

银杏营养贮藏蛋白质的分离鉴定

彭方仁 郭红彦 吴青霞

(南京林业大学森林资源与环境学院 南京 210037)

摘要: 采用光学和电子显微镜技术、SDS-PAGE 技术、间接免疫酶标光镜定位和胶体金免疫电镜定位技术对银杏枝条中的营养贮藏蛋白质(VSPs)进行分离鉴定,并对其细胞学特性及动态变化规律进行初步研究。研究结果:运用制备型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并制备银杏 32 和 36 ku 2 种营养贮藏蛋白质抗原,通过免疫新西兰大白兔成功获得银杏 32 和 36 ku 2 种营养贮藏蛋白质的多克隆抗体。银杏 VSPs 主要分布于落叶期当年生枝条的次生韧皮部细胞中,呈现出团块状、颗粒状和均一状 3 种形态。在新梢生长期,积累在枝条中的 VSPs 逐渐降解消失,表现出明显的季节变化。

关键词: 银杏;营养贮藏蛋白质;分离鉴定;免疫标记分析

中图分类号:S718.43 文献标识码:A 文章编号:1001-7488(2010)03-0052-04

Isolation and Identification of Vegetative Storage Protein of *Ginkgo biloba*

Peng Fangren Guo Hongyan Wu Qingxia

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)

Abstract: The vegetative storage proteins(VSPs) in branches of *Ginkgo biloba* were isolated and identified by using light- and electron-microscope, SDS-PAGE, immunoenzyme optical-microscopy localization and immunogold electron-microscopy localization. The cytological characteristic and dynamic changes of VSPs were preliminarily studied. The results were as follows: The antigens of vegetative storage protein of 32 and 36 ku were separated and prepared by using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, antibodies of vegetative storage proteins of 32 and 36 ku were successfully achieved with immunizing New Zealand rabbits. VSPs were found mainly in the secondary phloem parenchyma cells of one-year-old twigs during deciduous stage and they were accumulated in vacuole in different forms such as nubbly, granular, and homogeneous under electron microscope. The protein inclusions of branches almost disappeared during new shoot development, with obviously seasonal change.

Key words: *Ginkgo biloba*; vegetative storage protein(VSPs); isolation and identification; immuno-labeling analyzing

营养贮藏蛋白质(vegetative storage proteins, VSPs)是许多落叶树种季节性氮素贮藏的主要形式。这种蛋白质通常在夏末秋初开始积累,越冬期间维持较高含量,春季随着新梢的萌发,降解成可利用的氨基酸,为新梢迅速生长提供充足的氮源(彭方仁等,2001;2006)。营养贮藏蛋白质的存在不仅能防止养分损失,而且能为树木在新生长季节的结构伸长和生殖生长提供必需的养分储备。

近年来,国内外学者对树木营养贮藏蛋白质进行了大量研究,肯定了它的氮素贮藏作用(Clausen et al.,1991;Wetzel et al.,1991;Coleman et al.,1993;1994;郭红彦等,2009;田维敏等,2001;2002;Peng et al.,2004),揭示了其细胞学和生物化学性质的多样性和统一性(田维敏等,2000;2001;Tian et al.,

2002;2007),并已从多种木本植物中分离鉴定出营养贮藏蛋白质(van Cleve et al.,1988;Wetzel et al.,1991;Harms et al.,1992;Tian et al.,2002;2007;王旭初等,2004;潘瑞英,2004)。但有关银杏(*Ginkgo biloba*)营养贮藏蛋白质的生物化学性质及分离鉴定等方面的研究还未见系统报道。本文在免疫新西兰白兔后采集血样提取抗血清,制备银杏营养贮藏蛋白质的抗体,应用 Western blot 方法鉴定其营养贮藏蛋白质特性,结合胶体金免疫电镜细胞化学定位和间接酶标免疫光镜细胞化学定位对 2 种营养贮藏蛋白质进行定位研究并对其细胞学特性及动态变化规律进行初步研究,旨在从银杏中分离鉴定出主要的营养贮藏蛋白质,为研究营养贮藏蛋白质的积累和降解机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以南京林业大学树木园成年健康的银杏雄株为材料,采集树冠外围受光良好的当年生枝条进行研究。采样时间为2006年1月—2007年1月,在春季萌芽阶段(3月和4月初)和接近落叶期(10月)每隔7天采样1次,其他月份每月各采样1次。全年中所有样品均采于同一雄株。

