素. 成分分析和致萎活性测定结果表明: 棉花黄萎病菌产生的毒素是一种致萎力极强的糖蛋白. 其含糖量为 14.74%, 蛋白质量为 85.26%. 其致萎活力是半纯化液的 10~15 倍, 活力回收为 76%.

关键词 棉花, 黄萎病菌, 致萎毒素, 糖蛋白, Con. A-Sepharose 4B 亲和层析
中图分类号 S435.621.24; Q503

为明确植物病原菌分泌的致病毒素的化学组成及性质, 70 年代以来, 人们对不同的植物病原菌毒素进行了分离纯化^[1, 2]. 对棉花黄萎病菌致萎毒素的分离纯化及其化学组成和性质, 提出了不同的见解. 1970 年苏联 B.H 鲁诺夫和 T.N 鲍罗金用有机溶剂萃取法提取了一种着色的羟肟酸化合物, 1972 年 Mussell 用 Sephadex G-75 从病菌的分泌物中按分子量大小, 分离出 5 种蛋白质毒素成份^[3]. 1972~1982 年美国的 Keen 等采用 DEAE-纤维素阴离子交换层析、琼脂糖凝胶过滤, 从病菌培养液中分离纯化了具毒素性质的蛋白质——脂多糖复合物^[4, 5]. 1984 年我们采用超滤的方法分离得到了主要为蛋白质的粗毒素 (也含有脂, 多糖)^[6]. 1985 年又采用 Con. A-Sepharose 4B 亲和层析从粗毒素中纯化出一种具强致萎力的糖蛋白毒素, 致萎力比粗毒提高 10~15 倍, 而弃液和其它蛋白质对棉花几乎无致萎力. 经多次重复, 分离物成分分析和致萎活性测定, 证明该方法是一种简便有效的分离棉花黄萎病菌致萎毒素的方法.

1 材料与方 法

1.1 材料

供试棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 由泾阳县三渠村自然病斑病株分离所得. 致萎活性测定所用棉花品种为 86-1.

1.2 方 法

1.2.1 病菌培养 将 PDA 斜面的棉花黄萎病菌转接到 100ml Czapek's 培养液中, 25℃ 振荡培养 15d.

1.2.2 粗提 病菌培养液倒入布氏漏斗, 抽气减压过滤, 收集滤液并经 1500g 离心 15min, 去沉淀. 上清液经微孔膜 (孔径 0.45μm) 超压 (1kg/cm²) 过滤, 显微镜检查无菌

体后, 装入超滤器内, 用孔径 15A° 截留分子量 1 万以上的超滤膜, 外加高纯氮气超压($3\text{kg}/\text{cm}^2$)电磁震动过滤, 浓缩 100 倍。将超滤所得浓缩液经 $15\,000\text{r}/\text{min}$ (0°C)离心 1h, 上清液装入透析袋内, 磁力搅拌透析, 每 3h 换 1 次缓冲液($0.05\text{mol}/\text{L}$ Tris-HCl pH 7.5), 查无 SO_4^{2-} , 上清液备用。

1.2.3 用 Con. A-Sepharose 亲和层析纯化致萎毒素糖蛋白 参照赵永芳等的方法^[7], 制成的 Con. A-Sepharose 4B 亲和吸附剂装柱, 用 pH7.5 的平衡液($0.05\text{mol}/\text{L}$ Tris-HCl, $0.2\text{mol}/\text{L}$ NaCl, $1\text{mmol}/\text{L}$ MgCl_2 , $1\text{mmol}/\text{L}$ CaCl_2 , $1\text{mmol}/\text{L}$ MnCl_2)平衡后, 加入粗提液 10mL , 流速 $15\text{mL}/\text{h}$, 待样品全部加入后, 静止反应 1~3h, 随之用平衡液冲洗, 至洗出液在 $A_{280\text{nm}}$ 处小于 0.05 时, 再改用含有 $0.01\text{mol}/\text{L}$ D-甘露糖平衡液和 $0.1\text{mol}/\text{L}$ D-甘露糖的平衡液在自制的梯度混合器中, 直线梯度洗脱, 流速 $15\text{mL}/\text{h}$, 每管收集 3mL , 用 UV-240 可见紫外分光光度计测定, 以 280nm 消光读数为纵坐标, 洗脱毫升数为横坐标, 绘制洗脱曲线。致萎毒素糖蛋白的分离提纯见图 1。

