

沙冬青抗冻蛋白的分离、纯化及其理化特性分析

费云标^① 魏令波^{①*} 高素琴^① 陆漫春^② 王保怀^② 李芝芬^②
张有民^② 舒念红^① 江 勇^① 王维香^①

(^①中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080; ^②北京大学物理化学研究所, 北京 100871. * 联系人,
Email: lbwei@public.east.cn.net)

摘要 用 DEAE-纤维素 DE-52, 丙烯葡聚糖 S300 柱层析, 热处理及等速电泳技术分离纯化了热稳定的冬季沙冬青叶片抗冻蛋白(AFP), 获得了电泳纯的分子量约为 50 ku 的 AFP, 经 Shift 试剂检验为含糖的 AFGP. 显微镜观察冰点熔点差异技术和差示扫描量热法(DSC)测定了该蛋白热滞活性(THA), 用 DSC 测定 THA 在 5 mg/mL 时约为 0.35℃. 圆二色性(CD)分析表明, 该 AFGP 中 α -螺旋为 11%, 反平行 β -折叠为 34%, 无规则线团为 55%. 植物 AFP 与某些鱼类的 AFP 具有一定的相似性, 但植物 AFP 可能与其他多种抗寒冻因子协同起抗冻作用.

关键词 沙冬青 抗冻蛋白 热滞活性 差示扫描量热法 圆二色性

抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)是存在于许多抗冻生物中的高效抗冻生物活性物质, 它能够抑制体液冰晶生长, 降低溶液冰点. 但其对熔点影响较少, 从而导致溶液的熔点和冰点之间出现差值, 这种差值称为热滞活性(thermal hysteresis activity, THA). 抗冻蛋白的功能除了降低冰点以外, 还包括降低冰晶的形成速度、改变冰晶形成状态、降低过冷点、抑制重晶化、抑制成冰核蛋白的作用和降低玻璃化与去玻璃化损伤等. 关于其抗冻作用机制目前有多种假设, 但普遍认为主要是通过对抗冰晶的吸附抑制.

鱼类 AFP 研究较早, 目前鱼类中已发现 5 种 AFP^[1], 包括含糖的抗冻糖蛋白质(AFGP)和不含糖的 I~IV 型 AFP, 在昆虫中已发现比鱼类 AFP 活性更高的不含糖的 AFP, 也称热滞蛋白(thermal hysteresis protein, THP)^[2]. 最近 Graham 等人^[3]纯化了一种高活性的昆虫 AFP, 在低浓度时相当于鱼类 AFP 活性的 100 倍. 关于植物中 AFP 研究报道较少, 近年来从冷诱导的黑小麦(winter rye)叶片类囊体中分离到了部分纯化的植物 AFP, 其 THA 在 60 mg/mL 时为 0.30℃, 并且观察到类似鱼类 AFP 的双锥体冰晶形态^[4]; 从茄属(*Solanum dulcamara*)中分离到 67 ku AFP, THA 在 10~30 mg/mL 时为 0.25~30℃^[5]. 我们曾报道从雪莲和沙冬青中分离到有一定活性的植物 AFP^[6~8], 并观察到沙冬青 AFP 的冰晶类似于鱼类和黑小麦 AFP 的冰晶形态^[8].

本文介绍强抗冻植物沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)AFP 的分离纯化, THA 测定及二级构型等理化特性, 并讨论了植物 AFP 可能的抗冻功效及与其他多种抗寒冻因子的关系.

1 材料与方法

(i) 材料. 冬季沙冬青叶片, 采自内蒙古自治区乌海市郊, 保存于-80℃备用.

