

冬小麦春化期间玉米赤霉烯酮 结合蛋白的研究^①

韩玉珍^② 孟繁静
(生物学院)

摘要 采用放射配体结合分析法结合生化技术分析了冬小麦春化期间的玉米赤霉烯酮(ZEN)特异结合蛋白。表明在冬小麦幼苗中存在着 ZEN 的特异结合蛋白(ZBP)。ZBP 对 ZEN 的结合具有可饱和的性质, Scatchard 分析表明解离常数 $K_d = 1.9 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结合位点数目 $n = 6.2 \text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 可溶性蛋白。30% 饱和硫酸铵沉淀可使 ZBP 纯化 3~4 倍。对 ZBP 进行的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明 ³H-ZEN 结合到两个组分上, 特异结合组分可能在 Rm0.5 处。

关键词 玉米赤霉烯酮; 结合蛋白; 冬小麦

中图分类号 Q945.41; S512.1

Studies on Zearalenone-Binding Protein in Winter Wheat During Vernalization

Han Yuzhen Meng Fanjing
(College of Biology)

Abstract We investigated the specific zearalenone-binding protein in winter wheat (*Triticum aestivum* L. cv Yan Da 1817) during vernalization by means of Radio Ligand Binding Assay and biochemical technique. The results showed that the young seedling of vernalized winter wheat contained the specific binding protein for zearalenone. Saturation analysis of zearalenone-binding protein (ZBP) showed that the binding for zearalenone was saturable. Scatchard analysis revealed the presence of a single type of binding sites. The dissociation constant for zearalenone (K_d) was calculated to be $1.9 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the number of binding sites to be 6.2 pmol per milligram soluble protein. Partial purification of ZBP was achieved by 30% saturated ammonium sulfate precipitation. The native PAGE analysis of ZBP showed that there were two peaks of radioactivity, which located in Rm0.5 and Rm0.95 respectively, P0.5 was probably the specific binding peak.

Key words zearalenone; binding-protein; winter wheat

李季伦等^[1]首次发现玉米赤霉烯酮广泛存在于植物体内,是一类具有激素性质的微量活性物质。随后一系列实验表明玉米赤霉烯酮在植物的成花诱导及开花过程中均可能起重

收稿日期: 1995-10-18

①国家自然科学基金资助项目 39330010

②韩玉珍,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

要调控作用,如已发现在植物的春化诱导、光周期诱导及授粉受精阶段都有玉米赤霉烯酮含量高峰出现^[2,3],但对玉米赤霉烯酮在植物体内的作用方式和调控机理还缺乏了解。玉米赤霉烯酮是一小分子信号物质(分子量 318),根据对动物激素及植物激素的作用方式的研究可知,小分子信号物质必须与细胞内的大分子物质结合,形成激素受体复合物,才能诱发特定的生理反应。已有实验证明在冬小麦春化幼苗提取液中有玉米赤霉烯酮特异结合蛋白存在,本文着重探讨了玉米赤霉烯酮结合蛋白对玉米赤霉烯酮结合的饱和性和解离常数,并对结合蛋白进行了初步分离和纯化。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

冬小麦燕大 1817(*Triticum aestivum* L. cv. Yan Da 1817)种子经 0.1% HgCl₂ 表面灭菌 10 min,流水冲洗 2 h,室温下吸涨萌动后,置于 4℃ 冰箱内进行低温春化处理。

1.2 溶液配制

³H-玉米赤霉烯酮(³H-ZEN,比活 3.18 Ci·mmol⁻¹,由中国原子能研究院标记,贮存于 2~4℃ 下乙醇液中)溶液:取一定量³H-ZEN 乙醇液,自然挥发干燥,加入缓冲液至所需浓度。TESH 缓冲液:Tris 10 mmol,DTT 1.5 mmol,EDTA 1 mmol,用 HCl 调 pH7.5。DCC 溶液:用 TESH 缓冲液配制 0.05% 的葡聚糖 T₇₀(Sigma 公司产品),再加入活性炭粉末(100~400 目,Simga 公司产品)至浓度 0.5%,磁力搅拌器搅拌 30 min。闪烁液:PPO 4 g,POPOP 125 mg,乙酸乙酯 250 mL,二甲苯 1 000 mL。TNT 漂洗液:NaCl 150 mmol,Tris 50 mmol,Tween-20 0.05%,pH7.5。

