

· 技术方法 ·

基于等温滴定微量热技术的玉米脱落酸受体检测体系

杨瑞雪[†], 刘海洋[†], 刘胜利, 于婷乔, 陈玉珍^{*}, 卢存福^{*}

¹北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ²林木育种国家工程实验室, 北京 100083

³教育部林木花卉遗传育种重点实验室, 北京 100083

摘要 脱落酸(ABA)是响应逆境胁迫及调控植物生长发育的重要激素, 其受体的发现以及在不同植物中的比较研究具有重要的理论与实际意义。等温滴定微量热技术(ITC)是鉴定和筛选ABA受体的一项重要技术之一, 该方法对受体蛋白的纯度和生物活性要求较高。该文探讨了超声波破碎条件对受体蛋白得率以及ABA和受体蛋白浓度对二者亲和力的影响。结果表明, 通过超声波破碎获得的原核表达玉米(*Zea mays*) ABA受体蛋白ZmPYL1含量高, 蛋白质图谱条带清晰。超声波破碎适宜的条件为: 菌悬液浓度 $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 破碎总时长15分钟, 单次破碎时长为3秒, 间歇时长10秒; ITC检测结果发现, (\pm)-ABA与玉米受体ZmPYL1的结合反应为吸热过程, 推测该受体蛋白ZmPYL1为二聚体, $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm)-ABA与 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 受体蛋白ZmPYL1反应结合效果较好, 反应的解离常数 K_d 值为 $72.46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究结果为筛选和鉴定植物ABA受体奠定了重要技术基础。

关键词 ABA受体, 等温滴定微量热技术, 超声波破碎法, 玉米

杨瑞雪, 刘海洋, 刘胜利, 于婷乔, 陈玉珍, 卢存福 (2016). 基于等温滴定微量热技术的玉米脱落酸受体检测体系. 植物学报 51, 790–800.

ABA (abscisic acid)在植物许多生长发育过程中均发挥重要作用, 如种子萌发、成熟和休眠、幼苗生长和气孔关闭以及响应病菌、干旱、高盐和低温等多种胁迫(易文凯等, 2012)。ABA受体是ABA信号通路最上游的调节因子, 能够识别ABA信号并启动信号转导过程。自20世纪70年代以来, ABA受体即成为ABA信号转导通路研究的热点和难点, 直到Park等(2009)和Ma等(2009)同时报道了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) PYR/PYL/RCAR蛋白家族为ABA的潜在受体, 受体蛋白的明确才使ABA信号转导通路研究进入了新阶段。

等温滴定微量热技术(isothermal titration calorimetry, ITC)是一种直接测量生物分子结合过程中热量变化的技术, 用于生物分子相互作用的热力学和动力学研究(Falconera and Collinsb, 2011)。此方法灵敏度高、重现性好, 还具有原位在线无损检测的优点, 是目前反应热力学和动力学研究中发展速度最快且应用范围最广的方法之一(Ding et al., 2012; Dracz-

kowski et al., 2014)。目前, ITC被广泛应用于酶促动力学及生物分子(如小分子、蛋白质、抗体、核酸和脂类)之间相互作用的特征鉴定以及分析由于分子结构改变导致的结合变化等领域。其中, 新药研发行业已经利用ITC技术检测蛋白质(或核酸)与候选药物的相互作用(Falconera and Collinsb, 2011; 黄卓楠, 2013; 周洁等, 2014; 石会刚和陈东戎, 2015)。ITC检测需要良好的反应系统, 其中样品预处理体系的建立是关键环节之一(周洁等, 2013)。超声破碎法是提取细菌样品中蛋白质的常用方法, 其工作原理是利用超声波产生的与细胞震动频率不同的高频振动, 产生空化现象引起冲击波和剪切力, 从而造成细胞结构破坏, 释放胞内物质(邓洁等, 2006)。已有的研究主要致力于超声波破碎如何提高细胞破碎率以及增加蛋白得率, 缺乏破碎过程对蛋白损坏及降解的探索(吴蕾等, 2002; 李永霞等, 2010)。近年来, 人们利用生物信息学方法推测玉米(*Zea mays*) ABA受体蛋白可能有13个家族成员(Wei et al., 2014), 但目前还没有相

收稿日期: 2015-12-30; 接受日期: 2016-03-21

基金项目: 国家自然科学基金(No.31270737)、高等学校学科创新引智计划(No.B13007)、长江学者和创新团队发展计划(No.IRT13047)和北京市自然科学基金(No.6112016)

