

小麦叶片硝酸还原酶钝化蛋白的纯化与活力^{*}

何 平^{**} 文树基 汪沛洪

(西北农业大学植物生化研究室,陕西杨陵 712100)

摘 要 通过硫酸铵分级分离和 Sephadex G-100柱纯化得到的小麦叶片蛋白,可分为两个部分,其对硝酸还原酶(NR)都有明显的钝化活力;且钝化蛋白部分II的钝化活力明显高于同样蛋白含量的部分I。小麦叶片中硝酸还原酶钝化蛋白部分I和II同样对其根中的NR具有钝化活性。钝化蛋白部分I通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步纯化,达到电泳纯,测得分子量为47.5 kD。

关键词 硝酸还原酶,钝化蛋白,冬小麦

中图分类号 Q554.9

硝酸还原酶(Nitrate Reductase, NR)是植物利用 $-NO_3^-$ 途径中的第一个酶,植物体内NR活力的高低直接关系到土壤中无机氮的利用率,从而影响农作物特别是禾谷类作物的产量和品质^[1]。由于植物体内的NR活力经常在迅速地变化,可能在体内存在着有效的自动调节机制^[2]。关于NR活力的钝化作用已日益引起人们的注意,且已从水稻幼苗^[3]、大豆叶片^[4]等材料中初步分离出NR钝化蛋白,但关于钝化蛋白对NR活力的钝化作用方式却众说不一。本文在研究NR性质的基础上,从小麦叶片中分离纯化了NR钝化蛋白,测定了钝化活性和钝化蛋白I的分子量,为进一步研究NR的性质提供参考。

1 材料与方法

材料的培养 小麦种子(郑引一号)经0.1% HgCl₂消毒,催芽后,播于尼龙网上,培养至三叶一心期(温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照10 h/d,光强8000~10000 lx,营养液为Hoagland溶液)。

NR粗提液的制备 取小麦倒数第三片完全展开叶(或根),用粗滤纸吸干营养液,剪成小块,加入pH8.5的25 mmol L⁻¹磷酸盐缓冲液(含5 mmol L⁻¹ EDTA和5 mmol L⁻¹半胱氨酸),匀浆后置于4层纱布过滤,滤液在4000 r min⁻¹离心15 min后立即使用。

NR钝化蛋白的分离和初步钝化 取小麦叶片30 g,放入300 mL pH7.5, 25 mmol L⁻¹磷酸缓冲液(内含5 mmol L⁻¹ EDTA, 5 mmol L⁻¹半胱氨酸)中以组织捣碎机捣碎,经4000 r min⁻¹离心后吸取上清液,再经30%~45%饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级分离。沉淀溶于30 mL上面的提取磷酸缓冲液中。通过已用pH7.5, 25 mmol L⁻¹磷酸缓冲液(内含5 mmol L⁻¹ EDTA)平衡的Sephadex G-100柱(2 $\times$ 95 cm),并以平衡液洗脱,流速90 mL h⁻¹,5 mL为一管,分管收集得到钝化蛋白部分I和部分II,冷藏

收稿日期:1995-11-14

^{*} 国家自然科学基金资助课题;^{**} 现在华南农业大学生物技术学院

待用^[5]。

NR钝化蛋白的钝化活力测定 取NR粗提液0.7 mL加上述钝化蛋白1 mL(对照为提取钝化蛋白的磷酸缓冲液1 mL),在10℃下(在此温度下NR自然失活较小,而钝化蛋白对NR的钝化作用又较易发挥)放置1 h,然后分别加入0.1 mL NADH溶液($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和1.2 mL浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸钾缓冲液(pH7.5),置于25℃下保温30 min,保温结束后立即加入1 mL 1%的对-氨基苯磺酸和1 mL 0.1% α-萘胺,放置1 h,离心,在540 nm下测吸光度(A_{540}),以NR和钝化蛋白在10℃下预保温60 min后,NR活力丧失1%为一个钝化活力单位。

SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳 电泳在Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.3,含0.1% SDS)系统中进行,分离胶浓度1%,浓缩胶浓度3%,钝化蛋白溶液放入蔗糖溶液缩至蛋白 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,每个样品取 $10 \mu\text{L}$,稳流,每板电流为24 mA。

聚丙烯酰胺凝胶制备电泳 电泳在Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.3)非变性系统中进行,分离胶浓度5%,浓缩胶浓度3%,稳流,电流为24 mA,4℃下电泳10 h,电泳结束后在其两边切下2 cm窄条进行染色,脱色。

