

文章编号: 1000-0240(2001)04-0342-04

天山寒区冰缘植物珠芽蓼叶片抗冻蛋白的发现

祭美菊^{1,2}, 安黎哲^{1,2*}, 陈 拓^{1,2}, 刘艳红²
冯虎元^{1,2}, 刘光¹, 程国栋¹

(1. 中国科学院 寒区旱区环境与工程研究所冻土工程国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

2. 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 以生长在天山海拔 3 450 m 处的珠芽蓼 (*Polygonum viviparum*) 为实验材料, 从叶片中提取质外体蛋白. 经 SDS-PAGE 分析, 发现在分子量为 15.2~72.3 kD 范围内出现七条多肽, PAS 染色显示这些多肽中均含有糖基. 通过光镜组织切片显示, 在珠芽蓼叶片细胞的质外体中存在丰富的蛋白质, PAS 染色确定其含有糖蛋白. 通过测定其热滞值, 进一步确定质外体蛋白是具有抗冻活性的糖蛋白, 说明抗冻蛋白是维持珠芽蓼抗冻性的重要物质基础.

关键词: 天山; 冰缘植物; 珠芽蓼; 抗冻蛋白; 热滞值

中图分类号: Q946.1 **文献标识码:** A

抗冻蛋白 (antifreeze proteins, AFPs) 从 20 世纪 60 年代被发现以来, 先后引起国内外许多科学家的研究兴趣, 研究对象先后从极区鱼到昆虫. 对植物 AFPs 的研究起步较晚, Giffth *et al.*^[1] 在 1992 年首先在冬黑麦中发现了 AFP, 第一次明确提出获得内生 AFP. 由于 AFPs 具有特殊的性质, 即降低溶液的冰点而对溶点影响甚微, 对 AFPs 的研究具有重要的科学意义和应用价值, 同时为进一步通过基因工程手段提高冷敏感植物的抗冻性提供理论依据.

寒区是一个多因子的综合胁迫体系, 随着海拔的升高, 生存环境对植物的生长越来越不利, 其中低温是影响高山植物分布和生存的重要因子. 严酷的高山环境塑造了特殊的基因型, 可以认为冰缘植物可能是很好的抗冻基因库^[2]. 位于天山中段的乌鲁木齐河源区, 自末次冰期以来经历了多次冰川作用, 从海拔 3 820 m 的现代冰川末端至海拔 3 000 m 的望峰之间新老冰碛绵延 12 km, 是进行高山冰川、冻土、寒区高山地理研究的理想场所, 该区气象、水文、地理等生态条件的研究较为丰富^[3,4]. 对天山寒区冰缘植物的研究尚少, 因而存在有大片余地

有待研究. 本文以天山广布的典型植物珠芽蓼 (*Polygonum viviparum*) (生长海拔为 3 450 m) 叶片为材料, 研究珠芽蓼叶片中提取的抗冻蛋白, 为探讨寒区冰缘植物特殊的抗冻机制提供一定的理论依据.

1 材料和方法

1.1 实验材料

珠芽蓼采自天山中段乌鲁木齐河源海拔 3 450 m 处. 乌鲁木齐河地处新疆天山中部, 地理位置 43° 01' 20"~43° 22' 35" N, 86° 47' 40"~87° 47' 45" E, 流域面积约 924 km². 该地区平均气温为 - 5.5 °C, 气温年温差为 35.9 °C, 植物生长期的 6~9 月间均温为 - 4.7 °C. 乌鲁木齐河源区高寒冰缘植物种类简单, 草本植物在本区占绝对优势, 主要由草本植物组成的高山草甸和高山垫状植物. 群落结构简单, 植物的生态适应特征属于抗性特征^[5]. 植物随海拔升高, 植株变小. 冰缘植物生长缓慢, 在较短的生长期中, 常常伴有霜冻、冰雹、大雪和大风天气, 然而植物生长发育良好.