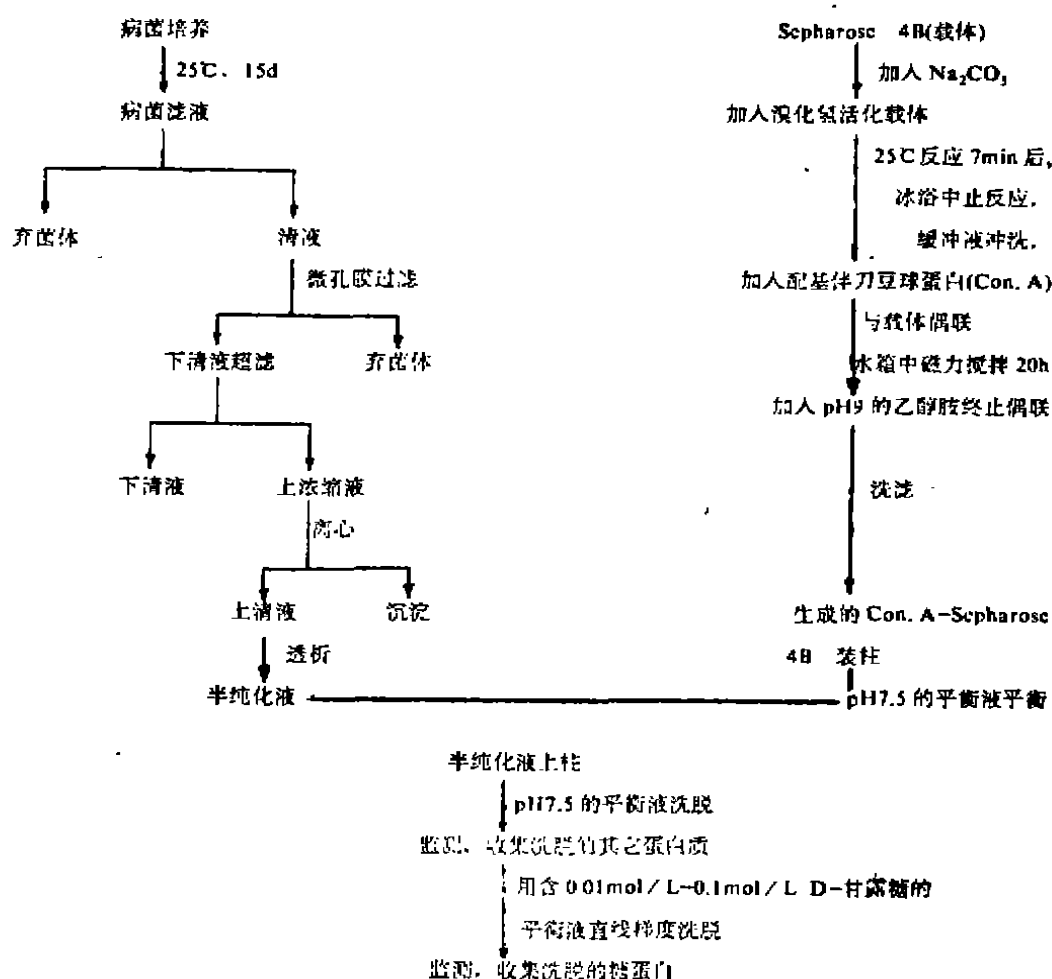


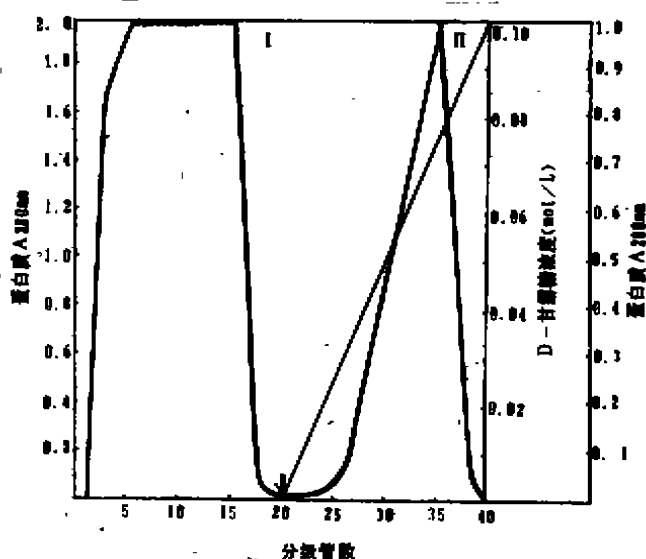
图 1 致萎毒素糖蛋白的分离提纯程序示意图

1.2.4 直线梯度电泳 聚丙烯酰胺凝胶在垂直平板玻璃槽内,制成5%~20%的直线梯度凝胶。用0.09mol/L Tris-0.08mol/L H_3BO_3 pH8.0做电极缓冲液,电流2mA/cm,电泳7~10h结束。其凝胶切成两块,其中一块用考马斯兰R-250作蛋白质染色;另一块用过碘酸-schiff试剂作糖蛋白染色。即凝胶在40%乙醇、5%的冰乙酸中固定过夜,用0.1%高碘酸处理2~3h,再用0.2%偏重亚硫酸钠处理2~3h,置于schiff试剂,室温染色。

1.3 糖蛋白的分析与鉴定

1.3.1 糖和蛋白质含量 用蒽酮法测定糖的含量;蛋白质用凯氏定氮法,瑞典K-II型半微量定氮仪测定,以牛血清白蛋白为标准制成标准曲线,用UV-240型可见/紫外分光光度计测定半纯化液及糖蛋白毒素的蛋白浓度。

