

小麦面粉 Puroindoline 蛋白的提取与纯化

王珏, 罗立廷, 陈明洁, 李洋, 张金锐, 何光源*

(华中科技大学, 中英 HUST-RRes 基因工程和基因组学联合实验室, 武汉 430074)

摘要: Puroindoline 蛋白是小麦面粉中一种非常重要的蛋白质, 不仅影响和决定了籽粒的硬度, 而且有抗 G^+ 、 G^- 菌以及抗真菌的作用。用含 4% Triton X-114、100 mmol/L pH7.8 Tris-HCl 缓冲液处理小麦面粉来分离 Puroindoline 蛋白, 经处理后得到的蛋白质混合溶液首先用分子筛葡聚糖 G-75 纯化, 每个收集管内的组分经 SDS-PAGE 分析, 分子量小于 31 kD 的蛋白质组分被回收和集中, 回收的蛋白质组分经 PEG20000 浓缩后, 再用离子交换柱羧甲基纤维素 (CM-23) 进行纯化。其洗脱液分别是双蒸水和 NaCl, 梯度为 0.05~0.7 mol/L、8 mmol/L pH5.5 的 MES 缓冲液, 回收只含 15 kD 的蛋白质的组分, 接着用 PEG20000 浓缩, 最后冷冻干燥得到 Puroindoline 蛋白。

关键词: Puroindoline 蛋白; 面粉; 提取与纯化; Triton X-114; SDS-PAGE

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)06-0568-04

Extraction and Purification of Puroindoline from Wheat Flour

WANG Jue, LUO Li-Ting, CHEN Ming-Jie, LI Yang, ZHANG Jin-Rui, HE Guang-Yuan*

(China-UK HUST-RRes Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Puroindoline, influenced and decided the wheat hardness and exhibiting activity against gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and fungi, is a very important protein in wheat flour. In this studies, the puroindoline was extracted from wheat flour in the 100 mmol/L Tris-HCl pH7.8 buffer, containing 4% Triton X-114. Then the protein mixture including puroindoline was successively purified by Sephadex G-75, and each fraction was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Fractions containing polypeptides with apparent molecular weights of less than 31 kD were pooled and loading on Carboxymethyl-cellulose (CM-23) after concentrated by PEG20000, and each fraction was analyzed as preceding. In those ways, they were eluted by distilled water and applying a gradient from 0.05 mol/L to 0.7 mol/L NaCl in 8 mmol/L MES pH5.5 buffer respectively. The fractions containing polypeptides apparent molecular weight 15 kD were pooled and concentrated by PEG20000, at last the puroindoline was obtained by freeze-dried.

Key words: Puroindoline; Flour; Extraction and purification; Triton X-114; SDS-PAGE

籽粒硬度是麦类作物中一种重要品质性状, 主要是由一个主效基因和一些微效基因所控制^[1]。主效基因 (*Ha*) 编码一个 15 kD 的蛋白复合体, 由两个蛋白多肽 Puroindoline a 和 Puroindoline b 按 1:1 组成^[2]。Puroindoline 蛋白 (简称 Pin 蛋白) 除了决定小麦的硬度之外, 它还是一种抗菌多肽, 能够抵抗 G^+ 、 G^- 菌以及真菌对植物的感染和侵袭, 在植物免疫系统中扮演重要的角色^[3]。将 *pina* 基因转入到水稻中后, 它能够提高水稻对稻瘟病和纹枯病两种疾

病的抵抗力^[4]。将 *pinb* 基因转入到苹果后, 转基因苹果的疤痕会显著降低^[5]。目前研究已经发现: 当 *pina* 基因不表达, 或 Pinb 蛋白的第 46 位的甘氨酸突变为丝氨酸、或第 44 的色氨酸突变为精氨酸、或第 60 位亮氨酸突变为脯氨酸以及第 39、44 和 56 位的色氨酸突变为终止密码子时都会导致小麦籽粒表现为硬质, 只有当 *pina* 和 *pinb* 基因都表达且 Pinb 蛋白无突变时小麦籽粒就会表现为软质, 如中国春^[6-8]。