1.2 光学显微技术和电子显微技术

光镜及电镜样品制作参照郭红彦等(2009)。

1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用BIO-RAD mini垂直板电泳槽进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。上样量20 μg 。分离胶浓度15%,浓缩胶浓度4.4%。样品提取液含2% SDS、5% 巯基乙醇、10% 甘油、0.02% 溴酚蓝的0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH8.0。用0.25%的考马斯亮蓝染色液染色2.5 h,脱色,直到背景脱干净为止。脱色后的凝胶经清水冲洗后,用凝胶成像系统拍照记录。试验在相同条件下重复3次。

1.4 银杏32, 36 ku蛋白质的抗血清制备

免疫动物选择健康纯种新西兰白色雄兔,购于江苏农业科学研究院种兔中心。1只作为对照,2只免疫32 ku蛋白质,另2只免疫36 ku蛋白质。抗血清制备按田维敏等(1998)的方法。抗血清效价用琼脂免疫扩散法测定(王旭初等,2004)。本试验的36, 32 ku蛋白质的抗血清效价为128。

1.5 免疫印迹(Western-blotting)

使用BIO-RAD半干式转印仪进行电印迹,将凝胶上的蛋白质转印到PVDF膜上。免疫反应中使用的一抗为制备的32或36 ku蛋白质的抗血清(稀释体积比1:100),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(稀释体积比1:4000,购自博士德生物工程有限公司),DAB显色后拍照。

1.6 间接免疫酶标定位

间接免疫酶标光镜定位参考Mishkind等(1987)的方法,略有改动。样品用含0.5%戊二醛和4%多聚甲醛的0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH7.2)4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定24 h,乙醇系列脱水,二甲苯透明后包埋于石蜡中,AO旋转切片机切片,切片厚度4 μm 。切片经常规脱蜡、复水后用3% H_2O_2 蚀刻处理8~10 min,蒸馏水洗3次,每次2 min,再入0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0, 1000 mL)中进行微波抗原修复,蒸馏水冲洗2次,再用pH7.5的Tris-HCl缓冲盐溶液(简称TBS)冲洗3次,每次

5 min,之后进行免疫反应。对照为用正常血清代替一抗处理的切片,其余步骤同上。

1.7 胶体金免疫电镜定位

参考Moore等(1988)的方法,略有改动。样品在含0.5%戊二醛和4%多聚甲醛的0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.2)中4 $^{\circ}\text{C}$ 固定24 h(不经酸后固定),乙醇系列脱水,环氧丙烷过渡,60 $^{\circ}\text{C}$ 聚合后包埋于Epon812树脂,室温干燥保存。LKB-V超薄切片机切片,厚度50 nm,切片捞于有Formvar支持膜的100目铜网上。之后进行如下步骤:1)载网先用双蒸水浸润10 min,然后经10% H_2O_2 处理10 min, TBST(含0.02% Tween20的TBS)洗5次,每次5 min;2)0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl处理10 min, TBST洗5次,每次5 min;3)在含0.02% Tween20、5%脱脂奶粉的TBS缓冲液中封闭1 h;4)与一抗(1:10体积稀释)在室温下作用1 h;5)TBST冲洗,然后浸洗5次,每次5 min;6)与二抗(胶体金标记的羊抗兔IgG,胶体金直径10 nm,购自北京博奥森生物技术有限公司)(1:4稀释)在室温下作用1 h;7)TBST洗5次,每次5 min;蒸馏水洗3次,每次5 min;8)醋酸铀染色15 min,柠檬酸铅染色6 min;9)H-600型透射电镜观察拍照。对照为用正常血清代替一抗处理的切片,其余步骤同上。

2 结果与分析

2.1 银杏贮藏蛋白质细胞学特点

汞-溴酚蓝染色后,光镜下观察处于落叶期的银杏当年生枝条次生韧皮部、皮层和木质部,这些部位的许多细胞中含有被染成鲜蓝色的蛋白质内含物,以次生韧皮部细胞中居多,且这些鲜蓝色的蛋白质内含物主要存在于近形成层的韧皮薄壁细胞和韧皮射线细胞中,呈颗粒状(图版I-1)。随着芽的萌发和新梢的生长,枝条中的蛋白质内含物纷纷降解消失(图版I-2),具明显的季节变化。

电镜下观察发现,贮藏蛋白质细胞的液泡中含有大量电子致密物,形态各异,呈现出颗粒状、团块状和均一状(图版I-3,4)。这些不同形态的电子致密物就是光镜下看到的液泡蛋白质内含物。

