

小麦多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的部分结构

万琳, 周立*

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要 为了弄清小麦多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP) 的作用机制, 并为其在基因工程中的应用提供依据, 对其结构进行了研究. 用 Edman 降解法测得小麦 PGIP 的 N 端序列为 Lys-Pro-Leu-Leu-Thr-Lys-Ile-Thr-Lys-Gly-Ala-Ala-Ser-Thr. 用 CD 谱研究其二级结构, 发现小麦 PGIP 天然态含有 43.7% 的 β -折叠和 13.1% 的 α -螺旋. 酸碱和温度变性引起了二级结构改变. 不完全变性阶段, 二级结构的变化表现为 α -螺旋无明显变化, β -折叠遭到破坏; 活性完全丧失阶段, β -折叠变化很小, α -螺旋含量明显减少. 用 NR/R (非还原/还原) 双向对角线 SDS-PAGE 鉴定出小麦 PGIP 含有链内二硫键. 用去糖基化法确证了小麦 PGIP 的糖含量为 22%. 小麦 PGIP 与双子叶植物 PGIP 相比, 一级结构差异较大, 同源性由 36% 变为 9%; 二级结构相似, 都是 α - β -折叠的蛋白; 均具有链内二硫键; 在糖含量上也相似. 研究结果为进一步弄清小麦 PGIP 作用机理打下了基础, 同时对于植物抗赤霉病基因工程具有重要意义.

关键词 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白, 小麦, 结构

中图分类号 Q51

The Partial Structure of Wheat Polygalacturonase-inhibiting Protein

WAN Lin, ZHOU Li*

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract In order to reveal the mechanism of wheat polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) and to make best use of it in gene engineering, its structure was studied. The N-terminal amino acid sequence of wheat PGIP was determined by Edman degradation. The result was: Lys-Pro-Leu-Leu-Thr-Lys-Ile-Thr-Lys-Gly-Ala-Ala-Ser-Thr. The secondary structure of wheat PGIP was obtained by the measurement of circular dichroic spectra. The native PGIP of wheat was estimated to contain about 43.7% β -sheet and 13.1% α -helix. The secondary structure was changed by effects of pH and temperature. α -helix had little change and β -sheet was destroyed while the protein denatured incompletely. When the activity of wheat PGIP lost, the content of β -sheet varied a little and that of α -helix reduced apparently. Wheat PGIP had internal disulfide bond by analysis of NR/R (not reduced/reduced) two-dimensional electrophoresis. Wheat PGIP was deglycosylated using TFMS, and the result indicated that carbohydrates content was 22%. When dicotyledon PGIPs was compared with wheat PGIP, there was difference in primary structure. The N-terminal sequence of PGIPs in dicotyledonous plants shared 36% identical amino acids, but the percentage of overall identity was changed to only 9% when wheat PGIP was included in the analysis. However, PGIPs from Wheat and dicotyledon were consistent in secondary structure, disulfide bond and carbohydrates content. The results have laid the foundation for the elucidation of its mechanism, and is significant for breeding crops resistant to *Gibberella zeae* (Schw.) Petch.

Key words polygalacturonase-inhibiting protein, wheat, structure

多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase, PG) 是病原真菌入侵过程中分泌的第一个细胞壁降解酶, 它对植物细胞壁的降解不仅使其它细胞壁降解酶对其底物的攻击更容易, 而且为真菌生长和发育提供糖源. 迄今还没有有效手段控制植物的真菌病, 因此在

收稿日期: 2001-07-04, 接受日期: 2001-09-12
国家自然科学基金资助项目 (NO. 39880030)

*联系人: 028-5412955, zhoulicao @263.net
万琳, 女, 1976 年 7 月出生, 硕士生

Received: July 4, 2001; Accepted: September 12, 2001

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39880030)

*Corresponding author Tel: 028-5412955, E-mail: zhoulicao @263.net

植物中发现的对病原真菌的特异性应答产物——PGIP,作为抗性品种培育中的目标蛋白,成为人们的关注焦点^[1]。

目前对 PGIP 的研究几乎都集中于双子叶植物 PGIP。我们实验室首次从小麦中分离出 PGIP^[2],发现小麦 PGIP 可以抑制小麦禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 等的 PG 活性^[3],而镰刀菌可引发小麦赤霉病 (*Gibberella zeae* (Schw.) Petch)。后者是小麦的一种主要病害,会造成小麦的大幅度减产。小麦 PGIP 对 PG 的抑制功能提示它可能成为抗赤霉病的有效手段。