1.3 细胞组分制备

春化四周的小麦幼苗,剪去胚根及部分胚芽鞘,留下胚芽和胚芽鞘基部在内的 0.5 cm 切段,按 1:2(W/V)加入 TESH 缓冲液,匀浆,4 层纱布过滤,滤液经 100 000×g 离心后,上清液进行结合分析,用考马斯亮蓝 G250 蛋白测定法测定蛋白含量^[2]。

1.4 饱和分析

取 180 μL 提取液,加入 20 μL³H-ZEN,使其终浓度为 10,50,100,150,200 nmol·L⁻¹,于非特异结合管中预先加入过量(³H-ZEN 浓度的 500 倍)非标记 ZEN 乙醇液,液氮吹干,如同总结合管加入植物组织提取液和³H-ZEN,4℃ 下保温 1 h,保温结束后,取 100 μL 保温混合液滴在 3 cm²的硝酸纤维素(NC)膜上(Amersham 公司产品,预先用 TESH 缓冲液浸湿,干燥),30 s 后用 TNT 溶液漂洗,漂洗过程在摇床上完成,3 min 内更换洗脱液 3 次(3×10 min),洗后的 NC 膜直接放入闪烁瓶,加 5 mL 闪烁液,放置过夜,用 Beckman L. S. 9800 液体闪烁计数器测定放射活性。取 3 次实验平均值,计算方法参考邹继超等^[5],计算每 100 μL 样品中的³H-ZEN 的量,总结合为 B_T,非特异结合为 B_{nsp},未经分离的总³H-ZEN 的量为 T,游离³H-ZEN 的量 F=T-B_T,特异结合的³H-ZEN 的量 B_{sp}=B_T-B_{nsp},以游离的³H-ZEN 的浓度 F(nmol·L⁻¹)为横坐标,B_T,B_{nsp}和 B_{sp}为纵坐标绘制曲线,为饱和曲线,以 B_{sp}为横坐标,B_{sp}/F 为纵坐标绘图,为 Scatchard 图(图 1)。从 Scatchard 图上可求得结合蛋白的解离常数和结合位点数目。

1.5 硫酸铵沉淀分析

在组织提取液中(预先与 $^3\text{H-ZEN}$ 保温的或未保温的)小心加入固体硫酸铵颗粒并不断搅拌(用 NH_4OH 维持 $\text{pH}7.5$ 左右),使成30%或90%饱和度的硫酸铵溶液,产生白色乳浊液,在 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 下放置30 min, $10\ 000\times g$ 离心30 min,沉淀的蛋白用原体积 TESH 缓冲液溶解,直接用于测定放射活性或进行结合分析,并同时测定各级沉淀中的蛋白含量,以确定 ZEN 结合蛋白的纯化情况。

1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

聚丙烯酰胺凝胶电泳方法参照张龙翔等^[6]。电泳胶板为 $1\ \text{mm}\times 120\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}$ 。样品制备: $100\ 000\times g$ 离心后的上清液,经30%饱和硫酸铵沉淀,沉淀用稀释5倍的浓缩胶缓冲液再悬浮。悬浮液与 $^3\text{H-ZEN}$ 保温(同上),保温结束后加入由 $20\ \mu\text{L}$ DCC 溶液沉淀得到的活性炭粉,摇匀, 4°C 下置10 min, $1\ 000\times g$ 离心15 min,离心后上清液中加入固体蔗糖使浓度为15%,加入0.1%溴酚兰(100:1, V/V),取 $60\ \mu\text{L}$ 用于上样。 4°C 下电泳3~4 h,电泳完毕后,将电泳胶切条(每份样品切20条),分别放入闪烁瓶中,同上测定放射活性。根据测定结果,绘制电泳图谱。

