

用于植物光系统 II 蛋白酶检测的活性染色方法*

周 昊 杜林方** 朱晓峰

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要 采用分离胶中加入 0.25% 明胶作为底物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对光系统 II 颗粒及其 1 mol/L NaCl 抽提液中存在的蛋白酶进行了分离、活性检测和部分性质分析. 在 PS II 颗粒的 1 mol/L NaCl 抽提液中检测到有 6 条酶带存在, 分子质量分别为 34、37、50、54、58 和 68 ku. 初步分析了还原剂、离子强度等对蛋白酶活性的影响. 此方法分离与检测同步, 具有灵敏度高、方便等优点.

关键词 光系统 II 颗粒, 原位染色, 明胶, 外周蛋白酶

学科分类号 Q94

植物蛋白酶要参与植物发育、衰老和环境胁迫响应等生理过程. 在种子萌发时降解储藏蛋白质提供幼苗生长所需氨基酸, 而叶片衰老时优先降解丧失功能的蛋白质, 环境变化时特定蛋白酶还参与翻译后的调控^[1]. 在光合作用中, 叶绿体类囊体膜蛋白复合物进行光能的吸收、传递和转化, 水的裂解及光合磷酸化等, 这些膜蛋白的周转更新需要蛋白酶的作用^[2]. Kuwabara 等^[3~6]曾报道光系统 II (PS II) 颗粒的 NaCl 抽提液中存在蛋白酶, 会降解 18、24 ku 外周蛋白. 本实验室的工作证明, PS II 颗粒结合有 3 种以上性质不同的蛋白酶^[2, 7, 8].

对上述 PS II 结合的蛋白酶主要以 18、24 ku 外周蛋白为底物, 通过电泳分析它们的降解情况, 来进行酶的性质研究. 这不利于微量蛋白酶的检测, 此外分离时蛋白酶会发生自身降解^[9, 10], 因此建立方便、灵敏的检测方法十分必要. 我们经多次实验, 建立了电泳分离胶中加明胶作底物的活性染色方法, 在 PS II 颗粒及其 NaCl 抽提液中检测到多种蛋白酶存在.

1 材料与方法

1.1 材料

菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 购自市场. 丙烯酰胺 (Acr)、巯基乙醇 (β -mercaptoethanol, β -ME), Sigma 公司产品; 甲叉双丙烯酰胺 (Bis), Fluka 公司产品; 明胶 (gelatin), 国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 PS II 颗粒及其 1 mol/L NaCl 抽提液的制备: 按照文献 [2] 的方法制备, 用 1 mol/L NaCl 洗涤 PS II 颗粒 (叶绿素浓度为 2 g/L), 抽提液置

于液氮中冻存.

1.2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 按照文献 [2] 的方法进行 SDS-PAGE. 采用 13.75% 的分离胶和 5% 的浓缩胶 (均含有 6 mol/L 尿素), 样品处理液中不含 β -ME. 电泳后胶板用考马斯亮蓝 R250 染色.

1.2.3 Gelatin-SDS-PAGE 分析: 在分离胶中加入 0.25% (质量体积比) 明胶 (使用前配制), 除不含尿素外, 其他条件同上. 电泳结束后, 胶板先用含 2% (质量体积比) Triton X-100 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 充分浸泡 10 min, 除去 SDS, 清水漂洗 3 次 (每次 1 min) 后, 置于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 中 37℃ 温育 8 h, 再用考马斯亮蓝 R250 染色.

1.2.4 离子强度和巯基乙醇对 NaCl 抽提溶液中蛋白酶活性的影响: 进行 gelatin-SDS-PAGE 时, 样品用 1% (体积比) β -ME 处理, 以考察 β -ME 还原对酶活性的影响. NaCl 抽提液的脱盐采用加入 5 倍体积预冷丙酮 (-20℃) 放置 1 h, 于 0℃ 12 000 g 离心 10 min, 沉淀用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 充分溶解. 相同上样量进行 gelatin-SDS-PAGE, 胶板按泳道切割, 分别置于含 0~1 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 中 37℃ 温育 8 h, 再染色.