2.2 36, 32 ku蛋白质的分离纯化及抗体制备

SDS-PAGE分析表明,在落叶期的当年生枝条树皮组织中有2种高含量的蛋白质,分子质量为36, 32 ku。在SDS-PAGE图谱上(图1),它们呈显著的蛋白质谱带。芽萌发和新梢生长期间,36, 32 ku蛋白质逐渐降解并消失。

以12月份的当年生枝条树皮为材料,采用制备

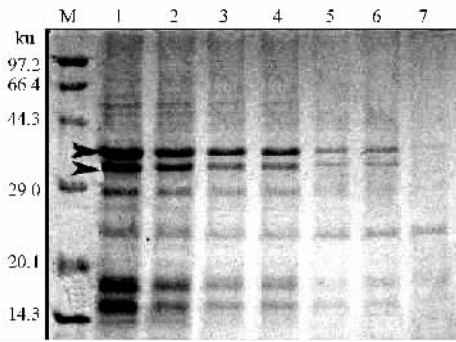


图 1 当年生枝条树皮可溶性蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE polypeptide profiles of soluble protein in bark of annual branchlet

1-7 对应的日期分别为 2006-01-09, 2006-02-20, 2006-03-11, 2006-03-18, 2006-03-26, 2006-03-31, 2006-04-14。箭头示 36, 32 ku 蛋白质。每槽蛋白上样体积 20 μL 。M 标准蛋白质。

1-7 mean the sample in Jan. 9th, Feb. 20th, Mar. 11th, Mar. 18th, Mar. 26th, Mar. 31th, Apr. 14th of 2006. Arrows indicate proteins of 32 and 36 ku. Totally 20 μL protein sample was loaded per lane. M. Standard proteins.

性 SDS-PAGE 技术分离并纯化出银杏 32, 36 ku 2 种蛋白质用作抗原, 分别免疫新西兰白兔后, 获得了 36, 32 ku 蛋白质的多克隆抗体。采用 Western-blotting 技术, 用 36, 32 ku 蛋白质的抗血清分别检测落叶期当年生枝条树皮中的可溶性蛋白质(图 2), 结果表明: 36 ku 蛋白质的抗血清能够与 36 ku 蛋白质发生强的免疫反应, 同时与 32 ku 蛋白质有较强的免疫交叉反应, 类似地, 32 ku 蛋白质的抗血清能够很好地识别 32 ku 蛋白质并与 36 ku 蛋白质有较强的免疫交叉反应, 说明 36 与 32 ku 蛋白质具有相同的抗原决定簇。

2.3 营养蛋白质的免疫细胞化学定位

间接免疫酶标定位结果表明, 在分别用 36, 32 ku 蛋白质的抗血清处理的组织切片中, 具有被染成棕黄色的物质, 呈颗粒状(图版 I-5, 6)。汞-溴酚蓝染色表明, 这些颗粒状物质是贮藏蛋白质细胞中的蛋白质内含物。用正常血清代替一抗处理的对照切片中, 除了一些单宁细胞自身呈现的棕黄色外, 没有观察到任何棕黄色颗粒存在(图版 I-7)。

采用胶体金免疫细胞化学定位技术, 进一步在电镜水平对 36 ku 蛋白质进行亚细胞定位。结果表明, 液泡中的电子致密物特异性被胶体金颗粒标记(图版 I-8, 9), 用正常血清代替一抗处理的对照切片中, 没有任何胶体金颗粒分布(图版 I-10)。

3 结论与讨论

依据 Clausen 等(1991)为树木营养贮藏蛋白质

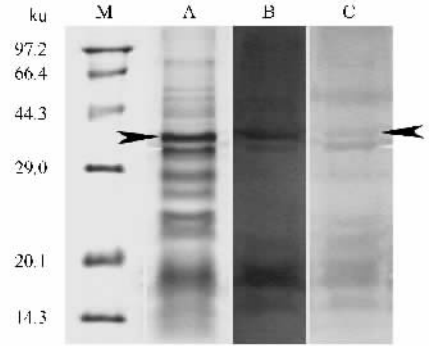


图 2 树皮可溶性蛋白 SDS-PAGE 及免疫印迹图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of soluble protein from bark and western immunoblot of its duplication

A. 落叶期树皮可溶性蛋白 SDS-PAGE 图谱; B, C. 分别示 36, 32 ku 蛋白质抗血清的免疫印迹图谱。蛋白上样体积为 20 μL 。M 标准蛋白质。

A. SDS-PAGE polypeptide profiles of soluble protein in bark during leafless stage. B, C. Duplication of A by using two antiserum against proteins of 36 and 32 ku. Totally 20 μL protein sample was loaded per lane. M. Standard proteins.