2 结果

2.1 ZEN 结合蛋白的饱和分析和解离常数确定

任何一种激素受体都必须具有有限的结合容量(可饱和性)和对配体激素的高亲和性。我们对冬小麦提取液的玉米赤霉烯酮结合蛋白进行了饱和分析和 Scatchard 分析,以确定 ZEN 结合蛋白(ZBP)的结合位点数目和对 ZEN 的亲合性。

从图1可知 ZBP 对 $^3\text{H-ZEN}$ 的特异结合是可饱和的。 Scatchard 图上表现为一条直线(图1右),说明提取液中有一类 ZEN 的结合位点。 Scatchard 图的直线回归方程为 $Y = -0.005\ 268X + 0.009\ 944$,相关系数 $r = -0.956$ 。从回归方程可以求得春化小麦幼苗提取液的 ZEN 结合位点数目 $n = 6.2\ \text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$,解离常数 $K_d = 1.9\times 10^{-7}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

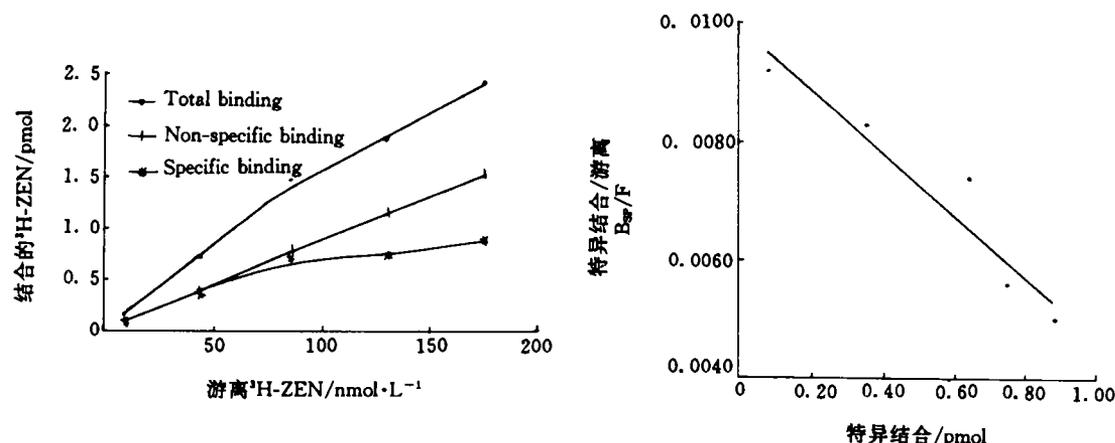


图1 小麦幼苗提取液对 $^3\text{H-ZEN}$ 结合的饱和分析(左图)和 Scatchard 分析(右图)

2.2 硫酸铵沉淀对 ZBP 进行部分纯化

用硫酸铵分级盐析对 ZBP 进行部分纯化, 900 μL 样品提取液与 100 μL $^3\text{H-ZEN}$ 保温 1 h 后, 加入 100 μL DCC 溶液除去 $^3\text{H-ZEN}$, 用 30% 饱和硫酸铵沉淀, 离心后于上清液中继续加硫酸铵至浓度 90% 饱和度, 分别测定 30% 沉淀、30%~90% 沉淀及上清液的放射活性分布, 从表 1 的结果看出, 结合活性主要分布在 30% 饱和硫酸铵沉淀部分, 占总结结合活性的 81%, 在 30%~90% 饱和硫酸铵沉淀部分和上清液中, 放射活性各占总结结合放射活性的 10% 和 9%。各部分蛋白含量测定表明: 在 30% 饱和沉淀中蛋白含量占总蛋白含量的 30%, 在 30%~90% 沉淀部分蛋白含量占 55%, 上清液中蛋白含量占 15%。

