青稞中β-1, 3-葡聚糖酶的纯化及其抗血清的制备

黎柳君　魏慧敏　吴守锋　郭军伟　杜林方*
四川大学生命科学学院，成都 610064

Purification and Preparation of Antibody of β-1,3-Glucanase from Highland Barley

LI Liu-Jun, WEI Hui-Min, WU Shou-Feng, GUO Jun-Wei, DU Lin-Fang*
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

提要　萌发的青稞种子经醋酸钠缓冲液抽提，50%~85%硫酸铵分级沉淀，DEAE-Cellulose 52、CM-Sepharose Fast Flow离子交换层析和Sephadex G-75分子筛层析，得到具活性的β-1,3-葡聚糖酶。SDS-PAGE检测显示分子量27 kDa左右的主带(95%)。将纯化的β-1,3-葡聚糖酶对新西兰兔进行免疫制备抗血清，双向免疫扩散测定效价为1:64。免疫印迹分析表明纯化的β-1,3-葡聚糖酶免疫杂交带亦在27 kDa处。

关键词　β-1,3-葡聚糖酶；青稞；纯化；抗血清；免疫印迹

β-1, 3-葡聚糖酶(EC 3.2.1.39)存在于大多数高等植物种子中(Leubner-Metzger和Meins 1999)，按植物种类、生理发育期或细胞定位的不同，认为存在一个同功酶家族；按分子量、等电点、蛋白一级结构、细胞定位、作用方式分为多种类型(Leubner-Metzger 2003)。β-1, 3-葡聚糖酶在细胞分裂、小孢子发生、胚发生等生理发育活动中起作用，且很有可能参与植物抵抗真菌的防御反应，是一类重要的与病程相关的蛋白(pathogenesis-related protein, PR-2)(Leubner-Metzger 2003)。青稞(*Hordenm vulgare* var. *nudum* Hook. F.)是我国西藏和青海地区特有的高原作物，我们曾在青稞种子的胚中检测到几种β-1, 3-葡聚糖酶，并分离纯化了其中的一种(Ding等2003)。本文从青稞种子抽提物50%~85%硫酸铵组分中，纯化出另一种β-1, 3-葡聚糖酶，并制备其特异性抗血清，为从分子水平上研究β-1, 3-葡聚糖酶提供了方法。

材料与方法

1　材料

青稞(*Hordenm vulgare* var. *nudum* Hook. F.)种子采自西藏地区。

2　β-1, 3-葡聚糖酶的分离纯化

取100 g青稞种子，经0.02%硝酸汞消毒，用水冲洗后置于湿润纱布上于20℃下萌发40 h。种子以1:3.5 (*W/V*) 加入冰冷的匀浆缓冲液A [50 mmol·L^{-1} 醋酸钠，10 mmol·L^{-1} EDTA，5 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇，10 mmol·L^{-1} 苯甲基磺酰氟(PMSF)，pH 5.0]，捣碎，静置40 min，离心(15 000×*g*，20 min)，上清液为粗酶液。

粗酶液用50%~85%饱和硫酸铵分级沉淀，15 000×*g* 离心45 min，沉淀用缓冲液B (50 mmol·L^{-1} Tris-HCl，10 mmol·L^{-1} EDTA，5 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇，pH 8.0)溶解，并对缓冲液B透析过夜。已透析的酶液经预先用缓冲液B平衡好的DEAE-Cellulose 52离子交换柱(2 cm×8 cm)吸附，收集穿透峰(活性峰)，对缓冲液C (20 mmol·L^{-1} 醋酸钠，10 mmol·L^{-1} EDTA，5 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇，pH 5.0)透析过夜，浓缩后上预先用缓冲液C平衡好的CM-Sepharose Fast Flow离子交换柱(2 cm×8 cm)。先用缓冲液C洗脱至A_{280}<0.05，再换用0~0.5 mol·L^{-1} NaCl溶液进行线性梯度洗脱，收集活性组分。冷冻干燥浓缩活性组分，施于缓冲液D (100 mmol·L^{-1} NaCl，20 mmol·L^{-1} 醋酸钠，10 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇，pH 7.0)预先平衡好的葡聚糖凝胶[Sephadex G-75柱 (1.2 cm×60 cm)]，流速18 mL·h^{-1}，并收集活性组分，得到4.1 mg β-1, 3-葡聚糖酶。

以上步骤均在4℃度下操作。

收稿　2005-11-07　修定　2006-03-13
资助　高等学校骨干教师资助计划(20006502)。
*通讯作者(E-mail: dulinf@mail.sc.cninfo.net, Tel: 028-85412766)。

