

# 小麦胚乳贮藏蛋白高分子量谷蛋白 亚基抗血清的制备<sup>①</sup>

宋希云<sup>②</sup> 高文淑 吕冬 黄铁城 刘广田  
(农学与植物遗传育种系)

**摘 要** 本文利用纯化的小麦胚乳贮藏蛋白高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS)为抗原制备了8个不同的兔抗血清,并对这些抗血清与不同品种小麦贮藏蛋白的免疫化学反应进行了研究,结果表明:HMW-GS 具有较好的免疫原性,能够产生较高效价的抗血清;HMW-GS 抗血清与小麦胚乳全谷蛋白具有较强的反应,但与醇溶蛋白反应较弱;HMW-GS 抗血清可用于小麦品质性状的测定,但不能有效地鉴别不同的 HMW-GS。

**关键词** 抗血清; 高分子量谷蛋白亚基; 小麦

**中图分类号** Q512.4; S512.1

## Preparation of Antisera to High-Molecular-Weight Glutenin Subunits (HMW-GS) of Wheat Endosperm Storage Protein

Song Xiyun Gao Wenshu Lü Dong Huang Tiecheng Liu Guangtian  
(Dept. of Agronomy & Plant Genetics and Breeding)

**Abstract** Eight strains of antisera to HMW-GS in wheat endosperm storage protein were prepared and their reaction with glutenin of different cultivars were studied. The main results showed that the antisera with high titer could be obtained by immunizing rabbits with HMW-GS. Antisera to HMW-GS could react strongly with total glutenin from different wheat cultivars, but their reacting with gliadin was very weak. The glutenin could be distinguished from gliadin by using the antisera, but the different HMW-GS could not. The antisera also be used to detect the quality parameters of wheat.

**Key words** antisera; HMW-GS; wheat

随着现代科学技术的进步以及免疫学理论的发展,免疫化学技术现已不再局限于医学及动物学领域,在农业方面的应用也日益扩大。免疫化学技术在农业主要用于检测病毒对植物的感染、定量测定植物激素含量等<sup>[1~4]</sup>。近年来,免疫化学技术在小麦和大麦 $\alpha$ -淀粉酶及其抑制因子、谷类作物胚乳贮藏蛋白、植物激素、热激蛋白、花粉微管蛋白等的组织化学定位研究方面取得了较快进展<sup>[5~11]</sup>。

免疫化学技术在小麦品质方面的研究始于70年代,概括起来,主要用于以几个方面:检测小麦胚乳贮藏蛋白的免疫同源性;测定小麦品质性状,为杂交育种提供选择的依据;制备抗体探针,对小麦cDNA文库进行筛选;研究小麦染色体组间或不同品种间的关系;利用免

收稿日期: 1996-12-13

①本研究为国家自然科学基金资助项目 39570491

②宋希云,现在山东莱阳农学院农学系,265200

疫细胞化学方法对某些特异蛋白的发育及其贮藏、运输机制等进行研究;研究蛋白质的结构及其相互作用等。因此,有必要对小麦胚乳贮藏蛋白的免疫化学特性及其抗体制备方法进行研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料

1.1.1 西德大白兔 购自北京农业大学实验兔场。

1.1.2 福氏完全佐剂(Freund's Complete Adjuvant),福氏不完全佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant) 购自中国兽医兽药督察所。

1.1.3 聚苯乙烯微量反应板(Microtiter Plate) 天津有机玻璃制品厂。

1.1.4 酪蛋白 军事医学科学院微生物流行病学研究所惠赠。

1.1.5 羊抗兔 IgG-HRP 军事医学科学院微生物流行病学研究所。

1.1.6 小麦品种 Gabo,京 411,中国农业大学小麦品质分析实验室。

1.1.7 3',3',5',5'-四甲基联苯二胺(3',3',5',5'-Tetramethyl Benzidine TMB) 美国 Sigma 化学公司,购自华美公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 HMW-GS 电泳 样品提取:取一粒小麦种子,研碎,放入 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 1 mL 样品提取缓冲液(0.062 5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,pH6.8,2%(W/V) SDS,10%(V/V)丙三醇,5%(V/V) $\beta$ -巯基乙醇,0.002%(W/V)溴酚兰),振荡 3 h,90℃水浴 3 min,冷却后离心 5 min(12 000 r/min),上清液用于电泳。