表 1 结合的 $^3\text{H-ZEN}$ 在不同饱和度硫酸铵沉淀组分中的分布

组 分	结合的 $^3\text{H-ZEN}/\text{cpm}$	总放射活性的百分数/%	蛋白量/mg	放射活性/ $\text{dpm}\cdot\text{mg}^{-1}$
30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$				
沉淀部分	87 770 \pm 1 020	81	0.81 \pm 0.01	216 716
沉淀部分	10 877 \pm 540	10	1.48 \pm 0.05	14 689
上清	9 422 \pm 320	9	0.41 \pm 0.01	45 960

组织提取液经不同饱和度硫酸铵分级沉淀后的 TESH 悬浮液进行的结合分析表明(表 2), 与粗提液相比, 30% 饱和硫酸铵沉淀悬浮液对 $^3\text{H-ZEN}$ 结合能力提高, 以每毫克蛋白结合的放射活性的 dpm 计算, 30% 饱和硫酸铵沉淀后的悬浮液可使 ZBP 纯化 3~4 倍。而在 30%~90% 沉淀部分特异结合活性极低, 上清液中几乎没有特异结合活性。

表 2 硫酸铵分级沉淀后各组分对 $^3\text{H-ZEN}$ 的结合分析

组 分	总结合/cpm	非特异结合/cpm	蛋白量/mg	特异结合/ $\text{dpm}\cdot\text{mg}^{-1}$	纯化倍数
粗 提 液	5 542 \pm 112	4 025 \pm 96	0.20 \pm 0.010	15 170	
30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀的悬浮液	4 804 \pm 88	3 115 \pm 91	0.06 \pm 0.001	56 300	3.75
30%~90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀的悬浮液	421 \pm 11	402 \pm 12	0.11 \pm 0.005	345	
上清	380 \pm 14	381 \pm 11	0.08 \pm 0.003	0	

从以上实验可见, 用 30% 饱和硫酸铵可以使 ZBP 得到部分纯化。为防止 ZBP 失活, 对悬浮液未进行透析脱盐, 实验结果表明, 少量硫酸铵盐的存在对结合反应的影响并不大。这一方法为 ZBP 的进一步纯化打下基础。

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离玉米赤霉烯酮结合蛋白

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳是根据蛋白分子大小和所带电荷多少进行分离蛋白质的一种方法, 曾有许多实验室用此法成功地分离了与放射配体相连接的完整受体^[7]。我们用 Tris-甘氨酸缓冲液体系(pH8.3)和 7.5% 丙烯酰胺与 0.8% 双丙烯酰胺交联胶分离 ZEN-ZBP 复合物, 从所得电泳洗脱放射活性图谱(图 2)看出, 有两个放射活性峰出现, 在 $R_{m0.5}$ 处的峰($P_{0.5}$)较小, $R_{m0.95}$ 处的峰较大。 $P_{0.5}$ 基本可被过量非标记 ZEN 取代, $P_{0.95}$ 则只有部

分可被过量非标记 ZEN 取代。由于 $P_{0.95}$ 在电泳前沿,推测其中可能有在电泳过程中解离下的游离 $^3\text{H-ZEN}$ 存在。 $P_{0.5}$ 可能为高亲和力的特异性结合,其峰值较低可能是由于在电泳过程中的 ZEN-ZBP 复合物解离程度较大造成的。用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离完整 ZEN-ZBP 复合物的最佳实验条件还需进一步摸索。

3 讨论

植物生长物质引起特异的生理生化反应,其作用机理是现代植物分子生物学研究的中心问题之一。对植物激素作用机理的深入研究表明,植物体对小分子信号物质的识别是通过受体蛋白完成的。目前,已鉴定出所有 5 大类植物激素的特异结合蛋白^[8]。对于 ZEN 这类新型的植物内源生长物质,探索其受体蛋白是阐明其作用机理的重要途径之一。

