

冬小麦中玉米赤霉烯酮结合蛋白的分离纯化^①

国凤利^② 王凡玲 孟繁静
(生物学院)

摘 要 玉米赤霉烯酮是植物体内源产生的一类小分子生理活性物质,已证明它与冬性植物的春化作用密切相关。本研究应用亲和层析和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对春化的冬小麦幼苗中的玉米赤霉烯酮结合蛋白进行了分离纯化。供试材料为冬小麦品种燕大 1817,种子萌发后在 4℃下春化 4 周,提取幼苗的水溶性总蛋白进行亲和层析。层析基质为琼脂糖凝胶 Sepharose 4B,配体为玉米赤霉烯酮多聚赖氨酸复合物。总蛋白溶液先经过 Sepharose 4B 结合后,再与连有配体的亲和胶进行反应,然后洗去非结合蛋白;改变洗脱条件,进一步洗涤得到的为玉米赤霉烯酮结合蛋白(ZBP)溶液。研究表明,在春化的冬小麦幼苗中存在两种玉米赤霉烯酮结合蛋白,它们的分子量分别为 25.4 kD 和 22.9 kD。

关键词 玉米赤霉烯酮; 结合蛋白; 亲和层析; 冬小麦

中图分类号 Q945.41

Isolation and Purification of Zearalenone-Binding Protein from Wheat Seedlings

Guo Fengli Wang Fanling Meng Fanjing
(College of Biology)

Abstract Two kinds of soluble zearalenone-binding proteins (ZBP) in the vernalized seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L. YanDa 1817) were isolated and purified using affinity chromatography and SDS-PAGE. The results indicated that affinity chromatography using immobilized zearalenone coupled to Sepharose 4B via polylysines was very effective for purification of the proteins. The molecular weight of the proteins were estimated to be 25.4 kD and 22.9 kD by SDS-PAGE. The characteristics of these ZBPs are under study.

Key words zearalenone; binding protein; affinity chromatography; *Triticum aestivum* L.

植物激素作为信号物质在植物的生长发育过程中起着重要的调节作用。一般认为,激素类物质首先与某些特定的蛋白质分子结合后,才能诱发一系列的生化过程和生理反应,这些与激素发生特异性结合的蛋白称为受体(receptor)^[1]。因此,激素受体的获得及其特性的研究对进一步了解激素的作用机理是至关重要的。玉米赤霉烯酮(zearalenone,简称 ZEN)是

收稿日期: 1996-04-29

①国家自然科学基金重点资助项目 39330010

②国凤利,北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区),100094

普遍存在于高等植物体内的一种小分子活性物质,大量的研究已经证明它参与了成花过程的各个阶段(如春化作用、光周期诱导和开花受精)的调节^[2~14],并与植物的抗性有关^[15]。本研究以春化的冬小麦幼苗为材料,采用亲和层析和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对玉米赤霉烯酮结合蛋白(zearalenone-binding protein,简称 ZBP)进行了分离和纯化,以期进一步得到玉米赤霉烯酮的真正受体,探索玉米赤霉烯酮在植物体内的生理功能和作用机理。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试植物为冬小麦品种“燕大 1817”(Triticum aestivum L.),种子经 0.1% 升汞表面灭菌,流水冲洗 2 h,室温下吸胀萌动后,置 4℃ 冰箱内进行低温春化。

1.2 亲和胶的制备

1.2.1 半抗原 ZEN-6'-羧甲基肟(ZEN-O)的制备(参考陈新建方法)^[16] 取 ZEN 纯品 420 mg 和盐酸羧甲基羟胺(CMO)535 mg 溶于 25 mL 吡啶中,室温黑暗条件下搅拌 24 h,吹干。将所得固体混合物溶于 50 mL 蒸馏水中,用 0.4 mol·L⁻¹ NaOH 调至 pH8.5,然后用二氯甲烷抽提 4 次,每次 100 mL,弃二氯甲烷;水相用盐酸调至 pH3.0,再用二氯甲烷抽提 3 次,每次 120 mL,收集二氯甲烷,无水硫酸钠脱水,过滤后抽干,得白色晶体 350 mg。

1.2.2 ZEN-O-NHS 的合成 称取 N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)12 mg 溶于 5 mL 四氢呋喃(THF),为 A 溶液;22 mg 碳二亚胺(DCC)溶于 5 mL THF,为 B 溶液。取 A、B 两种溶液各 4.2 mL 混合后,加入 ZEN-O 晶体 25 mg,4℃ 下搅拌 12 h,吹干后得针簇状晶体 39 mg。

