

香石竹花瓣中乙烯诱导的 70 kD 蛋白的分离纯化

姜微波^①

(食品科学系)

Purification of the Ethylene Induced 70 kD Protein from Carnation Petal

Jiang Weibo

(Dept. of Food Science)

广泛的研究表明乙烯在许多花卉衰老和一些水果的成熟过程中起重要作用,充分的证据显示乙烯诱导的花瓣反应依赖于新的蛋白质合成。深入研究那些与乙烯反应相关的蛋白质将了解乙烯作用的机理、控制乙烯作用奠定基础。在不同的植物器官中,一些乙烯诱导的蛋白已被鉴定出来。我们曾发表了由香石竹花瓣中鉴定出乙烯诱导的 70 kD 蛋白。本文报道对乙烯诱导的 70 kD 蛋白的更深入的研究结果。

香石竹花朵刚刚完全开放时采收。花枝(5 cm)置于去离子水中,在气调处理箱内进行乙烯处理或对照处理(25℃恒温)。采用 Harlow and Lane 的硫酸铵沉淀法初步纯化 70 kD 蛋白的抗体,并制备成 sepharose affinity column。含有 70 kD 蛋白质的 gel filtration 样品经冷冻浓缩、将其蛋白质含量调整为 2 mg/mL。取 10 mL 此样品放入由 70 kD 蛋白抗体制成的 Sepharose Affinity Column,在 2℃下置于摇床上 6 h。然后用 100 mL 的清洗缓冲液(100 mmol Glycine-HCl, pH5)洗脱未被吸附的蛋白质及杂质。最后用 20 mL 洗脱缓冲液(100 mmol Glycine-HCl, pH2.5)将 Sepharose Affinity Column 中蛋白洗脱,采集洗脱样品备用。蛋白质凝胶电泳分析采用 Laemmli 的 PAGE 方法。蛋白质等电点的确定按 Garfin 等电点聚焦电泳(Iso-Electric Focusing)方法进行。

利用由 70 kD 蛋白抗体制成的 Affinity Column 进一步分离纯化 70 kD 蛋白。如 PAGE 分析结果显示,采集的洗脱样品中只含有一条 70 kD 蛋白带,表明最终获得了高纯度的、活性 70 kD 蛋白样品。我们曾经用凝胶过滤分离法粗略测定出活性 70 kD 蛋白的分子量在 65~85 kD 之间。综合分析这两种方法测定的结果可以确定,乙烯诱导合成的活性 70 kD 蛋白是由单一肽链构成。

通过等电点聚焦电泳(Iso-Electric Focusing)分析由 Affinity Column 分离纯化的 70 kD 蛋白样品,测得活性 70 kD 蛋白的等电点为 pH7.9。

综上所述,利用由 70 kD 蛋白抗体制成的 Affinity Column 可分离出高纯度的活性 70 kD 蛋白。并进一步确定活性 70 kD 蛋白是由单一肽链构成,这种蛋白的等电点为 pH7.9。

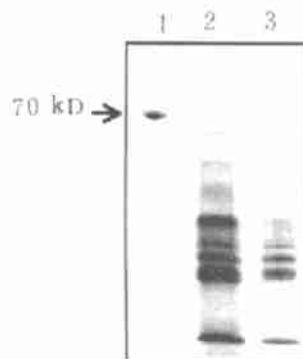


图 1 PAGE 分析纯化的 70 kD 蛋白

泳带 1=纯化后的 70 kD 蛋白样品
泳带 2=鲜花瓣的粗提蛋白样品
泳带 3=乙烯处理(10 μL/L, 12 h)的花瓣蛋白粗提样品

收稿日期: 1997-02-26

①姜微波,北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区),100094