



金针菇蛋白的研究与应用

JINZHENGU DANBAI DE
YANJIU YU YINGYONG

张介驰 沙长青◇主编



金针菇蛋白的研究与应用

JINZHENGU DANBAI DE
YANJIU YU YINGYONG

张介驰 沙长青主编



图书在版编目(CIP)数据

金针菇蛋白的研究与应用 / 张介驰, 沙长青主编.
-- 哈尔滨: 黑龙江大学出版社, 2011. 12
ISBN 978 - 7 - 81129 - 427 - 9

I. ①金… II. ①张…②沙… III. ①金钱菌属—植物蛋白—研究 IV. ①Q949.329.06

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 124712 号

书 名	金针菇蛋白的研究与应用
作 者	张介驰 沙长青 主编
出 版 人	李小娟
责 任 编 辑	赵丽华 付天松
出 版 发 行	黑龙江大学出版社(哈尔滨市学府路 74 号 150080)
网 址	http://www.hljupress.com
电 子 信 箱	hljupress@163.com
电 话	(0451)86608666
经 销	新华书店
印 刷	黑龙江省教育厅印刷厂
开 本	880 × 1230 1/32
印 张	6.25
字 数	150 千
版 次	2011 年 12 月第 1 版 2011 年 12 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 978 - 7 - 81129 - 427 - 9
定 价	18.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

本书编写人员

主 编：张介驰 沙长青

参编人员：张丕奇 杨志兴 韩增华 孔祥辉

马庆芳 戴肖东 刘佳宁

前 言

众所周知,金针菇、香菇、裂褶菌、草菇、杏鲍菇等是大众化的食用菌,其中尤以香菇、裂褶菌和金针菇更具有代表性,研究人员对它们的研究更加深入,这些研究结果在一定程度上代表了对大量食用菌的研究和认识。

本书是黑龙江省科学院微生物研究所资源微生物室的研究人员,在多年从事食用菌资源、微生物资源的开发利用实践活动中所积累和应用知识的归纳总结。本书是以金针菇作为模式植物,将国内外对金针菇酶的研究报告给予总结归纳,并分别予以论述,以便深入地认识金针菇中酶的存在、提取、纯化、性质、结构、功能及作用。

在本书编写过程中参考了大量的国内外相关文献,并将所参考文献列于各章之后,以便读者能够通过阅读本书,找到研究过程中所需要参考的内容,进而对原文献进行阅读和参考。

本书虽然经过作者深入研究,认真推敲,慎重撰写,但因笔者学识有限,不当之处在所难免,欢迎广大读者批评指正。

编者

2011年8月

目 录

1	金针菇免疫调节蛋白	1
1.1	金针菇免疫调节蛋白的性质	3
1.2	金针菇调节蛋白基因克隆及表达	5
1.3	金针菇免疫调节蛋白的生物学作用	8
1.4	金针菇免疫调节蛋白的免疫调节机制	11
1.5	金针菇免疫调节蛋白的开发与应用	12
1.6	应用领域和前景展望	15
	参考文献	17
2	金针菇核糖体失活蛋白	20
2.1	金针菇核糖体失活蛋白	22
2.2	核糖体失活蛋白(RIPs)的作用机制	25
2.3	核糖体失活蛋白的生物学功能及其应用	26
2.4	应用前景	27
	参考文献	28
3	金针菇的疏水蛋白	30
3.1	疏水蛋白的分类与结构特征	30
3.2	疏水蛋白的分布	32
3.3	疏水蛋白的性质	34
3.4	丝状真菌疏水蛋白的作用	35
3.5	疏水蛋白的生产	40

3.6	疏水蛋白的应用	41
	参考文献	42
4	金针菇子实体的凝集素	44
4.1	金针菇子实体凝集素(FVA)的性质	45
4.2	FVA 凝集素的血清学性质	47
4.3	金针菇等蘑菇凝集素(Lectin)的生物学活性及其 应用	49
4.4	金针菇凝集素的应用	51
	参考文献	54
5	金针菇毒素	55
5.1	金针菇毒素的性质	56
5.2	金针菇毒素的成孔性质	57
5.3	金针菇毒素的应用展望	58
	参考文献	59
6	金针菇的冰结合蛋白	61
6.1	金针菇冰结合蛋白活性的测定	61
6.2	金针菇冰结合蛋白基因的 DNA 序列	62
6.3	金针菇 IBP 蛋白的基因结构及基因表述	63
6.4	金针菇冰结合蛋白的作用	65
6.5	金针菇的抗冻蛋白或冰结合蛋白	65
6.6	金针菇的冰结合蛋白在已知冰结合蛋白中的 进化树中的位置	66
6.7	金针菇抗冻蛋白或冰结合蛋白的应用与展望	67
	参考文献	68
7	金针菇的血管紧张素转化酶抑制剂	70
7.1	金针菇等的 ACE 抑制活性	71