SDS——聚丙烯酰胺凝胶电泳:浓缩胶缓冲液:0.5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,pH6.8;分离胶缓冲液:0.037 5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,pH8.8。分离胶丙烯酰胺浓度为 10%,浓缩胶为 2.5%,交联度 2.6%,采用垂直板电泳槽,每块板 20 mA 稳流电泳 10 h。

1.2.2 抗原制备 利用 SDS-PAGE 分离小麦品种 Gabo 及京 411 籽粒中的各高分子量谷蛋白亚基,电泳后用水冲洗胶板 2 次,然后用 0℃的 0.25 mol·L<sup>-1</sup> KCl 处理 5 min,各亚基带呈白色,用刀片将亚基带所在的凝胶条切下,然后分别装入透析袋,在水平电泳槽中电泳,收集各 HMW-GS,利用聚乙二醇 6000(PEG6000)浓缩,之后用蒸馏水透析 24 h,其间换透析液 3 次,再用 PBS 透析 24 h,换透析液 3 次。收集透析后的各 HMW-GS,在紫外分光光度计下测定 260 nm 和 280 nm 的吸光值,利用下列公式计算蛋白质亚基浓度。

$$\text{蛋白质亚基含量(mg/mL)} = 1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$$

然后各 HMW-GS 即可用作抗原或分装于 Eppendorf 管中-20℃保存。

1.2.3 免疫程序 自北京农业大学实验兔场购入 9 只雄性、健康的西德大白兔,体重平均 2.5 kg。分别用 8 个不同的 HMW-GS 免疫其中 1~8 号,9 号留作对照,免疫程序为:

①初免 约 0.15 mg 抗原用无菌的磷酸盐缓冲生理盐水稀释,加入等体积完全福氏佐剂,混匀并完全乳化,形成油包水乳化抗原,颈背部皮下多点注射。

②加强免疫 四周后进行,抗原量同初免,用不完全福氏佐剂混合,后腿肌肉注射。

③第二次加强免疫 于第二次免疫后两周进行,剂量、方法同 1.2.3.2,不加佐剂,同时

耳静脉取血测定效价。

①第三次加强免疫 于第三次免疫后两周进行,剂量为 2.5 mg 抗原/只。

⑤取血 第三次加强免疫后一周心脏采血,于大平皿中室温静置一小时,移入 4℃ 冰箱过夜,收集血清,分装, -20℃ 保存。

#### 1.2.4 测定效价—间接酶联免疫吸附测定(ELISA)法

①抗原包被 用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释抗原,加入微量反应板中,  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  4℃ 过夜。然后用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH7.4 的 PBS+0.05% Tween20 洗涤 3 次,每次 2 min。

②封闭 加入 0.05% 酪蛋白,  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ , 37℃, 放置 0.5 min, 然后用洗涤液冲洗 3 次。

③加待测抗血清 将各待测抗血清分别用含 0.05% 酪蛋白的  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH7.4 PBS 按 1:200, 1:400, 1:800……作倍比稀释,加入微量反应板中,  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ , 37℃ 温育 1 h, 然后洗涤 3 次。

④加酶标二抗 将羊抗兔 IgG-HRP 用含 0.05% 酪蛋白的 PBS 按其效价稀释,加入微量反应板,  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ , 37℃ 温育 0.5 h, 然后洗涤 4 次。

⑤加入底物 加入新配制的 TMB,  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ , 37℃ 温育 5~15 min。

⑥终止反应 加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 。

⑦比色 用酶联免疫检测仪在 450 nm 下测定各孔吸光度(OD)值,以不加酶标二抗的孔作对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 供试品种各 HMW-GS 抗原制备效果

供试品种 Gabo 有 5 条 HMW-GS, 分别定名为 1, 5, 17, 18 和 10。由于 17 和 18 带难以分开, 所以通常将其一起进行研究, 称为 17+18 带。品种京 411 的 HMW-GS 为 4 条, 分别为 2, 7, 8 和 12。通过电泳谱带扫描图可知: 各品种中每一 HMW-GS 的量不同, 在 Gabo 中 4 条带的比例约为 1:5:17+18:10=11.45:21.96:37.01:23.63。京 411 中各带所占比例分别为 2:7:8:12=13.75:6.41:0.74:19.09(图 1)。由于各带所占比例不同在测定籽粒蛋白时应注意适宜的加样量。

由于抗原的纯度在很大程度上决定了抗体的特异性, 为此对所制备的各 HMW-GS 抗原进行了 SDS-PAGE, 结果表明: 利用电泳法制备的抗原纯度较高, 可用于免疫动物。