(ii) AFP 的分离. 经冷冻的沙冬青叶片, 在抽提缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.4), 0.1 mol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂(PMSF))中用高速捣碎机捣碎成糊状, 经 4 层纱布压滤, 滤液在 4℃, 20 000 $\times g$ 离心 30 min, 取上清液上 DEAE-52 柱进行层析分离, 上柱前后均用 5 mmol/L Tris-HCl(pH = 7.4), 0.1 mol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA 平衡柱或洗到 A_{280} 吸收值为基础水平, 然后用 25 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.4), 0.1 mmol/L EDTA 及 KCl 梯度洗脱, 步骤为先以 0.1~0.3 mol/L KCl 梯度洗脱, 用 0.3 mol/L KCl 洗至 A_{280} 吸收值为基础水平, 接着用 0.3~0.6

mol/L KCl 梯度洗脱, 再用 0.6, 1.0 mol/L KCl 洗脱, 收集各洗脱峰(图 1), 经超滤(截留分子量 6 ku)与冷冻干燥浓缩后再上丙烯葡聚糖 S300, 用 50 mmol/L NH_4HCO_3 过柱, 分部收集各洗脱峰, 经超滤浓缩、脱盐后冷冻干燥。

(iii) 热处理. 冷冻干燥后的 AFP 溶于 25 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.4, 0.1 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 沸水中加热 10 min, 冰水中迅速冷却, 离心弃沉淀, 收集清液, 再经 Microcon-10(AMICON 公司)脱盐。

(iv) 制备性等速电泳. 使用 491 型电泳仪(Bio-Rad Lab)^[9]. PAGE 为 T 3%, C 2.67%, 引导离子缓冲液为 5 mmol/L Tris-HAc, pH = 8.5; 尾随离子缓冲液为 33 mmol/L 甘氨酸, 4 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.5; 样品缓冲液为两性电解质, pH = 7~10; 电压为 500 V; 电泳时间为 7 h. 按每管 10 min 收集 2 mL。

(v) THA 的测定. 第 1 种方法: 按文献[10], 用显微镜观察方法测定样品熔点和冰点, 其冰点和熔点之差即 THA. 第 2 种方法: 用差示扫描量热法(DSC)测定 AFP 的 THA^[7], 所用仪器为 Micro DSC III(SETARAM Co France)。

(vi) AFP 纯度检测. SDS-PAGE(12.5%)分析由制备性等速电泳所收集得到的各组分。

(vii) 圆二色分析. 使用仪器为 Jasca, J-500. 二级结构分析按氨基酸残基平均分子量为 114, 采用 Convex Constraint Analysis(CCA)软件包完成。

2 结果

通过 DEAE-52 柱交换层析(图 1), 再经丙烯葡聚糖 S300 分离得到沙冬青叶片的各个蛋白质组分, 用显微镜观察法初步测定各组分的 THA. 其中从 DEAE-52 柱分离到的 156~210 管样品经丙烯葡聚糖凝胶过滤, 再用 50 mmol/L NH_4HCO_3 洗脱得到的部分收集液仍具有 THA, 用显微镜观察法测定, 浓度约在 10 mg/mL 时, 熔点为 -0.30°C , 冰点为 -0.55°C , THA 为 0.25°C 。

将从丙烯葡聚糖 S300 凝胶过滤所收集的样品超滤浓缩、脱盐、冷冻干燥, 再经加热处理后, 用 Microcon-10(按 AMICON 公司)脱盐. 该样品经制备性等速电泳进一步分离纯化(图 2), 共获得 40 个组分, 每份 2 mL。

用 DSC 测定 THA(表 1 和图 3), AFP 溶液体系内冰核含量随 T_h 的升高而逐渐减少, 在 T_h 为 $-2.10\sim-1.70^\circ\text{C}$ 之间时, 冰核含量为 27%~5%, 部分熔融体系随温度下降立即再次