[†] 共同第一作者

^{*} 通讯作者: E-mail: chenyzhen@bjfu.edu.cn; lucunfu@bjfu.edu.cn

关的实验证据支持, ABA受体蛋白的样品预处理方法也未见报道。

本文以玉米AS-9自交系ABA受体基因(*ZmPYL1*)的重组菌株为实验材料, 研究了超声波破碎总时长、菌悬液浓度、单次破碎时长以及单次间歇时长等因素对超声波法破碎大肠杆菌表达蛋白质的影响, 同时对ITC实验中ABA与其受体蛋白相互作用的浓度进行了探索, 为植物激素受体筛选和鉴定建立了较为系统的技术体系。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

实验材料: 含有玉米(*Zea mays* L.)自交系(AS-9) ABA受体蛋白*ZmPYL1*重组质粒的大肠杆菌BL21 (DE3)菌株, 由本实验室构建并保存; 蛋白纯化采用Ni-NTA琼脂糖填料(Qiagen); (±)-ABA购自Sigma公司。

仪器: 紫外可见分光光度计(TU-1810, 北京普析通用仪器有限责任公司)、超声波细胞粉碎仪(VC 255, 序列号: 51830Y, Sonics & Materials, Inc. U.S.A)及等温滴定量热仪(MicroCal ITC-200, GE)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种培养与收集

取20 μL 带有目的基因的原核表达菌液, 放入20 mL含有50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kan抗生素的LB培养基中, 37°C, 每分钟200转过夜摇菌12小时, 吸取5 mL该菌液, 加入含有Kan的500 mL LB培养基中进行二次活化, 37°C, 每分钟150转, 2.5小时左右菌体生长至对数期, 用紫外可见分光光度计测得OD600为0.6–0.7, 加入100 μL 0.2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的IPTG, 室温25°C, 每分钟120转培养过夜, 不超过12小时, 测得OD600在1.0–1.5之间。将500 mL菌液收集到50 mL离心管中, 10 000 $\times\text{g}$, 4°C离心集菌, 每次10分钟。收集好的菌液于–20°C冰箱保存备用。

1.2.2 菌液超声波破碎条件的单因素实验

1.2.2.1 破碎总时长的选择

称取离心管收集菌体前后的质量, 每管菌体质量约为1.0 g, 向离心管中加入10 mL lysis buffer (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

imidazole, pH8.0), 重悬菌液, 吸打混匀, 菌悬液浓度为100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 转移至干净的40 mL小烧杯中, 避免引起泡沫。破碎过程全程冰浴, 单次破碎时长3秒, 间歇时长10秒, 振幅40%, 工作总时长分别选取5、10、15、20、25、30、35和40分钟, 检测上述时间节点初始菌液的OD600值和上清中的蛋白质浓度。蛋白质定量参照Bradford法(Bradford, 1976; 金德善等, 2012)。

1.2.2.2 菌悬液浓度的选择

分别向4管菌体中加入25、14、10和5 mL lysis buffer, 制得浓度为40、70、100和200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液。将菌悬液置于冰浴中进行超声波破碎, 单次破碎时长3秒, 间歇时长10秒, 振幅40%, 工作总时长选取15分钟。处理完毕后检测上述各浓度菌悬液破碎前后的OD600, 同时检测各浓度菌悬液破碎前后上清中的蛋白质含量, 最后通过SDS-PAGE电泳检测不同浓度菌悬液破碎后沉淀及上清中的蛋白质含量。

1.2.2.3 单次破碎时长的选择

向菌体中加入10 mL lysis buffer制得浓度为100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液。将菌悬液置于冰中进行超声波破碎, 振幅选取40%, 单次破碎时长分别选取2、3、6和9秒, 间歇时长10秒, 工作总时长选取15分钟。处理完毕后检测各处理条件下菌悬液初始及最终的OD600, 同时检测各处理条件下菌悬液破碎前后上清中的蛋白质含量。

1.2.2.4 间歇时长的选择

向菌体中加入10 mL lysis buffer制得浓度为100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液。将菌悬液置于冰浴中进行超声波破碎, 振幅为40%, 单次破碎时长为3秒, 间歇时长分别为2、6、10和14秒, 工作总时长15分钟。处理完毕后检测各处理条件下菌悬液破碎前后的OD600和上清中的蛋白质含量。实验重复3次, 结果以平均值表示。