7.2	金针菇悬浮培养产生 ACE 条件的优化	71
7.3	培养液 pH 值和培养温度对金针菇菌丝的生长和 ACE 抑制剂活性的影响	73
7.4	金针菇的培养时间对菌丝生长和 ACE 活性的影响	73
7.5	金针菇 ACE 是肽类	74
	参考文献	74
8	金针菇的亲环素	76
8.1	与金针菇子实体形成相关的蛋白质	77
8.2	金针菇亲环素 N 端氨基酸序列分析与其他亲环 素的比较	77
8.3	亲环素在金针菇子实体形成中的作用	78
8.4	亲环素作用的分子生物学机制	79
8.5	亲环素的生物学作用	81
	参考文献	82
9	金针菇的细胞壁结合蛋白	83
9.1	金针菇的培养和细胞壁结合蛋白(PSH)的提取	84
9.2	光照处理之后菌盖的分化	85
9.3	在菌盖中表达的蛋白质	85
9.4	<i>psh</i> 基因的克隆	86
9.5	<i>psh</i> 基因组结构	87
9.6	<i>psh</i> 基因的表达方式	88
9.7	金针菇子实体菌盖的形成	89
9.8	光在担子菌子实体形成中的作用	90
	参考文献	91
10	金针菇的纤溶蛋白酶	93
10.1	金针菇胞外纤溶酶的发现	95

10.2	金针菇纤溶酶的性质	95
10.3	金针菇等蘑菇纤溶酶的生物学作用	99
	参考文献	100
11	金针菇的核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶	104
11.1	金针菇子实体中的 AIP 敏感的核糖核酸酶(RNase) ...	104
11.2	金针菇子实体的核糖核酸酶	105
11.3	金针菇子实体核酸酶的作用模式	105
11.4	金针菇 RNA 酶的作用机制及其应用	108
	参考文献	109
12	金针菇的磷酸二酯酶	111
12.1	金针菇子实体磷酸二酯酶的性质	111
12.2	PDase 酶反应动力学	112
	参考文献	115
13	金针菇中性酚氧化酶	116
13.1	金针菇中性酚氧化酶的性质	117
13.2	中性酚氧化酶的生物学作用	121
	参考文献	122
14	金针菇的草酸脱羧酶	123
14.1	转金针菇 OXDC 基因烟草的降解草酸作用	124
14.2	转 OXDC 基因植物的抗真菌感染能力	124
	参考文献	125
15	金针菇的甲壳质酶	126
15.1	甲壳质酶的底物特异性	127
15.2	甲壳质酶基因的克隆和表达	128
15.3	甲壳质酶的应用	131
	参考文献	132

16	金针菇的一氧化氮合成酶	133
16.1	NO 对金针菇子实体形成的影响	135
16.2	影响金针菇 NOS 酶活性的因素	135
16.3	金针菇 NOS 的相对分子质量及等电点	136
16.4	金针菇 NOS 的稳定性	136
16.5	NOS 的生物学功能及应用	137
	参考文献	138
17	金针菇的漆酶	139
17.1	漆酶的种类与分布	139
17.2	金针菇的漆酶	141
17.3	金针菇漆酶的底物及其催化机制	141
17.4	金针菇漆酶基因的克隆与表达	142
17.5	金针菇漆酶的应用与展望	142
	参考文献	145
18	金针菇甘油醛-3-磷酸脱氢酶	146
18.1	甘油醛-3-磷酸脱氢酶的特性	146
18.2	金针菇 GAPDH 的生物学作用及其应用	148
18.3	金针菇 GAPDH 基因克隆及表达研究	148
	参考文献	151
19	金针菇的内切 β -N-乙酰胺基葡萄糖苷酶	153
19.1	Endo FV- I 与 Endo FV- II 的提取和纯化	154
19.2	纯化的 Endo FV- I 与 Endo FV- II 的特性	154
19.3	编码 Endo FV 酶基因的分析	157
	参考文献	157
20	金针菇一种新的外切 β -1,3-1,6-葡聚糖酶	159
20.1	金针菇外切 β -1,3-1,6-葡聚酶的提取与纯化	160

