

## 当归生药中两种 PR-10 蛋白亚型的纯化与表征

王香玲<sup>1</sup>, 李娴<sup>1</sup>, 何火聪<sup>2,3</sup>, 李玲玲<sup>1</sup>, 吕迪<sup>1</sup>, 陈翠煌<sup>1</sup>, 叶小强<sup>1</sup>, 刘树滔<sup>1</sup>, 潘剑茹<sup>1</sup>

1 福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350108

2 福建医科大学附属肿瘤医院/福建省肿瘤医院放射生物学及肿瘤放射治疗学研究室, 福建 福州 350014

3 福建省科技厅转化医学重点实验室, 福建 福州 350014

王香玲, 李娴, 何火聪, 等. 当归生药中两种 PR-10 蛋白亚型的纯化与表征. 生物工程学报, 2019, 35(1): 159–168.

Wang XL, Li X, He HC, et al. Purification and characterization of two PR-10 protein isoforms from the crude drug of *Angelica sinensis*. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 159–168.

**摘要:** 为了进一步研究当归 (*Angelica sinensis*) 生药中的蛋白质及其功能, 通过 80% 硫酸铵沉淀、Sephadex G-50 凝胶过滤层析、DEAE-Sephadex 阴离子交换层析, 首次从当归生药中纯化出两种分子量相近的蛋白 (命名为 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2)。ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 在 SDS-PAGE 上的分子量分别为 17.33 kDa 和 17.18 kDa, 在溶液中主要以单体形式存在, 但会部分形成二聚体, 二者均为糖蛋白, 糖基含量分别为 2.6% 和 8.2%。经基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-TOF™) 鉴定发现 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 均为病程相关 (Pathogenesis-related 10, PR-10) 家族蛋白, 且具有核糖核酸酶活性, 比活分别为 73.60 U/mg 和 146.76 U/mg。两种蛋白的最适 pH 相近, 均为 5.6 左右, 但最适温度不同, ASPR-C-1 的为 50 °C, ASPR-C-2 的为 60 °C。二者虽然在 60 °C 下都表现出最大的酶活力稳定性, 但在更高的处理温度 (80–100 °C) 下, ASPR-C-1 迅速失活, 最终仅余 20% 左右活力, ASPR-C-2 则表现出良好的热稳定性, 最终仍有 80% 左右活力。此外, Fe<sup>2+</sup> 对二者的酶活性具有激活作用, 而 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、EDTA、DTT 和 SDS 则会不同程度地抑制二者的酶活性。研究结果为深入研究来自当归生药的 PR-10 蛋白的生物学功能奠定了基础。

**关键词:** 当归生药, 糖蛋白, 纯化, PR-10, 核糖核酸酶

**Received:** March 13, 2018; **Accepted:** June 13, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 81472907), Natural Science Foundation of Fujian Province, China (No. 2018J01732).

**Corresponding author:** Jianru Pan. Tel: +86-591-83732462; E-mail: panjr@fzu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81472907), 福建省自然科学基金 (No. 2018J01732) 资助。

网络出版时间: 2018-07-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180704.1636.002.html>

## Purification and characterization of two PR-10 protein isoforms from the crude drug of *Angelica sinensis*

Xiangling Wang<sup>1</sup>, Xian Li<sup>1</sup>, Huocong He<sup>2,3</sup>, Lingling Li<sup>1</sup>, Di Lü<sup>1</sup>, Cuihuang Chen<sup>1</sup>,  
Xiaoqiang Ye<sup>1</sup>, Shutao Liu<sup>1</sup>, and Jianru Pan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian, China

<sup>2</sup> Laboratory of Radiation Oncology and Radiobiology, Fujian Medical University Cancer Hospital & Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China

<sup>3</sup> Fujian Key Laboratory of Tumor Translational Cancer Medicine, Fuzhou 350014, Fujian, China

**Abstract:** Two proteins of similar molecular weight (named as ASPR-C-1 and ASPR-C-2) from the crude drug of *Angelica sinensis* were purified and characterized by 80% ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-50 gel filtration chromatography, and DEAE-Sephadex anion exchange chromatography. The molecular weight of ASPR-C-1 and ASPR-C-2 on SDS-PAGE was 17.33 kDa and 17.18 kDa, respectively. They were mainly monomeric in solution, but partially formed dimers and they were glycoproteins with glycosyl content of 2.6% and 8.2%, respectively. Both ASPR-C-1 and ASPR-C-2 were identified to be members of pathogenesis-related 10 family of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and have ribonuclease activities with the specific activity of 73.60 U/mg and 146.76 U/mg, respectively. The optimum pH of the two isoforms was similar, at about 5.6, while their optimum temperatures were different. The optimum temperature of ASPR-C-1 was 50 °C, and that of ASPR-C-2 was 60 °C. Both isoforms presented highest thermal stability at 60 °C. However, ASPR-C-2 was more thermotolerant than ASPR-C-1. The latter was rapidly inactivated and retained only about 20% residual activity while the former still maintained about 80% of its original activity at a higher treatment temperature (80 to 100 °C). In addition, Fe<sup>2+</sup> had an activating effect on the ribonuclease activities of two isoforms while Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid), dithiothreitol and sodium dodecylsulphate showed different degrees of inhibition of the enzyme activities. Our findings provide a foundation for further research on the biological function of PR-10 protein from *Angelica sinensis*.