收稿日期: 2001-08-28; 修订日期: 2001-09-20

基金项目: 中国科学院“百人计划”项目; 中国博士后科学基金; 中国科学院天山冰川观测试验站基金资助

作者简介: 祭美菊 (1976—), 女, 山东烟台人, 现为东南大学生命科学学院博士研究生, 主要从事分子生物学和基因芯片方面的研究工作. E-mail: admin@163.com

*通讯联系人

1.2 实验方法

1.2.1 质外体蛋白的提取

参照 Hon *et al.*^[6] 方法.

1.2.2 蛋白含量测定

膜蛋白含量用 Brandford 法^[7]测定,用牛血清蛋白作标准曲线.

1.2.3 抗冻蛋白抗冻活性的测定

用显微镜观察冰晶消长法测定,参照 Devris^[8]的方法.

1.2.4 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳分析及糖蛋白的显示

SDS-PAGE 分析蛋白成分,按 Laemmle^[9]的方法.分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 5%.采用 Pharmacia 生产的低分子量标准蛋白作标准,糖蛋白的显示参考 Glossman *et al.* 的方法.

1.2.5 珠芽蓼叶片组织细胞蛋白质的定位

叶片在 FAA 固定液固定,按常规方法制作石蜡切片.以 1%考马斯亮蓝 R-250 染色显示全蛋白,用 PAS 反应显示多糖.

1.2.6 抗冻蛋白中糖基作用的检测及蛋白酶处理

参照卢存福等^[11]的方法.蛋白质提取液分别用蛋白酶 K(1 mg mL⁻¹)、高碘酸钠为 50 mmol L⁻¹

的乙酸钠溶液和 150 mmol L⁻¹硼酸钠处理,测定 AFP 活性变化.

2 结果

2.1 珠芽蓼叶片质外体蛋白的 SDS-PAGE 图谱

将所得的蛋白质进行 SDS-PAGE 分析.电泳胶板经考马斯亮蓝染色,可得到分子量分别为 72.3kD、61.3kD、44.5kD、40.7kD、33.7kD、20.8kD 和 15.2kD 七条谱带(图 1a).PAS 染色显示多肽中含有糖基(图 1b).从图 1b 可以看到 PAS 染色的多肽谱带不清晰,说明糖基在多肽中含量很少,但经 PAS 染色后的湿电泳胶板在 X 光箱上仍可观察到同考马斯亮蓝染色对应的多肽谱带.

2.2 珠芽蓼叶片组织细胞蛋白质定位的观察

石蜡切片经考马斯亮蓝染色后,在光镜下可观察到丰富的蛋白质细胞,细胞间隙中也能观察到蛋白质的分布.经 PAS 染色后表明在叶片细胞间隙中也有糖蛋白存在(图版 Ia、b).

2.3 珠芽蓼叶片组织质外体蛋白的抗冻活性测定

冰点和溶点的差值称为热滞值(thermal hysteresis activity),以热滞值大小表示蛋白质的抗冻活性.如表 1 所示,浓度为 7.8 mg mL⁻¹质外体蛋白,热滞值可达 0.3.但是去离子水及 5 mg mL⁻¹的蛋白酶 K 溶液均不表现抗冻活性,这说明质外体蛋白是一种特殊的蛋白质——抗冻蛋白.

表 1 珠芽蓼叶片组织质外体蛋白的热滞活性(热滞值)

Table 1 Thermal hysteresis activity of proteins from leaf apoplast of <i>Polygonum viviparum</i>		
物 质	蛋白浓度/(mg mL ⁻¹)	热滞值/℃
去离子水	0.0	0.00 ±0.00
蛋白酶 K	5.0	0.00 ±0.00
叶片质外体蛋白	7.8	0.30 ±0.02

表 2 各种处理对抗冻蛋白抗冻活性的影响

Table 2 Effects of various treatments on thermal hysteresis activity of leaf apoplast of <i>Polygonum viviparum</i>		
蛋 白	处 理	热滞值/℃
叶片质外体蛋白 (7.8 mg mL ⁻¹)	对照	0.30 ±0.02
	煮沸	0.00 ±0.00
	蛋白酶 K	0.00 ±0.00
	硼酸	0.00 ±0.00
	高碘酸	0.00 ±0.00

