

小麦叶绿体中细胞分裂素的结合蛋白

黄 海 汤 玉 玮

(中国科学院上海植物生理研究所)

在激素作用机理的研究中,激素受体的鉴别和定位是一个重要的研究内容^[1,2]。自从1970年发现高等植物的核糖体存在着细胞分裂素(CTK)的结合蛋白之后^[3],陆续在一些植物的不同细胞组份中发现了这种结合蛋白^[4-6]。但是,CTK是否能与植物细胞的某一细胞器结合还未见报道。黄卓辉与魏家绵曾报道过6-苄氨基嘌呤(6BA)能使离体叶绿体的光合磷酸化活性增强^[7]。这使我们对CTK是否能与叶绿体结合,从而调节光合作用或代谢过程产生兴趣。由于色素的干扰,用常规离心分析法及平衡透析法分析激素与叶绿体的结合存在着严重的障碍。我们在离心分析法的基础上增加了硫酸提取步骤,用这一方法证明叶绿体中存在着与CTK专一结合的蛋白质。

一、材料与方 法

小麦(*Triticum aestivum* L.)的培养见文献[9],5天龄叶片用于实验。

实验在4℃下进行。叶绿体提取液见文献[10],另含0.4mol/l蔗糖。叶片匀浆后,用四层纱布过滤,1500g离心5min,沉淀用少量提取液悬浮。除蔗糖梯度为60%3ml、40%8ml、20%5ml(w/w)和400g离心2min再增速至2700g离心10min外,其它叶绿体纯化条件均参照文献[8]。吸出叶绿体区带,加3倍体积的缓冲液(同提取液,但无蔗糖),1500g离心5min,沉淀用同种缓冲液60ml悬浮,1500g离心5min,弃上清液。沉淀用5ml缓冲液悬浮,在CSF-14超声波发生器上用300mA处理30s。分装在塑料小离心管中,每管400μl。向小离心管中加入6BA或水200μl,置冰浴1h左右,再加400μl 2μCi³H-6BA/ml缓冲液,摇匀后在4℃下放置12h,12000g离心15min弃上清液并用滤纸吸干离心管壁上残余液体,加入0.2ml 6mol/l硫酸,将沉淀悬浮起,室温过夜,加入1ml蒸馏水,12000g离心15min。吸出清液0.4ml,加入7ml闪烁液(Triton X-100/甲苯、1/2(v/v); 0.5%PPO, 0.01%POPOP),黑暗中放置1d后,用液体闪烁计数器计数。

二、结果与讨论

1. 测定叶绿体与CTK结合的方法 由于叶绿体色素的干扰,使结合反应结束,离心后的叶绿体碎片不能直接用于液闪计数。我们发现,用酸处理叶绿体碎片可以使结合的³H-6BA重新脱落下来。这部分放射性可以间接地反映出³H-6BA与叶绿体碎片的结合量。当反映系统含有非标记6BA时,³H-6BA与叶绿体碎片的结合量下降。图1表明,在 1×10^{-4} — 8×10^{-4} mol/l浓度范围内,³H-6BA的结合量随非标记6BA浓度的升高而下降。由于在叶绿体提

本文1986年3月25日收到。

纯之后进行了低渗和超声波处理,叶绿体被膜的完整性基本丧失,因此,此时 ^3H -6BA 与叶绿体的结合位置可能在类囊体膜的表面。

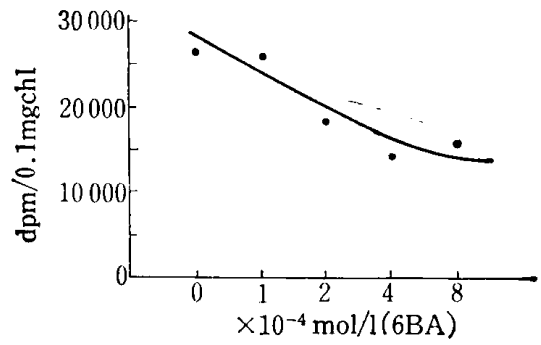


图1 ^3H -6BA 与叶绿体碎片结合的测定

2. CTK 结合蛋白的某些性质 经破碎的叶绿体,煮沸 5min, 几乎完全丧失了与 CTK 结合的功能(表 1), 这表明叶绿体碎片中的 CTK 结合位点可能是由蛋白质组成。当这些蛋白质具有某一特定的天然结构时,可以与 CTK 结合,而蛋白质热变性后失去了这一天然结构,则与 CTK 的结合能力也丧失了。改变反应系统的 pH 值,结合活性会发生变化(表 2), pH 为 7.6 时,有较高的结合活性。叶绿体碎片中 CTK 的结合有一定的专一性,当反应系统中含有天然植物激素与 ^3H -6BA 竞争结合位点时,只有玉米素具有明显的置换效应(表 3)。