* 国家自然科学基金 (39770071) 和四川省青年科技基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 028-85410356, E-mail: dulinfang@yahoo.com

收稿日期: 2001-12-17, 接受日期: 2002-03-01

2 结 果

2.1 检测 PS II 颗粒 NaCl 抽提液中的蛋白酶

以前的研究表明^[2,3,7], PS II 颗粒的 1 mol/L NaCl 抽提液中主要含 18 ku 和 24 ku 外周蛋白. gelatin-SDS-PAGE 的胶板除去 SDS, 温育时分离的蛋白酶降解明胶, 胶板中有蛋白酶处不被考马斯亮蓝染色, 为亮带. 图 1 结果表明, 有 6 条明显的负染亮带存在, 即有 6 条蛋白酶带, 分子质量分别是 34、37、50、54、58 和 68 ku. 其中 34、50 和 68 ku 蛋白酶带亮度最大, 37 ku 蛋白酶次之, 而 54、58 ku 蛋白酶较弱. 它们的相对量不同, 表明此条件下它们的活性不同. 适当降低分离胶中明胶的含量, 可以使负染的酶带和正染的蛋白带同时显现出来. PS II 颗粒中部分蛋白酶带被相邻蛋白带遮盖, 有分子质量分别是 34、37、41 和 68 ku 的 4 条蛋白酶带, 其中 34、41 和 68 ku 蛋白酶带亮度较强, 37 ku 较弱. NaCl 抽提液酶带较强, PS II 颗粒中没有 50、54 和 58 ku 蛋白酶带.

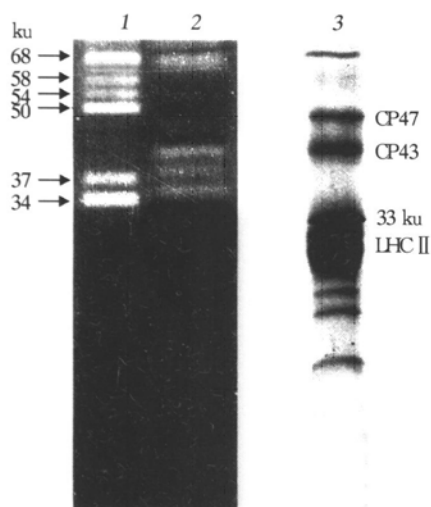


Fig. 1 Proteases of PS II particle and NaCl extract

1: PS II NaCl extract (gelatin-SDS-PAGE); 2: PS II particle (gelatin-SDS-PAGE); 3: PS II particle (SDS-PAGE).

2.2 NaCl 抽提液中蛋白酶性质的初步分析

分别考察 β -ME 和离子强度对 NaCl 抽提液中蛋白酶活性的影响. 图 2 活性染色结果表明: 与未用 β -ME 处理样品相比, 经 β -ME 处理样品中只有 34、37、50 和 54 ku 等 4 条酶带存在, 58、68 ku 蛋白酶带完全消失, 说明二硫键对这两种酶构象的维持是必须的, 二硫键被破坏导致酶活性丧失; 而二硫键对另外 4 种酶构象的维持并不是必需的.

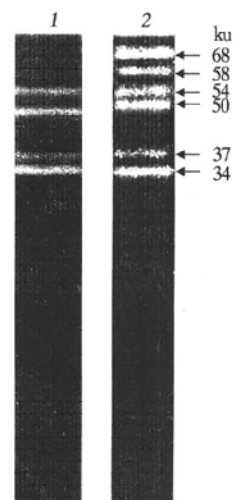


Fig. 2 Influence of the β -mercaptoethanol on the activity of proteases

1 and 2: NaCl extract; 1: Treated NaCl extract with β -ME.

样品脱盐后再进行 gelatin-SDS-PAGE, 胶条分别在 0~1 mol/L NaCl 溶液中温育, 当 NaCl 浓度低于 0.5 mol/L 时, 这 6 种蛋白酶活性未受明显影响, 但是 NaCl 浓度达到 1 mol/L 时, 6 种蛋白酶中只有 37 ku 蛋白酶有活性 (图 3).