可溶性蛋白质测定 采用Folin-酚法^[6]。

2 结果与分析

2.1 NR钝化蛋白的分离与初步纯化

叶片NR钝化蛋白经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级分离和Sephadex G-100柱层进行初步纯化后,主要出现两个峰,为钝化蛋白部分I 和部分II,结果如图1。

2.2 NR钝化蛋白对NR的钝化活力

从表1可看出,钝化蛋白部分II的钝化活力明显高于部分I;而且从叶片中提取的NR钝化蛋白对根的NR同样具有钝化作用,但从钝化蛋白总的钝化活力来看,对叶片NR的钝化作用大于根(约高11%)。

2.3 NR钝化蛋白部分I 的进一步钝化

将上述得到的小麦叶片NR钝化蛋白部分I,装入透析袋中,放入60%蔗糖溶液中,在4℃低温下浓缩,进行制备电泳。从图2可看出有3条带,为确定真正的钝化蛋白,再次进行制备电泳,剥胶后,切下胶的左右两边各宽2 cm的窄条进行染色,得3条清晰条带,将已显色的两个窄条再与4℃冰箱中保存的中间部分胶相重合,切下相对应的凝胶的3个条带部分,分别加入20 mL $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.5,内含 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA),研磨后于4000 g离心10 min,得到的上清液装入透析袋,在40%蔗糖溶液中浓缩后,测其钝化活性,结果如表2。从表2中可看出,第1、2条带中蛋白质预处理后测 A_{540} 与CK差异不显著,故无钝化能力;第3条带中蛋白质具有钝化活力,从而达到进一步纯化的目的。

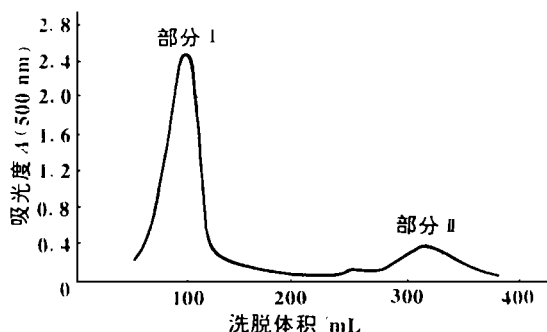


图1 小麦叶片中分离纯化的NR钝化蛋白

表 1 NR钝化蛋白对 NR的钝化作用

NR	预 处 理	预处理后 NR活力 (A_{540})	钝化活力 (活力单位 /mg 蛋白)
叶片	NR+ 磷酸缓冲液	0. 618	—
	NR+ 钝化蛋白部分I	0. 384	167. 1
	NR+ 钝化蛋白部分II	0. 291	272. 5
根	NR+ 磷酸缓冲液	0. 413	—
	NR+ 钝化蛋白部分I	0. 292	86. 4
	NR+ 钝化蛋白部分II	0. 204	174. 1

表 2 制备电泳中 3条带蛋白质对 NR的钝化作用

预处理	预处理后 NR活力 (A_{540})	NR活力丧失 (%)	钝化活力 (活力单位 /mg 蛋白)
NR+ 磷酸缓冲液 (CK)	0. 559	—	—
NR+ 第 1条带中的蛋白质	0. 547	不显著	—
NR+ 第 2条带中的蛋白质	0. 564	不显著	—
NR+ 第 3条带中的蛋白质	0. 196	64. 9	187. 6

2. 4 NR钝化蛋白部分I 分子量测定

将上述第 3条带的蛋白质即纯化的 NR钝化蛋白部分I 溶液加入 SDS和巯基乙醇 ,水浴加热 3 min,进行 SDS-PAGE分析,结果如图 3,测得小麦叶片 NR钝化蛋白部分I 的分子量为 47. 5 kD.