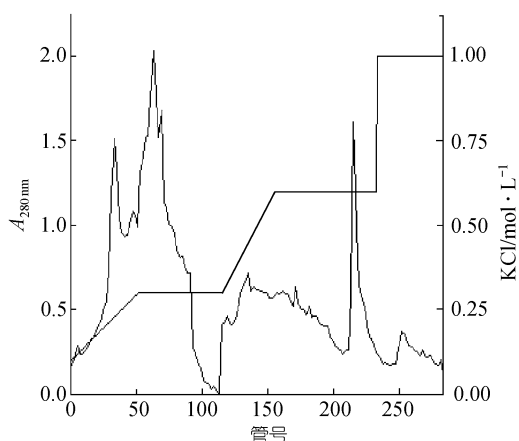


图 1 DEAE 纤维素 DE-52 离子交换层析
柱体积为 60 mL, 平衡缓冲液为 5 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.4, KCl 梯度洗脱, 按每管每小时 20 mL 收集样品

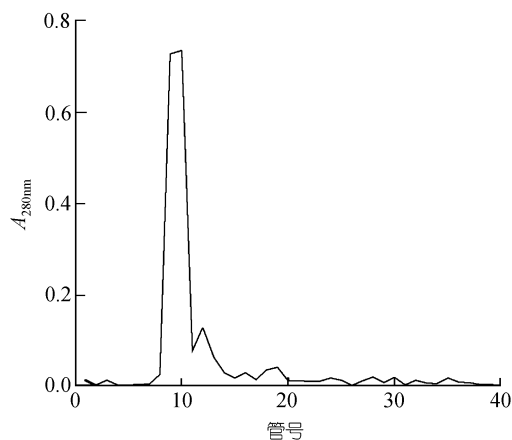


图 2 沙冬青 AFP 等速电泳图谱
其中第 13 管具有 THA

结冰, 出现平滑的放热峰(曲线 1~3). 当体系内冰核含量较少(<5%)时, T_h 由 -1.60°C 升高到 -1.50°C , 体系内冰核含量进一步减少, 降温时放热峰不再平滑显示, 而是先后出现 0.03°C (曲线 4), 0.27°C (曲线 5), 0.35°C (曲线 6)的冻结滞后. 说明体系内存在大量冰核(>5%)时, AFP 的作用尚不足以抑制降温时冰晶生长(即冻结), 但体系内含有少量冰核 (<5%)时, AFP 起到降低冰点的作用, 而且 THA 也随冰核含量的减少而逐步增大, 这与文献[7]的报道相一致. 用显微镜观察法测定 THA 时, 在抗冻蛋白部分熔融体系内, 以冰核含量足够小时观察到的熔点与冰点之差为 THA. 同样, 用 DSC 测定时也以冰核含量足够小时测定的 T_h 与 T_o 之差为 THA, 所以经等速电泳纯化后的 AFP 在 5 mg/mL 时的 THA 为 0.35°C .

表 1 AFP 溶液(5 mg/mL)的停留温度(T_h)、二次冻结起始温度(T_o)、冰核(Nuclei)含量及热滞活性(THA)

$T_h/^{\circ}\text{C}$	$T_o/^{\circ}\text{C}$	Nuclei/%	THA/ $^{\circ}\text{C}$
-2.10	-2.09	27	-0.01
-1.80	-1.79	8	-0.01
-1.70	-1.70	5	0.00
-1.60	-1.63	< 5	0.03
-1.55	-1.82	< 5	0.27
-1.50	-1.85	<< 5	0.35

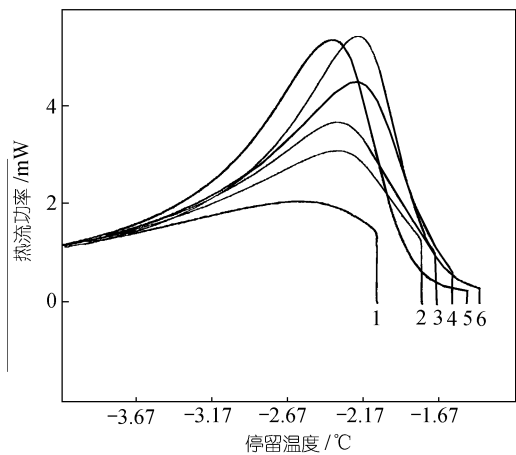


图 3 不同停留温度 T_h 下, 部分熔融抗冻蛋白体系降温再次冻结过程的热流功率-温度图
曲线 1~6 对应的 T_h 分别为 -2.10 , -1.80 , -1.70 , -1.60 , -1.55 , -1.50