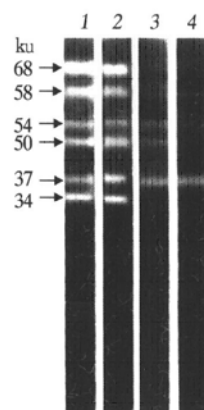


Fig. 3 Influence of the ion strength on the activity of proteases

$c(\text{NaCl}) / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 1, 0; 2, 0.1; 3, 0.5; 4, 1.

3 讨 论

胞内蛋白酶对细胞内环境的维持具有重要作用, 类囊体结合的蛋白酶对于类囊体膜的加工成熟和周转代谢是必需的. 但是这些蛋白酶含量少, 难于纯化和鉴定^[3,9]. Kuwabara 等^[11]曾从菠菜 PS II

颗粒的 1 mol/L NaCl 抽提液中纯化得到一种对 DTT 敏感的四聚体蛋白酶^[5], 随后证实它是一种多酚氧化酶。我们则纯化得到另一种对 DTT 敏感的蛋白酶^[7]。根据抑制剂实验、离子强度影响、外周蛋白降解片段差异, 我们的结果表明菠菜 PS II 颗粒结合 3 种以上蛋白酶^[2]。但是检测蛋白酶的方法是以 18 ku、24 ku 外周蛋白为底物, 于微量透析装置中酶解反应 6~10 h 后, SDS-PAGE 分析这 2 种外周蛋白的降解情况, 并进行性质分析的^[2, 5, 7, 11]。因而原来的方法需用样品较多、灵敏度不够高, 难于检测微量的蛋白酶。

本实验在分离胶中加入适量明胶, 利用 SDS-PAGE 分离蛋白酶, 经去垢剂除去 SDS 使蛋白酶复性, 温育时恢复活性的蛋白酶便降解明胶, 形成不被染色的亮带, 进而检测到蛋白酶。该方法灵敏度高, 结果直观, 检测方便, 除分离和直接检测蛋白酶外, 还可以确定样品中蛋白酶的数量和电泳相对位置 (分子质量)。此外, 温育缓冲溶液加入抑制剂或改变 pH、离子强度, 可对蛋白酶的性质进行分析。应用于蛋白酶分离纯化时, 还可以追踪各步骤酶的变化情况。

迄今未见到关于 PS II 颗粒的 NaCl 抽提液中蛋白酶具体数量和种类的报道。本文借助建立的方法, 检测到菠菜 PS II 颗粒的 NaCl 抽提液中共有 6 种蛋白酶存在 (分子质量分别是 34、37、50、54、58 和 68 ku)。根据分子质量大小、受 NaCl 影响的情况和前人的结果^[6, 7, 10, 11], 初步判定如下: 因 37 ku 蛋白酶不受 NaCl 的影响, 它可能是杜林方等^[7] (1996 年) 报道的, 37 ku 对 DTT 敏感的单体蛋白酶; 54 ku 蛋白酶可能是 Kuwabara 等^[6] (1994 年) 报道的 54 ku 脯氨酸内肽酶, 来自 165 ku 蛋白酶的降解产物; 50 ku 蛋白酶可能是 Kuwabara (1995 年) 报道的 51 ku 天门冬氨酸蛋白酶^[10]; 58 ku 蛋白酶可能是 Kuwabara 等^[11] (1997 年) 报道的 60 ku 多酚氧化酶。对于 34、68 ku 蛋白酶, 迄今未见报道, 我们将进行分离纯化和进一步研究。

使用本方法时应注意以下问题: a. 明胶需临用前新鲜配制; b. 明胶的用量要根据蛋白酶活性大小选择, 不宜使用过大的浓度; c. 电泳应该在

较低温度 (4~10℃) 中进行; d. 根据 gelatin-SDS-PAGE 测定蛋白质分子质量仅供参考, 因为凝胶中加有明胶可能对蛋白质的电泳行为有影响^[12]。最近, 使用此方法, 我们对菠菜 PS II 颗粒的 1 mol/L NaCl 抽提液中的蛋白酶, 进行了还原剂、离子强度、抑制剂和 pH 的研究, 均取得了预期的结果。

