

## 玉米精细胞质膜特异蛋白的纯化\*

杨中汉 张一洪 曹宗巽

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

**摘要** 在获得 6 个品种的玉米 (*Zea mays* L.) 花粉精细胞后, 采用 N-hydroxysuccinimido-biotin (NHS-biotin) 标记其外膜蛋白, 并通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 对比了其中主要标记蛋白, 发现其主要蛋白带差异并不显著, 主要标记蛋白分子量均集中于 91、60、43、30 和 17 kD。采用免疫亲和层析技术进一步纯化已获得的混杂少量其它细胞器成分的精细胞质膜制剂, 即利用制备的体细胞主要细胞器: 线粒体、内质网、高尔基体及质膜的膜蛋白, 分别免疫豚鼠, 从其抗血清中纯化获得 IgG, 并进一步制成各种膜蛋白的免疫亲和吸附剂。利用此技术进一步纯化经 NHS-biotin 标记的精细胞质膜蛋白, 获得精细胞质膜特异的蛋白质, 其中最为显著的蛋白质分子量约为 65、22 kD。

**关键词** 玉米, 精细胞质膜特异蛋白, 免疫亲和吸附, NHS-生物素, Western blotting

## PURIFICATION OF THE SPECIFIC PLASMA MEMBRANE PROTEINS FROM THE SURFACE OF SPERM CELLS OF *ZEA MAYS*

Yang Zhong-han, Zhang Yi-hong and Cao Zong-xun (Tsao T H)

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** Pollen samples of 6 varieties of *Zea mays* L. were used to isolate the viable sperm cells. After being probed with N-hydroxysuccinimido-biotin (NHS-biotin), the sperm cell plasma membrane proteins were compared with each other using the method of Western blotting. Results showed that there was no significant difference among varieties. The molecular weights of probed plasma membrane proteins were concentrated on 91, 60, 43, 30 and 17 kD. Immunochemical method was adopted for further purification of sperm plasma membrane protein preparation which was somewhat contaminated with cell organelles. After the cell organelles were isolated from etiolated seedlings of *Zea mays* by sucrose density gradient super centrifugation, the crude membrane proteins of organelles, endoplasm reticulum, mitochondria, Golgi body and plasmolemma were respectively used as antigen to immunize Guinea pig. The antibody was obtained from respective antiserum, then further used to produce immuno-affinity absorbent. After the solution of membrane proteins of sperm cells passed through the column, some proteins probed with NHS-biotin were identified. Two major proteins probed with NHS-biotin were considered to be sperm cell specific. The size of these proteins in SDS-PAGE was about 65 kD, 22 kD, respectively.

**Key words** *Zea mays*, Plasma membrane protein of sperm cells, Immuno-affinity chromatography, N-hydroxysuccinimido-biotin, Western blotting

收稿日期: 1995-12-23 接受日期: 1996-08-16

\* 国家自然科学基金“八五”重大项目资助。

植物精细胞质膜特异蛋白的研究对揭示雌雄配子的识别和高等植物双受精过程的奥秘有重要意义。前文报道玉米精细胞的大量分离已获成功<sup>[1]</sup>,用蔗糖密度梯度离心法制备了玉米精细胞质膜,并对其膜蛋白进行了初步分析<sup>[2]</sup>。用 NHS-生物素(N-hydroxysuccinimido-biotin)标记法对玉米精细胞及体细胞原生质体膜蛋白作了比较<sup>[3]</sup>。玉米栽培品种之间精细胞质膜是否存在差异? 本文用 NHS-生物素标记了 6 个玉米品种精细胞,对其质膜蛋白作了比较。前文已报道<sup>[2]</sup>在精细胞质膜的制备中,用标记酶实验对精细胞质膜蛋白的纯度进行了检测,发现其中混杂有一定数量的线粒体等成分。本文采用免疫化学方法进一步纯化上述精细胞质膜蛋白制剂,将精细胞质膜蛋白通过免疫亲和柱除去细胞器膜蛋白,用生物素标记的精细胞质膜蛋白经免疫亲和柱纯化后,获得精细胞质膜特异蛋白。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

玉米 (*Zea mays* L.) 花粉采自东北旺农场生产地。玉米品种:“科多 6 号”、“E8085”、“E005”、“农大 60”、“京杂 6 号”和“掖单 3 号”,由中国科学院遗传研究所提供。花粉收集方法同文献<sup>[1]</sup>。

### 1.2 精细胞的分离纯化

同文献<sup>[1]</sup>。

### 1.3 精细胞质膜的分离及膜蛋白的提取、电泳分析

同文献<sup>[2]</sup>。

### 1.4 NHS-biotin 标记精细胞质膜蛋白

同文献<sup>[3]</sup>。

### 1.5 细胞器膜蛋白的制备及其抗体的获得

1.5.1 线粒体、高尔基体、内质网、质膜蛋白的制备 同文献<sup>[2]</sup>。

1.5.2 细胞器膜蛋白抗体的制备 福氏佐剂与等量抗原液(200 mg/0.5 L)充分乳化,(福氏佐剂含卡介苗 0.5 g/L)分别注射豚鼠两侧腹腔。每周 1 次,第一次用完全佐剂,以后用不完全佐剂,4 周后静脉取血用 ELISA 检测效价,效价符合要求后加强免疫 1 次,5 d 后颈动脉放血。血清用硫酸铵沉淀和 DEAE-纤维素进一步纯化,获得抗各细胞器膜蛋白的 IgG<sup>[4]</sup>。