1.2.3 蛋白纯化

将上述破碎后的菌液10 000 $\times\text{g}$, 4°C离心20分钟, 上清通过Ni柱纯化蛋白质, 纯化步骤参考Ni-NTA琼脂糖填料使用说明书。收集纯化过程中各步骤的蛋白质溶液进行SDS-PAGE分析, 用HEPES溶液(20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnCl_2 ,

1 mmol·L⁻¹ β-巯基乙醇)置换离心,配成所需浓度的蛋白质溶液后进行ITC实验。

1.2.4 ABA与受体蛋白亲和性实验的参数优化

用HEPES溶液配制不同浓度的(±)-ABA溶液和受体蛋白溶液,分别用2 mmol·L⁻¹ (±)-ABA滴定0.05 mmol·L⁻¹ ZmPYL1、2 mmol·L⁻¹ (±)-ABA滴定0.1 mmol·L⁻¹ ZmPYL1、4 mmol·L⁻¹ (±)-ABA滴定0.1 mmol·L⁻¹ ZmPYL1。

滴定样品须在4°C下12 000 ×g离心10分钟除气泡。进行等温滴定实验前,运行清洗程序清洗样品池和syringe,同时超纯水清洗加样针;用加样针吸出样品池中的水,运行程序干燥syringe,吸取300 μL蛋白质样品加入样品池,加样时需小心操作以避免产生气泡,取100 μL ABA溶液加入0.2 mL离心管中,运行加样程序,加样完成后,在ITC200软件中的Advance Experimental Design设置ITC实验参数:反应温度25°C、总注射滴数17滴、注射体积第1滴为0.4 μL、第2滴以后为2.41 μL;每滴持续时间第1滴为0.8秒,从第2滴开始为4.82秒,每滴之间时间间隔150秒,搅拌器转速为每分钟800转。

实验结果用Origin 7 (MicroCal ITC200)软件进行分析,得到结合常数(K_b)和反应的化学计量数(N)等,通过对结合常数(K_b)取倒数得到解离常数(K_d)。用One Set of Sites模拟法按照非线性最小方差法拟合滴定反应热,对拟合曲线与实验点进行回归分析,直到方差最小。经过多次迭代拟合,直至χ²不再变化时,即完成拟合。空白对照为相应浓度(±)-ABA与不含蛋白质的HEPES溶液的滴定反应。各实验重复3次,结果以平均值表示。

2 结果与讨论

2.1 超声波破碎条件的单因素实验

2.1.1 破碎总时长的选择

实验结果(图1)表明,随着破碎总时长的增加,菌悬液OD600值呈现下降趋势,在30分钟后趋于平稳,菌悬液OD600值最初为2.741,当破碎到15分钟时下降到1.797,超声破碎30分钟后降为0.749;而单位菌体中得到的蛋白质含量随着破碎时间从5–15分钟不断增加,到15分钟时接近最大值(图1),此时菌液上清

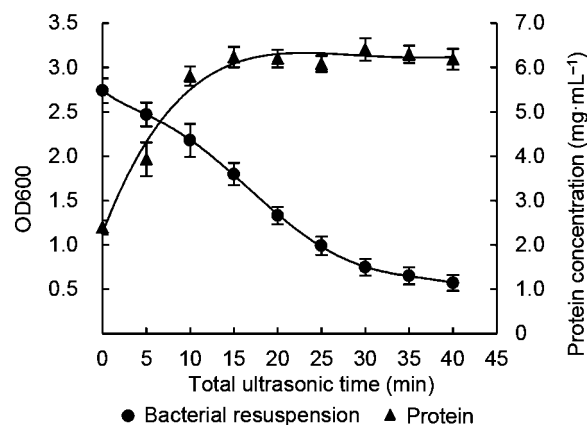


图1 超声波破碎总时长对菌悬液OD值及蛋白质浓度的影响

Figure 1 Effect of total ultrasonic time on the OD600 and protein concentration of bacterial resuspension in lysis buffer

中蛋白质浓度为初始浓度的2.61倍。结果显示,超声破碎至15分钟时,绝大部分菌体已释放出蛋白质,虽然继续破碎至30分钟时,菌体破碎才较为彻底(菌液OD600值变化趋于平缓),但综合考虑蛋白质活性及之后ITC的亲合实验等的需要,后续实验采用15分钟为超声破碎的总时长。