制订的 3 条标准, 采用光学和电子显微镜技术、SDS-PAGE 技术、Western-blotting 以及间接免疫酶标定位和胶体金免疫定位技术对银杏营养贮藏蛋白质进行了分离鉴定, 结果证明, 36 和 32 ku 2 种蛋白质完全符合上述标准:

1) 用蛋白质专一性的染料汞-溴酚蓝染色的光镜石蜡切片中, 枝条次生韧皮部薄壁细胞中有许多被染成鲜蓝色的颗粒状蛋白质内含物, 说明这些物质是蛋白质性质的。在电子显微镜下, 这些细胞中分布着很多大小不等的小液泡, 小液泡里有大量形态各异的电子致密物, 其超微结构主要有 3 种形状, 呈颗粒状、团块状和均一状。不同形状的蛋白质内含物分别存在于不同的贮藏蛋白质细胞中, 它们应当是光镜下的蛋白质内含物。

银杏营养贮藏蛋白质超微结构的差异与营养贮藏蛋白质 VSPs 的种类不同有关。例如大叶桃花心木 (*Swietenia macrophylla*) 与麻楝 (*Melia azedarach*) 的 VSPs 的超微结构存在明显差异, 两者的主要 VSPs 无免疫相关性(田维敏等 2002)。杨树 (*Populus*) 32 ku 蛋白质的抗体不能识别杨柳科 (*Salicaceae*) 以外的其他科树木的 VSPs; 不同科树木的 VSPs 缺乏免疫相关性 (Wetzel *et al.*, 1991)。大叶桃花心木和非洲楝 (*Melia toosendan*) 的 VSPs 超微结构非常相似, 两者的主要 VSPs 的分子质量相近且高度同源; 麻楝和毛麻楝 (*Aglaiia odorata*) 的超微结构相同, 它们的主要 VSPs 相同 (Tian *et al.*, 2002)。这些现象表明: VSPs 生化性质的不同很可能是造成其形态多样性的主要

原因(田维敏等, 2001)。

2) SDS-PAGE 分析显示, 落叶期的当年生枝条树皮组织中, 有 2 种含量相对较高的蛋白质, 在图谱上, 这 2 种蛋白质的分子质量分别为 36 和 32 ku。在银杏萌芽和抽梢的过程中, 枝条树皮组织中的 36 和 32 ku 蛋白质逐渐减少, 具明显季节变化。

木本植物的 VSPs 通常被认为是一类为春季生长提供氮素的贮藏物质(Sauter *et al.*, 1990; 1992)。VSPs 贮藏功能的确定主要是根据这些蛋白质的含量具有明显的季节性变化。Wu 等(1991) 对几种楝科(*Meliaceae*) 树种末端小枝的显微观察发现, 落叶期间整个次生韧皮部的薄壁组织细胞中都充满了蛋白质颗粒, 而当抽新梢时这些蛋白质在次生韧皮部的里层消失。Rossato 等(2002) 在芸苔(*Brassica*) 包围组织的外层薄壁细胞中也发现了 1 种 23 ku 的 VSP。杨树射线细胞中蛋白质体的代谢与大量氨基酸进入导管是同时进行的, 这充分表明 VSPs 具有季节性氮贮藏功能, 用于树木生长发育(Coleman *et al.*, 1993)。

3) 间接免疫酶标定位表明, 用 36 和 32 ku 蛋白质的抗血清处理组织切片中, 只有贮藏蛋白质细胞的液泡蛋白质被染成棕黄色, 光镜下, 这些被染色的棕黄色蛋白质呈颗粒状, 它们和经汞-溴酚蓝染色的深蓝色颗粒状液泡蛋白质完全一致。胶体金免疫定位分析表明, 在用 36 ku 蛋白质的抗血清处理的切片中, 只有贮藏蛋白质细胞的液泡蛋白质被胶体金颗粒标记。说明液泡蛋白质的主要成分是 36 ku 蛋白质。同时, 因 36 ku 蛋白质与 32 ku 蛋白质具有强的免疫相关性, 间接表明 32 ku 蛋白质也是液泡蛋白质的一种主要成分。表明 36 和 32 ku 2 种蛋白质都是贮藏蛋白质细胞的液泡蛋白质内含物的主要成分。上述结果充分表明 36 和 32 ku 蛋白质是银杏的 2 种主要营养贮藏蛋白质。

参 考 文 献

郭红彦, 吴青霞, 彭方仁. 2009. 银杏枝条营养贮藏蛋白质的组分及动态变化. 林业科学, 45(3): 25-28.

