

新疆沙冬青叶片氨基酸和蛋白质的测试与分离 以及抗冻蛋白的鉴定结果分析

鲁春芳^{1,2*}, 尹林克^{1*}, 牟书勇¹, 赵峰侠^{1,2}, 尉姗姗^{1,2}

(1. 中国科学院新疆生态与地理研究所, 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 提取并纯化了新疆沙冬青(*Ammopiptanthus nanus*)叶片总蛋白, 得到了适合新疆沙冬青叶片总蛋白提取的最佳缓冲体系; 用 DEAE₅₂-C 分离了各蛋白质组分, 并用 SDS-PAGE 测定了纯度和分子量(14 ~ 90 kD 之间); 氨基酸组成分析显示了新疆沙冬青属内种遗传的一致性。对抗冻活性分析讨论证实了与蒙古沙冬青同属的新疆沙冬青中也含有抗冻蛋白(AFPs)。

关键词: 新疆沙冬青(*Ammopiptanthus nanus*); 叶片总蛋白; 氨基酸组成分析; 抗冻活性

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)05-0531-04

Extraction and Measurement of Total Protein and Amino Acids, Analysis the Identification Result of Antifreeze Protein in *Ammopiptanthus nanus*

LU Chun-Fang^{1,2*}, YIN Lin-Ke^{1*}, MU Shu-Yong¹, ZHAO Feng-Xia^{1,2}, YU Shan-Shan^{1,2}

(1. Xinjiang Institute of Ecology and Geography, The Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China;

2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Total protein of the leaves of *Ammopiptanthus nanus* was extracted, the buffer solution system was established which can obtain max leaves proteins from *A. nanus*. All protein groups were isolated by DEAE₅₂-C, whose molecular weights (14 – 90 kD) and purities were measured by SDS-PAGE. The results of relative percentage of amino acids revealed the genetic consistency of the different species. Four protein groups were identified as antifreeze proteins whose thermal hysteresis activities (THA) were 0.4°C, 0.33°C, 0.48°C and 0.15°C, respectively. This was evidences of discovery of antifreeze proteins in *A. nanus*.

Key words: *Ammopiptanthus nanus*; Total protein; Amino acids; Antifreeze proteins

抗寒性是植物在系统进化过程中, 为适应生态环境获得的一种对策, 抗寒性植物体内的多种耐低温物质, 如糖类、多元醇、脯氨酸、不饱和脂肪酸等, 对植物的抗冻适应起着巨大的作用, 尤其当气温降低或人工驯化与脱水还可以诱导形成大量的冷诱导蛋白^[1,2]。在进化过程中, 冷诱导蛋白的产生显得尤为重要, 因此, 人们也将关注的焦点集中在对抗冻蛋白的研究方面^[3,4]。已从极区鱼类、陆地昆虫、植物^[4,5]、细菌和真菌等各类生物中分离到多种抗冻蛋白^[6,7], 并测得了它们的基因序列及一些晶体结构^[8], 近些年主要集中开展该类蛋白质抗冻机制的研究^[9-12]。蒙古沙冬青[*Ammopiptanthus mongolicus*

(Maxim.) Cheng f.] 叶片中已发现抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)^[1], 但涉及其同属另一种新疆沙冬青(*Ammopiptanthus nanus* (M. Pop.) Cheng f.)的报道不多, 有关新疆沙冬青的抗寒性研究更少。新疆沙冬青是新疆特有常绿的高抗寒阔叶木本植物类群, 已有的研究成果不能从属和类群的角度上说明沙冬青抗低温胁迫的空间范围以及种间差异, 针对高抗寒植物沙冬青属的抗性机理还未进入系统性的研究阶段。有研究证明在进化方面, 植物 AFPs 暂无规律可循, 即使是种源相近在 AFPs 表达上也不尽相同^[13]。因此, 对新疆沙冬青中是否存在 AFPs 这一问题的研究具有重要意义。另外, 冷诱导

收稿日期: 2007-03-13, 修回日期: 2007-06-27。

基金项目: 国家科技部重大基础研究前期研究专项(2004CCA03400); 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(200421106); 新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题(XJDX0201-2005-09)。

作者简介: 鲁春芳(1980-), 女, 在读博士生, 主要从事新疆沙冬青抗冻生理生化方面的研究(E-mail: lcf0330@yahoo.com.cn); 尹林克, 男, 研究员(E-mail: yinlk@ms.xjb.ac.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence)。