**Keywords:** crude drug of *Angelica sinensis*, glycoprotein, purify, PR-10, ribonuclease

病程相关 (PR) 蛋白是宿主植物因各类病原体 (例如病毒、细菌和真菌) 诱导产生的一类蛋白质<sup>[1]</sup>。目前根据生物学活性、物理化学性质及序列同源性将 PR 蛋白分类为 17 个家族 (PR-1 至 PR-17)<sup>[2-3]</sup>。PR-10 家族蛋白属于其中一个类别, 广泛地存在于不同单、双子叶植物中<sup>[4]</sup>, 该家族又被称为多基因家族, 例如豌豆中存在至少 5 种 PR-10 基因, 麝香中有 18 种 Mal d 1 基因<sup>[5]</sup>等。据报道 PR-10 蛋白质是多功能蛋白, 主要参与植物病原体入侵的防御反应以及各种生物和非生物胁迫的应答反应, 但家族成员间没有统一的生物学功能<sup>[1]</sup>。

研究表明, 大多数 PR-10 蛋白是一类分子量小 (15–18 kDa)、酸性、结构相似且与核糖核酸酶同源的胞内蛋白<sup>[4]</sup>。最早从人参中分离出具有核

糖核酸酶活性的 PR-10 蛋白为 IPR 1 和 IPR 2<sup>[6-7]</sup>。类似地, 从白羽扇豆根中分离的 LaPR-10 蛋白具有核糖核酸酶活性<sup>[8]</sup>。

当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels] 是伞形科当归属的一种生多年草本植物。其干燥的贮藏根是我国一味常用的中药材, 素有“十方九归”之说。性温, 味甘、辛; 归肝、心、脾经; 具有补血活血、调经止痛、润肠通便的功能<sup>[9-10]</sup>。现有研究结果表明, 当归多糖能有效地改善高脂饮食小鼠的脂肪肝并维持体内葡萄糖平衡<sup>[10-11]</sup>; 当归挥发油对高血脂小鼠动脉粥样硬化具有一定的保护作用<sup>[12]</sup>; 阿魏酸是较早被分离和鉴定的当归有效成分, 也是当归有机酸主要成分之一, 能抗动脉粥样硬化<sup>[9,13-14]</sup>。虽然目前关于当归多糖和当归药效小分子已有很

多研究,但对于当归中重要的高分子化合物——蛋白质的研究却很少。本课题组早期研究发现当归中蛋白含量较为丰富,且当归总蛋白具有清除 DPPH 自由基能力,可促进人正常肝细胞 L02 增殖<sup>[15]</sup>。

本课题组近期发现初步纯化的当归低分子量蛋白 AP 可显著改善小鼠的急性放射损伤<sup>[16]</sup>,且在当归鲜根中也存在 PR-10 家族蛋白<sup>[17]</sup>。本研究对当归生药中的 AP 蛋白进行了进一步纯化,首次从当归生药中纯化得到两种 PR-10 蛋白亚型(命名为 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2),并对二者的理化性质进行了表征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

当归生药购自甘肃省岷县琪祥阁食品专营店。蛋白分子量 marker 购自美国 Thermo 公司。酵母 tRNA 购自上海宝曼生物科技有限公司。BCA 蛋白含量测定试剂盒选购自美国 Thermo 公司。Sephadex G-50 填料购自美国 GE 公司。DEAE Sepharose Fast Flow 填料购自 Pharmacia Biotech 公司。其余试剂均为分析纯。

### 1.2 当归蛋白的制备与纯化

#### 1.2.1 制备当归蛋白粗提液

将 12.96 g 当归生药切成片状,加入 10 倍体积(即 130 mL) Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0),4 °C 静置过夜,次日用 4 层纱布过滤,滤液于 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min,收集上清(蛋白粗提液),测定其蛋白含量和核糖核酸酶活力。

#### 1.2.2 硫酸铵一步沉淀

将 61.71 g 硫酸铵加入蛋白粗提液(110 mL)进行硫酸铵一步沉淀(0–80%)(即 561 g/L),沉淀过夜后于 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min。收集沉淀,将沉淀溶于 2 倍体积的 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0)中,12 000 r/min、4 °C 离心 10 min 取上清(当归生药蛋白粗提液),测定其蛋白含量和核糖核酸酶活力。

#### 1.2.3 凝胶过滤层析分离

将当归生药蛋白粗提液流经以 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0)预先平衡的 Sephadex G-50 层析柱(3 cm×105 cm),流速为 0.25 mL/min,收集第二个洗脱峰(P<sub>2</sub>),测定其蛋白含量和核糖核酸酶活力,并于 4 °C 保存备用。

#### 1.2.4 弱阴离子交换柱分离

将样品(P<sub>2</sub>)上柱于用 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.3)预先平衡的 DEAE-Sepharose 弱阴离子交换柱(2.5 cm×10 cm),流速为 1 mL/min,收集穿透峰 1(C<sub>1</sub>)、穿透峰 2(C<sub>2</sub>),直至 OD<sub>280</sub><0.035,最后以含 1 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.3)洗脱结合的杂蛋白,分别测定穿透峰 1 和穿透峰 2 的蛋白含量和核糖核酸酶活力,并于 4 °C 保存。

### 1.3 PAGE 和 SDS-PAGE

PAGE 分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 4%;SDS-PAGE 分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 4%。以考马斯亮蓝 R-250 染色鉴定蛋白,结合 PAGE 和 SDS-PAGE 结果检测蛋白纯度;用高碘酸-希夫(PAS)染色鉴定糖蛋白<sup>[18]</sup>;以 Carestream MI SE 软件通过还原与非还原条件下(即有无 β-巯基乙醇)SDS-PAGE 结果计算蛋白质分子量。