为了更好地利用小麦 PGIP 的功能,对其结构的研究是必不可少的。决定小麦 PGIP 功能和性质的结构如何?小麦 PGIP 与双子叶植物 PGIP 都能抑制 PG,它们在结构上有何异同?本文对于这些问题进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 实验小麦 (*Triticum Aestivum* L.) 品种为“SW89-2589”,由四川省农科院作物所提供。

1.1.2 试剂 CM-Sephadex C-50、Sephadex G100 由 Pharmacia 公司进口分装;丙烯酰胺、N,N-甲叉双丙烯酰胺、Pectinase 为 Serva 产品;Pectin 为 Sigma 产品;考马斯亮蓝 R250 为 Fluka 进口分装;TFMS (trifluoromethanesulfonic acid) 为 Acros 产品;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 小麦 PGIP 的制备 按照文献[2]方法,分离纯化小麦 PGIP。

1.2.2 小麦 PGIP 的检测 采用文献[3]方法测定小麦 PGIP 生物学活性。在 30 ℃,用 endo-PG 降解 0.5%果胶,在等量 PGIP 存在和不存在时,测定 15 min 后果胶降解百分比,然后计算出 PGIP 对 endo-PG 的抑制百分比。同时可用我们实验室的 PGIP 抗体^[4],经 Western 印迹法检测 PGIP,具体方法参照文献[5]。

1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按照 Laemmli^[6]的方法,进行 SDS-PAGE。

1.2.4 蛋白电泳的凝胶染色 参照郭尧君^[7]的方法,用银染法将凝胶染色。

1.2.5 小麦 PGIP N 端结构的测定 测序前参照文献^[5]进行蛋白的电印迹:将 PVDF 膜在甲醇中均匀润湿后,在超纯水中漂洗 2~3 min,再在转移缓冲

液 (10 mmol/L CAPS, 10%甲醇, pH 11.0) 中平衡 15 min 以上。将经过 SDS-PAGE 的凝胶在转移缓冲液中平衡 5 min,置于浸过转移缓冲液的滤纸上,再依次覆上处理好的 PVDF 膜、浸过转移缓冲液的滤纸,注意排除滤纸、凝胶、PVDF 膜间的气泡。恒流 200 mA, 3 h 转移完毕后,取出 PVDF 膜,蛋白面向上,在超纯水中漂洗 3 次,每次 5 min。然后用染色液 (0.2%丽春红 + 1%冰乙酸) 染色,再在超纯水中脱色。最后将 PVDF 膜晾干,切下目标带,放入微量离心管中。用 Edman 降解法测定 N 端结构。

1.2.6 CD 谱的测定 使用 J-500C 型自动记录分光偏振仪测定远紫外 CD 谱。蛋白质浓度以分光光度法测定。测定不同温度对小麦 PGIP 的 CD 谱的影响时,系在样品经不同温度处理后,缓慢平衡至 25 ℃再行测定。实验待测样品,均在配制后于 25 ℃放置 2 h 或过夜后测定。平均残基分子量由小麦 PGIP 的氨基酸组成^[8]计算得到,为 129,用 0.05 cm 石英样品池,圆二色性用平均残基椭圆值 [θ] 表示,单位为 deg·cm²·dmol⁻¹,并按 Chen 和 Yang 的方法^[9]计算小麦 PGIP 的二级结构的构象单元含量。

1.2.7 NR/R 双向对角线 SDS-PAGE 参照文献^[10]的方法进行:第一向为 10%SDS-PAGE (8.5 cm × 8.5 cm × 0.75 mm 板胶),样品处理液为 62.5 mmol/l Tris-HCl, 2%SDS, 10%甘油, 0.002%溴酚蓝, pH 6.8。第二向为 10%SDS-PAGE (8.5 cm × 8.5 cm × 1 mm 板胶),样品处理液为第一向处理液中加入 5%巯基乙醇。样品经第一向样品处理液室温处理 1 h 后电泳。第一向结束后,按加样孔切下胶条,置于第二向样品处理液中室温浸泡 90 min,然后将胶条置于第二向胶上进行第二向电泳。