参 考 文 献

- 1 Popovic T, Kidrie M, Puizdar V, *et al.* Purification and characterization of two cysteine proteinases from *Phaseolus vulgaris* leaves. *Plant Physiol Biochem*, 1998, **36** (9): 637~645
- 2 杜林方, 张立新, 梁厚果. 与光系统 II 颗粒结合的蛋白酶的初步分析. *科学通报*, 1993, **38** (15): 1408~1411
Du L F, Zhang L X, Liang H G. *Chinese Science Bulletin*, 1993, **38** (15): 1408~1411
- 3 Kuwabara T, Murata N, Miyao M, *et al.* Partial degradation of the 18 ku protein of the photosynthetic oxygen-evolving complex: a study of a binding site. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **850**: 146~155
- 4 Kuwabara T, Suzuki K. Reversible changes in conformation of the 23 ku protein of photosystem II and their relationship to the susceptibility of the protein to a proteinase from photosystem II membranes. *Plant Cell Physiol*, 1995, **36** (3): 495~504
- 5 Kuwabara T, Yoshiaki H. Purification of a dithiothreitol-sensitive tetrameric protease from spinach PS II membranes. *Plant Cell Physiol*, 1990, **31** (5): 581~589
- 6 Kuwabara T, Suzuki K. A prolyl endoprotease that acts specifically on the extrinsic 18 ku protein of photosystem II: purification and further characterization. *Plant Cell Physiol*, 1995, **35** (4): 665~675
- 7 杜林方, 张立新, 林宏辉, 等. 与光系统 II 颗粒结合的对 DTT 敏感的蛋白酶的纯化和性质. *生物化学与生物物理学报*, 1996, **28** (1): 77~82
Du L F, Zhang L X, Lin H H, *et al.* Purification and properties of a DTT-sensitive protease associated with photosystem II particles. *Acta Biochim Biophys Sinica*, 1996, **28** (1): 77~82
- 8 郑洪武, 张 文, 杜林方, 等. 与光系统 II 结合的蛋白酶的进一步分析. *四川大学学报 (自然科学版)*, 1997, **34** (2): 245~248
Zhang H W, Zhang W, Du L F, *et al.* Further analysis of proteases associated with photosystem II particles. *J Sichuan University (Natural Science Edition)*, 1997, **34** (2): 245~248
- 9 Adam Z. Protein stability and degradation in chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 1996, **32**: 773~783
- 10 Sokolenko A, Altschmied L, Herrmann R G. Sodium dodecyl sulfate-stable proteases in chloroplasts. *Plant Physiol*, 1997, **115**: 827~832
- 11 Kuwabara T, Masuda T, Aizawa S. A dithiothreitol-sensitive tetrameric protease from spinach thylakoids has polyphenol oxidase activity. *Plant Cell Physiol*, 1997, **38** (2): 179~187
- 12 Jiang B W, Lers A, Lomanec E, *et al.* Senescence-related serine protease in parsley. *Phytochemistry*, 1999, **50**: 377~382

A Native-staining Method for Detecting The Proteases of Plant Photosystem II^{*}

ZHOU Hao, DU Lin-Fang^{**}, ZHU Xiao-Feng

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

Abstract In order to detect the proteases in the 1 mol/L NaCl extract of plant PS II particles and its 1 mol/L NaCl extract, gelatin-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was used. Six proteases with molecular mass of 34, 37, 50, 54, 58 and 68 ku were detected. Influence of reducer and ion strength on the activity of proteases was analyzed preliminary. The new approach is convenient and highly sensitive for separation and detection of proteases at the same time.

Key words PS II particle, native-staining, gelatin, extrinsic protease

^{*} This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39770071) and The Youth Science and Technology Foundation of Sichuan Province.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-28-85410356, E-mail: dulinfang@yahoo.com

Received: December 17, 2001 Accepted: March 1, 2002