

# 利用固定化木聚糖酶分离小麦木聚糖酶抑制蛋白的研究

刘新育, 张贝贝, 李学琴, 陈红歌\*

(河南农业大学 生命科学学院 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 根据木聚糖酶与木聚糖酶抑制蛋白之间的特异性结合作用, 采用固定化木聚糖酶在不同 pH 值、温度和时间下对小麦籽粒粗蛋白提取液中的木聚糖酶抑制蛋白进行亲和吸附, 并通过改变 pH 值对木聚糖酶-木聚糖酶抑制蛋白复合物进行解吸研究, 以期对木聚糖酶抑制蛋白的获得提供一个较好的新方法。结果表明, 固定化木聚糖酶与木聚糖酶抑制蛋白的最佳吸附条件为: 小麦籽粒粗蛋白提取液 pH 值 6.5、反应温度 30 °C、反应时间 50 min; 固定化木聚糖酶-木聚糖酶抑制蛋白复合物的最佳解吸条件为: 巴比妥钠-盐酸缓冲液 pH 值 8.5。

**关键词:** 木聚糖酶; 木聚糖酶抑制蛋白; 小麦; 亲和层析

**中图分类号:** S432.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2013)08-0146-04

## Separation of Xylanase Inhibitor Protein from Wheat Seeds Using Immobilised Xylanase

LIU Xin-yu, ZHANG Bei-bei, LI Xue-qin, CHEN Hong-ge\*

(Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Based on the special interaction between xylanase and xylanase inhibitor protein, inhibitor protein was purified from the protein crude extract of wheat seeds using affinity chromatography with immobilized xylanase under the conditions of different pH values, temperatures and times. Subsequently, the desorption experiment of enzyme-inhibitor complex was carried out under different pH values. The results showed that the optimum adsorption pH value was 6.5, temperature was 30 °C, time was 50 min; the optimum desorption pH value was 8.5. Purification of inhibitor protein using affinity chromatography with immobilized xylanase is a better new method.

**Key words:** xylanase; xylanase inhibitor protein; wheat; affinity chromatography

植物病原真菌在侵染植物叶片的过程中, 其细胞壁降解酶是重要的致病因子和植物防卫反应的激发子<sup>[1-2]</sup>。小麦纹枯病菌等在侵染叶鞘组织过程中, 分泌纤维素酶、木聚糖酶和果胶酶等细胞壁降解酶类, 以分解、软化寄主细胞壁, 从而有利于病菌的侵染和扩展<sup>[3]</sup>; 腐烂病菌侵染致病过程中产生活性极强的木聚糖酶, 且酶活性与菌株致病力存在显著相

关性, 研究发现, 寄主的抗病性与其抑制木聚糖酶活性的能力呈正相关<sup>[4]</sup>。1997 年 Debyser 等<sup>[5]</sup>首次发现小麦中存在木聚糖酶抑制蛋白。木聚糖酶抑制蛋白在小麦根、茎、叶片和籽粒中都存在, 其中以籽粒中含量最高<sup>[6]</sup>。至今, 已从小麦中分离纯化出 3 类木聚糖酶抑制蛋白, 即 TAXI (*Triticum aestivum* xylanase inhibitor)<sup>[7]</sup>、XIP (xylanase inhibitor

收稿日期: 2013-02-04

基金项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目(12A180013)

作者简介: 刘新育(1976-), 男, 河南延津人, 在读博士研究生, 研究方向: 微生物酶学。E-mail: liuxinyu@henau.edu.cn

\* 通讯作者: 陈红歌(1967-), 女, 河南许昌人, 教授, 博士, 主要从事微生物酶学方面的研究。E-mail: honggeyz@163.com

protein)<sup>[8]</sup>和 TLXI (thaumatin-like xylanase inhibitor)<sup>[9]</sup>。近几年,发现木聚糖酶抑制蛋白在小麦、玉米、水稻、大麦、黑麦、燕麦和高粱中广泛存在。许多研究表明,木聚糖酶抑制蛋白通过阻止病原微生物木聚糖酶的水解作用而参与植物防御反应<sup>[10]</sup>。因此,木聚糖酶抑制蛋白的存在很可能是植物防御病原菌入侵的一种机制,故而被归为植物防御相关蛋白<sup>[11]</sup>。