1.2.8 小麦 PGIP 的化学法去糖基化 参照 Karp 的方法^[11],用 TFMS 将纯化的小麦 PGIP 去糖基化:10 μg 冻干的小麦 PGIP 在干燥器中用 P₂O₅ 充分脱水后,重悬于 45 μl TFMS 和 5 μl 苯甲醚中,然后充以氮气,并盖紧盖子,冰浴 2 h。在这个过程中,TFMS 可以同时去除糖蛋白上的 N-糖链和 O-糖链^[12]。接着将反应混合物加到在干冰-丙酮浴中预冷的 1 ml 吡啶/乙醚 (1:9) 中,蛋白和 TFMS 的吡啶盐产生的共沉淀通过 10 000 g 离心 10 min 收集。沉淀用 0.1 mol/L NH₄HCO₃ 溶解,然后对 0.1 mol/L NH₄HCO₃ 充分透析。将透析液冻干即得到去糖基化的蛋白。

2 结果与讨论

2.1 小麦 PGIP 的 N 端序列测定及分析

从小麦黄化苗中纯化的 PGIP 经 SDS-PAGE 后,使用电印迹法直接将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上.将 PGIP 蛋白带切下后,测得小麦 PGIP 的 N 端 14 个氨基酸序列,为 Lys-Pro-Leu-Leu-Thr-Lys-Ile-Thr-Lys-Gly-Ala-Ala-Ser-Thr.其它文献和 GenBank 中报道的 PGIP 都存在于双子叶植物中^[12-16],它们的 N 端一级结构见 Fig. 1.

bean	E L C;N P;Q;D K;Q A	L L	Q I;K;K D L G N;P T
soybean	E L C;N P;Q;D K;Q T	L L	Q I;K;K E L G N;P T
pear	D L C;N P;D;D K;K V L L	Q I;K;K A F G D;P Y	
orange	D L C;N P;N;D K;K V L L	K F;K;K S L N N;P Y	
kiwifruit	D R C;N P;N;D K;K V L L	R I;K;Q A L N N;P Y	
tomato	V R C;N P;K;D K;K V L L	Q I;K;K D L G N;P Y	
trifoliata	D L C;N P;N;D K;R V L L	N F;K;K A L N N;P Y	
fortunella	D L C;N P;N;D K;K V L L	K F;K;K A L N N;P Y	
cherry	E L C;N P;E;D K;K V L L	Q I;K;K A F N D;P Y	
eucalyptus	E F;N;P;D;D K;K V L L	Q I;K;K A F G D;P Y	
wheat		K P L L	T K I T K G A A S T

Fig. 1 Homology analysis of the N-terminal amino acid sequences of PGIPs from wheat and dicotyledonous plants

Within the N-terminal amino acid sequences of PGIPs from bean^[14], soybean^[15], pear^[12], orange (GenBank accession number AB016204), kiwifruit^[16], tomato^[13], trifoliata (GenBank accession number AB020528), fortunella (GenBank accession number AB020529), cherry (GenBank accession number AF263465), eucalyptus (GenBank accession number AF159171) and wheat, the identical amino acids in all sequences are boxed by continual line, while the identical amino acids in PGIPs from dicotyledonous plants are boxed by dashed line

同源性分析表明,已知双子叶植物 PGIP N 端氨基酸序列同源性较高,N 端 22 个(桉树属植物为 21 个)氨基酸残基中有 8 个是保守的(-NP、-DK、-LL、K、P),同源性为 36%。小麦 PGIP 的 N 端氨基酸序列与它们相比差异较大.单、双子叶植物 PGIP N 端序列同源性降低到 9%,只有 2 个氨基酸残基(-LL)仍是保守的.这可能反映了单、双子叶植物 PGIP 在一级结构上有差异.

Mattei 研究发现^[17],在双子叶植物 PGIP 有三个保守的结构域:LRR 区、N 端区、C 端区.LRR 即富含 Leu 的重复子 (Leucine-rich repeat),是一段富含 Leu 的序列.LRR 区是决定 PGIP 对 PG 的特异性和亲和性的结构单元.N 端区一级结构的保守性并不存在于单子叶植物中,而小麦 PGIP 仍然具有对 PG 的抑制作用,可能改变的一级结构并未影响该结构域应形成的高级结构^[17].也可能决定高级结构和功能保守一级结构存在于 LRR 区,但这个假设尚有待小麦 PGIP 氨基酸全序列的获得后证实.