3 蛋白质浓度与酶活性的测定

蛋白质浓度测定按Bradford法(Bradford 1976)，以牛血清白蛋白(BSA)为标准。0.1% (w/v)海带多糖(Sigma公司)作为反应底物，DNS法(Wood 和Bhat 1988) 测定反应生成的还原糖量。1个单位的β-1,3-葡聚糖酶活力定义为1 min水解生成1 μmol 还原糖(μmol·min^{-1}·mg^{-1}) (Ding等 2003)。

4 SDS-PAGE及分子量测定

SDS-PAGE参照Laemmli系统(Laemmli 1970)，分离胶和浓缩胶浓度分别为15%和6%，用考马斯亮蓝R-250染色。标准蛋白为Pharmcia公司产品。

5 抗血清的制备和检测

5.1 抗血清的制备和效价的测定 参照张龙翔等(1997)方法略有改动。基础免疫(0 d)为0.5 mL 2.0 mg·mL^{-1}抗原加等体积的福氏完全佐剂，完全乳化后注射于新西兰雌免腹股沟皮下及后脚掌；加强免疫(10、20和30 d)为0.6 mL 2.0 mg·mL^{-1}抗原加等体积的福氏不完全佐剂，完全乳化后注射于腹股沟皮下及后脚掌；第3次免疫后的第3天耳静脉采血，用双向免疫扩散法(张龙翔等1997)检测抗血清效价。若效价符合要求，第4次免疫后的第8天进行心脏主动脉采血，4℃静置8 h后离心(3 000×*g*，10 min)，吸取抗血清分装，-20℃保存备用。

5.2 免疫印迹 粗酶液和纯化的β-1,3-葡聚糖酶经SDS-PAGE分离后，电转移至偏氟聚乙烯(PVDF)膜上(Archambault等1998) (400 mA，2 h)，在含5%脱脂奶粉的TTBS (20 mmol·L^{-1} Tris-HCl、0.1% Tween 20、100 mmol·L^{-1} NaCl，pH 7.5)溶液中封闭8 h。然后与β-1,3-葡聚糖酶抗血清(按照1:2 000稀释)室温孵育2 h，TTBS洗膜4次，每次5 min。再用辣根过氧化物酶(HRP)耦联的羊抗兔IgG抗体(按照1:10 000稀释)室温孵育1 h，TTBS洗膜4次，每次5 min。用增强化学发光试剂(ECL) (Amersham公司)进行反应，曝光，观察结果。

实验结果

1 β-1,3-葡聚糖酶的分离纯化

萌发青稞种子经醋酸钠缓冲液抽提，50%~85%硫酸铵分级沉淀，DEAE-Cellulose 52和CM-Sepharose Fast Flow离子交换层析和Sephadex G-75分子筛层析，获得β-1,3-葡聚糖酶。SDS-PAGE检测显示分子量27 kDa左右的主带(95%)，并存在非常微弱的副带(图1)。

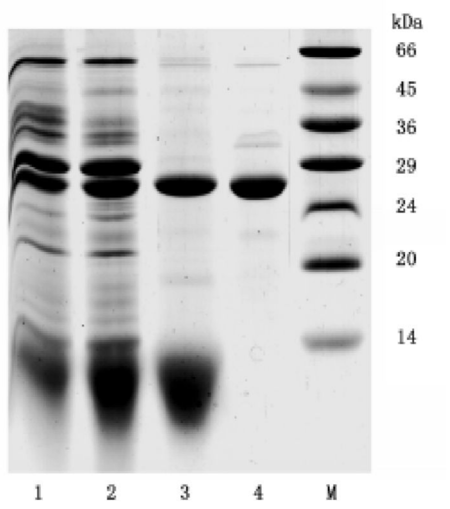

图1 纯化的β-1,3-葡聚糖酶SDS-PAGE分析

1：50%~85% $(NH_4)_2SO_4$沉淀组分(20 mg)；2：DEAE-Cellulose 52层析穿透峰(20 μg)；3：CM-Sepharose Fast Flow梯度洗脱组分(10 μg)；4：Sephadex G-75纯化的β-1,3-葡聚糖酶(10 μg)；M：标准蛋白质分子量。