目前,获得木聚糖酶抑制蛋白的途径主要有2种,一种是利用木聚糖酶抑制蛋白基因的异源重组表达,但重组表达获得的木聚糖酶抑制蛋白并不能像天然蛋白一样有效地抑制木聚糖酶活性<sup>[9]</sup>,因此该方法一般不被研究人员采用;另一种途径是依靠离子交换层析或凝胶层析等多种不同层析手段的串联操作,分离获得木聚糖酶抑制蛋白<sup>[12-13]</sup>,这类方法过程复杂。由于木聚糖酶与木聚糖酶抑制蛋白之间具有特异性结合作用,因此,可以尝试采用固定化木聚糖酶对木聚糖酶抑制蛋白进行亲和层析纯化,该方法可以大大简化抑制蛋白的纯化过程,并且所用的固定化木聚糖酶可以回收、反复使用。但目前还没有关于此方法的研究报道。为此,采用固定化木聚糖酶对小麦木聚糖酶抑制蛋白进行亲和层析纯化,研究两者最佳的吸附、解吸条件,以期对木聚糖酶抑制蛋白的获得提供一个较好的新方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 小麦品种郑麦 9023 来自河南省农业科学院,挑选籽粒饱满、胚部完整、无虫斑和霉斑的籽粒备用。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白胨、酵母抽提物、桦木木聚糖等生化试剂均购自 TaKaRa 公司,其他试剂均为分析纯。

DNS 溶液配制方法:将 3.15 g DNS (3,5-二硝基水杨酸)溶于 131 mL 2 mol/L 的热 NaOH 溶液中,加入 250 mL 364 g/L 的热酒石酸钾钠溶液,再加入 2.5 mL 苯酚和 2.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>,溶解后定容至 500 mL,贮于棕色瓶中 7 d 后使用。

1.1.3 主要仪器 FW-100 型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)、紫外分光光度计(优尼科公司)、SK18 型高速冷冻离心机(SIGMA 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 小麦籽粒粗蛋白的提取 用粉碎机将郑麦

9023 籽粒粉碎,称取 100 g 全籽粒粉,放入 500 mL 三角瓶中,加入 500 mL 灭菌去离子水,混合均匀,在室温条件下,于摇床上 160 r/min 振荡 2 h,然后于 4 ℃、6 000 r/min 离心 30 min,取上清;用饱和度 70% 的硫酸铵盐析沉淀上清中的蛋白质,9 000 r/min 离心 30 min,弃上清,沉淀溶于 100 mL 灭菌去离子水中,9 000 r/min 离心 30 min,弃沉淀取上清,即为小麦籽粒粗蛋白提取液,用于测定木聚糖酶活性及木聚糖酶抑制蛋白的抑制活性。

1.2.2 木聚糖酶指示酶液的制备 采用来自毕赤酵母表达的黑曲霉 GH11 家族木聚糖酶 XynⅢ 作为木聚糖酶抑制蛋白指示酶。挑取毕赤酵母工程菌 GS115-XynⅢ 单菌落接种于装有 50 mL BMGY 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,于 30 ℃、250 r/min 条件下,摇床培养至 OD<sub>600</sub> 介于 2.0~6.0 时,离心收集菌体,转接到等量的 BMMY 液体培养基中,相同培养条件下继续培养。每 12 h 补加 5% 甲醇于培养基中至终体积分数为 0.5%,同时取 100 μL 样液,离心,取上清用于木聚糖酶活性的检测。培养 6 d 时(产酶量最大),于 4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min,收集上清,即为木聚糖酶指示酶液。