收稿日期: 2005-03-18, 修回日期: 2005-09-21。

基金项目: 国家 973 计划项目 (2002CB111301); 国家自然科学基金资助项目 (30370807)。

作者简介: 王珏 (1981-), 女, 硕士在读, 从事分子生物学研究。

* 通讯作者。

Pin 蛋白与小麦的淀粉易结合,从而影响小麦的硬度^[6,7]。小麦的硬度决定了小麦的品质和最终用途;当小麦籽粒表现为硬质时其出粉率就高,反之就低;硬质小麦适合做面包,而软质小麦则适合做蛋糕。Pina 和 Pinb 蛋白都含有 1 个 19aa 残基的信号肽,其等电点 $pI > 10$,每个含有 5 个二硫键,其中有 1 个富含色氨酸的区域^[9]。Pin 蛋白是一种膜蛋白,它对脂类物质有较高的亲和力,能够与一些脂类蛋白质与脂类分子紧密结合^[10]。成熟的 Pin 蛋白与籽粒中淀粉粒相结合共同作用从而影响籽粒的硬度。

Triton X-114 是一种非离子去垢剂,当温度是 0℃ 时其表现为均一相,但在水相中时会表现为分层现象;它的主要作用是破坏整个细胞和溶解膜蛋白^[11]。本实验主要是根据国外从小麦籽粒中提取 Puroindoline 蛋白的方法,利用含 4% Triton X-114 的 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.8) 缓冲液,从市售蛋糕面粉中提取和制备 Pin 蛋白。在本研究中,一方面对层析的参数条件进行了摸索,另一方面提取 Puroindoline 蛋白也是为了将来进一步的分离、二级结构的鉴定以及抗体的实验做铺垫。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料为市售蛋糕面粉。

1.2 主要实验试剂

Triton X-114; Sigma; MES[2-(N-吗啡啉)乙磺酸]; Amresco; Sephadex G-75; Pharmacia; CM-Celulose (CM-23); Whatman; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器和设备

冷冻离心机; Beckman Coulter J-30I avanti-30 (I); BS-100A 自动部分收集器; HD-2 核酸蛋白检测仪; 上海沪西分析仪器厂; 低温冷冻干燥器; RD-20 III。

1.4 实验方法

1.4.1 Pina 蛋白的提取 称取 400 g 中国春小麦面粉溶于 1 L 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(其中含 5 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L 的 KCl, 4% Triton X-114, 用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.8)中,于 4℃ 缓慢搅拌过夜(避免产生泡沫);离心 30 min,离心力为 5 000 g;上清液在 30℃ 水浴中温浴 1 h,离心 15 min,离心力为 5 000 g;弃去上清,加入不含有 Triton X-114 的 Tris-HCl 缓冲液,与含有 Triton X-114 作相同处理;取上清加入乙醚:乙醇(1:3),摇

晃均匀, -20℃ 沉淀过夜;离心 15 min,离心力为 2 000 g;用乙醚:乙醇(同上)清洗沉淀 2 次;无水乙醚清洗沉淀 2 次;负压过夜,使沉淀干燥^[12]。

1.4.2 Sephadex G-75 凝胶层析 把干燥的蛋白质粉末溶于 5 mmol/L 的 MES 溶液中(pH 5.5);在 4℃ 用 MES 缓冲溶液中透析 24 h(缓慢搅拌,中途换透析液 3 次);10 000 g 下离心 30 min;取上清液经葡聚糖 G-75 凝胶过滤层析。层析柱体积为 1 cm×80 cm,用双蒸水洗脱。在波长为 280 nm 下测量每个收集管内洗脱液的吸光度值,分别研究 3 种不同加样体积(分别为 4、6、10 mL)和两种不同收集体积时(分别为 2、4 mL)洗脱曲线变化;从每管中取 20 μL 洗脱液,用 15% SDS-PAGE 检测洗脱液中蛋白质组成;回收和集中分子量小于 31 kD 以下的蛋白质洗脱液,用 PEG20000 浓缩回收的洗脱液^[13]。

1.4.3 CM-23 层析 将用 PEG20000 浓缩的洗脱液用 CM-23 进一步层析分离得到 Pin 蛋白混合样品。层析柱体积为 2.5 cm×25 cm,用 pH 5.5、浓度为 8 mmol/L 的 MES 缓冲液洗脱,其中 NaCl 梯度为 0.05~0.7 mol/L,加样体积是 5 mL,收集 2 mL/(3 min·管),测量每个收集管内洗脱液的吸光度值(波长同上),SDS-PAGE 检测同上^[14]。

1.4.4 Pin 蛋白的浓缩干燥 只收集分子量为 15 kD 的洗脱液,用 PEG20000 浓缩至体积大约为 5 mL,用双蒸水透析 24 h(缓慢搅拌,中途换透析液 3 次);真空冷冻干燥。

2 结果与分析

2.1 Sephadex G-75 凝胶层析

2.1.1 不同加样量洗脱曲线 本实验研究了在 3 种不同的加样量(分别为 4、6 和 10 mL,每收集管内的洗脱液均为 2 mL)情况下,其吸光度曲线变化结果见图 1。从图 1 中的曲线可以知道,3 种不同加样量其吸光度曲线并没有太多的变化,都为 3 个峰值,根据 SDS-PAGE 分析得知:第一个为高分子量