1.5.3 免疫亲和吸附剂的制备及其效率检测 Sepharose 4B 的活化与偶联参照 Kohn 和 Wilchek<sup>[5]</sup>的方法。吸附剂偶联效率的检测按杨中汉和陈良甫<sup>[4]</sup>的方法。吸附剂加 0.02% NaN<sub>3</sub>, 4 °C 保存。

1.5.4 免疫亲和柱吸附特性的测定 取 1 mL 吸附剂凝胶,装入 1 mL 注射器,注射器前端用尼龙绸垫片防止胶漏出。用 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)平衡免疫亲和柱。细胞器膜蛋白浓度为 1 g/L,上样 0.3 mL,将样品吸附于柱上,4 °C 保持过夜,使样品充分被吸附,然后用 5~10 倍柱体积的 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗脱杂蛋白。用 0.1 mol/L HCl-Gly (pH 2.8)缓冲液洗脱柱上与配基结合的蛋白,并立即用 0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 中和和洗脱液。用冷丙酮沉淀蛋白,用作电泳分析。免疫柱再生用 3 倍体积的 0.1 mol/L HCl-Gly (pH





### 3 讨 论

细胞识别首先是细胞表面的事件,大多数情况下它是由存在于细胞质膜的糖蛋白所介导的<sup>[6]</sup>。植物精、卵细胞的识别在启动植物有性生殖过程中具有决定性的意义。精细胞质膜蛋白的分离纯化为研究此过程打下基础。

Blomstedt 等<sup>[7]</sup>将生物素标记方法引入生殖细胞质膜蛋白的标记。我们的实验也证明这是一种相当有效的方法。利用该法我们对比了一系列栽培玉米品种的标记质膜蛋白,发现比较显著条带为 91、60、43、30、17 kD。主要条带在这系列玉米品种中差异并不显著。基于玉米品种间可相互杂交的事实,可以认为,在这些蛋白中,存在起识别作用的功能蛋白。

标记酶实验结果证明在我们制备的精细胞质膜蛋白样品中,含有少量线粒体膜蛋白成分,同时质膜及其它细胞器膜上的许多同源的结构蛋白也存在。如何排除这些物质的干扰?我们通过免疫亲和层析的方法在最大可能范围内,将精细胞特异膜蛋白的筛选范围降低到最小。再结合生物素标记精细胞质膜蛋白<sup>[8]</sup>,被标记蛋白性质稳定,标记信号检测方便,可以用 SDS-PAGE 及 Western blotting 加以检出。在通过免疫亲和柱后的膜蛋白条带中,虽然其量极微,但经富集后其中 2 条(65、22 kD)较为明显。这些蛋白应是精细胞质膜所特有的并与其功能相关。这为进一步制备这些蛋白带的特异抗体,研究其生理功能打下基础。

### 参 考 文 献

- 1 杨中汉,张一洪,曹宗巽. 从三核型玉米花粉中大量分离制备生活精细胞. 科学通报, 1994. 39:1226 ~ 1228
- 2 张一洪,杨中汉,曹宗巽. 玉米精细胞质膜的制备及膜蛋白的初步分析. 科学通报, 1995. 40:179 ~ 181
- 3 陈苹,杨中汉,曹宗巽. 玉米精细胞及体细胞原生质体表膜蛋白的比较. 植物学报, 1995. 37:697 ~ 703
- 4 杨中汉,陈良甫. 纯化测定植物中细胞分裂素的免疫亲和法和酶联免疫法. 植物生理学通讯. 1993. 29:56 ~ 59
- 5 Kohn J, Wilchek M. A new approach( cyanotrifer) for cyanogen bromide activation of sepharose at neutral pH, which yields activated resins, free of interfering nitrogen derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982. 107:878 ~ 884
- 6 Knox R B, Southworth D A, Singh M B. Sperm cell determinants and control mechanism of fertilization in plant. In: Chapman G P, Ainsworth C C, Chatham C eds., *Eukaryotic Cell Recognition*. Cambridge: Camb Univ Press, 1988. 175 ~ 193
- 7 Blomstedt C K, Hu H-L, Singh M B *et al*. The isolation and purification of surface specific proteins of somatic and reproductive protoplasts of lily and rapeseed. *Physiol Plant*, 1992. 85:396 ~ 402
- 8 Grimes H D, Slay R M, Holges T K. Plant plasma membrane protein. II biotinylation of *Daucus carota* protoplasts and detection of plasma membrane polypeptides after SDS-PAGE. *Plant Physiol*, 1988. 86:444 ~ 449