1.2.3 木聚糖酶的固定化 取一定量壳聚糖,加入体积分数为 3% 的醋酸溶液中,使壳聚糖终质量浓度为 50 g/L。用一次性注射器将该液体从 15 cm 高度向下注入到由 20 g NaOH、30 mL 甲醇、50 mL 去离子水组成的溶液中,立即形成光滑的空心微球,在室温下静置 30 min,用 pH 值 7.0 的磷酸缓冲液将微球洗净,并在体积分数为 5% 的冷戊二醛溶液中孵育 16 h,待微球呈褐色时,用磷酸缓冲液将其洗至不含戊二醛为止。将 pH 值 5.5 的木聚糖酶指示酶液与微球混合,40 ℃ 条件下作用 24 h,然后用磷酸缓冲液洗净备用。

1.2.4 固定化木聚糖酶亲和层析纯化木聚糖酶抑制蛋白 将固定化木聚糖酶微球放入新鲜制备的一定 pH 值(4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)的小麦籽粒粗蛋白提取液中,在一定温度(20、25、30、35、40 ℃)、时间(10、20、30、40、50、60 min)下反应,将固定化木聚糖酶微球过滤分离,用 50 mL 去离子水洗涤 3 次,洗涤液并入滤液,分别测定小麦籽粒粗蛋白提取液在固定化木聚糖酶亲和吸附前后木聚糖酶抑制蛋白的抑制活性,计算固定化木聚糖酶对木聚糖抑制蛋白的吸附率及相对吸附率。吸附率=(吸附前提取液抑制活性-吸附后上清抑制活性)/

吸附前提取液抑制活性 $\times 100\%$ , 相对吸附率=吸附率/最大吸附率。

上述操作中过滤得到的固定化木聚糖酶微球亲和吸附了木聚糖抑制蛋白, 将此复合物置于不同 pH 值(7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5)的巴比妥钠-盐酸缓冲液中, 4℃下解吸反应 24 h, 将固定化木聚糖酶-木聚糖酶抑制蛋白复合物分成单体, 测定溶液中木聚糖酶抑制蛋白的抑制活性, 计算木聚糖酶抑制蛋白的解吸率及相对解吸率。解吸率=解吸后上清抑制活性/(吸附前提取液抑制活性-吸附后上清抑制活性) $\times 100\%$ , 相对解吸率=解吸率/最大解吸率。

1.2.5 木聚糖酶活性的测定 取 0.1 mL 适当稀释的木聚糖酶指示酶液, 加入 0.1 mL 20 g/L 桦木木聚糖溶液(由 pH 值 4.6 的 0.2 mol/L 的 HAC-NaAC 缓冲液配制), 在 50℃保温 15 min, 加入 0.6 mL DNS 溶液, 煮沸 10 min 灭活显色, 定容至 5 mL, 在 550 nm 波长处测定还原糖含量(以木糖计), 以灭活的粗蛋白提取液作为空白。

在上述条件下, 以每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  木糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位(IU)。木聚糖酶活力  $E=1.53D\times Y$ 。其中,  $E$  为木聚糖酶的活力(IU/mL),  $D$  为酶液的稀释度,  $Y$  为吸光度。

1.2.6 小麦籽粒木聚糖酶抑制蛋白活性的测定 将木聚糖酶指示酶液适当稀释, 至木聚糖酶活力  $\text{OD}_{550}$  在 0.6~0.8(相当于 0.92~1.23 IU/mL 木聚糖酶)。取 2 份 200  $\mu\text{L}$  稀释后的木聚糖酶指示酶液, 一份加入 200  $\mu\text{L}$  小麦籽粒粗蛋白提取液, 另一份加入 200  $\mu\text{L}$  灭菌去离子水作为对照, 混匀, 30℃保温 30 min。从保温后的 2 份混合液中分别取 100  $\mu\text{L}$ , 测定木聚糖酶活性。同时测定小麦籽粒粗蛋白提取液的木聚糖酶活性。每降低 0.01 个木聚糖酶活力单位定义为 1 个木聚糖酶抑制蛋白抑制活力单位(IA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 pH 值蛋白提取液对木聚糖酶抑制蛋白吸附率的影响