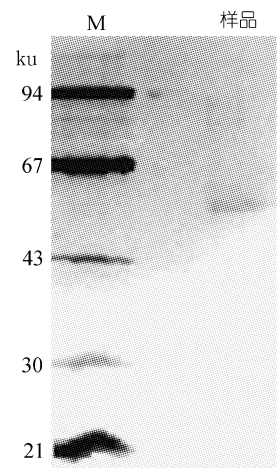


图 4 从等速电泳分离的 No.13 样品的 SDS-PAGE (12.5%)电泳银染图谱
M——标准分子量, 样品约 50 ku

SDS-PAGE 并银染显示, 13 号组分的组成成分单一, 其分子量约为 50 ku (图 4). 用 Shift 试剂处理显示有糖基反应, 说明是含糖的 AFGP.

从制备性等速电泳分离到的 No.13 样品用 ddH_2O 配成约为 0.05 mg/mL , 在 15°C 时作 CD 分析(图 5). 图中表明从 $195\sim 225\text{ nm}$ 有一个 -5.30×10^{-3} 度的 CD 带, 进一步分析表明 AFP 中 11%为 α -螺旋, 34%为反平行 β -折叠, 55%为随机无规线团(图 6).

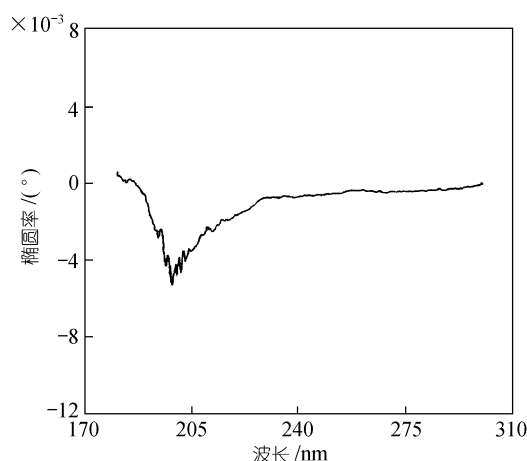


图5 沙冬青 AFP 在 15℃时的 CD 谱
波长范围 190~300 nm

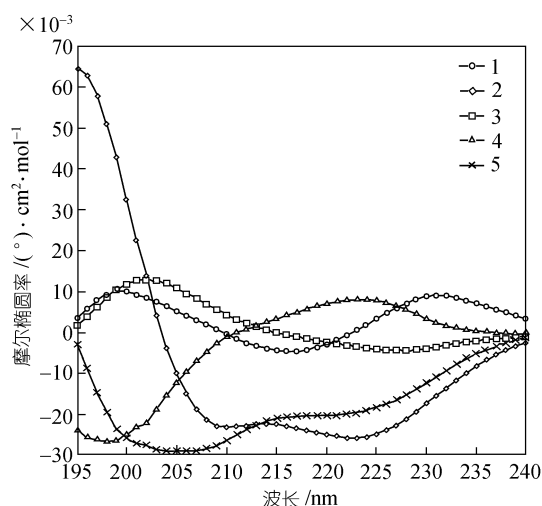


图6 在 15℃时沙冬青 AFP CD 谱的 CCA 分析结果
波长范围 195~240 nm. 单一的二级结构类型为随机卷曲
(1, 4), α -螺旋(2), 反平行 β -折叠(3), β -转向和平行 β -折叠(5)