### 2.2 抗血清效价

经过一次基础免疫和三次加强免疫, 各抗血清效价如图 2, 分别为: 兔抗 HMW-GS1 血清为 1:1.2 万, 抗 HMW-GS5 为 1:10.2 万, 抗 HMW-GS17+18, 1:20.4 万, 抗 HMW-GS10, 1:20.4 万, 抗 HMW-GS2, 1:5.1 万, 抗 HMW-GS7, 1:10.2 万, 抗 HMW-GS8, 1:5.1 万, 抗 HMW-GS12, 1:20.4 万。可以看出, 虽然所用抗原量相同, 但所得抗血清效价相差较大, 最高者与最低者相差近 20 倍, 这可能与两方面原因有关: 一是各 HMW-GS 的免疫原性不同, 二是各动物免疫反应不同。

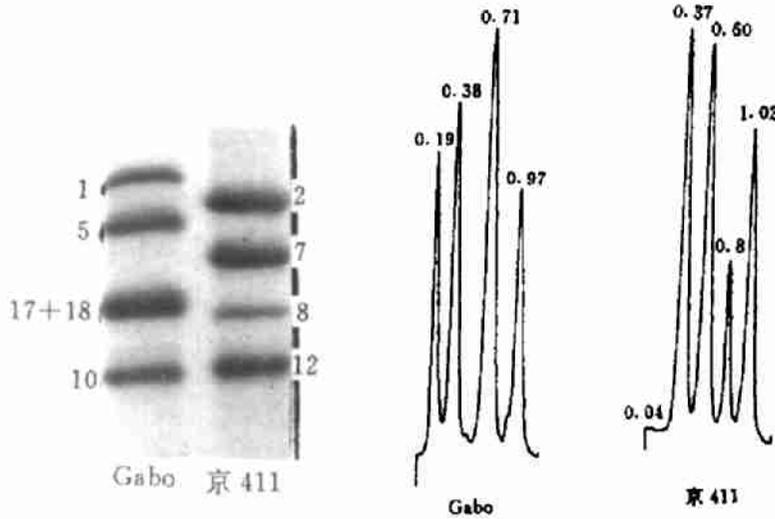


图1 Gabo、京411 SDS-PAGE及其扫描图

### 2.3 各抗血清与籽粒全谷蛋白的反应

制备各HMW-GS抗血清的目的,是探索利用免疫学方法区分籽粒贮藏蛋白中的不同亚基的可能性以及确定抗体吸收值与各品质参数间的关系,为此,首先测定了各抗血清与籽粒全谷蛋白之间的关系,其中抗血清Anti-HMW-GS10与其反应关系列于表1(其余因篇幅略),可以看出,抗体浓度不变的情况下,吸附值随籽粒全谷蛋白浓度的增加而提高,例如,抗血清1:200情况下,全谷蛋白浓度为0.009和1.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的吸附值分别为0.97和1.48;籽粒全谷蛋白浓度相同的情况下,吸附值随抗体浓度的增加而增加,例如,全谷蛋白为1.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抗血清浓度为1:204 800和1:200的吸附值分别为0.15和1.48,其它抗血清也有类似的表现。因此在实际测定中,应在点阵中找双方的饱和点。考虑到制备抗体的工作量及花费较大,测定时多选用较高浓度的籽粒蛋白量和较低浓度的抗血清。

表1 抗血清Anti-HMW-GS10与不同浓度Gabo籽粒全谷蛋白的反应

抗血清	全谷蛋白/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$							
	1.220	0.610	0.305	0.150	0.075	0.038	0.019	0.009
1:100	1.48	1.33	1.36	1.30	1.21	1.18	1.09	0.97
1:400	1.47	1.33	1.30	1.30	1.16	1.17	1.02	0.93
1:800	1.44	1.25	1.22	1.22	1.15	1.12	1.03	0.90
1:1 600	1.41	1.17	1.22	1.08	1.11	1.14	0.87	0.78
1:3 200	1.33	1.08	1.04	1.09	1.08	1.03	0.84	0.67
1:6 400	1.13	0.91	0.90	0.88	0.96	0.86	0.65	0.47
1:12 600	0.97	0.68	0.85	0.67	0.89	0.61	0.47	0.35
1:25 600	0.70	0.46	0.57	0.46	0.59	0.44	0.27	0.21
1:51 200	0.46	0.29	0.27	0.33	0.36	0.28	0.11	0.08
1:102 400	0.29	0.20	0.22	0.21	0.09	0.10	0.05	0.03
1:204 800	0.15	0.07	0.12	0.11	0.05	0.05	0.01	0.01