1.2.3 ZEN-O-NHS 与多聚赖氨酸(Poly-L)的连接 将所得 39 mg ZEN-O-NHS 与 27 mg DCC 混合后加入 15 mg NHS 和 3 mL N,N-2-甲基甲酰胺(DMF),在 22℃ 下搅拌 40 min。取 Poly-L 50 mg 溶于 3 mL 0.13 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 溶液。将上述两种溶液慢慢混合后,在 22℃ 下搅拌 35 min,4℃ 下用 0.1 mol·L⁻¹ NaHCO₃(pH8.3)透析 12 h。

1.2.4 配体与琼脂糖的交联 将配体(ZEN-Poly-L 复合物)溶于交联缓冲液(0.1 mol·L⁻¹ NaCO₃+0.5 mol·L⁻¹ NaCl,pH8.3),加入经 CNBr 活化的琼脂糖 Sepharose 4B(购自 Sigma 公司)3 g(每克 Sepharose 4B 预先用 200 mL 1 mol·L⁻¹ HCl 过滤冲洗),在室温下摇动 2 h 或 4℃ 下过夜。交联缓冲液洗去多余配体,1 mol·L⁻¹ 乙醇胺(pH9.0)封闭亲和胶(室温下 2 h 或 4℃ 下过夜)。亲和胶再经 0.1 mol·L⁻¹ HAc+0.5 mol·L⁻¹ NaCl(pH4.0)和 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl+0.5 mol·L⁻¹ NaCl(pH8.0)交替冲洗各 3 次后,4℃ 下贮存备用。

1.3 ZEN 结合蛋白的分离和纯化

参考 GA 结合蛋白的纯化方法^[17]。

1.3.1 样品的提取 取春化 3~4 周的小麦幼苗,称重,加入等量的匀浆缓冲液(HB:50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl+10 mmol·L⁻¹ EDTA+30 mmol·L⁻¹ 2-ME+0.1 mmol·L⁻¹ PMSF+0.1 mol·L⁻¹ NaCl,pH7.6),研磨,过滤。滤液离心(9 500 g,20 min),收集上清液,加入 60%(W/V)硫酸铵后搅拌 90 min,离心(9 500 g,20 min),弃上清,沉淀溶于溶解缓冲液(RB:10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl+1 mmol·L⁻¹ EDTA+10 mmol·L⁻¹ 2-ME+0.1 mmol·L⁻¹ PMSF+0.1 mol·L⁻¹ NaCl,pH7.6),相同缓冲液透析 24 h。将透析后的蛋白质溶液高

速离心(25 000 g, 20 min), 收集上清液并用冲洗缓冲液(WB: 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl + 10 mmol·L⁻¹ 2-ME + 0.1 mol·L⁻¹ NaCl, pH7.6) 稀释, 得蛋白质溶液 A。以上过程均在 4℃ 下进行。

1.3.2 亲和层析 首先将蛋白质溶液 A 与等体积的 Sepharose 4B 混合, 轻轻搅拌 60 min, 过滤, 以除去与 Sepharose 4B 结合的非特异蛋白。所得滤液为蛋白质溶液 B。取该溶液 1 mL 作为电泳对照样品, 其余与亲和胶混合, 轻轻搅拌 60 min, 过滤。结合后的亲和胶经 WB 清洗后, 在洗脱缓冲液(EB: 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl + 10 mmol·L⁻¹ 2-ME + 1 mol·L⁻¹ NaCl, pH7.6) 悬浮 20 min, 过滤, 所得滤液即为 ZEN 结合蛋白溶液 C。

1.3.3 电泳 取所得各级蛋白质溶液及相应的滤液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 3.75% 考马斯亮蓝染色, 根据相对迁移率计算分子量。

2 结果

经亲和层析后, 所得 ZEN 结合蛋白及其相应对照溶液的电泳图谱见图 1。其中 B¹ 为亲和胶结合后剩余的蛋白溶液, 通过与结合前的蛋白溶液 B 比较可以看出, B¹ 中明显缺少一种蛋白条带, 表明样品中的这种蛋白全部与配体发生了结合而滞留在亲和胶中。进一步洗涤亲和胶, 所得洗脱液 C 中有两个蛋白条带, 经计算得知它们的分子量分别为 25.4 kD 和 22.9 kD。其中 25.4 kD 的条带与层析后滤液中所缺条带的位置相同, 表明该蛋白在原样品中确实全部与亲和

胶发生了结合并得到了有效洗脱。在 22.9 kD 蛋白的条带位置, 滤液中亦有相同的蛋白条带出现, 根据这一现象, 推测有两种可能: ①在 22.9 kD 蛋白的位置, 除了 ZEN 结合蛋白之外, 还存在大量其他分子量相同或相近的非特异蛋白。所以, 在亲和层析过程中, 非特异蛋白进入滤液(B¹) 而出现相应的条带。②在 22.9 kD 蛋白条带位置有较多的 ZEN 结合蛋白, 由于配体容量有限, 只有特异性较强的 ZBP 与配体发生了结合, 剩余的 ZBP 则进入滤液。体外结合分析表明, 所得 ZBP 溶液与 ³H-ZEN 有较强的结合活性。