2.2 小麦 PGIP 的二级结构及与生物活性关系

2.2.1 pH 对小麦 PGIP 的生物活性和 CD 谱的影响

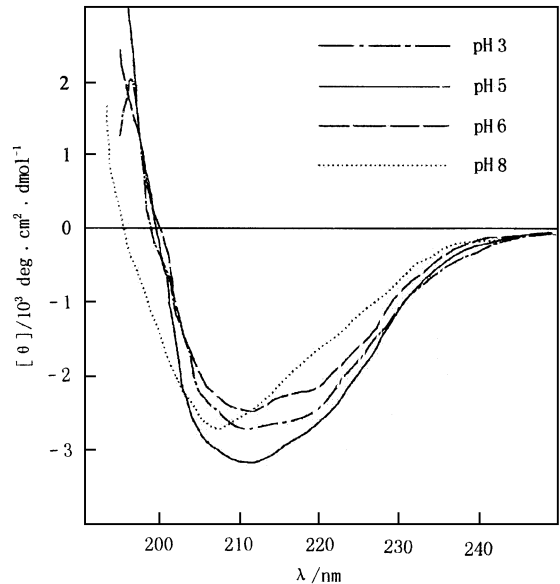


Fig. 2 The far UV-CD spectra of wheat PGIP at various pH values

实验所用的缓冲液为:0.025 mol/L Gly-HCl (pH 3), 0.025 mol/L NaAc-HAc (pH 5), 0.025 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 6), 0.025 mol/L Gly-NaOH (pH 8).不同 pH 时小麦 PGIP 的 CD 谱见 Fig. 2.由 Fig. 2 得出的在不同 pH 时小麦 PGIP 二级结构各构象单元含量和小麦 PGIP 生物学活性的变化如 Table 1 所示.

Table 1 The effect of pH on secondary structure and activity of wheat PGIP

pH	3	5	6	8
-Helix (%)	14.5	13.1	15.2	7.9
-Sheet (%)	39.9	43.7	43.6	38.3
Relative activity (%)	50	100	70	0

pH 5 时,小麦 PGIP 具有最大的活性,二级结构计算结果是:螺旋为 13.1%,折叠为 43.7%,说明小麦 PGIP 是一种以折叠构象为主的蛋白,这点和菜豆 PGIP 相同^[17].从 pH 5 时的生物学活性来看,此高折叠构象是小麦 PGIP 的天然态结构.

pH 5-6 时,对二级结构基本无影响,活性却由 100%变为 70%.此时蛋白活性的丧失可能只是由于分子局部结构的较小变化造成的.pH 继续向酸或碱的方向变化,引起了二级结构的改变.活性降低到 50%时,螺旋无明显变化,折叠遭到破坏.到活性完全丧失时,折叠变化很小,螺旋含量明显减少.

2.2.2 温度对小麦 PGIP 的生物活性和 CD 谱的影响

响 小麦 PGIP 经不同温度处理后,测定其活性,发现在 20 和 40 处理后活性基本不变,60 处理后活性全部丧失. CD 谱变化见 Fig. 3. 不同温度时小麦 PGIP 主链构象变化的结果见 Table 2.

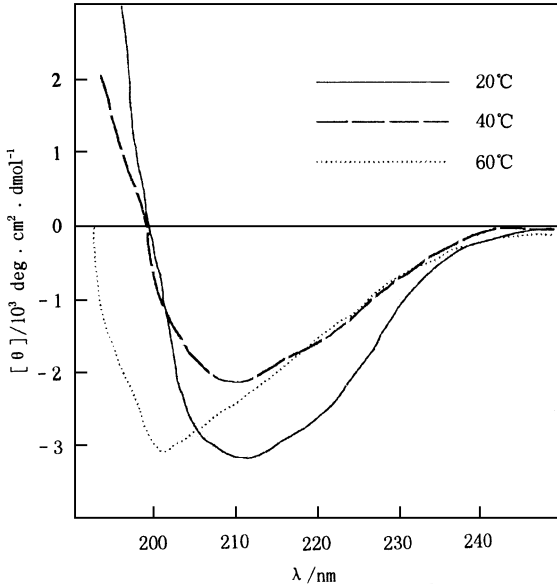


Fig. 3 The far VU-CD spectra of wheat PGIP at various temperature

Table 2 The effect of temperature on secondary structure and activity of wheat PGIP

Temperature (°)	20	40	60
- Helix (%)	13.1	10.3	4.6
- Sheet (%)	43.7	39.1	37.3
Relative activity (%)	100	90	0

温度对二级结构的影响近似于 pH 的影响. 不完全变性阶段, 螺旋无明显变化, 折叠遭到破坏. 活性完全丧失阶段, 折叠变化很小, 螺旋含量明显减少.