### 1.4 蛋白质及糖基含量测定

以 BCA 试剂盒测定粗提液和每一步纯化得到的当归蛋白的蛋白含量。以蒽酮硫酸法测定蛋白中糖基含量<sup>[19]</sup>。

### 1.5 质谱鉴定

相关蛋白经 PAGE 电泳后,剪下胶上对应目的蛋白质的条带,送至复旦大学蛋白质组学研究中心使用 MALDI-TOF-TOF™(AB SCIEX)进行质谱鉴定,并用 GPS Explorer(V 3.6)数据库检索分析。

### 1.6 核糖核酸酶活性的活性表征

#### 1.6.1 核糖核酸酶活力测定

参照张哲等的方法<sup>[20]</sup>,略为修改后测定两种

纯蛋白的核糖核酸酶活性。反应体系为 10  $\mu$ L 酵母 tRNA、5  $\mu$ L 样品溶液和 135  $\mu$ L 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0)。将上述反应体系混合后于 37  $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 加入 350  $\mu$ L 3.4% 高氯酸中止反应, 4  $^{\circ}$ C 离心 (12 000 r/min, 5 min), 上清稀释后测  $OD_{260}$  的吸光值。以 1 mL 体系 37  $^{\circ}$ C 反应 15 min 后于 260 nm 产生 1 个  $OD$  值所需要的酶含量作为一个酶活力单位。

### 1.6.2 反应 pH 的影响

以酵母 tRNA 为底物, 使用缓冲体系 (0.1 mol/L 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液, pH 3.0–7.0; 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.0–8.0) 分别将两种蛋白调至 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。按照本文方法 1.6.1, 在 37  $^{\circ}$ C 反应 15 min 测定蛋白的核糖核酸酶活性。以最适 pH 条件下的酶活性为 100%, 计算各处理的相对酶活性。

### 1.6.3 反应温度的影响

以酵母 tRNA 为底物, 将两种蛋白分别调至其最适 pH, 然后分别在温度为 30  $^{\circ}$ C、40  $^{\circ}$ C、50  $^{\circ}$ C、60  $^{\circ}$ C、70  $^{\circ}$ C 下反应 15 min, 测定蛋白的核糖核酸酶活性。测定方法参照本文方法 1.6.1, 以最适温度条件下的酶活性为 100%, 计算各处理的相对酶活性。

### 1.6.4 温度稳定性研究

将 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 蛋白分别在常温

(25  $^{\circ}$ C)、40  $^{\circ}$ C、60  $^{\circ}$ C、80  $^{\circ}$ C、100  $^{\circ}$ C 下水浴 30 min, 待样品冷却至室温, 4  $^{\circ}$ C 离心 (12 000 r/min, 5 min) 取上清, 以酵母 tRNA 为底物, 分别于最佳反应条件下测定当归蛋白核糖核酸酶活性。测定方法参照本文方法 1.6.1, 两种蛋白均以其最适反应条件下的酶活性为 100%, 计算各处理的相对酶活性。

### 1.6.5 金属离子、螯合剂、表面活性剂和还原剂等对 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 酶活性的影响

各种试剂对 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 酶活性的影响是分别在最适反应体系中加入含 1 mmol/L (终浓度) 的金属离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ )、螯合剂 EDTA、蛋白还原剂 DTT 和表面活性剂 SDS 下测定当归蛋白核糖核酸酶活性。测定方法参照本文方法 1.6.1, 两种蛋白均以其最适反应条件下的酶活性为 100%, 计算各处理的相对酶活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 当归蛋白的纯化

110 mL 当归生药蛋白粗提液经过 80% 硫酸铵沉淀后, 复溶, 离心取上清, 进行 Sephadex G-50 凝胶过滤层析, 收集 Sephadex G-50 第二峰 ( $P_2$ ), 色谱及 SDS-PAGE 结果如图 1 所示。由图 1B 可知,  $P_2$  峰中含有分子量约为 17 kDa 蛋白, 在 PAGE 中显示为两条条带 (图 2B)。

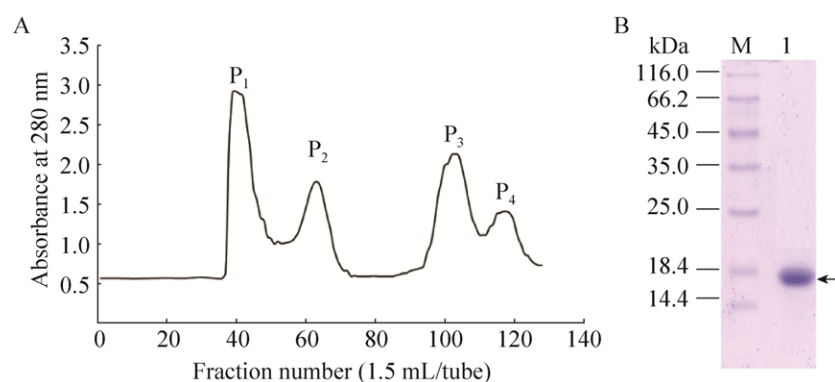


图 1 当归生药蛋白粗提液的 Sephadex G-50 凝胶过滤层析图谱 (A) 与 SDS-PAGE 分析 (B)

Fig. 1 Sephadex G-50 gel filtration chromatography (A) and SDS-PAGE (B) of crude extracts of *Angelica sinensis*. M: protein weight markers; 1:  $P_2$  fractions.