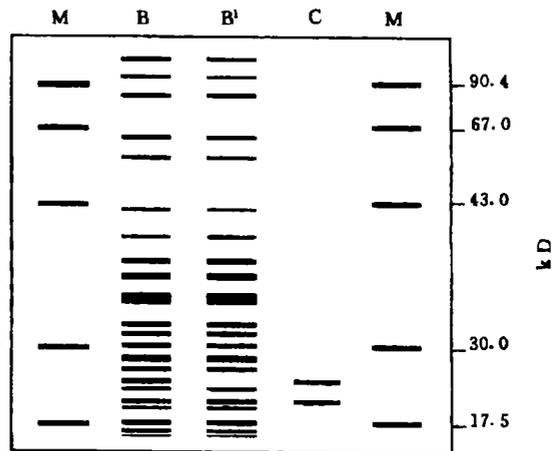


图 1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
M, 标准蛋白; B, 层析前样品; B¹, 层析后滤液; C, 结合蛋白

3 讨论

3.1 玉米赤霉烯酮是植物体内的激素类小分子活性物质

玉米赤霉烯酮的发现始于对动物雌性化症状的研究^[18]。早在 20 年代人们就注意到, 发

霉的玉米能够引起动物的雌性化病症,具有类似雌性激素的作用。此后,进一步的研究发现,雌性症状是由霉玉米中的赤霉菌引起。1962年,Stob等^[19]从玉米赤霉菌中分离出了一种活性物质,并证明了该物质具有动物雌性激素的作用。1966年,Urry等^[20]利用经典化学、核磁共振和质谱等技术确定了该物质的化学结构,并命名为玉米赤霉烯酮(zearealenone)。此后的一系列研究发现,玉米赤霉烯酮参与了真菌有性生殖过程的调节^[21~25]。基于玉米赤霉烯酮在动物和微生物中具有性激素的作用,而且某些菌系需要低温才能产生玉米赤霉烯酮的特点,李季伦、孟繁静等首次提出了玉米赤霉烯酮可能与高等植物春化现象有联系的设想,并从研究冬小麦的春化作用入手,获得了启发性的结果。他们的研究发现,冬小麦的越冬茎尖中确实存在玉米赤霉烯酮的类似物,并且该物质的积累随春化作用的加深而增多,在春化阶段的第四周出现含量高峰^[2]。进一步的研究确证了这种物质与真菌产生的玉米赤霉烯酮同质^[5]。并先后在不同科属的十余种冬性植物的越冬茎尖或花芽中均提取出了玉米赤霉烯酮^[3~11]。此外,玉米赤霉烯酮还与植物的光周期诱导及开花受精亦有密切联系^[9,12]。外施低浓度的玉米赤霉烯酮可促进植物的成花过程^[10,13,14]。上述研究结果均表明,玉米赤霉烯酮是高等植物体内源产生的激素类活性物质,可能在高等植物的成花过程中起重要调节作用。

3.2 玉米赤霉烯酮的结合蛋白

为了进一步探讨玉米赤霉烯酮在高等植物成花过程中的作用机理,应首先分离、纯化和研究玉米赤霉烯酮的特异结合蛋白,进而确定其真正的受体。目前,对玉米赤霉烯酮结合蛋白的研究尚处于起始阶段,王琿等^[26]曾利用直接酶联免疫技术检测了冬小麦和油菜春化过程中体内玉米赤霉烯酮结合蛋白的存在,并证明其含量变化趋势与内源玉米赤霉烯酮含量变化趋势相似。韩玉珍等^[27]利用组织印迹技术的研究发现,春化冬小麦幼苗中的玉米赤霉烯酮结合蛋白主要存在于茎尖生长点部位。但上述研究均未对玉米赤霉烯酮结合蛋白进行分离纯化。本研究应用亲和层析技术首次对春化冬小麦幼苗中的玉米赤霉烯酮结合蛋白进行了分离,并结合SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术达到了进一步纯化的目的。得到了分子量分别为25.4 kD和22.9 kD的两种蛋白组分。根据所出现的电泳条带分析,其中25.4 kD的蛋白是较为可靠的玉米赤霉烯酮结合蛋白。它们的有关特性正在研究之中。