潘瑞英. 2004. 荔枝营养贮藏蛋白质的分离鉴定及其与开花结实的关系. 华南热带农业大学硕士学位论文.

彭方仁, 郭娟, 徐柏森. 2001. 木本植物营养贮藏蛋白质研究进展. 植物学通报, 18(4): 445-450.

彭方仁, 王改萍, 郭娟. 2006. 银杏营养贮藏蛋白质的细胞学及生物化学分析. 南京林业大学学报: 自然科学版, 30(4): 109-113.

田维敏, 邱德勃, 韩亚琴, 等. 1998. 热带树木免疫组织细胞化学研究的抗血清制备. 热带农业科学, (6): 52-55.

田维敏, 吴继林, 郝秉中, 等. 2000. 15 科温带树木营养贮藏蛋白质的细胞学研究. 西北植物学报, 20(5): 835-841.

田维敏, 高政权, 孟春晓, 等. 2001. VSPs 在热带树木中分布的细胞学研究. 热带作物学报, 22(4): 1-8.

田维敏, 吴继林. 2002. 楝科树木营养贮藏蛋白质的研究. 植物学报, 44(2): 242-245.

王旭初, 史敏晶, 陈月异, 等. 2004. 无患子科树木细子龙营养贮藏蛋白质的分离鉴定. 热带作物学报, 25(4): 78-83.

Clausen S, Apel K. 1991. Seasonal changes in the concentration of the major storage protein and its mRNA in xylem ray cells of poplar trees. *Plant Mol Biol*, 17: 669-678.

Coleman G D, Englert J M, Chen T H H, *et al.* 1993. Physiological and environmental requirements for poplar(*Populus deltoides*) bark storage protein degradation. *Plant Physiol*, 102: 53-59.

Coleman G D, Banados M P, Chen T H H. 1994. Poplar bark storage protein and a related wound-induced gene are differentially induced by nitrogen. *Plant Physiol*, 106: 211-215.

Harms U, Sauter J J. 1992. Storage proteins in the wood of Taxodiaceae and of *Taxus*. *Plant Physiol*, 138: 497-499.

Mishkind M L, Plumley F G, Raikhel N V. 1987. Immunochemical analysis of plant tissue. *Handbook of Plant Cytochemistry*, 2: 65-119.

Moore P J, Staehelin L A. 1988. Immunogold localization of the cell-wall-matrix polysaccharides rhamnolacturonan I and xyloglucan during cell expansion and cytodinesis in *Trifolium pratense* L., implication for secretory pathways. *Planta*, 174: 433-445.

Peng Fangren, Guo Juan. 2004. Subcellular localization of vegetative storage protein of *Ginkgo biloba* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, 46(1): 77-85.

Rossato L, Le Dantec C, Laine P, *et al.* 2002. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. *Journal of Experimental Botany*, 53(367): 265-275.

Sauter J J, van Cleve B. 1990. Biochemical, immunochemical and ultrastructural studies of protein storage in poplar(*Populus × canadensis* 'Robusta') wood. *Planta*, 183: 92-100.

Sauter J J, van Cleve B. 1992. Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of ' *Populus × canadensis* ' and its relation to protein body mobilization. *Trees*, 7: 26-32.

Tian Weimin, Wu Jilin, Hao Bingzhong, *et al.* 2002. Vegetative storage proteins in *Meliaceae*. *Acta Bot Sin*, 44(2): 242-245.

Tian Weimin, Peng Shiqing, Wang Xuchu, *et al.* 2007. Vegetative storage protein in *Litchi chinensis*, a subtropical evergreen fruit tree, possesses trypsin inhibitor activity. *Annals of Botany*, 100: 1199-1208.

van Cleve B, Just J, Sauter J J. 1988. Immunochemical localization of a storage protein in poplar wood. *Plant Physiol*, 133: 371-374.

Wetzel S, Greenwood J S. 1991. The 32 kD vegetative storage protein of *Salix microstachya* Turz characterization and immuno-localization. *Plant Physiol*, 97: 771-777.

Wu Jilin, Hao Bingzhong. 1991. Vacuoles proteins in secondary phloem parenchyma cells of the *Meliaceae* species. *Lawa Bull*, 12(1): 51-56.