20.2	金针菇子实体的 β -葡聚糖酶酶谱	161
20.3	金针菇子实体 FvBGL1 的酶学性质	161
20.4	金针菇 FvBGL1 酶的作用机制	165
20.5	金针菇 FvBGL1 酶的应用与展望	165
	参考文献	166
21	金针菇的海藻糖酶和海藻糖磷酸化酶	168
21.1	金针菇海藻糖磷酸化酶的性质	169
21.2	金针菇子实体发育过程中糖元磷酸化酶活性的变化	170
21.3	金针菇子实体发育过程中海藻糖磷酸化酶和海藻糖酶活性的变化	170
21.4	海藻糖磷酸化酶的应用与展望	171
	参考文献	172
22	金针菇的甲壳质脱乙酰基酶	174
22.1	甲壳质脱乙酰基酶的研究概况	174
22.2	金针菇甲壳质脱乙酰基酶基因的克隆及在毕赤酵母中的表达	177
22.3	金针菇 CDA 的应用与展望	179
	参考文献	181
23	金针菇的胆固醇脱氢酶	183
23.1	金针菇胆固醇脱氢酶的性质	183
23.2	胆固醇脱氢酶的应用	184
	参考文献	185

1 金针菇免疫调节蛋白

金针菇(*Flammulina velutipes*),别名冬菇、朴蕈、绒毛柄金钱菌等,属真菌门担子菌亚门层菌纲伞菌目口蘑科金钱菌属。金针菇广泛分布于亚洲、欧洲、北美洲、大洋洲等地,在我国广泛分布。金针菇是我国古代最早进行人工栽培的食用菌之一,栽培历史十分悠久。日本从20世纪60年代实现了金针菇的工厂化生产,现年产量100 000 t左右,我国台湾地区的金针菇年产量达5 000 t以上,我国的金针菇年产量已达160 000 t以上,成为世界上金针菇产量最大的国家。

金针菇盖滑、柄脆、味鲜,营养极其丰富。据测定,每100 g鲜菇含水88.37 g、蛋白质2.72 g、脂肪0.13 g、灰分0.83 g、糖5.45 g、粗纤维1.77 g;铁0.22 mg、钙0.097 g、磷1.48 mg、钠0.22 mg、镁0.31 mg、钾3.7 mg;维生素B₁0.29 mg、维生素B₂0.21 mg、维生素C2.27 mg。金针菇含有18种氨基酸,每100 g鲜菇中所含氨基酸总量可达20.9 mg,其中人体必需氨基酸占氨基酸总量的44.5%,高于一般菇类。其中,赖氨酸和精氨酸含量特别丰富,每100 g干菇中赖氨酸和精氨酸的含量分别为1.024 g和1.231 g,具有很好的食药价值(马庆芳等,2005)。

高等真菌作为免疫调节药物在中医中的应用已有2 000年之久,对其药学功能的研究也一直为学者们所关注。真菌免疫

调节蛋白(Fungal Immunomodulatory Protein, FIP)是20世纪90年代从灵芝中发现的一类蛋白质,它不仅具有与免疫球蛋白重链可变区相似的结构,而且具有抑制过敏反应,促进核酸、蛋白质合成和加速代谢的功能,能够增强机体的免疫力等作用。

金针菇中含有多种功能性蛋白,统称为火菇素,如核糖体失活蛋白(Ribosome Inactivating Proteins, RIP)具有抗肿瘤、抗病毒、抗虫、抗真菌以及抗人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)等活性。金针菇毒素(Flammutoxin, FTX)是一种成孔溶细胞素(Pore-forming Cytolysin),可引起哺乳动物红细胞裂解,使肿瘤细胞溶胀破裂,并能改变肠上皮细胞的渗透性,具有促进药物吸收等作用;免疫调节蛋白经Ko等人(Ko et al., 1995; Ko et al., 1997; Hsu, 1997; Rincon, 1998; Wang, 2004)研究表明,具有抗癌、抗过敏、抗增殖、刺激免疫细胞产生多种细胞因子和免疫调节功能(孔祥辉等, 2006; 孙宇峰等, 2006, 2007)。