2.1.2 菌悬液浓度的选择

在初始菌悬液浓度相当的情况下(图2B),超声波破碎处理15分钟后,100、70和40 mg·mL⁻¹的菌悬液始终未出现气泡,菌悬液较澄清,破碎声音清脆(图2A2–A4),OD600值由近2.5下降至1.7左右(图2B),而200 mg·mL⁻¹的菌悬液在破碎1.5分钟时即开始出现气泡,继续破碎气泡会迅速充满整个烧杯,破碎声音不再清脆,变得微弱,破碎15分钟后菌液依旧浑浊(图2A1),OD600值变化较小。初始蛋白质浓度相当的条件(图2C),超声波破碎处理15分钟,菌悬液浓度在40–100 mg·mL⁻¹范围内超声破碎前后蛋白质浓度变化较大,菌液上清中蛋白质分别增加1.08倍、1.8倍和1.69倍,而200 mg·mL⁻¹的菌悬液破碎15分钟后,上清中的蛋白质浓度只增加了99.1%;SDS-PAGE结果显示,随着菌悬液由40 mg·mL⁻¹升高至100 mg·mL⁻¹,目的蛋白表达量增加,但200 mg·mL⁻¹菌悬液的目的蛋白表达量并无显著增加(图2D,分子量为42.3 kDa)。综上,菌悬液浓度在70–100 mg·mL⁻¹之间较为适宜,