### 2.4 抗血清与不同品种籽粒全谷蛋白的交叉反应

利用小麦品种 Gabo、京 411 和中国春的籽粒全谷蛋白以及 Gabo 醇溶蛋白提取液分别包被微量反应板,以测定各抗血清与不同 HMW-GS 的交叉反应,探索抗血清识别不同类型品种的可能性,结果见表 2。可以看出:1. 各抗血清与不同抗原蛋白具有较强的交叉反应。例如,抗血清 Anti-GS10 与 Gabo、京 411 及中国春谷蛋白反应的吸附值分别为 1.56、1.12 和 1.24,虽然在有其抗原亚基存在的情况下吸附值相对较高,但难以有效地区别某一品种是否存在抗原 HMW-GS。2. 与谷蛋白相比,醇溶蛋白与抗血清的反应强度要低的多。例如,抗血清 Anti-GS10 与 Gabo 谷蛋白及醇溶蛋白反应的吸附值分别为 1.56 和 0.38,两者相差四倍多。另外,经研究发现:有一部分抗体吸附值与某些品质性状存在显著正相关(另文报道),这些抗血清可用于测定不同品种小麦的品质。

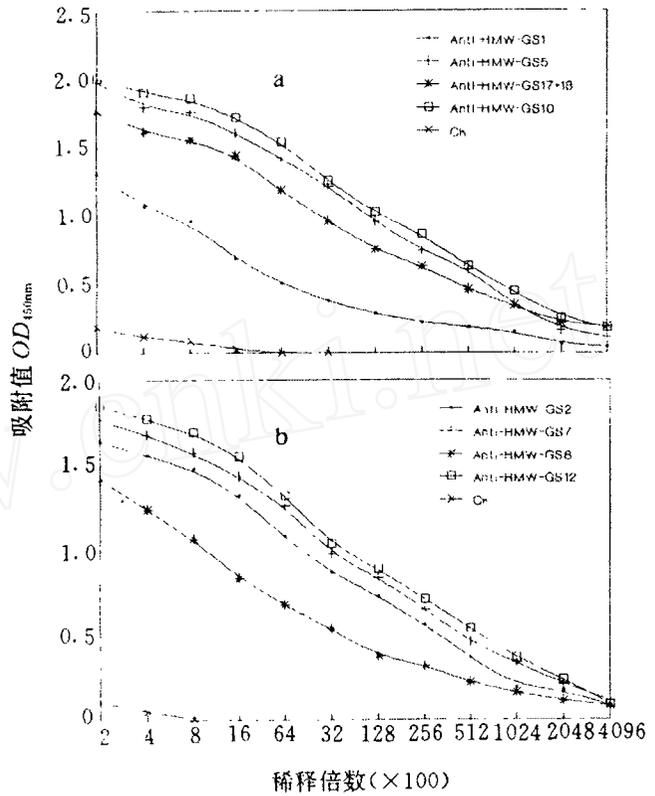


图 2 (1)(2)抗血清效价曲线

### 3 讨论

免疫化学技术对于研究小麦籽粒胚乳贮藏蛋白的结构、功能等非常有用,但其抗体的制备比较困难,因为抗体制备需要较多的纯化抗原。小麦籽粒贮藏蛋白以分为  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\omega$ -醇溶蛋白,高低分子量谷蛋白和三联体蛋白,

表 2 各抗血清与不同品种籽粒贮藏蛋白的反应(OD 值)

品 种	gabo	京 411	中国春	醇溶蛋白
抗 GS1 Anti-GS1	0.79	0.58	0.61	0.24
抗 GS5 Anti-GS5	0.92	0.62	0.70	0.27
抗 GS17+18 Anti-GS17+18	1.30	0.86	0.92	0.35
抗 GS10 Anti-10	1.56	1.12	1.24	0.38
抗 GS2 Anti-GS2	0.73	0.92	0.95	0.21
抗 GS7 Anti-GS7	0.61	0.75	0.86	0.18
抗 GS8 Anti-GS8	0.58	0.74	0.77	0.18
抗 GS12 Anti-GS12	1.53	1.16	1.19	0.33

利用醇溶蛋白制备的抗体已有许多报道,而有关谷蛋白抗体的报道较少<sup>[12~14]</sup>。本研究利用 SDS-PAGE 的方法纯化 HMW-GS 抗原,制备了高分子量谷蛋白亚基 1,5,17+18,10,2,7,8 以及 12 的兔抗血清,研究了不同抗体与不同类型的品种籽粒全谷蛋白的反应。表明利用 SDS-PAEG 方法可制备纯化的小麦胚乳贮藏蛋白 HMW-GS 抗原,所制备的抗原具有较高的免疫原性。