金针菇免疫调节蛋白(Immunomodulatory Proteins of *Flammulina velutipes*, FIP-fve)作为火菇素的一种是从金针菇中分离得到的免疫调节蛋白,能促进淋巴细胞的活性,诱导白介素-2和干扰素的产生。我国台湾林荣耀院士首次通过阳离子和阴离子交换纤维素柱层析法从金针菇中纯化出一种免疫调节蛋白,命名为金针菇免疫调节蛋白(Immunomodulatory Protein of *Flammulina velutipes*),相对分子质量约为12 700。已知FIP-fve对人体周边淋巴细胞及小鼠脾脏细胞具有增殖活性,并可刺激淋巴细胞产生细胞因子,同时减少发炎时的水肿现象,此蛋白对免疫细胞的分子作用机制以及对癌症的作用机制正在研究中,现就金针菇免疫调节蛋白的研究与开发应用概述如下。

1.1 金针菇免疫调节蛋白的性质

1.1.1 金针菇免疫调节蛋白的分离纯化

Ko 等(1997)从鲜金针菇中提取纯化金针菇免疫调节蛋白(FIP-five),方法是取 400 g 金针菇,用 PB 缓冲液清洗,沥干。加入 1 000 mL 0.15 mol/L NaCl,匀浆。4 ℃放置 2 h,6 000 r/min 冷冻离心 40 min。收集上清液,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 85%饱和度,不断搅拌 1 h。6 000 r/min 冷冻离心 40 min。收集沉淀,加入 220 mL 灭菌水溶解,透析后得样品溶液,4 ℃保存。超滤浓缩脱盐后,进行蛋白浓度测定。将溶胀好的 DEAE 纤维素分别用 0.5 mol/L NaOH 溶液和 0.5 mol/L HCl 溶液处理,用 200 mL pH 值为 7.4 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液浸泡,装柱。用同样的缓冲液平衡 DEAE-纤维素柱(2.2 cm × 10 cm),将样品溶液加入柱中,用同样的缓冲液洗涤,收集未结合的具有免疫调节活性和细胞凝集素作用的蛋白部分样品,浓缩后用 MonoSHR5/5 层析柱分离,该柱先以 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 5.2)平衡,样品上柱后用同样的缓冲液洗涤,然后用含 0 ~ 1 mol/L NaCl 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 5.2)进行线性梯度洗脱,收集流出样品的活性峰,浓缩冻干,得到 35 mg 样品即为纯化的金针菇免疫调节蛋白。经凝胶电泳检测为单一蛋白条带,相对分子质量为 12 800。

1.1.2 金针菇免疫调节蛋白的生化性质

Ko 等(1997)从金针菇中分离到一种具有免疫调节功能的

蛋白,命名为 FIP-fve,又称为火菇素。这种蛋白具有免疫调节作用和细胞凝集活性,纯化的 FIP-fve 为 114 个氨基酸构成的一条多肽链,相对分子质量为 12 704,由 342 个碱基编码,它的一级、二级结构类似于人免疫球蛋白(Ig)的重链。它对过碘酸-席夫氏试剂显示负染色,表明 FIP-fve 未被糖基化,为单纯蛋白质。

1.1.3 单糖和二糖对 FIP-fve 凝集作用的影响

FIP-fve 浓度在 2 $\mu\text{g/mL}$ 时,对人的红细胞具有显著的细胞凝集活性,浓度为 0.1 mmol/L 的不同单糖和二糖,如 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-岩藻糖、N-乙酰-D-葡萄糖胺,N-乙酰-D-氨基半乳糖或乳糖等对其凝集作用没有任何影响。

1.1.4 对 Balb/c 小鼠系统过敏症的抑制作用

FIP-fve 对 Balb/c 小鼠的系统过敏症有抑制作用。对小鼠通过皮下或腹腔注入牛血清白蛋白(BSA)使其致敏,在 17 d 后再注入 BSA 以加强免疫,所有小鼠均呈现过敏症,在最后注入 BSA 的 30 min 内,观察发现对照组小鼠死亡,但实验组即分别注入 6~7 次 FIP-fve 的小鼠却未表现出过敏症,表明 FIP-fve 有抗过敏症作用。