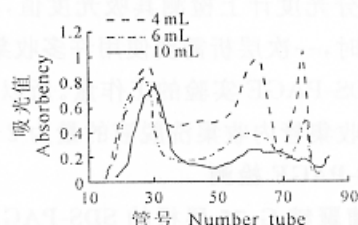


图 1 不同加样量蛋白质分离效果
Fig. 1 Absorbency of different loading volume

蛋白的峰值,第二个为中分子量蛋白的峰值,也是本实验所要提取的分子量为 15 kD 的 Pin 蛋白,第三个峰值是低分子量。但当加样量增多时,整个峰值都高,而且相应的高、中分子量蛋白之间波谷的值也高,也就是说高、中分子量两种蛋白质组分没能很好分开。

在每个收集管内收集恒定洗脱液(2 mL)的情况下,加样量 4 mL 和 6 mL 都能将蛋白质混合液较好地分离和纯化,加样量为 10 mL 时高分子量和低分子量的蛋白质组分就没能很好地分离。但是当加样量为 4 mL 时其工作效率就会降低,虽然加样量越少其分离效果就会越好。事实上,只要加样体积不超过床体积的 10%,凝胶层析都会很好地分离出蛋白质样品^[14]。因此在用 Sephadex G-75 凝胶层析时,考虑到分离结果和实验效率,本实验加样量选择为 6 mL。

2.1.2 不同收集量洗脱曲线 实验研究了在相同的加样量(6 mL)情况下,每个收集管内不同洗脱液量(分别为 2、4 mL)的吸光度曲线变化(图 2)。从图 2 曲线得知,每管收集量为 4 mL 时,整个吸光度曲线只有 1 个峰值,也就是高分子量蛋白和低分子量蛋白并没有分开;当每管收集 2 mL 的时候,可以完整看到 3 个峰值。因此本实验确定每管收集的洗脱液量为 2 mL。

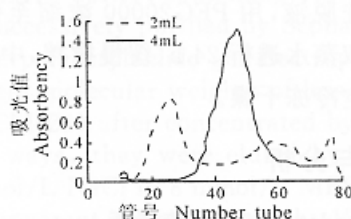


图 2 两种不同体积收集液量的比较

Fig. 2 Absorbency of different gather volume

从理论上讲,每个收集管内收集的洗脱液体积越小,每个分离吸光曲线的峰值间隔越大,即分离效果越好。但是如果每个收集管内收集的洗脱量降低到 1 mL,就会出现许多不足。首先是因为量少而无法在 754 分光光度计上检测其吸光度值,其次收集液体积过少时,一次层析需要使用许多收集管,也增加了后续 SDS-PAGE 实验的工作量。所以本实验最终确定每个收集管内收集洗脱液的量为 2 mL。

2.2 SDS-PAGE 检测

2.2.1 葡聚糖 G-75 层析的 SDS-PAGE 检测 经摸索,最终纯化条件确定为加样量体积 6 mL,每管收集洗脱液量 2 mL。选用葡聚糖 G-75 作一种分子

筛,以它为介质做凝胶层析时,分子量大的组分首先被洗脱出来,接着是中分子量,最后被洗脱的是小分子量蛋白质。初提的蛋白混合液经葡聚糖 G-75 层析分离后,用 15% SDS-PAGE 分析,可以看到 3 条主要的带(图 3),其中泳道 1~8 是高分子量蛋白质,泳道 9~14 为中分子量的蛋白质,泳道 15 中分子量为 20 kD 蛋白质开始被分离出来,这时分子量为 15 kD,即 Pin 蛋白出现。回收和集中分子量小于 31 kD 蛋白质洗脱液,其他洗脱液弃去不用。



图 3 经 Sephadex G-75 层析后 SDS-PAGE 图
Fig. 3 SDS-PAGE of fractionated by Sephadex G-75

2.2.2 CM-23 层析的 SDS-PAGE 检测 浓缩的分子量小于 31 kD 蛋白质溶液经 CM-23 层析纯化,每组组分经 SDS-PAGE 分析,结果如图 4 所示。其中,蛋白质成份主要还是 3 种,第 7~14 泳道为分子量 15 kD 的 Pin 蛋白,与葡聚糖 G-75 纯化结果一致。