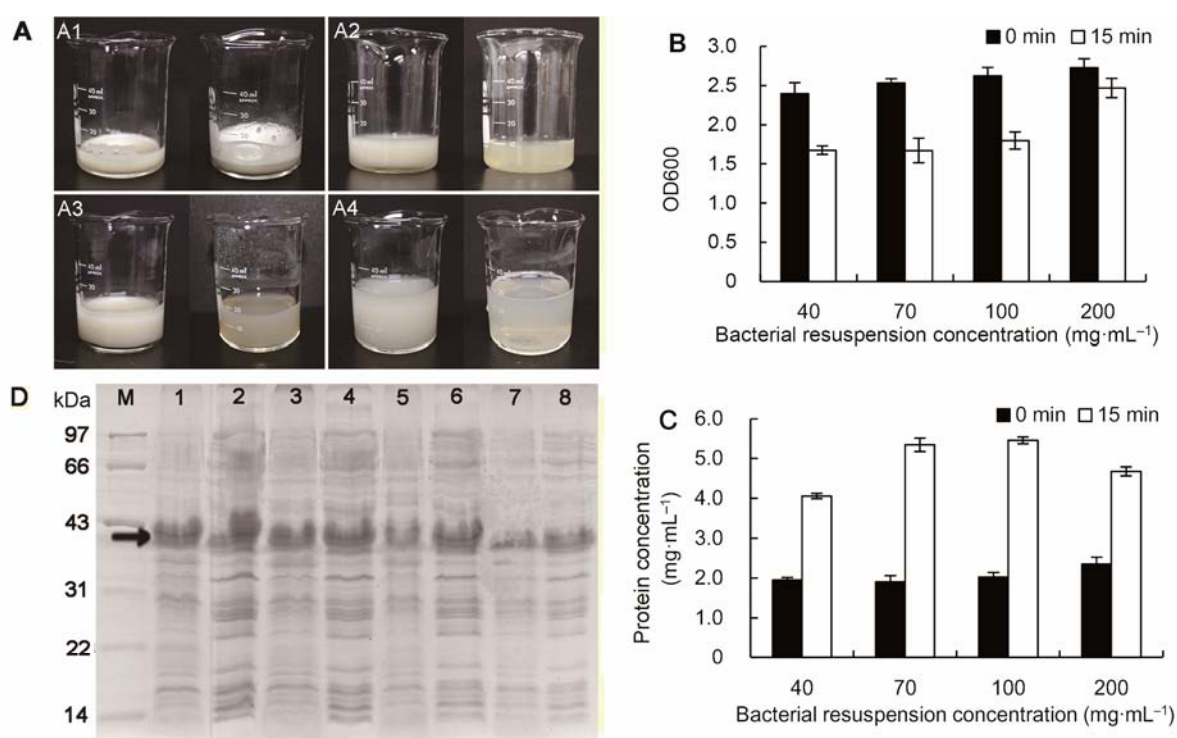


图2 不同浓度菌悬液超声波破碎结果

(A) A1–A4分别为200、100、70和40 mg·mL⁻¹菌悬液超声波破碎前(左侧烧杯)后(右侧烧杯)对比图; (B) 菌悬液浓度对超声波破碎前后菌液OD值的影响; (C) 菌悬液浓度对超声波破碎前后上清中蛋白质浓度的影响; (D) 不同浓度菌悬液超声波破碎后沉淀和上清中蛋白含量SDS-PAGE检测, 泳道1、3、5、7分别代表200、100、70和40 mg·mL⁻¹菌悬液沉淀中的蛋白, 泳道2、4、6、8分别代表200、100、70和40 mg·mL⁻¹菌悬液上清中的蛋白, 箭头所示为目的蛋白。

Figure 2 Ultrasonic treatments for bacterial resuspension of different concentrations

(A) A1–A4 indicate the comparison of 200, 100, 70 and 40 mg·mL⁻¹ bacterial suspension before (left beaker) and after (right beaker) ultrasonic treatments; (B) Effect of bacterial resuspension of different concentrations on the OD600 before (0 min) and after (15 min) ultrasonic treatments; (C) Effect of bacterial resuspension of different concentrations on the protein content before (0 min) and after (15 min) ultrasonic treatments; (D) SDS-PAGE detection of protein content in sediment and supernatant of different bacterial concentration, lane 1, 3, 5, 7 represent the protein content in sediment of 200, 100, 70 and 40 mg·mL⁻¹ bacterial suspension, respectively; and lane 2, 4, 6, 8 represent the protein content in supernatant of 200, 100, 70 and 40 mg·mL⁻¹ bacterial suspension, respectively. Target protein band is showed by arrow.

最终选取100 mg·mL⁻¹作为菌悬液的浓度标准。

玉米ABA受体蛋白质ZmPYL4菌悬液浓度为100 mg·mL⁻¹, 破碎时间在15分钟以内, OD600值下降, 但15–30分钟菌悬液OD600值又有升高现象(图3A), 即使破碎30分钟, 菌液仍未澄清(图3B); 破碎15分钟和30分钟后, 菌液上清中蛋白质浓度只分别增加了33.5%和4.0% (图3A), 推测此时菌悬液中存在非水溶蛋白质的影响。SDS-PAGE检测表明, 蛋白质集中在沉淀中, 而上清中的目的蛋白较少(图3C, 分子量为36.1 kDa)。这说明菌悬液中玉米ABA受体蛋白质

ZmPYL4为包涵体, 进一步镍柱纯化很难进行, 该蛋白质能否进行复性及ITC鉴定还有待进一步研究。

2.1.3 单次破碎时长的选择

在初始菌悬液OD600值相当条件下, 单次破碎时长为3秒时, 菌悬液OD600值最低为0.76, 而悬液上清中蛋白质含量最高, 达到8.57 mg·mL⁻¹, 比初始蛋白质浓度增加4.49倍(图4A, B), 推测此时菌体破碎较充分。当单次破碎时长为2秒时, 破碎时间过短, 菌体破碎不完全; 而单次破碎时长超过6秒时, 破碎时