1.3.2 致萎活性测定 平均15℃的室温条件下,1片真叶期棉苗插入装有不同处理溶液的试管内,定时观察记载致萎程度。



2 结果与分析

截留分子量1万以上的超滤浓缩液在15000r/min下离心后的上清液,经Con.A-Sepharose 4B亲和层析分离得到两类物质,即平衡液洗脱的除糖蛋白以外的蛋白质和其它物质(峰I),含D-甘露糖直线浓度梯度洗脱的糖蛋白(峰II)(见图2)。

2.1 沉淀物质的亲和层析

超滤浓缩经15000r/min离心后的沉淀溶解于0.05mol/L Tris-HCl缓冲液中,上Con.A-Sepharose 4B亲和层析柱层析,只得到用平衡液洗脱的吸收峰,换含D-甘露糖直线浓度梯度洗脱没有吸收峰(见图3)。

2.1.1 亲和层析各吸收峰的直线梯度电泳 将吸收峰分别收集装入透析袋,聚乙二醇浓缩后,用凝胶浓度直线梯度电泳鉴定峰I只能被考马斯亮兰R-250染色,而不能被过碘酸-schiff试剂染色。峰II能同时被蛋白质染色剂考马斯亮兰R-250和糖蛋白染色剂过碘酸-schiff试剂染色,进一步证明峰II是糖蛋白的吸收峰(见图4)。