表1 叶绿体碎片中 CTK 结合蛋白的热失活性质

	H ₂ O	6BA $4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ (dpm/0.1mgChl)	%
对 照 煮沸 5min	21 353	16 048	-24.8
	22 857	23 188	1.4

表2 不同 pH 值对叶绿体碎片中 ^3H -6BA 结合活性的影响

pH	H ₂ O	6BA $4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ (dpm/0.1mgChl)	%
7.6	21 353	16 048	-24.8
7.2	21 048	18 841	-10.5
6.5	2 2462	22 274	-0.8

表3 不同植物内源激素对 ^3H -6BA 与叶绿体碎片结合的影响

	H ₂ O	$4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$			
		6BA	zeatin	IAA	GA ₃
dpm/0.1mgChl	28 191	16 389	21 459	28 676	25 739
%	—	-41.9	-23.8	1.7	-8.7

3. 脱落酸 (ABA) 对于 CTK 与叶绿体碎片结合的影响 在 CTK 与叶绿体碎片结合的反应系统中,如果仅含有 ABA,对结合反应几乎无影响,如果在含非标记 6BA 系统里加入同样浓度的 ABA,则非标记 6BA 置换 ^3H -6BA 的能力明显下降(表 4)。对于植物体来说,

ABA 与 CTK 类激素有拮抗效应^[9,11,12],但是这种拮抗效应的机理至今仍不清楚^[13]。从表 4 的结果可以推测,ABA 降低 CTK 作用这一效应,可能是由于在植物体内,ABA 改变了 CTK 结合蛋白与 CTK 结合后的某些性质。

表 4 ABA 对 ³H-6BA 与叶绿体碎片结合的影响

	H ₂ O	4×10 ⁻⁴ mol/l		
		6BA	ABA	6BA + ABA
dpm/0.1mgChl	31 676	19 030	30 289	28 253
%	—	-39.9	-4.4	-10.8

与动物激素受体蛋白的研究相比较,植物激素受体蛋白的研究开始较晚。由于动物激素的受体蛋白与激素结合后,常常在转录和翻译水平上起作用^[3,10,14],因此,在开始研究植物激素受体蛋白时,往往把注意力集中于与转录翻译有关的细胞组分,如 CTK 与核糖体结合^[3,10]。以后,虽有人^[11,12]注意到 CTK 与生物膜的结合,但是由于细胞的分级组分不够纯,很难确定 CTK 结合的确切位置。我们用纯化的叶绿体为材料,证明了 CTK 可以与叶绿体碎片结合。这表明,激素与其受体结合,除了可能对转录翻译进行调节之外,也可能直接通过膜透性的调节来影响光合作用或代谢过程。CTK 与叶绿体膜系统结合之后如何影响代谢过程,是一个值得进一步探究的问题。

参 考 文 献

- [1] Sussman, M. R. et al., *Planta*, 140(1978), 251—259.
- [2] 陆嘉陵, 植物生理学通讯, 1984, 1—7.
- [3] Berridge, M. et al., *Biochem. J.*, 119(1970), 75—84.
- [4] Yoshida, K. et al., *J. Biochem.*, 81(1977), 791—799.
- [5] Gardner G. et al., *Planta*, 143(1978), 67—73.
- [6] Moore, F. H., *Plant Physiol.*, 64(1979), 594—599.
- [7] 黄卓辉、魏家绵, 植物生理学报, 1984, 10: 161—167.
- [8] Mifflin, B. J. et al., *Plant Physiol.*, 53(1974), 870—874.
- [9] 黄海、汤玉玮, 植物生理学报, 1984, 10: 347—351.
- [10] Fox, J. E. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64(1975), 530—536.
- [11] Fountain, D. W., *Plant Physiol.*, 58(1976), 530—536.
- [12] Ray, S., *Physiol. plant.*, 59(1983), 343—346.
- [13] Longo, G. P. et al., *Physiol. Plant.*, 53(1981), 82—86.
- [14] 张德颐, 植物生理学通讯, 1983, 11—20.