在反应温度 30℃、时间 30 min 的条件下, 以相对吸附率作为评价指标, 研究不同 pH 值蛋白提取液对木聚糖酶抑制蛋白吸附率的影响。由图 1 可知, 当蛋白提取液 pH 值介于 4.5~6.5 时, 随着 pH 值的上升, 木聚糖酶抑制蛋白的相对吸附率逐渐增加, pH 值为 6.5 时, 相对吸附率最大; 当 pH 值大于 6.5 时, 随着 pH 值的增加, 相对吸附率逐渐降低。

因此, 蛋白提取液 pH 值以 6.5 最佳。

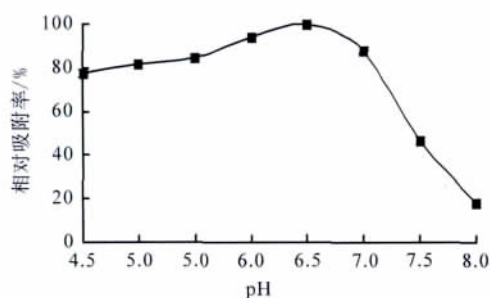


图 1 不同 pH 值对木聚糖酶抑制蛋白吸附率的影响

### 2.2 不同反应温度对木聚糖酶抑制蛋白吸附率的影响

在蛋白提取液 pH 值 6.5、反应时间 30 min 的条件下, 以相对吸附率作为评价指标, 研究不同反应温度对木聚糖酶抑制蛋白吸附率的影响。如图 2 所示, 当反应温度介于 20~30℃时, 随着温度的升高, 木聚糖酶抑制蛋白相对吸附率逐渐增加, 温度 30℃时达到最大; 当温度大于 30℃时, 相对吸附率开始降低。因此, 反应温度以 30℃为佳。

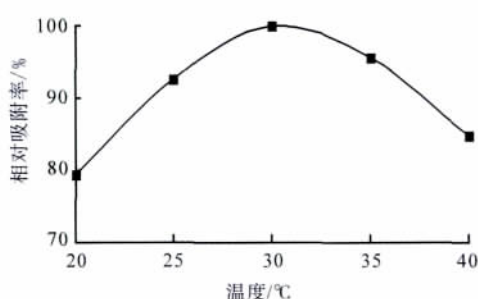


图 2 不同反应温度对木聚糖酶抑制蛋白吸附率的影响

### 2.3 不同反应时间对木聚糖酶抑制蛋白吸附率的影响

在蛋白提取液 pH 值 6.5、反应温度 30℃的条件下, 以相对吸附率作为评价指标, 研究不同反应时间对木聚糖酶抑制蛋白吸附率的影响。如图 3 所示, 随着反应时间的增加, 木聚糖酶抑制蛋白的相对吸附率先增加后趋于平稳, 50 min 时最大。因此, 反应时间以 50 min 为佳。

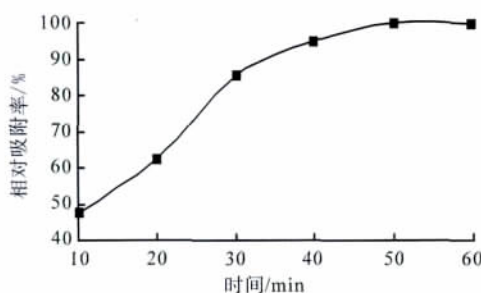


图 3 不同反应时间对木聚糖酶抑制蛋白吸附率的影响

## 2.4 不同巴比妥钠-盐酸缓冲液 pH 值对固定化木聚糖酶-木聚糖酶抑制蛋白复合物解吸的影响

以相对解吸率作为评价指标,研究不同巴比妥钠-盐酸缓冲液 pH 值对木聚糖酶抑制蛋白解吸率的影响。如图 4 所示,在巴比妥钠-盐酸缓冲液 pH 值为 7.0~8.5 时,随着 pH 值的上升,木聚糖酶抑制蛋白的相对解吸率逐渐升高,在 pH 值 8.5 时相对解吸率达到最大;当 pH 值继续升高时,相对解吸率基本保持不变。因此,选择巴比妥钠-盐酸缓冲液的 pH 值为 8.5 比较合适。