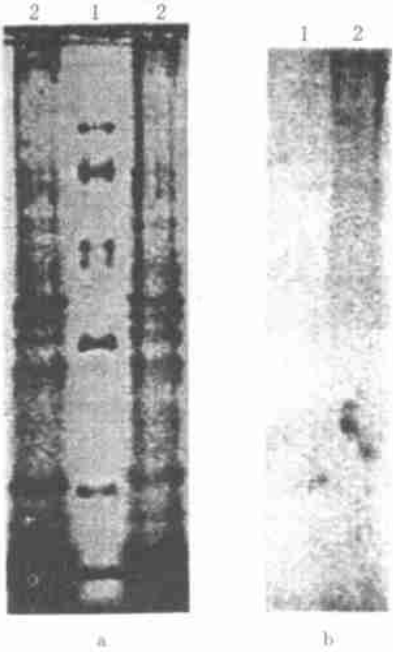


图 1 珠芽蓼叶片质外体蛋白 SDS-PAGE 图谱
Fig. 1 SDS-PAGE of the apoplastic protein in leaves of *Polygonum viviparum*

a. The gel was stained with coomassie brilliant blue;
b. The gel was stained with PAS. Lane1: Marker;
Lane2: apoplastic protein

2.4 AFP 糖基的检测

对 AFP 作了沸水处理、蛋白酶 K 水解、高碘酸氧化处理及硼酸钠处理(表 2), 发现质外体蛋白的抗冻活性均消失. 证明了所获得抗冻蛋白的蛋白质性质并且糖基的含量虽少但对维持抗冻蛋白的活性方面是很必要的.

3 讨论

冰缘植物在其生长季节内一方面要快速生长, 另一方面又要抵抗长期的冰冻胁迫侵袭. 长期的低温环境压力, 塑造了冰缘植物特殊的抗冻机制^[2]. Griffith 发现经低温锻炼的冬黑麦中存在 AFP^[1]. 费云标等在沙叶冬青中发现 AFP 的存在^[12]; 卢存福在培养的红景天悬浮细胞中发现了 AFP 的存在^[13]; 本研究发现冰缘植物珠芽蓼叶片内也存在 AFP. 这一发现进一步证实了 AFP 在抗冻植物中是普遍存在的这一早期推测.

从叶片组织细胞蛋白质定位的观察发现, 珠芽蓼叶片组织细胞间隙也存在糖蛋白. Jian Lingcheng *et al.*^[14] 在低温锻炼的小麦间隙及细胞内也观察到这种糖蛋白的存在. 因此可以推测这种糖蛋白可能起着 AFP 作用, 形成一层保护性屏障, 避免细胞内结冰的伤害.

AFP 是维持珠芽蓼抗冻性的主要物质. 抗冻生物避免冰冻伤害必须满足两个条件: 1) 冰必须在胞外形成; 2) 冰晶的大小及形状要受到控制^[15, 16]. AFP 在植物中具有两个方面的作用: 既能降低溶液的冰点, 也能够降低冰晶的形成速率, 从而使结冰伤害降低到最小程度^[15]. Wei Linbo *et al.*^[15] 研究沙叶冬青时发现, AFP 没有组织表达特异性, 在沙冬青根、茎和叶片中普遍存在, 它们是普遍存在的抗冻剂. 本研究在珠芽蓼的叶片中也发现了 AFP 的存在, 说明 AFP 对保证冰缘植物珠芽蓼的抗冻能力是至关重要的.

参考文献(References):