2.3 小麦 PGIP 的二硫键分析

二硫键是双子叶植物 PGIP 结构中重要且保守的元素,形成的链内二硫键对维系蛋白结构十分重要^[17]. 小麦 PGIP 中含有 Cys^[8],但有无二硫键? 二硫键是否也存在于肽链内? NR/R 双向对角线 SDS-PAGE 可以直观地对这些问题进行分析.

小麦 PGIP 的 NR/R 双向对角线 SDS-PAGE 结果见 Fig. 4.

既无链内又无链间二硫键的分子位于对角线上(双向电泳中分子迁移率相等),存在链内二硫键的分子位于对角线的上方(第一向泳动快,第二向泳动慢),而存在链间二硫键的分子由于第二向电泳时被

还原,分子变成小的肽链位于对角线下方. 低分子量标准蛋白中牛血清白蛋白因含有数对链内二硫键而出现在对角线的上方;胰蛋白酶抑制剂在同一水平线上有两个斑点,分别在对角线上、下方;其余蛋白质不含二硫键,均位于对角线上. 小麦 PGIP 出现在对角线上方,说明它是带有链内二硫键的蛋白. 这与菜豆 PGIP 中鉴定出有链内二硫键的结果^[17]相一致. 说明二硫键在双子叶植物 PGIP 和单子叶植物 PGIP 中保守.

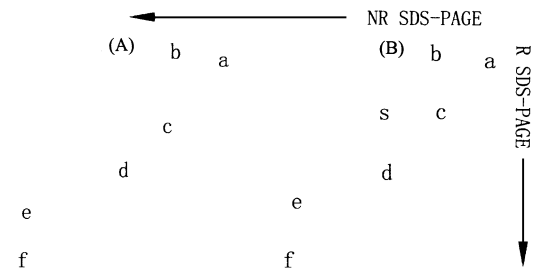


Fig. 4 Analysis of NR/R two-dimensional electrophoresis

(A) Protein marker (a: Rabbit phosphorylase b,97.4 kD;b:Bovine serum albumin,66.2 kD;c:Rabbit actin,43 kD;d:Bovine carbonic anhydrase,31 kD;e:Trypsin inhibitor,20.1 kD;f:Hen egg white lysozyme,14.4 kD). (B) Sample (s) and protein marker. Diagonal was indicated by dashed line

2.4 小麦 PGIP 的去糖基化分析

纯化的小麦 PGIP 经 SDS-PAGE 得到它的分子量为 41 kD,TFMS 处理使它的分子量降低到 32 kD (Fig. 5). 由此可见,小麦 PGIP 是糖蛋白,糖对成熟蛋白的总质量有 22 %的贡献.

1	2	3	kD
			94
			66.2
			43
			30
			17.5

Fig. 5 SDS-PAGE of purified wheat PGIP after deglycosylation

1. Purified wheat PGIP; 2. Protein marker; 3. Wheat PGIP after deglycosylation

以前采用酚-硫酸法^[8]测定得到的小麦 PGIP 含糖 6.89 %,TFMS 处理双子叶植物 PGIP 得到的含糖

量约为 20 %^[12,13,18]. 通过采用与双子叶植物 PGIIP 相同的方法处理小麦 PGIIP, 发现它也包含约 20 % 的糖, 从而消除方法不同造成差异. 说明小麦 PGIIP 与双子叶植物 PGIIP 在糖含量上有相似性.

结构的研究, 为进一步弄清小麦 PGIIP 的作用机理打下了基础. 其次, 上述结果在结构方面, 揭示了功能相似的小麦 PGIIP 与双子叶植物 PGIIP 的异同. 它们在一级结构上有差异, 但高级结构上却有一定程度的相似性, 在糖含量上也相似. 可能一级结构的差异反映了单、双子叶植物 PGIIP 的物种差异, 而高级结构和糖的相似性对应于二者功能的相似. 最后, 上述结构研究的结果是小麦 PGIIP 天然蛋白的重要参数, 对于植物抗赤霉病基因工程具有重要意义.