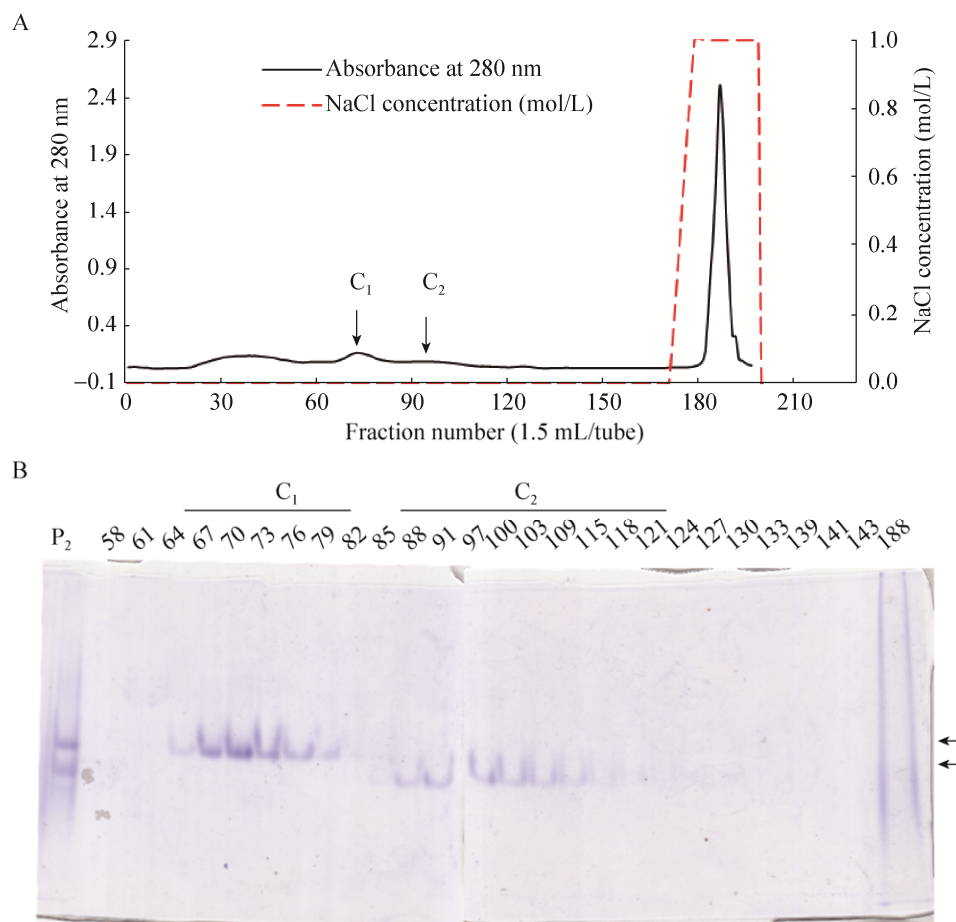


图 2  $P_2$  组分的 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱图谱 (A) 与 PAGE 分析 (B)

Fig. 2 DEAE-Sepharose chromatography (A) and PAGE (B) of  $P_2$  fractions.  $P_2$ :  $P_2$  fractions; 58–188: fractions of DEAE-Sepharose chromatography.

将 Sephadex G-50 第二峰进行 DEAE-Sepharose 弱阴离子交换层析, 分别收集穿透峰 1 (67–82 管,  $C_1$ ) 和穿透峰 2 (88–121 管,  $C_2$ ), 其色谱结果和 PAGE 分析结果如图 2 所示。由图 2B 可知, DEAE-Sepharose 可将 PAGE 上对应的两种蛋白分离开, 穿透峰 1 ( $C_1$ ) 和穿透峰 2 ( $C_2$ ) 均为 PAGE 纯的蛋白, 将其分别命名为 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2。为进一步验证其纯度, 分别取两个峰的组分进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3A 所示, 由图可知, ASPR-C-1 (泳道 1) 和 ASPR-C-2 (泳道 2) 在还原条件下为 SDS-PAGE 纯的组分。两种蛋白的纯化过程如表 1 所示, ASPR-C-1 比活力为 73.69 U/mg,

纯化倍数为 5.35, ASPR-C-2 酶的比活力为 146.68 U/mg, 纯化倍数为 10.64。

## 2.2 蛋白二聚体和糖基分析

如图 3 所示, ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 蛋白在还原条件下经 Carestream MI SE 软件计算出分子量分别为 17.33 kDa 和 17.18 kDa。在非还原条件下, ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 蛋白都出现了少量高分子量条带, 分子量分别为 35.66 kDa 和 35.32 kDa, 是 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 蛋白分子量的 2 倍, 可知高分子量的蛋白是 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 在溶液中部分聚集所形成的二聚体。

表 1 两种蛋白亚型的纯化表

Table 1 Purification summary of two isoforms.