- [1] Griffith M, Ala P, Yang D S. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves [J]. *Plant Physiology*, 1992, **100**: 593 - 596.
- [2] Lu Cunfu, Fen Guiyin. Characteristics of photosynthesis in alpine plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany* 1995, **12**: 38 - 42. [卢存福, 费桂英. 高山植物光合特性[J]. *植物学通报*, 1995, **12**: 38 - 42.]
- [3] Cheng Guodong. Glaciology and geocryology of China the past 40 years progress and prospect [J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 1999, **21**(4): 289 - 309.
- [4] Li Zhongqin, Ye Baisheng, Zhang Mingjun. Ten years of progress in Tianshan Glaciological Station of China[J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 1999, **21**(4): 326 - 335.
- [5] An Lizhe, Liu Yanhong, Feng Guoning, *et al.* Studies on ecological properties of altifrigetic subnival vegetation at the source area of Irünqi River [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2000, **20**(1): 98 - 105. [安黎哲, 刘艳红, 冯国宁, 等. 乌鲁木齐河源区高寒冰缘植被的生态特征研究[J]. *西北植物学报*, 2000, **20**(1): 98 - 105.]
- [6] Hon W, Griffith M, Chong P, *et al.* Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves [J]. *Plant Physiology*, 1994, **104**: 971 - 980.
- [7] Brandford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing: the principle of protein-dye binding [J]. *Annual Biochemistry*, 1976, **72**(2): 248 - 254.
- [8] Deveris A L. Antifreeze glycopeptides: Interaction with ice and water [J]. *Method of Enzymology*, 1986, **127**: 293 - 303.
- [9] Laemmle U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, **227**: 680 - 685.
- [10] Gossman H, Neville D M. Glycoproteins of cell surfaces [J]. *J. Biological Chemistry*, 1971, **246**(20): 6 339 - 6 346.
- [11] Lu Cunfu, Jian Lingcheng, Kuang Tingyun. Secretory antifreeze proteins produced in suspension culture cell of *Rhodiola algida* Var. *tangutica* during cold acclimation [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000, **27**(5): 555 - 559. [卢存福, 简令成, 匡廷云. 低温诱导唐古特红景天细胞分泌抗冻蛋白[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27**(5): 555 - 559.]
- [12] Fei Eunbiao, Sun Longhua, Huang Tao. Isolation and identification of antifreeze with activity in *Ammopiptanthus Mongolians* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1994, **36**(8): 649 - 650. [费云标, 孙龙华, 黄涛, 等. 沙冬青高活性抗冻蛋白的发现[J]. *植物学报*, 1994, **36**(8): 649 - 650.]
- [13] Gay C L, Niemi K J, Brambl R. Altered gene expression during cold acclimation of spinach [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1992, **81**: 3 673 - 3 677.
- [14] Jian Lingcheng, Sun Longhua, Shi Guoshung. Electron microscope cytochemical studies on the glycoproteins in cellular membrane of winter wheat seedlings with concanavalin a horseradish peroxidase method [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1999, **36**(8): 649 - 450.
- [15] Wei Linbo, Jiang Yong, Shu Nianhong, *et al.* Purification and identification of antifreeze proteins from the leaves of *Ammopiptanthus mongolicus* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1999, **41**(7): 677 - 685.
- [16] Lu Cunfu, Wang Hong, Jian Lingcheng. Research progress of antifreeze proteins [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1998, **25**(3): 210 - 216. [卢存福, 王红, 简令成. 抗冻蛋白研究进展[J]. *生物化学和生物物理进展*, 1998, **25**(3): 210 - 216.]

Isolation and Identification of the Antifreeze Proteins in *Polygonum viviparum* of Altifrigetic Subnival Plants in the Tianshan Mountains

J I Mei-ju^{1,2}, AN Li-zhe^{1,2}, CHEN Tuo^{1,2}, LIU Yan-hong²

FENG Hu-yuan^{1,2}, LIU Guang-xiu¹, CHENG Guo-dong¹

(1. State Key Laboratory of Frozen Soil Engineering, CAREERI, CAS, Lanzhou Gansu 730000, China;

2. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou Gansu, 730000, China)

Abstract: The altifrigetic subnival plants and eco-environmental conditions at the headwaters of the Fújūnqí River, Tianshan mountains, China were investigated. The adaptive mechanisms of typical altifrigetic subnival plants to alpine environment in the Tianshan Mountains were studied in this paper. Antifreeze proteins were isolated and identified in the leaves of *Polygonum viviparum* by the methods of physiology and biochemistry. Thermal hysteresis activity was discovered in leaf apoplastic proteins of *Polygonum viviparum* (3 450 m), which was composed of 7 polypeptides (72.3kD、61.3kD、44.5kD、40.7kD、33.7kD、20.8kD and 15.2kD). PAS reactions showed

that the presence of carbohydrate in the polypeptides. The photomicroscope observation indicated that cells with high proteins and polysaccharide contents could be found in leaves tissues. Apoplastic proteins from leaves exhibited antifreeze activity. AFPs were inactivated by the treatments of boiling, proteinase K, periodate and borate caused, suggesting the presence of carbohydrate. The results showed that *Polygonum viviparum* plants produce AFPs to adapt the special geographical environments, such as low temperature, low concentration of O₂ and CO₂, strong ultraviolet radiation and wind.