3 讨论

沙冬青叶片 50 ku AFGP 的 THA 在 5 mg/mL 时为 0.35℃. 其二级结构含 α -螺旋为 11%, 反平行 β -折叠为 34%, 随机无规线团为 55%. 而鱼类 AFGP 的二级结构为无规线团的伸展型, AFP-I 中约有 45%为 α -螺旋型, AFP-II 含 α -螺旋和 β -折叠, 但以 β -折叠为主^[11]. 所以我们分离到的 AFGP 与某些鱼类 AFP 的二级结构相类似. 此外, 无论从黑小麦 AFP^[4]的冰晶形态或我们以前观察到的沙冬青 AFP 的冰晶^[8]都具有鱼类 AFP 双锥形的冰晶形态, 所以植物 AFP 可能具有鱼类 AFP 类似的作用机制和功能.

植物体内的 AFP 尽管与鱼类 AFP 有类似之处, 但不像鱼类和昆虫含有高浓度与很高活性的 AFP, 植物 AFP 降低冰点的效应低于鱼类和昆虫 AFP 的作用. 所以在植物中 AFP 的作用除了降低冰点外, 更重要的是降低过冷点和抑制重晶化等作用, 因为这些作用比冰晶生长的抑制作用更易达到, 例如, 少量 AFP 就有较高的重晶抑制活性^[2, 12]. 但值得注意的是植物体内含有许多耐低温的物质如糖类、多元醇、山梨糖醇、甘氨酸内铵盐、脯氨酸、多胺、植物激素(ABA)、不饱和脂肪酸等. 尤其当气温降低或人工驯化与脱水时还可以诱生大量冷诱导蛋白, 包括改变酶系统^[13, 14]. 在拟南芥和冬小麦中, 至少有 25 个与抗低温相关的基因, 包括一些抗低温相关的转录因子^[15]促进抗低温基因的表达. 昆虫中高浓度的多元醇和 AFP 可降低冰点到-15℃, 冬天过冷温度又降低 6℃, 最终达到-21℃^[2]. 在植物体内多种耐低温物质或抗低温基因表达产物作为 AFP 的内环境, 是否与 AFP 相互作用而影响 AFP 的效能还不清楚.

对于降低冰点的效果, 在实验中发现纯化的 AFP 比 AFP 的粗制品低, 尤其纯化的昆虫血淋巴 AFP 远低于同种昆虫血淋巴粗制品. 分析其原因, 可能内在的多种 AFP 的相互促进作用和 AFP 的某些内环境物质的共存增加了 AFP 的活性. 例如, 在同一种鱼类中存在多种 AFP. Wu 等人^[16]在昆虫血淋巴中分离到一种不具 THA 的 70 ku 的蛋白质, 当 AFP 溶液中加入这种 70 ku 的蛋白质时, AFP 的活性明显增加, 在 4 mg/mL 的昆虫 AFP, THA 为 1.6℃, 加入 70 ku 的蛋白质后, 使 AFP 的 THA 增加至 5.24℃, 认为这种 70 ku 蛋白质是内源 AFP 的活化蛋白. 在

3 mg/mL 纯化的昆虫 AFP 水溶液中加入 0.5%(体积比)的抗血清, THA 可以增加 1 倍, 甚至在不能检出 THA 的低浓度 AFP 中加入适量抗体, THA 升至 1.5~2.5℃^[2]. 有人发现 AFP 溶液中混入少量聚丙烯酰胺凝胶, 也会增加 AFP 的活性^[2]. 从沙冬青中分离的部分纯化的 AFP 比纯化的 AFP 活性要高^[7], 暗示着植物中可能也存在着 AFP 的活化蛋白或 AFP 与其他某些物质的相互作用可以增加 AFP 的活性, 但尚需确切的实验结果来论证. 在植物体内的 AFP 与这些内源物质共存时, 能否影响到熔点也是不清楚的, 如果在生物体内不仅更有效地降低冰点也影响到熔点, 则 AFP 在生物体内具有更大的抗冻效果.