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Crude extract of ASPR-C	185.18	2 552.00	13.78	1.00	100.0
80% Ammonium sulfate precipitation	69.02	1 081.45	15.67	1.14	42.4
Sephadex G-50	50.02	1 302.18	26.03	1.89	51.0
DEAE-(ASPR-C-1)	5.69	419.47	73.69	5.35	16.4
DEAE-(ASPR-C-2)	6.80	998.53	146.68	10.64	39.1

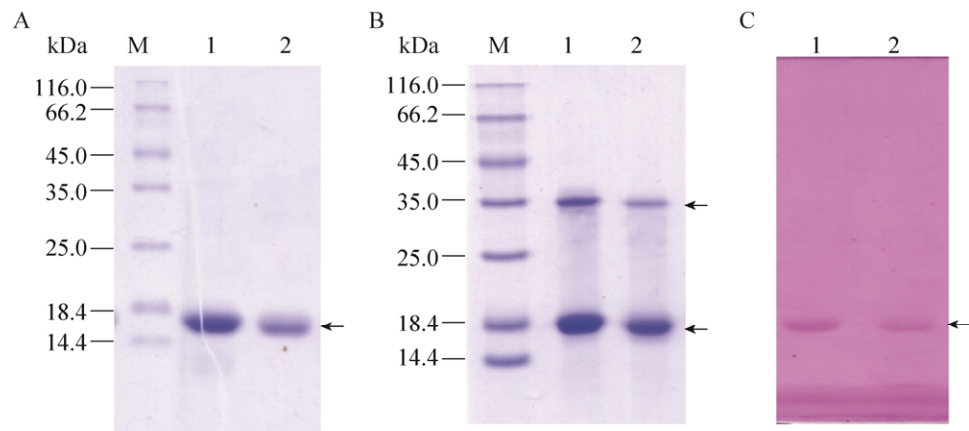


图 3 两种蛋白亚型的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of two isoforms. (A) SDS-PAGE of the isoforms with  $\beta$ -mercaptoethanol. (B) SDS-PAGE of the isoforms without  $\beta$ -mercaptoethanol. (C) PAS staining of the isoforms. M: protein weight marker, 1: ASPR-C-1, 2: ASPR-C-2.

如图 3C 所示，ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 蛋白在 SDS-PAGE 上的条带经 PAS 染色后均呈紫红色，表明两种蛋白均为糖蛋白。经蒽酮硫酸法检测，ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 糖基含量分别为 2.6% 和 8.2%。

2.3 质谱鉴定

对纯化的当归生药蛋白进行 AB SCIEX 5800

TOF/TOF 质谱分析，得到其肽指纹图谱 (PMF，并将 PMF 质荷比为 1 861.69 (ASPR-C-1)、952.52 (ASPR-C-2) 的肽段作为母离子进行 MALDI-TOF-MS (AB SCIEX) 二级质谱分析，用 Masoct 软件搜索 NCBI nr 蛋白质数据库，鉴定结果如表 2 所示。由表 2 结果可知，与 ASPR-C-1 最为匹配的蛋白是来自胡萝卜 *Daucus carota* 的分子量为

表 2 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 质谱分析结果

Table 2 Mass spectrometry analysis results of ASPR-C-1 and ASPR-C-2

No.	Accession No.	Known protein	Source	$M_w$ (Da)	Protein score
ASPR-C-1	gi 18652047	Major allergen isoform Dau c 1.0201	<i>Daucus carota</i> (carrot)	16 508	100
ASPR-C-2	gi 18652047	Major allergen isoform Dau c 1.0201	<i>Daucus carota</i> (carrot)	16 508	102
ASPR-C-2	gi 14423646	Api g 2; Api g 1	<i>Apium graveolens</i>	17 079	102
ASPR-C-2	gi 1769847	Api g 1.0201 allergen	<i>Apium graveolens</i>	17 079	102

Petein scores greater than 93 are significant ( $P<0.05$ ).



16 508 Da、得分为 100、登录号为 gi/18652047 的 Dau c 1.0201 蛋白。同样的,与 ASPR-C-2 相匹配的除了与 ASPR-C-1 相似的 major allergen isoform Dau c 1.0201 蛋白外,还有来自芹菜 *Apium graveolens* 的分子量为 17 079 Da、得分为 102、登录号为 gi/14423646 的 Api g 1 蛋白和同样来自 *Apium graveolens*、登录号为 gi/1769847 的 Api g 1.0201。这些蛋白均属于 PR-10 家族蛋白。由此可知 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 均为 PR-10 类蛋白,是当归 PR-10 蛋白的两个亚型。

## 2.4 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 的酶学性质研究

### 2.4.1 反应 pH 的影响

图 4 所示的 pH-活性曲线的结果表明,ASPR-C-1 在 pH 5.8 左右相对酶活性最高,在 pH 4.0–5.8 之间,该酶相对酶活性随 pH 的增加而快速增加,pH 5.8–7.0 之间,该酶相对酶活性随 pH 的增加反而急剧减少,当 pH<4.0 或 pH>7.0 时,其活性变化缓慢,该酶的相对酶活性均不到 30%。反应 pH 对 ASPR-C-2 核糖核酸酶活性的影响与 ASPR-C-1 的相似,但 ASPR-C-2 的最适反应 pH 为 5.5。

### 2.4.2 反应温度的影响

分别在最适 pH 的条件下进一步研究反应温度对两种蛋白核糖核酸酶活性的影响,结果如图 5 所示。当反应温度为 30–50 °C 时,ASPR-C-1 的

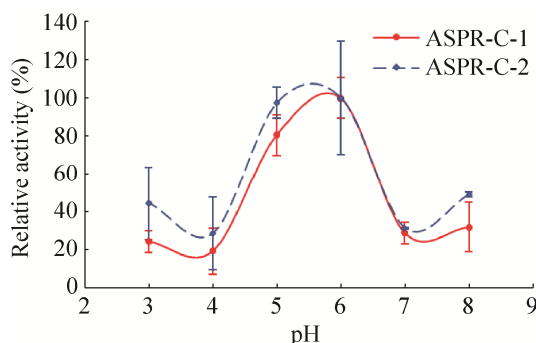


图 4 两种蛋白亚型核糖核酸酶活性的最适 pH

Fig. 4 The optimum pH of the ribonuclease activity of two isoforms.