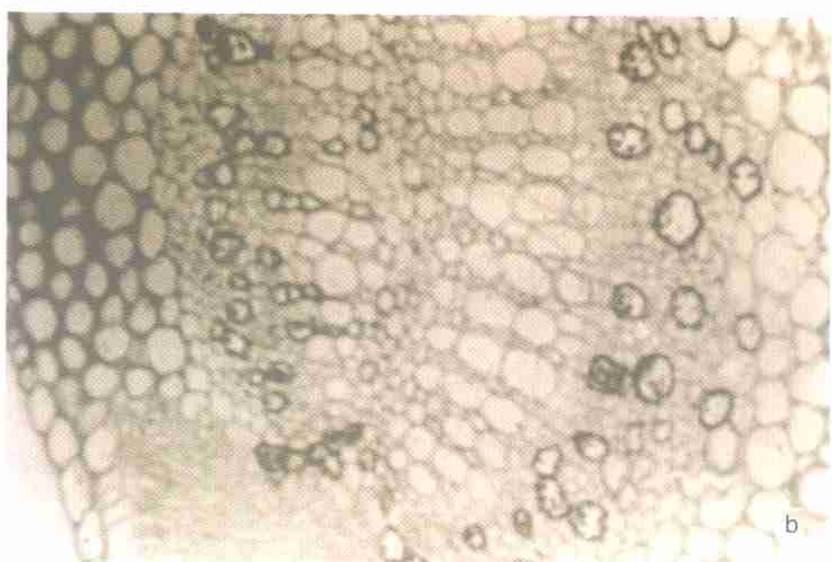
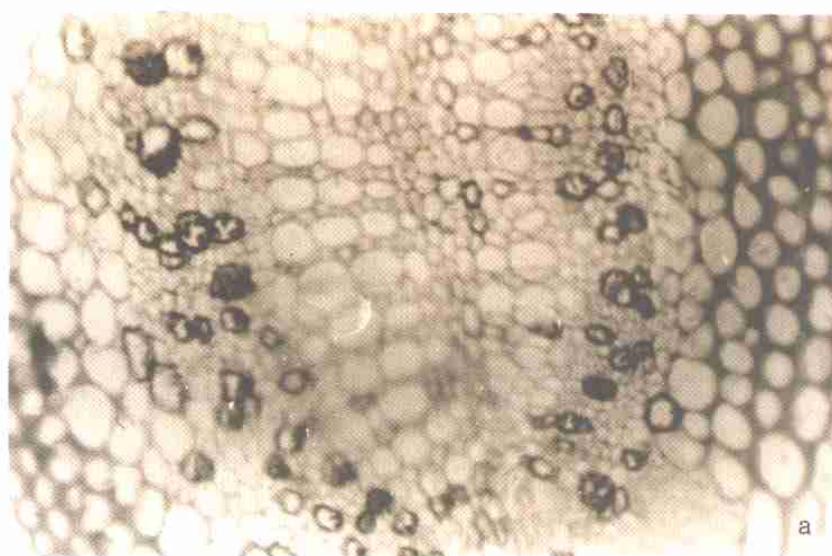
Key words: Tianshan Mountains; *Polygonum viviparum*; antifreeze proteins; subnival plant; thermal hysteresis activity

祭美菊, 安黎哲, 陈 拓, 等: 天山寒区冰缘植物珠芽蓼叶片抗冻蛋白的发现

Ji Meiju, AN Lizhe, CHEN Tuo, *et al.* Isolation and identification of the antifreeze proteins in *Polygonum viviparum* of altifrigetic subnival plants in the Tianshan Mountains

图版 I

Plate I



×200 珠芽蓼 (*Polygonum viviparum*) 叶片纵剖面图

a. PAS 染色; b. 考马斯亮蓝染色

×200 cross sections of the leaf of *Polygonum viviparum*