我们以前的工作已表明在春化的冬小麦幼苗中存在着 ZEN 特异结合蛋白。本实验进一步证明 ZBP 对 ZEN 结合具有可饱和性和较高的亲和性。从 Scatchard 图上计算出其解离常数 $K_{dZEN} = 1.9 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,这一数值与动物雌性激素雌二醇受体相比(约 $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)高得多,说明 ZEN 结合蛋白对玉米赤霉烯酮的亲和性远远低于雌二醇受体对雌二醇的亲和性,与植物激素受体蛋白相比则较接近,如生长素结合蛋白 ABPI $K_{dNAA} = 5.7 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[9] 细胞分裂素结合蛋白 CBP $K_{dZR} = 1.5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[10],赤霉素结合蛋白 GBPK $K_{dGA3} = 3 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[11]。

用硫酸铵盐析可使 ZBP 得到部分纯化。通过 30% 饱和硫酸铵可使 ZBP 纯化 3~4 倍,这为进一步纯化 ZBP 打下基础。

从本文的研究得知,冬小麦春化阶段的 ZBP 基本符合受体蛋白的性质,由于本项工作刚刚开展,对该结合蛋白的了解还很初步。此外,如其他生长物质一样,ZEN 在植物发育过程的不同阶段都有调控作用,因此 ZEN 的受体蛋白可能也不止一种,在植物的不同发育阶段,可能会有不同的受体蛋白产生,从而调控不同的生理反应。有关 ZBP 的研究有待于进行大量工作,对 ZBP 性质和功能的研究将阐明 ZEN 在高等植物生长发育过程中的作用和作用机理。

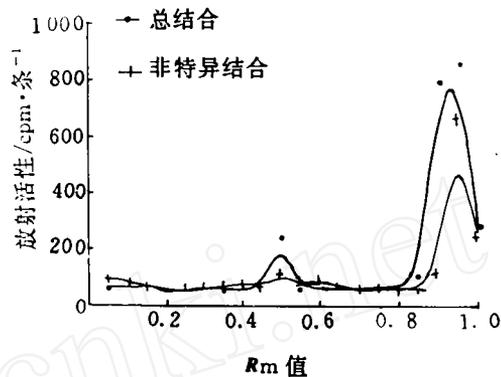


图 2 $^3\text{H-ZEN}$ 结合位点的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳洗脱放射活性图谱

参 考 文 献

- 1 李季伦,朱彤霞,张箴,李永生,孟繁静.玉米赤霉烯酮的研究.北京农业大学学报,1980,6(1):13~28
- 2 阙月美,梁振兴,韩玉珍,孟繁静.冬小麦和棉花开花结实过程中玉米赤霉烯酮含量的变化.北京农业大学学报,1990,16(2):153~155

- 3 Meng Fanjing, Han Yanzhen, Wang Hui, Que Yuemei. Zearalenone, a key substance controlling plant development. In: Karssen C M, van Loon L C, Vreugdenhil D V eds. *Progress in Plant Growth Regulation*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1991, 227~231
- 4 吴如丹. 溶液中蛋白质浓度的测定. 见: 鲁子贤编. *蛋白质和酶学研究方法*. 上海科学出版社, 1989, 1~7
- 5 邹继超, 刘兰英, 宋祥芬. 兔子宫内膜细胞核雌激素受体的分析. *动物学报*, 1985, 31(1): 39
- 6 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质. 见: *生化实验方法和技术*. 北京: 高等教育出版社, 1985, 94~102
- 7 施拉德 W T, 奥马利 B W 著. 曹永清等译. *激素作用与内分泌学实验手册*. 北京: 科学出版社, 1988, 49
- 8 Napier R M, Venis M. Receptors for plant growth regulators: recent advances. *J Plant Growth Regul*, 1990 9: 113~126
- 9 Lobler M, Klambt D. Auxin-binding protein from coleptile membrane of corn (*Zea mays* L.); I. Localization of a putative auxin receptor. *J Biol Chem*, 1985, 260: 9 854~9 859
- 10 Romanov G A, Taran V Ya, Khvoika L, Kulaeva O N. Receptor-like cytokinin binding protein(s) from barley leaves. *J Plant Growth Regul*, 1989, 7: 1~17
- 11 Nakajimai M, Sakai S, Kanazawa K. Partial purification of a soluble gibberellin-binding protein from mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol*, 1993, 34(2): 289~296