兔抗血清对不同类型品种的小麦籽粒胚乳贮藏蛋白都能起反应,虽然吸附值有一定差异,但不足以区分不同 HMW-GS,这与他人的研究结果相符一致:如 Skerritt 等认为:虽然 1Dx2+1Dy12 和 1Dx5+1Dy10 亚基对面粉烘烤品质的影响差异较大,但利用抗体对其进行区别却非常困难<sup>[12]</sup>;朱金宝利用纯化的 1Dy10 亚基为抗原制备了抗血清,也无法区分小麦籽粒胚乳贮藏蛋白中是否具有 1Dx5+1Dx10 亚基<sup>[15]</sup>;Curioni 制备了 HMW-GS1,5,7,12 抗血清,发现前三者只与高分子量谷蛋白亚基起反应,而且与 X-型亚基的反应要强于跟 Y-型亚基的反应,而 HMW-GS12 抗血清除高分子量谷蛋白亚基外,还与  $\alpha$ -、 $\beta$ -以及  $\gamma$ -醇溶蛋白反应,与 Y-型亚基的反应要强于跟 X-型亚基的反应,利用这些抗血清可以区分 X-型亚基和 Y-型亚基,但不能区分同型亚基<sup>[16]</sup>。因此,要利用免疫化学方法鉴别 1Dx2+1Dy12 和 1Dx5+1Dx10 亚基,有必要制备特异性更高的单克隆抗体。

### 参 考 文 献

- 1 Atzorn R, et al. The immunoassay of gibberellins I. Radioimmunoassays for the gillerellins A1,A3, A4,A7,A9 and A20. *Planta*, 1983,159:1~6
- 2 Atzorn R, et al. The immunoassay of gibberellins. Quantitation of GA3, GA4 and GA7 by ultra-sensitive solid-phase enzyme immunoassay. *Planta*, 1983, 159:7~11
- 3 Weiler E W. An enzyme-immunoassay for cis-(+)-abscisic acid. *Physiol Plant*, 1982, 54:510~514
- 4 Weiler E W. Immunoassay of plant growth regulators. *Ann Rev Physiol*, 1984,35:85~95
- 5 Jacobsen J V, Knox R B. Cytochemical localization and antigenicity of  $\alpha$ -amylase in barley aleurone tissue. *Planta*, 1973,112:213~224
- 6 Alexandrecu V, Milhailescu F. Immunochemical investigations on germinated seed endosperm  $\alpha$ -amylase of some cereals. *Rev Roum Biochim*, 1973,10:89~91
- 7 Masojc P, Zawistowski, J et al. Acombined monoclonal and polyclonal antibody sandwich ELISA for quantification of the endogenous Alpha-amylase inhibitor in barley and wheat. *J Cereal Sci*, 1993,17: 115~124
- 8 Skerritt J H. Immunochemistry of cereal-grain endosperm proteins. *Adv Cereal Sci technol*, 1988,9: 263~338
- 9 张军. 生长素和玉米素免疫组织化学的初步研究. 北京:北京农业大学[博士论文],1994
- 10 刘箭. 热冲蛋白与菜豆细胞耐热性的机理. 北京:北京农业大学[博士论文],1994
- 11 王秀珍,韩志强. 花粉中微管与花粉管伸长及其胞质颗粒运动的关系. *作物学报*,1995,21(2):150~154
- 12 Skerritt J H. A simple antibody-based test for dough strength. 1. Method development and choice of antibodies. *Cereal Chem*, 1991,58:467~474
- 13 Brett G W, Mills E N C et al. Monoclonal antibodies that recognize the repeat motif of the S-poor prolamins. *J Cereal Sci* 1990,12:245~255
- 14 Skerritt J H, Diment J A, Wrigley, C W. A sensitive monoclonal antibody-based-test for gluten detection: choice of primary and secondary antibodies. *J Sci Food Agric*, 1985,36:995~1003
- 15 朱金宝. 普通小麦品质性状遗传、环境互作及其与高、低分子量谷蛋白亚基(HMW-GS、LMW-GS)的关系. [博士论文],北京农业大学,1993
- 16 Curioni A, A Dal Belin Peruffo et al. Immunological distinction between x-type and y-type high molecular weight glutenin subunits. *Cereal Chem*, 1991,68(2):200~204