和干旱胁迫会使植物 AFPs 活性提高^[14]。一些植物抗冻蛋白与致病相关蛋白有序列同源性^[15],为此,我们以多年高温、大气干旱胁迫与低温胁迫兼而有之的中科院吐鲁番沙漠植物园环境下引种的新疆沙冬青为材料,分离纯化出了叶片总蛋白,对其氨基酸组成进行了分析,通过对新疆沙冬青低温应激蛋白的热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)进行分析讨论,证实了抗冻蛋白在新疆沙冬青叶片中也有分布,为抗逆反应机制的进一步研究提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

新疆沙冬青(*Ammopiptanthus nanus*)采自中国科学院吐鲁番沙漠植物园,该植物园地处42°51'N, 89°11'E。海拔-95~-76 m,终年干旱,夏季高温,冬季寒冷,年平均降水量16.4 mm,蒸发量3000 mm,年平均气温14℃,平均湿度40%;极端最高温49.6℃,地面最高温度80℃以上,极端最低温度-28℃。采集人工栽培10 a以上的植株叶片,采集时间为2005年1月下旬(吐鲁番最低温所在时间)。

1.2 叶片总蛋白的提取及含量测定

称取50 g沙冬青样品,抽提缓冲液[25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.6), 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂(苯甲基磺酰氟, PMSF)]中捣碎成糊状,三倍抽提缓冲液进行定容,在离心管中充分摇匀,4℃静置数小时后,20000×g反复离心数次,每次离心30 min,漂去上层脂质,得到澄清滤液。

使用核酸蛋白分析仪DU800(美国Beckman公司),采用考马斯亮蓝染色法,在595 nm绘制标准曲线,并测定 $A_{595\text{nm}}$ 值。

1.3 蛋白质的分离纯化

上清液用双流速中高压层析系统(美国BIO-RAD公司)进行梯度层析^[16]。分离上柱前用25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.6), 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA平衡柱,然后用25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.6), 0.1 mmol/L EDTA及梯度NaCl洗脱。步骤为先以0.1~0.3 mol/L NaCl平衡液梯度洗脱,用0.3 mol/L NaCl平衡液洗至 A_{280} 、 A_{260} 吸收值为基础水平,接着用0.3~0.6 mol/L NaCl平衡液梯度洗脱,再用0.6、1.0 mol/L NaCl平衡液洗脱,柱体积为60 mL,按每管5 mL收集样品。收集各洗脱峰,由该仪器测得的 A_{280} 和 A_{260} 的比值估算各峰核酸含量^[17],收集样品脱盐后冷冻干燥,分装后于

-70℃冰箱备用。

1.4 蛋白质分子量测定

使用垂直电泳(美国BIO-RAD公司)。聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)的Acr和Bis总浓度(T)为3%,交联剂百分比(C)为2.67%,不连续体系,样品缓冲液为内含1% SDS, 1% β -巯基乙醇, 20%甘油, 0.02%溴酚蓝, 0.01 mol/L pH 8.0 Tris-HCl缓冲液。电压设定为500 V;电泳时间5 h。整个过程以循环水将环境温度控制在15℃。

1.5 叶片氨基酸组成分析

将在植物园采集的成熟叶自然风干后,于80℃条件下烘干,研磨至粉状,送至新疆维吾尔自治区测试中心测定^[18]。

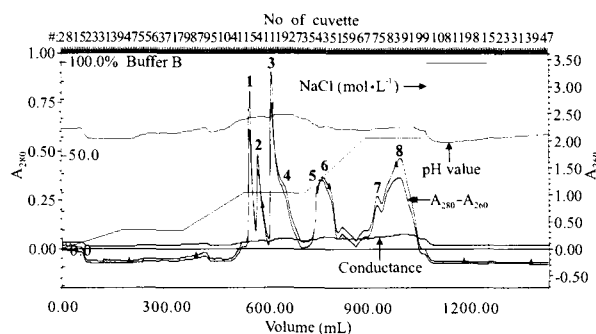
2 结果与分析

2.1 标准曲线及沙冬青叶片的总蛋白质含量

BSA标准蛋白溶液浓度与吸光度值 $A_{595\text{nm}}$ 关系曲线的回归方程为: $y = 1.1448x + 0.0324$ 。相关系数 $r^2 = 0.9992$,式中 y 为浓度, x 为吸光度。说明在595 nm处BSA溶液的浓度和吸光度之间有良好的线性关系,遵从朗伯-比尔定律,而且二者的吸收曲线基本一致,可以用来测定蛋白含量,沙冬青总蛋白含量测得为3.5 mg/g。