参考文献 (References)

- Cervone F, Hahn M G, De Lorenzo G, Pressey R, Darvill A G, Albersheim P. Host-pathogen interactions. XIII A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol.* 1989, **90**: 542 ~ 548
- 郑远旗, 杨宗剑, 李建吾, 周立, 吴文莲. 小麦内切多聚半乳糖醛酶抑制蛋白的分离纯化研究. *生物化学与生物物理学报* (Zheng Yuan-qi, Yang Zong-jian, Li Jiar-wu, Zhou Li, Wu Wen-lian. Purification of the polygalacturonase-inhibiting protein from *Triticum aestivum* L. *Acta Biochim Biophys Sin*), 1994, **26**(5): 555 ~ 558
- 周立, 刘勇, 李建吾, 杨雪海, 曹阳. 小麦多聚半乳糖醛酶抑制蛋白对几种病原真菌抑制作用的研究. *植物病理学报* (Zhou Li, Liu Yong, Li Jiar-wu, Yang Xue-hai, Cao Yang. Studies on the inhibition effect of PGIIP in wheat to some fungi. *Acta Phytopathol Sin*), 1998, **28**(2): 107 ~ 112
- 阮期平, 周立, 刘勇. 小麦在与水杨酸诱导的应答过程中 PGIIP 的积累. *应用与环境生物学报* (Ruan Qi-ping, Zhou Li, Liu Yong. PGIIP accumulation in wheat in response to induction with salicylic acid. *Chin J Appl Environ Biol*), 2000, **6**(4): 313 ~ 316
- 夏其昌主编. 蛋白质化学研究技术与进展. 北京: 科学出版社 (Xia Qi-chang ed. *Techniques and Progress in Protein Chemistry Research*. Beijing: Science Press), 1999: 108 ~ 110
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, **227**: 680 ~ 683
- 郭尧君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展. *生物化学与生物物理进展* (Guo Yao-jun. Consideration and progress of SDS electrophoresis. *Prog Biochem Biophys*), 1991, **18**(1): 32 ~ 37
- 周立, 郑远旗, 杨宗剑, 李建吾, 余露. 小麦内切多聚半乳糖醛酶抑制蛋白的部分性质研究. *应用与环境生物学报* (Zhou Li, Zheng Yuan-qi, Yang Zong-jian, Li Jiar-wu, Yu Lu. Study on characterization of PGIIP in wheat. *Chin J Appl Environ Biol*), 1995, **1**(4): 343 ~ 348
- Chen Y H, Yang J T, Chau K H. Determination of the helix and form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry*. 1974, **13**(6): 3350 ~ 3359
- Wang K, Richards F M. An Approach to Nearest Neighbor Analysis of Membrane Proteins. *J Biol Chem*. 1974, **249**: 8005 ~ 8018
- Karp D R, Atkinson J P, Shreffler D C. Genetic variation in glycosylation of the fourth component of murine complement. *J Biol Chem*. 1982, **257**(13): 7330 ~ 7335
- Stotz H U, Powell A L, Damon S E, Greve L C, Bennett A B, Labavitch J M. Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv Bartlett. *Plant Physiol*. 1993, **102**(1): 133 ~ 138
- Stotz H U, Contos J J, Powell A L, Bennett A B, Labavitch J M. Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from tomato. *Plant Mol Biol*. 1994, **25**(4): 607 ~ 617
- Toubart P, Desiderio A, Salvi G, Cervone F, Daroda L, De Lorenzo G, Bergmann C, Darvill A G, Albersheim P. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant J*. 1992, **2**(3): 367 ~ 373
- Favaron F, D'Ovidio R, Porceddu E, Alghisi P. Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. *Planta*. 1994, **195**(1): 80 ~ 87
- Simpson C G, MacRae E, Gardner R C. Cloning of a polygalacturonase inhibiting protein from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Plant Physiol*, 1995, **108**: 1748
- Mattei B, Bernalda M S, Federici L, Roepstorff P, Cervone F, Boffi A. Secondary structure and post-translational modifications of the leucine-rich repeat protein PGIIP (polygalacturonase-inhibiting protein) from *Phaseolus vulgaris*. *Biochemistry*. 2001, **40**(2): 569 ~ 576
- Yao C, Conway W S, Sams C E. Purification and Characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit. *Phytopathology*. 1995, **85**(11): 1373 ~ 1377