2 抗血清效价的测定

将纯化的β-1,3-葡聚糖酶对新西兰雌兔进行免疫，制备抗血清。双向免疫扩散试验呈现一条清晰沉淀线(图2)，表明抗血清效价为1:64。

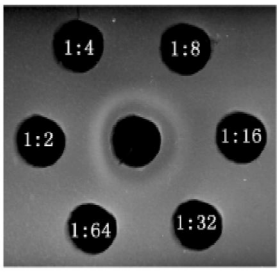

图2 双向免疫扩散图

中心孔为抗血清，周围孔为β-1,3-葡聚糖酶。

3 抗血清特异性检测

免疫印迹分析显示：制备的抗血清与纯化的β-1,3-葡聚糖酶发生免疫反应，只在分子量27

kDa处出现单一杂交带，说明β-1,3-葡聚糖酶抗血清制备成功；与粗酶液反应出现2条杂交带，27 kDa处的杂交带明显，而67 kDa处的杂交带微弱(图3)。

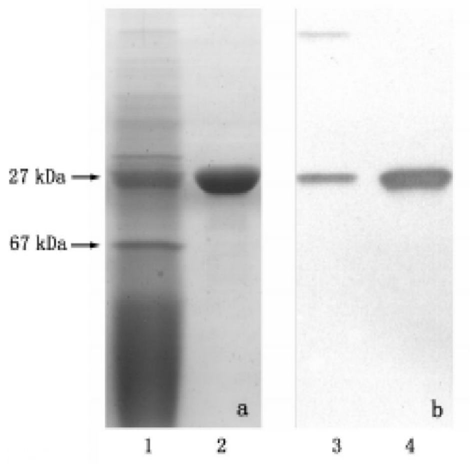

图3　β-1,3-葡聚糖酶SDS-PAGE图谱与免疫印迹

样品经SDS-PAGE (15%)，电转印到PVDF膜上，与制备的抗血清(1:2 000)杂交。a：考马斯亮蓝染色；b：免疫印迹检测。1和3：粗酶液(5、0.5 μg)；2和4：纯化的β-1,3-葡聚糖酶(5、0.5 μg)。

讨　论

β-1,3-葡聚糖酶参与植物多种生理过程，如花粉发育、受精、胚乳储藏物质的动用及细胞分化等(Leubner-Metzger 2003)。有人认为β-1,3-葡聚糖酶是种子萌发时的关键物质(Leubmer-Metzger等1995)。β-1,3-葡聚糖酶大量表达和聚集，以降解种皮和胚乳中可溶性β-1,3-葡聚糖，从而利于萌发胚的穿出(Bewley和Blank 1994)。分离得到分子量为27 kDa的β-1,3-葡聚糖酶主带，并伴有微弱的副带(图1)。我们用此方法曾从青稞发芽的胚中分离到32 kDa的碱性β-1,3-葡聚糖酶(Ding等2003)，查明青稞种子中存在至少2种β-1,3-葡聚糖酶。

制备的抗血清与纯化的β-1,3-葡聚糖酶只在27 kDa处有一条明显的免疫杂交带，表明其能专一性地识别β-1,3-葡聚糖酶。抗血清与粗酶液免疫印迹时，除27 kDa的明显免疫杂交带外，还出现67 kDa处微弱杂交带，推测粗酶液中可能存在另一种分子量为67 kDa的β-1,3-葡聚糖酶，它与27 kDa β-1,3-葡聚糖酶的抗血清存在交叉反应，是否如此，尚待进一步研究。免疫印迹时我们曾采用增强化学发光(ECL)法，比常规的显色法快速和灵敏。

参考文献

张龙翔，张庭芳，李令媛(1997). 生化实验方法和技术. 北京：高等教育出版社，348~356

Archambault C, Coloccaia G, Kermasha S, Jabaji-Hare S (1998). Characterization of an endo-1,3-β-glucanase produced during the interaction between the mycoparasite *Stachybotrys elegans* and its host *Rhizoctonia solani*. Can J Microbiol, 44: 989~997

Ballance GM, Manners DJ (1978). Partial purification and properties of an endo-1,3-β-glucanase from germinated rye. Phytochemistry, 17: 1539~1542

Bewley JD, Blank M (1994). Physiology of Development and Germination. NewYork: Plenum Press, 455~457

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254

Ding P, Du LF, Zhang NH (2003). Purification and activity staining of β-1,3-glucanase from highland barley. Natural Product Res Dev, 15: 284~288

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly by the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680~685

Leubner-Metzger G (2003). Function and regulation of β-1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-riping. Seed Sci Res, 13: 17~34

Leubmer-Metzger G, Frundt C, Vogeli-Lange R, Meins Jr F (1995). Class I β-1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination, Plant Physiol, 109: 751~759

Leubner-Metzger G, Meins Jr F (1999). Function and regulation of plant β-1,3-glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds). Pathogenesis-related Proteins in Plants. Boca Raton: CRC Press, 49~76

Wood TM, Bhat KM (1988). Methods of measuring cellulose activities. Method Enzymol, 160: 87~112