2.2 DEAE₅₂-C分离蛋白质组分

沙冬青叶片蛋白质经DEAE₅₂-C离子交换层析分离得到各个蛋白质组分。从图1和表1中各蛋白质峰值 A_{280}/A_{260} 值发现样品中混杂的核酸百分含量较低,蛋白浓度较高,得到部分纯化的蛋白质。



柱体积为60 mL,平衡缓冲液为5 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.6, NaCl梯度洗脱,按每管5 mL收集样品
Total volume was 60 mL, equilibration buffer involved 5 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.6 and gradient elution solution of NaCl; 5 mL sample solution were collected every tube

图1 DEAE₅₂-C离子交换柱层析

Fig. 1 DEAE₅₂ cellulose ion exchange chromatography (IEC)

表 1 收集峰 A₂₈₀、A₂₆₀ 测定值
Table 1 A₂₈₀, A₂₆₀ value of fractions

Fraction number	A ₂₈₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀ /A ₂₆₀
1	2.8862	2.1918	1.316817
2	1.6445	1.3515	1.216796
3	3.1754	2.5656	1.237683
4	1.1345	1.0954	1.035695
5	1.2573	1.254	1.002632
6	1.2008	1.2910	0.930132
7	0.789	0.9541	0.826957
8	1.3171	1.6655	0.790814

Note: This datasheet is from DEAE₅₂ cellulose chromatography.

2.3 SDS-PAG 鉴定蛋白质分子量及纯度

SDS-PAG 显示沙冬青叶片中分布着分子量约为 14~90 kD 分子量的蛋白(图 2)。经过 DEAE₅₂-C 纯化后的蛋白,仍然存在着若干不同组分,特别是 5,6,7 峰收集的蛋白为 3 种以上不同分子量的蛋白组分。

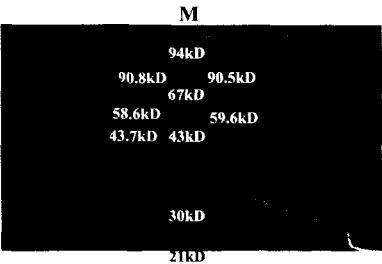


图 2 DEAE₅₂-C 分离各样品的 SDS-PAG (12.5%)
电泳考染图谱(M 为标准分子量)

Fig. 2 The fractions from DEAE₅₂-C was performed on 12.5% SDS-PAG pattern(M:Marker)

2.4 氨基酸组成百分率

氨基酸组成分析结果表明:天门冬氨酸含量最高,占总量的 12.76%;其次是脯氨酸和谷氨酸,分别为 10.78% 和 8.32%;缬氨酸、亮氨酸和丙氨酸等疏水性氨基酸含量总计占总量的 21.48%;芳香族氨基酸(苯丙氨酸和酪氨酸)占 9.43%;甲硫氨酸和组氨酸分别占 3.33% 和 2.06%;其余氨基酸各自百分含量在 0.95%~5.86% 之间(表 2)。

表 2 叶片中各氨基酸相对含量
Table 2 Relative percentage of amino acids in leaves

氨基酸 Amino acids	Content (%)	氨基酸 Amino acids	Content (%)
Lys	5.86	Ala	6.50
Try	0.95	Thr	5.39
Asp	12.76	Ile	5.71
Ser	4.83	His	2.06
Glu	8.32	Val	7.29
Cys	1.51	Leu	7.69
Pro	10.78	Arg	3.41
Tyr	3.41	Phe	6.02
Met	3.33	Gly	4.20

3 讨论

(1) 适当 pH 的抽提缓冲液能增加蛋白质的稳定性和溶解度。提取植物材料中的蛋白质时,要特别注意提取物的 pH 值,因为植物细胞中有巨大的液泡,在细胞破碎以后,液泡里的物质能改变提取所用的缓冲液 pH 值。因此,缓冲液的配方需要因材料而异反复多次实验^[19,20],我们得到了最大提取量的缓冲体系,制定出适合于沙冬青蛋白提取的最佳方案;同时,此方案对双向电泳样品处理提供了一定的参考^[21]。电泳上样量为 20 μg、凝胶浓度为 12.5% 时沙冬青各组分蛋白条带清晰。