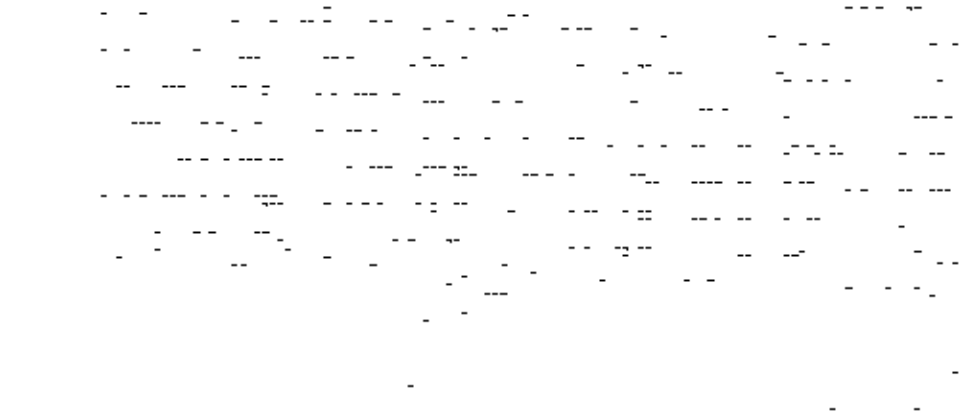


图 2 纯化的 NR钝化蛋白部分I

图 3 NR钝化蛋白的分子量

3 讨 论

目前从各种不同植物材料获得的 NR钝化蛋白有不同的特性 首先是分子量不同 ,如玉米根、水稻幼苗和大豆叶子中提取的 NR钝化蛋白分子量分别为 44 kD, 200 kD, 31 kD;本研究测得小麦叶片 NR钝化蛋白部分I 的分子量为 47. 5 kD.其次是对 NR的作用方式不同,如 Wallace(1978)用玉米根部作材料,认为对 NR的钝化作用是水解酶使蛋白

水解^[7],而 Yamaya 则认为钝化蛋白是可逆地或不可逆地与 NR 结合而使之失活的,它是一种特异的结合蛋白^[8]。

植物除通过 NR 钝化蛋白调节 NR 活性外,调节或影响 NR 活性的因素还很多,某些小分子物质如 NADH EDTA FAD 多肽等对提高 NR 活性有一定作用,但没有专一性^[9];NR 钝化蛋白是 NR 的稳定因子^[10],对 NR 有专一作用,是植物体内 NR 活性调节系统的主要因素。这也显示了植物体内 NR 的活化和钝化过程的复杂性。

参 考 文 献

- 1 陈 薇,张德颐.植物组织中硝酸还原酶的提取、测定和钝化.植物生理学通讯,1980(4): 45~ 49
- 2 Aslam M, Oaks A. Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reduces in corn roots and leaves. Plant Physiol, 1976, 57: 572~ 576
- 3 Yamaya T, Ohire K. Nitrate reductase inactivating factor from rice seedlings. Plant Cell Physiol, 1978, 19: 211~ 220
- 4 Jolly S O, Tolbert N E. NADH-nitrate reductase inhibitor from soybean leaves. Plant Physiol, 1978, 62: 197~ 203
- 5 何文竹,赵文恩,汤玉玮.硝酸还原酶的研究I.小麦叶片硝酸还原酶——钝化蛋白的分离和特性.植物生理学报, 1982, 8(1): 59~ 66
- 6 汪沛洪主编.蛋白质含量测定法(Folin-酚法).见:基础生物化学实验指导.西安:陕西科技出版社,1985, 64~ 66
- 7 Wallace W. Comparison of a nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root with a protease from yeast which inactivates tryptophan synthase. Biochim Biophys Acta, 1978, 524: 418~ 427
- 8 Yamaya T, Oaks A. Activation of nitrate reductase by extracts from corn scutella. Plant Physiol, 1980, 66: 212~ 214
- 9 Smarrelli J, Jr & Campbell W H. Reversible inactivation of higher plant nitrate reductase. Plant Physiol, 1979, 63: 545~ 549
- 10 李止正,安林升.蕃茄叶片中硝酸还原酶活性的“稳定因素”.植物生理学报, 1982, 8: 193~ 195

Purification and Activity of NR-Inactivating Proteins in Winter Wheat Leaf

He Ping Wen Shuji Wang Peihong

(Plant Biochemistry Lab, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract When a crude extract from wheat leaves was fractionated by a combination of ammonium sulfate (30% ~ 45% saturation) precipitation and Sephadex G-100 filtration, the presence of two NR-inactivating proteins was revealed. Both inactivating protein I and inactivating protein II had a strongly inhibitory effect on nitrate reductase activity from the leaves. The effect of inactivating protein II was much higher than that of protein I when an equal amount of inactivating protein I and II was used in the reaction mixture. The NR-inactivating proteins from wheat leaves also have inhibitory effect on nitrate reductase activity from the roots. With polyacrylamid electrophoresis the more pure inactivating protein I was obtained with the molecular weight of 47.5 kD.

Key words nitrate reductase, inactivating protein, winter wheat