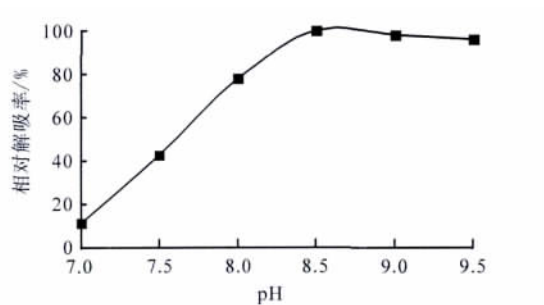


图 4 不同巴比妥钠-盐酸缓冲液 pH 值对木聚糖酶抑制蛋白解吸率的影响

## 3 结论

采用固定化木聚糖酶对木聚糖酶抑制蛋白进行亲和层析纯化,不仅可以大大简化抑制蛋白的纯化过程,而且所用的固定化木聚糖酶便于回收并可以反复使用,因此,利用固定化木聚糖酶进行小麦木聚糖酶抑制蛋白的亲和层析纯化是获得木聚糖酶抑制蛋白的一个较好的新方法。

本研究对固定化木聚糖酶与木聚糖酶抑制蛋白的吸附和解析条件进行初步研究发现,其最佳吸附条件为:小麦籽粒粗蛋白提取液 pH 值 6.5、反应温度 30℃、反应时间 50 min;固定化木聚糖酶-木聚糖酶抑制蛋白复合物的最佳解吸条件为:巴比妥钠-盐酸缓冲液 pH 值 8.5。

### 参考文献:

[1] Akimitsu K, Isshiki A, Ohtani K, *et al.* Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004, 65(6): 271-275.

[2] 赵蕾, 张天宇. 植物病原菌产生的降解酶及其作用[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(1): 89-93.

[3] 吴仕梅. 小麦纹枯病菌与寄主互作及粉锈宁对病菌影响的超微结构与细胞化学研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2002.

[4] 陈晓林, 牛程旺, 李保华, 等. 苹果树腐烂病菌产生细胞壁降解酶的种类及其活性分析[J]. *华北农学报*, 2012, 27(2): 207-212.

[5] Debyser W, Derdelinckx G, Delcour J A. Arabinoxylan solubilisation and inhibition of the barely malt xylanolytic system by wheat during brewing with wheat whole meal adjunct: Evidence for a new class of enzyme inhibitor[J]. *Journal of the American Society Brewing Chemists*, 1997, 55(4): 153-156.

[6] 王明道, 魏照辉, 陈红歌, 等. 小麦不同生育时期木聚糖酶活性及木聚糖酶抑制蛋白活性的变化[J]. *麦类作物学报*, 2010, 30(3): 544-547.

[7] Debyser W, Peumans W J, Van Damme E J M, *et al.* *Triticum aestivum* xylanase inhibitor (TAXI), a new class of enzyme inhibitor affecting breadmaking performance[J]. *Journal of Cereal Science*, 1999, 30(1): 39-43.

[8] McLauchlan W R, Garcia-Conesa M T, Williamson G, *et al.* A novel class of protein from wheat which inhibits xylanase[J]. *Biochemical Journal*, 1999, 338(pt2): 441-446.

[9] Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, *et al.* TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 403(3): 583-591.

[10] Gebruers K, Brijs K, Courtin C M, *et al.* Properties of TAXI-type endoxylanase inhibitors[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1696(2): 213-221.

[11] 陈红歌, 刘艳芳, 贾新成, 等. 木聚糖酶和木聚糖酶抑制蛋白在植物-病原菌互作中的作用[J]. *植物生理学报*, 2009, 45(2): 176-182.

[12] Goesart H, Gebruers K, Courtin C M, *et al.* A family of 'TAXI'-like endoxylanase inhibitors in rye[J]. *Journal of Cereal Science*, 2002, 36(2): 177-185.

[13] Gebruers K, Debyser W, Goesart H, *et al.* *Triticum aestivum* L. endoxylanase inhibitor (TAXI) consists of two inhibitors, TAXI I and TAXI II, with different specificities[J]. *Biochem J*, 2001, 353(2): 239-244.