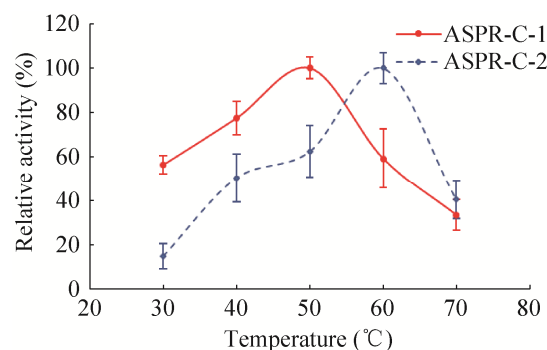


图 5 两种蛋白亚型核糖核酸酶活性的最适温度

Fig. 5 The optimum temperature of the ribonuclease activity of two isoforms.

相对酶活性随反应温度的增高而增加,当反应温度达到 50 °C 时,该酶的相对酶活性最高,当反应温度继续增大时,ASPR-C-1 的相对酶活性反而随着温度的增高而降低。ASPR-C-2 酶活性的最适反应温度为 60 °C,反应温度低于或高于 60 °C 都会使其相对酶活性下降。

### 2.4.3 温度稳定性研究

在两种蛋白的最适 pH 与最适温度下,两种蛋白的核糖核酸酶活性的热稳定性如图 6 所示。实验结果表明,两种蛋白在 60 °C 下均有最佳的稳定性。其中 ASPR-C-1 在 30–70 °C 保持 15 min 后剩余酶活性均大于 50%,但是当温度超过 70 °C 后,剩余酶活力急剧下降,表明 ASPR-C-1 在 30–70 °C 时有较好的热稳定性;而 ASPR-C-2 在 20–100 °C 保持 15 min 后剩余酶活性均大于 50%,且在 50–100 °C 的剩余酶活力均大于 80%,表明 ASPR-C-2 在 20–100 °C 时有较好的热稳定性活性。比较二者而言,ASPR-C-2 具有良好的热稳定性,100 °C 处理后仍余 80% 以上活力。

### 2.4.4 金属离子、螯合剂、表面活性剂和还原剂等对 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 酶活性的影响

如图 7 所示,Fe<sup>2+</sup>对 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 的核糖核酸酶活性有激活作用,分别使 ASPR-C-1 和 ASPR-C-2 的相对酶活性提高近 60% 和 70%。而 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>对二者的酶活性显示

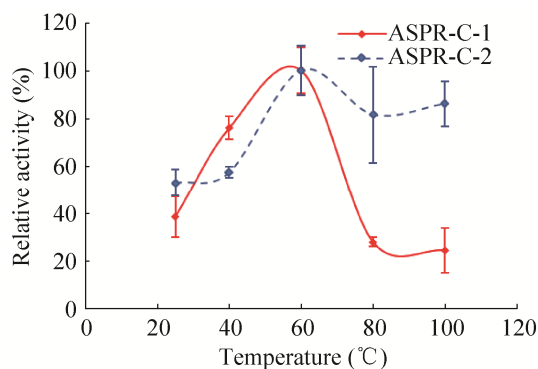


图6 两种蛋白亚型核糖核酸酶的热稳定性

Fig. 6 The thermal stability of the ribonuclease activity of two isoforms.

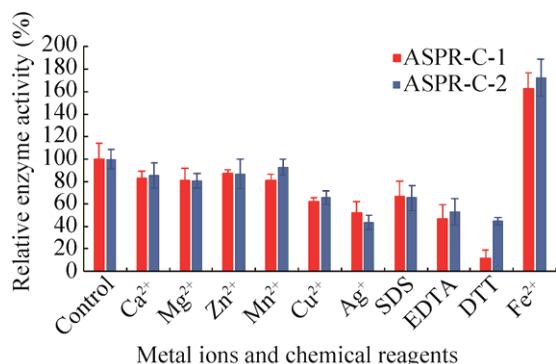


图7 金属离子、螯合剂、表面活性剂和还原剂等对ASPR-C-1和ASPR-C-2酶活性的影响

Fig. 7 Influence of metal ions, chelating agent, surfactant and protein reducing agent on ribonuclease activity of ASPR-C-1 and ASPR-C-2. EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid; SDS: sodium dodecylsulphate; DTT: dithiothreitol.

轻微抑制作用,二者在这四种离子下相对酶活性均保留在80%以上。但二者的酶活性受 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、EDTA和SDS的抑制程度较强,特别是ASPR-C-1在有DTT存在下相对酶活性仅剩15%,而ASPR-C-2有50%的酶活性残留。

### 3 讨论

本研究中通过硫酸铵一步沉淀(0–80%)、Sephadex G-50凝胶过滤层析和DEAE-Sepharose阴离子交换柱三步纯化从当归生药中分离纯化得到ASPR-C-1和ASPR-C-2两种蛋白,经质谱测

序鉴定均为PR-10类蛋白,得率分别为16.44%和39.13%(图1,图2,表1)。两种蛋白在SDS-PAGE中分子量分别为17.33 kDa (ASPR-C-1)和17.18 kDa (ASPR-C-2)(图3A),与已报道的大多数PR-10蛋白的分子量相似<sup>[21–26]</sup>。

PR-10蛋白通常以单体形式存在,但也有一些例外。例如豆薯 *Pachyrrhizus erosus* 中的PR-10蛋白质SPE-16<sup>[27]</sup>、黄芪AmPR-10<sup>[26]</sup>和绿豆CSBP<sup>[28]</sup>在溶液中均为同二聚体,人参PgPR-10.1和PgPR-10.2蛋白在溶液中既能以同二聚体形式存在,又能因为相互作用彼此间形成异二聚体<sup>[29]</sup>,桦树花粉过敏原Bet v 1在溶液中则既以单体存在又能形成二聚体<sup>[30]</sup>。