图 4 经 CM-23 层析后 SDS-PAGE 图
Fig. 4 SDS-PAGE of fractionated by CM-23

2.3 冷冻干燥

将回收的 Puroindoline 蛋白溶液,经浓缩、冷冻低温过夜、干燥后得到主要成份为 Puroindolie 蛋白的干粉。

3 讨论

国外有关从小麦籽粒中提取 Pin 蛋白的文献不是太多,主要是利用 Triton X-114 特性从籽粒中提取^[13,14],从面粉中提取 Pin 蛋白还未见报道。而且现有文献中关于提取步骤和各种参数均语焉不详,特别是在两次层析分离过程中,各种参数都不是很清楚。本研究就是从市售面粉中提取到了 Pin 蛋白,而且对各种参数进行了研究。在国外文献中^[2,5,7],两次层析都是采用 10 cm×100 cm 的层析柱,本实验

采用的层析柱分别是 1 cm×80 cm 和 2.5 cm×25 cm。这样虽然多做了几次层析,但是却节约了大量的葡聚糖 G-75 和 CM-23,因为这两种介质都需要进口,价格不菲。

Pin 蛋白在小麦中扮演非常重要角色,它影响着作物品质,直接关系到小麦最终用途。本实验利用两种层析介质分子筛葡聚糖 G-75 和阳离子树脂 CM-23,成功地纯化用 Triton X-114 提取的 Pin 蛋白。从小麦面粉中提取和纯化 Puroindoline 的成功,为从其他麦类作物中提取 Puroindoline 蛋白提供了有益的尝试,也为 Pina 蛋白和 Pinb 蛋白的进一步分离做了有益的准备,更为重要的是为进一步研究如 Puroindoline 抗体的制备和高级结构作先期准备。

参考文献:

- [1] Mattern P J. Location of gene for kernel properties in wheat variety 'cheyenne' using chromosome substitution lines [A]. In: Sear E R, Sears L M S eds. Proc 4th Int. Wheat Genet Symp[M]. Columbia: University of Missouri, 1973. 703-707.
- [2] Jolly C J. Characterization of the wheat Mr 15000 'grain softness protein' and analysis of the relationship between its accumulation in the whole seed and grain softness[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, **86**:597-598.
- [3] Broekaert W F, Marien W, Terras F R G, De Bolle M F C, Proost P, Van Damme J, Dillen L, Claeys M, Rees S B, Vanderleyden J, Cammue B P A. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine rich domain of chitin-binding proteins [J]. *Biochemistry*, 1992, **31**:4 308-4 314.
- [4] Krishnamurthy K, Balconi C, Sherwood J E, Giroux M J. Wheat puroindoline enhance fungal disease resistance in transgenic rice [J]. *The American Phytopathological Society*, 2001, **14**(10):1 255-1 260.
- [5] Faize M, Sourice S, Dupuis F, Parisi L, Gautier M F, Chevreau E. Expression of wheat puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple (*Malus × domestica* Borkh) [J]. *Plant Science*, 2004, **167**:347-354.
- [6] Giroux M J, Morris C F. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low level of starch-surface friabilin [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**:857-864.
- [7] Giroux M J, Morris C F. Wheat grain hardness results from highly conserved mutation in the friabilin components puroindoline a and puroindoline b [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**:6 262-6 266.
- [8] Lillemo M, Morris C F. A leucine to protein mutation in puroindoline b is frequently present in hardness wheat from Northern Europe [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, **100**:1 100-1 107.
- [9] Gautier M F, Aleman M E, Guirao A, Marion D, Joudrier P. Triticum aestivum puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression [J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, **25**: 43-57.
- [10] Sourdille P, Perretant M R, Charmet G, Leroy P, Gautier M F, Joudrier P, Nelson J C, Sorrells M E, Bernard M. Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat [J]. *Theoretical Apply Genetic*, 1996, **93**: 580-586.
- [11] Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution [J]. *J Biol Chem*, 1981, **256**:1 604-1 607.
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000. 28-29.
- [13] Gérard B, Nardjis A, Gilberto I, Thérèse G, Stéphane H, Mireille D, Didier M. Diversity of puroindolines as revealed by two-dimensional electrophoresis [J]. *Proteomics*, 2003, **3**: 168-174.
- [14] Bettge A D, Morris C F, Greenblatt G A. Assessing genotypic softness in single wheat kernels using starch granule-associated friabilin as a biochemical marker [J]. *Euphytica*, 1995, **86**:65-72.