(2) 有资料表明,在进化方面,植物 AFPs 毫无规律可言,即使是种源相近在 AFPs 表达上也不尽相同^[22,23]。例如胡萝卜表达 AFPs,而欧洲防风根(与胡萝卜亲缘很近的一个种)则不表达^[13]。新疆沙冬青叶片氨基酸组成中,天门冬氨酸和谷氨酸含量均较高,反映了沙冬青属内遗传的一致性^[5](对于测定所得的抗冻蛋白的氨基酸组成将做进一步测定,并与已知的抗冻蛋白进行比较分析)。我们将经 DEAE₅₂-C 分离后的各蛋白质组分用差示扫描量热法(DSC)测定 THA 值^[24],发现蛋白浓度为 20 mg/mL 时 4 组蛋白有热滞活性,THA 分别为 0.4℃、0.33℃、0.48℃、0.15℃^[25],表明新疆沙冬青叶片中含有具热滞活性的抗冻蛋白。这一发现证实了同属植物亦含有抗冻蛋白这一重要结论,为抗冻蛋白表达规律提供了新的论据,并为“抗冻植物中可能普遍存在抗冻蛋白”^[26]提供了论据。

(3) 经电泳谱带发现,经 DEAE₅₂-C 分离得到的蛋白为分子量不均一的多种蛋白质的复合物,仍为部分纯化的蛋白质粗制品。有研究表明,粗制的 AFPs 活性有高于或远远高于纯化的抗冻蛋白的现象。因此,沙冬青抗冻蛋白热滞活性的出现是否为多种蛋白或多种内源物质共同作用的结果,还是一种独特作用的结果,还需对层析分离后的各蛋白质进一步纯化后定论。另外,植物抗冻蛋白的表达和积累,既受控于发育及转录因子调节,又受到低温、短日照、脱水及乙烯等因素的影响。异源超表达抗冻蛋白基因能赋予敏感宿主植物抗冻能力^[15]。新疆吐鲁番沙漠植物园作为新疆沙冬青所存在的典型生境条件,为这一高抗寒常绿植物提供了终年干旱、夏季高温、冬季低温的天然胁迫条件,是发现抗冻蛋白的重要线索。在这种典型的胁迫条件下是否产生了多种应激蛋白并相互作用,有关的抗冻机制和表

达调控,以及遗传转化等方面的研究,在沙冬青属植物中有何异同,也是值得进一步探索的。

(4) 胁迫可以引起大量的蛋白质在种类和表达量上的变化^[27,28],而蛋白质组学研究可以使我们更好地了解非生物胁迫的伤害机制以及植物对非生物环境的适应机制。信号应答过程中蛋白质的变化状况逐渐引起了人们的关注。人们对于干旱诱导,盐胁迫诱导等方面做了一些相关的蛋白质组学研究。利用差异蛋白质组学的理论和方法,通过对低温胁迫环境下新疆沙冬青应激蛋白质组变化的研究,比较分析低温胁迫环境下蛋白质组发生的变化,从而认识新疆沙冬青的抗寒生物化学响应特点,揭示应激蛋白的类型及与其它蛋白质瞬时或稳定的相互作用,蛋白点的类型,抗冻蛋白是否同样具有抗其它逆境作用(包括干旱、病虫害、高温等),是非常有意义的。因此对新疆沙冬青胁迫条件下的蛋白质组学的研究是很有价值的。已经通过上述一系列实验和方法得到了成熟的提取纯化蛋白经验,在此基础上,我们将对沙冬青的蛋白质组学内容做进一步研究。

参考文献:

- [1] 费云标,孙龙华,黄涛,舒念红,高素琴,简令成. 沙冬青高活性抗冻蛋白的发现[J]. 植物学报,1994,36(8):649-650.
- [2] Guy L C. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism[J]. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol*,1990,41:187-223.
- [3] Griffith M,Ala P,Yang D S C,Hon W C,Moffatt B A. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves[J]. *Plant Physiol*,1992,100:593-596.
- [4] Pihakaski-Maunsbach K,Tamminen I,Pietiäinen M,Griffith M. Antifreeze proteins are secreted by winter rye cells in suspension culture[J]. *Physiol Plant*,2003,118:393-398.
- [5] 魏令波,江勇,舒念红,高素琴,费云标. 沙冬青叶片热稳定抗冻蛋白特性分析[J]. 植物学报,1999,41(8):837-841.
- [6] Huang T,Nicodemus J,Zarka D G,Thomashow M F,Wisniewski M,Duman J G. Expression of an insect (*Dendroides canadensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* results in a decrease in plant freezing temperature[J]. *Plant Mol Biol*,2002,50:333-344.
- [7] 林善枝,张志毅,林元震. 植物抗冻蛋白及抗冻性分子改良[J]. 植物生理与分子生物学报,2004,30(3):251-260.
- [8] Bar M,Bar-Ziv R,Scherf T,Fass D. Efficient production of a folded and functional,highly disulfide-bonded β -helix antifreeze protein in bacteria[J]. *Protein Expr Purif*,2006,48:243-252.
- [9] Duman J G,Olsen T M. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi and phylogenetically diverse plants[J]. *Cryobiology*,1993,30:322-328.
- [10] Huang T,Duman J G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara* [J]. *Plant Mol Biol*,2002,48:339-350.
- [11] 陈曦,卢存福,蒋湘宁,王沙生. 植物抗冻蛋白及其基因工程研究的新进展[J]. 北京林业大学学报,2002,24(3):94-98.
- [12] 谢秀杰,贾宗超,魏群. 抗冻蛋白结构与抗冻机制[J]. 细胞生物学杂志,2005,27(1):5-8.
- [13] Doucet C J,Byass L,Elias L,Worrall D,Smallwood M,Bowles D J. Distribution and characterization of recrystallization inhibitor activity in plant and lichen species from the UK and maritime Antarctic [J]. *Cryobiology*,2000,40:218-227.
- [14] Yu X M,Griffith M. Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid[J]. *Physiol Plant*,2001,112:78-86.
- [15] 王瑞云,李润植,孙振元,任有蛇,岳文斌. 抗冻蛋白与植物低温胁迫反应[J]. 应用生态学报,2006,17(3):551-556.
- [16] 费云标,魏令波,高素琴,陆漫春,王保怀,李芝芬,张有民,舒念红,江勇,王维香. 沙冬青抗冻蛋白的分离纯化及其理化特性分析[J]. 科学通报,2000,45(20):2185-2189.
- [17] 李建武,萧能懋,余瑞元,袁明秀,陈丽蓉,陈雅惠,陈来同. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994. 171-173.
- [18] 尹林克,张娟. 不同生存环境下沙冬青属植物的蛋白质氨基酸变化[J]. 干旱区研究,2003,21(3):269-274.
- [19] 陶慰孙. 蛋白质分子基础[M]. 北京:人民教育出版社,1980. 22-25.
- [20] 鲁子贤. 蛋白质化学[M]. 北京:科学出版社,1981. 40-48.
- [21] 王玉琪,彭新湘. 适用于水稻叶片蛋白质组分析的双向电泳技术[J]. 植物生理与分子生物学报,2006,32(2):252-256.
- [22] Zhang D Q,Wang H B,Liu B,Feng D R,He Y M,Wang J F. Carrot antifreeze protein does not exhibit the polygalacturonase-inhibiting activity of PGIP family[J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报),2006,33(11):1027-1036.
- [23] Hon W C,Griffith M,Chong P. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye leaves[J]. *Plant Physiol*,1994,104:971-980.
- [24] 陈廷超,张极震,杨景文,叶文,费云标. 差示扫描量热法直接测定抗冻蛋白溶液的热滞效应[J]. 生物物理学报,1995,11(3):309-313.
- [25] 尉姗姗,尹林克,牟书勇,鲁春芳,赵峰侠. 新疆沙冬青抗冻蛋白的提取分离及其热滞活性测定[J]. 云南植物研究,2007,29(2):251-255.
- [26] Scotter A J,Marshall C B,Graham L A,Gilbert J A,Garnham C P,Davies P L. The basis for hyperactivity of antifreeze proteins [J]. *Cryobiology*,2006,53:229-239.
- [27] Worrall D,Elias L,Ashford D,Smallwood M,Sidebottom C,Lillford P,Telford J,Holt C,Bowles D. A carotolucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization [J]. *Science*,1998,282:115-117.
- [28] Griffith M,Antikainen M,Hon W C,Pihakaski-Maunsbach K,Yu X M,Chun Y U,Yang S C. Antifreeze proteins in winter rye[J]. *Physiol Plant*,1997,100:327-332.