由于凝胶过滤层析Sephadex G-50分级分离的范围为1.5–30 kDa,本研究中所得的G-50第二峰中的蛋白分子量应低于30 kDa,但最终该峰中除了存在17 kDa左右的蛋白还存在35 kDa左右的蛋白(图1B),由于后者的分子量为前者的两倍,可知后者应该为前者在溶液中形成的二聚体。最终纯化得到的蛋白的SDS-PAGE分析结果(图3B)也证实了这一点,两种当归生药PR-10蛋白在溶液中的存在形式与桦树花粉过敏原Bet v 1类似,在溶液中主要以单体形式存在,但会部分形成二聚体<sup>[30]</sup>。

在已发现的植物PR-10家族的蛋白中具有糖基化的只有黄芪AmPR-10,糖基含量为13.7%<sup>[26]</sup>,本课题组发现,源于当归的PR-10蛋白也是糖蛋白,且源于当归生药的两种PR-10蛋白(糖基含量分别为2.6%和8.2%)比鲜根中的PR-10蛋白<sup>[17]</sup>糖基含量高。

PR-10家族蛋白具有多种功能,其中核糖核酸酶活力是许多PR-10蛋白共同具有的生物学功能,例如黄芪AmPR-10<sup>[24]</sup>、羽扇豆根LaPR-10<sup>[8]</sup>、棉花GaPR-10<sup>[23]</sup>、豆薯中的SPE16<sup>[24–27]</sup>、辣椒CaPR-10<sup>[25]</sup>等均具有核糖核酸酶活性。本研究纯化得到的两种当归生药PR-10蛋白也具有核糖



核酸酶活性,与同为糖基化蛋白的黄芪 AmPR-10 蛋白 (74.11 U/mg)<sup>[22]</sup>相比, ASPR-C-1 的比活 (73.60 U/mg) 与之相当, ASPR-C-2 的比活 (146.76 U/mg) 是其近 2 倍 (表 1)。当归生药 PR-10 蛋白也比当归鲜根中的 PR-10 蛋白具有更高的核糖核酸酶活性。当归生药 PR-10 蛋白核糖核酸酶活性的最适 pH 相近,均为 5.6 左右,但二者的最适温度不同, ASPR-C-1 的为 50 °C, ASPR-C-2 的为 60 °C (图 4, 图 5)。与 ASPR-C-1 以及当归鲜根中的 PR-10 蛋白<sup>[17]</sup>相比,当归生药中的 ASPR-C-2 具有最佳的耐热性能,在 50–100 °C 热处理后的剩余酶活力均大于 80% (图 6)。

不同金属离子、螯合剂和表面活性剂、还原剂对 PR-10 蛋白的核糖核酸酶的影响有显著差异。有研究表明  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、EDTA、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 和 SDS 对玉米 Zm PR10 和 Zm PR10.1 有轻微的抑制活性<sup>[31]</sup>,但  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 对黄芪 AmPR-10 有强烈的抑制活性<sup>[26]</sup>。在本研究中,  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 对二者的活性都轻微抑制作用,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、EDTA、DTT 和 SDS 对二者酶活性的抑制程度较强。而  $\text{Fe}^{2+}$ 对二者的核糖核酸酶活性有明显的激活作用 (图 7)。

当归中不同 PR-10 蛋白 PR-10 蛋白核糖核酸酶活性的酶学参数及稳定性的差异可能源于二者不同的氨基酸组成及糖基含量。未来将进一步测定当归中不同 PR-10 蛋白的全序列、三维结构及生物学功能,以进一步揭示当归中不同 PR-10 蛋白之间的结构与功能的异同点。

## REFERENCES

- [1] Agarwal P, Agarwal PK. Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(2): 599–611.
- [2] Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, et al. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(3): 479–488.
- [3] Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46(11): 941–950.
- [4] Liu JJ, Ekramoddoullah AKM. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2006, 68(1/3): 3–13.
- [5] Lebel S, Schellenbaum P, Walter B, et al. Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 184.
- [6] Moiseyev GP, Beintema JJ, Fedoreyeva LI, et al. High sequence similarity between a ribonuclease from *ginseng* calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta*, 1994, 193(3): 470–472.
- [7] Moiseyev GP, Fedoreyeva LI, Zhuravlev YN, et al. Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Lett*, 1997, 407(2): 207–210.
- [8] Bantignies B, Séguin J, Muzac I, et al. Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(6): 871–881.
- [9] Li X, Zhang LH, Wang XX, et al. The chemical composition and pharmacological research progress of *Angelica sinensis*. *J Chin Med Mater*, 2013, 36(6): 1023–1028 (in Chinese).  
李曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展. *中药材*, 2013, 36(6): 1023–1028.
- [10] Wang KP, Song ZZ, Wang HJ, et al. *Angelica sinensis* polysaccharide attenuates concanavalin A-induced liver injury in mice. *Int Immunopharmacol*, 2016, 31: 140–148.
- [11] Wang KP, Peng C, Wang HX, et al. Chronic administration of *Angelica sinensis* polysaccharide effectively improves fatty liver and glucose homeostasis in high-fat diet-fed mice. *Sci Rep*, 2016, 6: 26229.
- [12] Wu GT, Liu WZ, Niu TH, et al. Protective effects of angelica sinensis volatile oil on atherosclerosis in hyperlipidemia mice. *J Chin Med Mater*, 2016, 39(9): 2102–2107 (in Chinese).  
吴国泰, 刘五州, 牛亭惠, 等. 当归挥发油对高血脂小鼠动脉粥样硬化的保护作用. *中药材*, 2016, 39(9): 2102–2107.
- [13] Zhang Y, Rui YJ, Mi JY, et al. Effects of *Angelica polysaccharides* on the cell cycle and cell apoptosis