一些强抗冻植物可在零下几十度的低温下度过严寒却不被冻死, 而上述提到的各种单因子都不能解释如此有效的抗冻作用, 显然是生物体内 AFP 和各种抗寒冻因子共同协调综合作用, 从而达到抗冻效果. 实验表明, 纯化的植物 AFP 在离体化学实验中 THA 并不太高, 这可能是因为植物体内已有较多的其他抗寒冻因子, 但只有这些抗寒冻因子也许还不能达到强抗冻效果, AFP 在抗冻鱼类、昆虫和植物中存在的广泛性说明了其在抗冻生物中起着相当重要的作用, 所以植物 AFP 在生物体内的抗冻作用仍不可忽视. 那么, 在多基因控制的抗冻作用中, AFP 及其他抗冻因子具体起到了怎样的作用? 各有多大的效力? 是否在体内还有未被发现而更为重要的抗冻因子? 这些都尚不清楚. 从现有的资料分析, 至少有两项工作是值得重视的, 第一, 分离纯化 AFP 及其他抗冻因子, 再进行重组模拟生物体内的抗冻作用, 可能有利于分析抗冻作用机理与功能效应; 第二, 分离 AFP 及重要抗冻因子的基因, 包括与抗冻相关的转录因子基因及 AFP 活化因子基因, 将这些基因进行共转移, 可能是一个值得重视的遗传工程研究的新方向.

致谢 感谢姜韬先生帮助完成制备性等速电泳实验. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39680025)、中国科学院重点基金和国家“转基因植物研究与产业化开发”专项基金资助项目.

参 考 文 献

- 1 Deng G, Andrews D W, Laursen R A. Amino acid sequence of a new type of antifreeze protein from the longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecinspittosis*. FEBS Letter, 1997, 402: 17~20
- 2 Duman J G, Wu D W, Oslen T M, et al. Thermal-hysteresis proteins. Advances in Low-Temperature Biology, 1993, 2: 131~182
- 3 Graham L A, Liou Y C, Walker V K, et al. Hyperactive antifreeze protein from beetles. Nature, 1997, 388: 727~728
- 4 Griffith M, Ala P, Yang D S C, et al. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. Plant Physiol, 1992, 100: 593~596
- 5 Duman J G. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. Biochimica et Biophysica Acta, 1994, 1206: 129~135
- 6 费云标, 孙龙华, 黄 涛, 等. 分离和检出雪莲抗冻蛋白. 生物化学杂志, 1993, (增刊): 100~101
- 7 陈廷超, 张极震, 费云标, 等. 差示扫描量热法直接测定抗冻蛋白质溶液的热滞效应. 生物物理学报, 1995, 11: 309~313
- 8 费云标, 孙龙华, 黄 涛, 等. 沙冬青高活性抗冻蛋白的发现. 植物学报, 1994, 36: 649~650
- 9 Holloway C J, Battersby R V. Preparative isotachopheresis. Methods in Enzymology, 1984, 104: 281~301
- 10 DeVries A L. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. Science, 1971, 172: 1152~1155
- 11 费云标, 严绍颐. 抗冻蛋白的生物化学与抗冻作用机制. 生物工程进展, 1992, 12: 17~26, 46
- 12 江 勇, 贾士荣, 费云标, 等. 抗冻蛋白及其在植物抗冻生理中的作用. 植物学报, 1999, 41: 677~685
- 13 费云标, 舒念红, 黄 涛, 等. 植物寒冻损伤与抗性的细胞化学及生物化学. 生物工程进展, 1994, 14: 40~44
- 14 Guy C L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. Annu Rew Plant Physiol Plant Mol Biol, 1990, 41: 187~223
- 15 Pennisi E. Transferred gene helps plants weather cold snaps. Science, 1998, 280: 36
- 16 Wu D W, Duman J G. Activation of antifreeze proteins from the beetle *Dendroides canadensis*. J Comparative Physiology, Ser B, 1991, 161: 279~283

(2000-05-08 收稿, 2000-07-19 收修改稿)