1.1.5 对小鼠产生抗体的抑制作用

FIP-fve 对由 48/80 化合物免疫的 Balb/c 小鼠具有抑制其产生抗体的作用。通过皮下注射 48/80 化合物的小鼠后爪水肿试验研究发现:对照组 80% 小鼠表现出阳性的水肿反应,在 2 h 之内呈暗红色。但当小鼠用 5 mg/kg 和 20 mg/kg 的 FIP-fve 治疗后,阳性反应则减少至对照组的 49.3% 和 13.75%,证明 FIP-fve

可减少小鼠的水肿反应,抑制抗体的产生(Wu et al.,2008;孙宇峰等,2006)。

1.2 金针菇调节蛋白基因克隆及表达

真菌免疫调节蛋白(Fungal Immunomodulatory Protein, FIP)是20世纪90年代从灵芝中发现的一类蛋白质,具有与免疫球蛋白重链可变区相似的结构,有抑制过敏反应、促进核酸和蛋白质合成、加速代谢、增强机体免疫力等作用。Ko等(1997)从金针菇中分离出来一种具有免疫调节功能的蛋白,命名为FIP-fve。FIP-fve作为免疫调节蛋白,在抗过敏、显著提高腹腔细胞对癌细胞的杀灭能力、抑制癌细胞增长、激活T淋巴细胞产生大量细胞因子、促进人外周血淋巴细胞产生细胞因子(IFN- γ , IL-4)等方面具有明显作用,口服或注射均具有很好的临床效果。在金针菇子实体中,金针菇免疫调节蛋白含量极低,通过从子实体中提取的方法得到的量很少,所以通过基因工程的方法来生产该蛋白具有极其重要的意义。

1.2.1 金针菇免疫调节蛋白基因在大肠杆菌 DE3 (BL21)中的克隆与表达

孔祥辉等(2007)通过构建重组质粒 pUC19-FIP-fve,并在此基础上构建原核(*E. coli*)表达载体 pET30a-FIP-fve,转化感受态大肠杆菌 DE3 (BL21),并经 IPTG 诱导表达金针菇免疫调节蛋白,产物经 SDS-PAGE 电泳鉴定,表明该基因在大肠杆菌 DE3 (BL21)中成功表达,为金针菇免疫调节蛋白实现基因工程生产提供了基础。这对于将金针菇免疫调节蛋白开发成新的免疫制

品,用于预防和治疗癌症及过敏症等疾病有重要的实践意义。

孔祥辉等利用 RT-PCR 方法从金针菇子实体中提取分离其总 RNA,反转录后 PCR 得到 cDNA,重组到质粒 pUC19 中,构建成功 pUC19-FIP-fve。两个克隆测得的序列有一个碱基不同,即一个克隆在位置 54 为 T 而不是 C,其余均相同。二者表达的是同一种氨基酸,该基因的开放读码框为 342 bp,编码 114 个氨基酸。基因序列(342 bp)如下:

```
ATGTCCGCCACGTCGCTCACCTTCCAGCTTGCCTACTT
GGTGAAGAAGATCGATTTCGACTACACCCCCAACTGG
GGCCGTGGTACCCCCAAGCAGCTACATCGACAACCTTA
CCTTCCCCAAGGTTCTCACCGACAAAAAATACTCGTA
CCGCGTCGTGGTCAATGGCTCTGACCTTGGCGTCGAG
TCCAACCTTCGCAGTGACACCGTCCGGTGGGCAGACC
ATCAACTTCCTCCAGTACAACAAGGGGTATGGTGTCTG
CGGACACCAAAACGATTCAAGTTTTCGTTGTCAITCC
AGATACCGGCAACTCGGAGGAGTACATCATCGCTGAG
TGAAGAAG
```

重组质粒 pUC19-FIP-fve 经 *Eco*RI 与 *Bam*HI 双酶切进行琼脂糖凝胶电泳得到两条带,一条带为 pUC19,另一条带为目的基因 FIP-fve 片段(342 bp),将这一片段连接到 pET30a 经 *Eco*RI 与 *Bam*HI 双酶切的质粒上,获得重组质粒 pET30a-FIP-fve,转化到 *E. coli* DE3 中,测序结果与金针菇免疫调节蛋白基因序列相同,用 T 启动子引物对 FIP-fve 基因表达进行调控,用原核表达来生产金针菇免疫调节蛋白。对 pET30-FIP-fve 在 *E. coli* DE3 中的诱导表达产物进行 SDS-PAGE 电泳,观察到 pET30-FIP-fve 表达的融合蛋白在相对分子质量约 16 000 处存在明显条带,表明金