2.1.2 糖蛋白毒素的含量分析 糖蛋白毒素中蛋白质含量为85.26%,糖的含量为14.74%。

图2 离心后上清液的 Con. A-Sepharose 层析分离图谱
—含糖平衡液洗脱开始; I—平衡液洗脱的蛋白吸收峰;
II—含糖平衡液洗脱的糖蛋白吸收峰

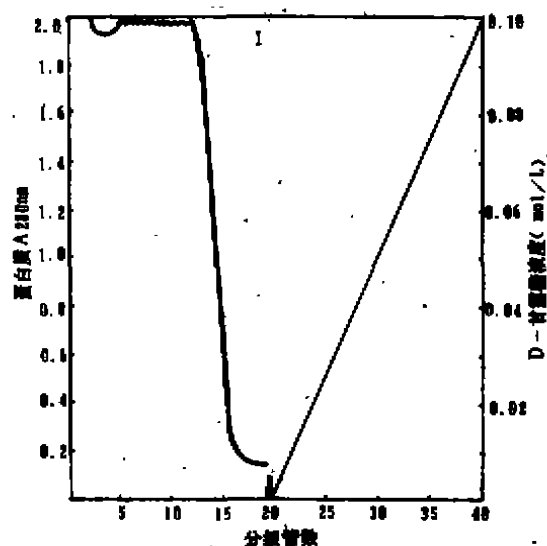


图3 离心后沉淀在 Con.A-Sepharose 层析分离图谱

—含糖平衡液洗脱开始; I—平衡液洗脱的蛋白吸收峰

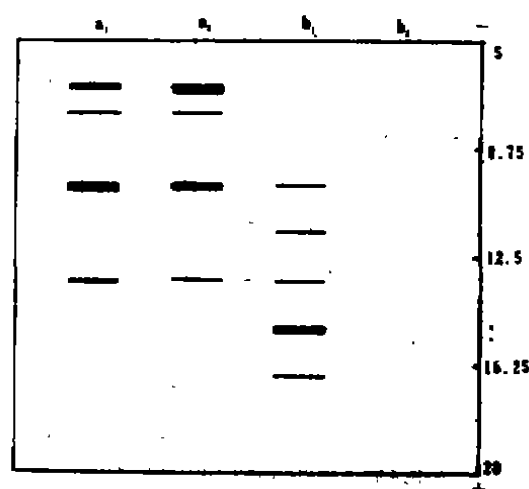


图4 层析的各吸收峰蛋白质直接凝胶电泳分离图谱

a₁, a₂—峰 II, a₁, 蛋白质染色; a₂, 糖蛋白染色

b₁, b₂—峰 I, b₁, 蛋白质染色; b₂, 糖蛋白染色

2.2 纯化毒素的致萎作用

2.2.1 分离纯化过程中去掉的三部分的致萎作用 由表 1 可以看出, 从培养滤液中分离去掉的三部分即: 超滤的下清液(培养液中分子量 1 万以下的小分子化合物)对棉苗没

表 1 从培养液中分离纯化的各个部分致萎作用

分离纯化的各个部分	浓度 μg/mL	萎蔫所需时间(h)			
		48	65	72	96
无离子水	0	—	—	—	—
未接菌培养液	0	—	—	—	—
平衡液	0	—	—	—	—
含糖平衡液	0	—	—	—	—
超滤浓缩下清液	—	—	—	—	—
半纯化液(15 000r/min 离心后上清液)	10	—	—	—	+
半纯化液(15 000r/min 离心后上清液)	60	—	+	++	++
半纯化液(15 000r/min 离心后上清液)	100	+	++	+++	++++
15 000r/min 离心后沉淀溶解于平衡液	100	—	—	—	+
Con.A 亲和层析峰 I	100	—	—	+	+
Con.A 亲和层析峰 II	6	+	++	+++	++++

注: “—”: 无症状; “+”: 1 级萎蔫 (一片子叶或两片叶子边缘开始失水萎蔫);

“++”: 2 级萎蔫 (二片子叶黄化失水萎蔫); “+++”: 3 级萎蔫 (真叶失水萎蔫);

“++++”: 4 级萎蔫 (全株萎蔫干枯)。