参 考 文 献

- 1 张德颐,陈 瑞. 植物激素受体. 见:余叔文主编. 植物生理与分子生物学. 北京:科学出版社,1992
- 2 李季伦等. 玉米赤霉烯酮的研究. 北京农业大学学报,1980,(1):13~28
- 3 孟繁静,张 箴. 玉米赤霉烯酮的研究(续). 北京农业大学学报,1981,7(2):101~103
- 4 孟繁静,阙月美,张蜀秋. 冬性植物体内类玉米赤霉烯酮与春化作用的关系. 植物学报,1986,28(6):622~627
- 5 孟繁静等. 冬小麦越冬茎尖中的玉米赤霉烯酮. 中国科学(B辑),1988,(12):1261~1266
- 6 韩玉珍. 油菜的类玉米赤霉烯酮与春化作用. 北京农业大学硕士论文. 1986,12(4):386
- 7 韩玉珍,孟繁静. 油菜的玉米赤霉烯酮类似物与春化作用. 北京农业大学学报,1986,12(4):386
- 8 黎洪霞,孟繁静. 芹菜中玉米赤霉烯酮的分离与鉴定. 植物生理学报,1989,15(2):211~215
- 9 姚坤林,张 帆,孟繁静. 玉米赤霉烯酮的生理作用(简报). 植物生理学通讯,1990,(5):34~36
- 10 韩玉珍,孟繁静. 玉米赤霉烯酮影响微青萍生长发育的研究. 科学通报,1990,1744~174611 王 琿,

- 孟繁静. 冬性植物春化过程中玉米赤霉烯酮的内源生成及马拉硫磷对它的抑制. 植物生理学报, 1990, 16(2):197~200
- 12 阙月美等. 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
- 13 傅永福, 孟繁静. 玉米赤霉烯酮对膨胀青萍 G3 生长与发育的影响(简报). 植物生理学报, 1993, 19(4): 395~398
- 14 傅永福, 孟繁静. 烟草茎薄层芽分化过程内源玉米赤霉烯酮含量的变化(简报). 实验生物学报, 1994, 27(2):271~273
- 15 李秀菊等. 玉米赤霉烯酮浸种对玉米幼苗抗冷性的影响. 北京农业大学学报, 1995, (3): 240~243
- 16 陈新建, 孟繁静. 玉米赤霉烯酮的放射免疫分析. 植物生理学报, 1990, 16(1):70~76
- 17 Nakajima M, et al. Partial purification of a soluble gibberellin-binding protein from mung bean hypocotyls. Plant Cell Physiol, 1993, 34(2):289~296
- 18 Mirocha C J, et al. F-2(zearalenone)estrogenic mycotoxin from *Fusarium*. Microbiol Toxins, 1971, 7: 107~138
- 19 Stob M, et al. Isolation of an anabolic uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. Nature, 1962, 196:1318
- 20 Urry W H, et al. The structure of Zearalenone. Tetrahedron Letters, 1966, 27:3109~3114
- 21 Nelson R R, et al. Effect of F-2, an estrogenic metabolite from *Fusarium* on sexual reproduction of certain ascomycetes. Phytopath, 1968, 58:1 061~1 062
- 22 Eugenio C P. Factors influencing the biosynthesis of the fungal estrogen (F-2) and the effects of F-2 on perithecia formation by *Fusarium*. Phytopathology, 1970, 60:1 055~1 057
- 23 Wolf J C, et al. Inhibition of F-2(zearalenone) biosynthesis and perithecium production in *Fusarium roseum*. Phytopathology, 1972, 62:937~939
- 24 Wolf J C, Mirocha C J. Regulation of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum* 'Graminearum') by F-2. Can J Microbiol, 1973, 19:725~734
- 25 Wolf J C, Mirocha C J. Regulation of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum* 'Graminearum'). Appl Environ Microbiol, 1977, 33:546~550
- 26 Wang Hui (王 琿), Meng Fan-Jing (孟繁静). Studies on zearalenone binding protein in the vernalized seeds of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Chinese J Bot, 1993, 5(1):65~72
- 27 韩玉珍. 冬小麦春化期间玉米赤霉烯酮结合蛋白的研究. 北京农业大学博士论文, 1994

(上接第 14 页)

工酶上与公认的野生种秘鲁番茄、多毛番茄及普通番茄的三个品种不同。根据我们的调查, 武陵野生番茄的分布, 在高海拔山区比低海拔山区要多, 交通不便的少数民族聚居的山区更多。可见, 这些野生番茄不可能从国外引进。武陵山区位于湖南、湖北、四川和贵州四省交界处, 属于热带季风型湿润气候, 温湿多雨, 地形复杂而独特, 地质史上受第四纪冰川影响较小, 因此保存了种类较多的生物资源, 武陵山区野生番茄应该是原产于我国而与国外引进的番茄无关。但它的分类地位的确定, 还有待于多种同工酶、DNA、杂交亲和力等方面的综合研究来解决。