- in bone marrow mononuclear cells of radiation injured mice. Yangzhou: Chinese Association for Laboratory Animal Sciences, 2012: 913–916 (in Chinese).
- 张雁, 芮永军, 糜菁熠, 等. 当归多糖对放射损伤小鼠骨髓单个核细胞细胞周期及细胞凋亡的影响//第十届中国实验动物科学年会论文集. 扬州: 中国实验动物科学年会, 2012: 913–916.
- [14] Zhang Y, Wu H, Gaun XJ, et al. Compared study of hematopoietic recovery of angelica polysaccharides dosaged pre-irradiation and post irradiation on radiation injured mice. J Chongqing Med Univ, 2010, 35(7): 965–969 (in Chinese).
- 张雁, 吴宏, 关雪晶, 等. 当归多糖照射前后给药对放射损伤小鼠造血功能恢复的比较研究. 重庆医科大学学报, 2010, 35(7): 965–969.
- [15] Pan JR, Zhang XM, Li LL, et al. Extraction and activity analysis of the protein in the decoction pieces of Chinese *Angelica*. Guihaia, 2016, 36(11): 1363–1368 (in Chinese).
- 潘剑茹, 张小梅, 李玲玲, 等. 当归饮片蛋白质的提取与活性分析. 广西植物, 2016, 36(11): 1363–1368.
- [16] Li X, Wang XL, He CH, et al. Protective effects of the *Angelica sinensis* protein against radiation injury in mice. J Radiat Res Radiat Proce, 2018, 36(4): 17–23 (in Chinese).
- 李娴, 王香玲, 何火聪, 等. 当归蛋白对小鼠的辐射防护作用. 辐射研究与辐射工艺学报, 2018, 36(4): 17–23.
- [17] Pan JR, Wang XL, Li LL, et al. Purification and characterization of two pathogenesis-related class 10 protein isoforms with ribonuclease activity from the fresh *Angelica sinensis* roots. Plant Physiol Biochem, 2018, 128: 66–71.
- [18] Zacharius RM, Zell TE, Morrison JH, et al. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. Analyt Biochem, 1969, 30(1): 148–152.
- [19] Zhang J, Li CY, Li JP, et al. Determination of polysaccharide in rhizoma of *Panax japonicus* by anthrone sulfuric acid method and phenol sulfuric acid method. Central South Pharm, 2012, 10(6): 421–424 (in Chinese).
- 张杰, 李春艳, 李劲平, 等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定竹节参多糖含量的比较研究. 中南药学, 2012, 10(6): 421–424.
- [20] Zhang Z, Niu WB, Zhao JK, et al. Isolation, purification and physiochemical properties of *Agaricus silvicola*. Edible Fungi, 2009, 31(6): 8–9, 11 (in Chinese).
- 张哲, 牛万宝, 赵靖坤, 等. 白林地蘑菇核糖核酸酶的分离纯化及理化性质研究. 食用菌, 2009, 31(6): 8–9, 11.
- [21] Sikorski MM, Biesiadka J, Kasperska AE, et al. Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. Plant Sci, 1999, 149(2): 125–137.
- [22] Liu XJ, Huang BB, Lin J, et al. A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress-and pathogen-inducible. J Plant Physiol, 2006, 163(5): 546–556.
- [23] Zhou XJ, Lu S, Xu YH, et al. A cotton cDNA (*GaPR-10*) encoding a pathogenesis-related 10 protein with *in vitro* ribonuclease activity. Plant Sci, 2002, 162(4): 629–636.
- [24] Wu F, Yan M, Li YK, et al. cDNA cloning, expression, and mutagenesis of a PR-10 protein SPE-16 from the seeds of *Pachyrrhizus erosus*. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(3): 761–766.
- [25] Park CJ, Kim KJ, Shin R, et al. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. Plant J, 2004, 37(2): 186–198.
- [26] Yan QJ, Qi XW, Jiang ZQ, et al. Characterization of a pathogenesis-related class 10 protein (PR-10) from *Astragalus mongholicus* with ribonuclease activity. Plant Physiol Biochem, 2008, 46(1): 93–99.
- [27] Wu F, Li Y, Chang S, et al. Purification, characterization and preliminary crystallographic studies of a PR-10 protein from *Pachyrrhizus erosus* seeds. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002, 58(12): 2165–2167.
- [28] Zawadzki P, Slósarek G, Boryski J, et al. A fluorescence correlation spectroscopy study of ligand interaction with cytokinin-specific binding protein from mung bean. Biol Chem, 2010, 391(1): 43–53.
- [29] Lee OR, Kim YJ, Balusamy SRD, et al. Expression of the ginseng PgPR10-1 in Arabidopsis confers resistance against fungal and bacterial infection. Gene, 2012, 506(1): 85–92.
- [30] Bufe A, Spangfort MD, Kahlert H, et al. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. Planta, 1996, 199(3): 413–415.
- [31] Xie YR, Chen ZY, Brown RL, et al. Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. J Plant Physiol, 2010, 167(2): 121–130.

(本文责编 陈宏宇)