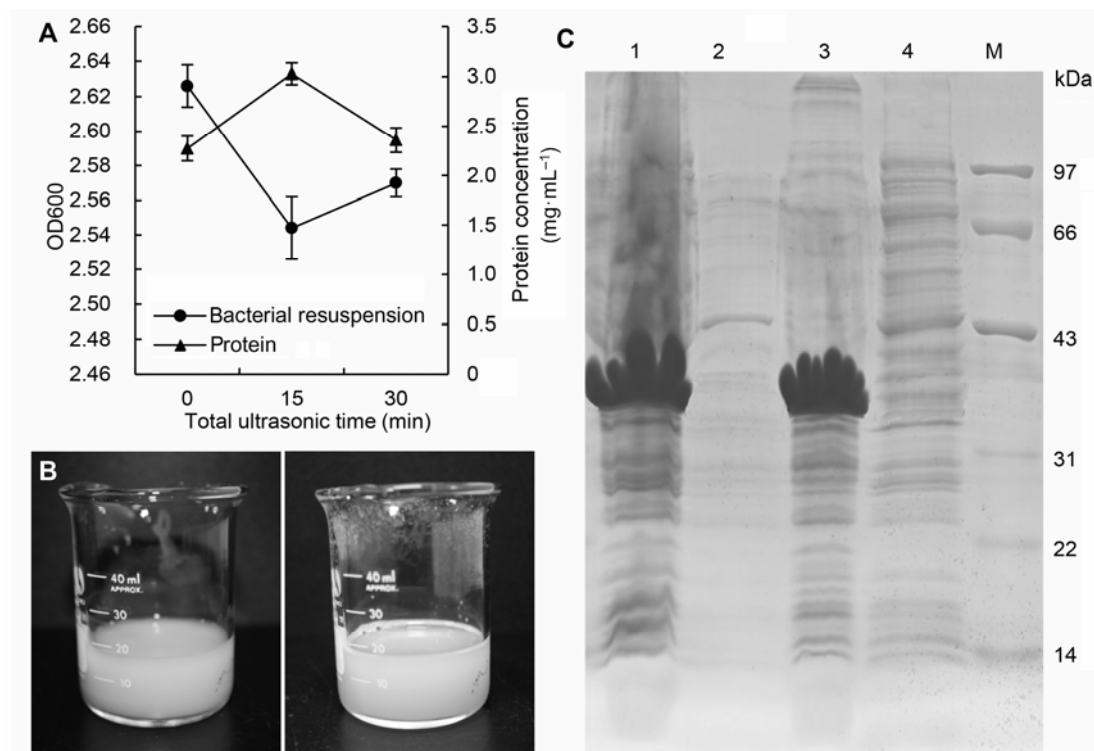


图3 包涵体蛋白ZmPYL4超声波破碎结果

(A) 超声波破碎总时长对菌悬液OD值及上清中蛋白质浓度的影响; (B) 菌悬液超声波破碎前(左侧烧杯)及30分钟后(右侧烧杯)对比图; (C) 包涵体蛋白超声波破碎前后沉淀和上清中蛋白SDS-PAGE检测图, 泳道1: 超声波破碎前菌悬液沉淀中蛋白质检测结果; 泳道2: 超声波破碎前菌悬液上清中蛋白质检测结果; 泳道3: 超声波破碎后菌悬液沉淀中蛋白质检测结果; 泳道4: 超声波破碎后菌悬液上清中蛋白质检测结果。

Figure 3 Ultrasonic treatment of inclusion body ZmPYL4

(A) Effect of total ultrasonic time on the OD600 of bacterial resuspension and the protein content in supernatant; (B) Bacterial resuspension before (left beaker) and after (right beaker) ultrasonic treatment for 30 min; (C) SDS-PAGE detection of protein level in sediment and supernatant of bacterial suspension. Lane 1: The protein level in sediment before ultrasonic treatment. Lane 2: The protein level in supernatant before ultrasonic treatment. Lane 3: The protein level in sediment after ultrasonic treatment for 30 min. Lane 4: The protein level in supernatant after ultrasonic treatment for 30 min.

间过长, 热效应明显, 影响蛋白破碎效果。因此, 在后续实验中单次破碎时长选取3秒。

2.1.4 间歇时长的选择

由于超声波破碎会产生热效应, 处理时需将菌悬液置于冰浴环境, 设置适当的间歇时长也是消除热效应的有效手段。受体菌悬液在2–10秒范围内随着间歇时长的延长, OD600值分别从初始的2.6降至2.3、1.0和0.5(图5A), 而悬液上清中蛋白质浓度与初始浓度相比, 分别增加了15.1%、2.74倍和3.06倍(图5B); 但当间歇时长延长为14秒时, OD600值由2.6变为2.197, 蛋白浓度增加了1.95倍(图5A, B)。推测在总时间不变的

情况下, 在2–10秒范围内随着间歇总时间延长, 蛋白质提取效果增加, 但间歇时长延长为14秒时, 相应的破碎总时间就过短, 破碎效果变差。因此, 后续实验的间歇时间选取10秒。

2.2 蛋白质纯化

根据以上单因素实验建立的ABA受体蛋白质表达菌体超声波破碎体系, 浓度为100 mg·mL⁻¹的菌悬液, 破碎总时长为15分钟, 单次破碎时长为3秒, 间歇时间为10秒, 振幅40%。原核表达菌体破碎后的菌悬液离心得到沉淀和上清, 上清通过镍柱进行蛋白质纯化, 收集过程中的溶液进行SDS-PAGE分析(图6)。结

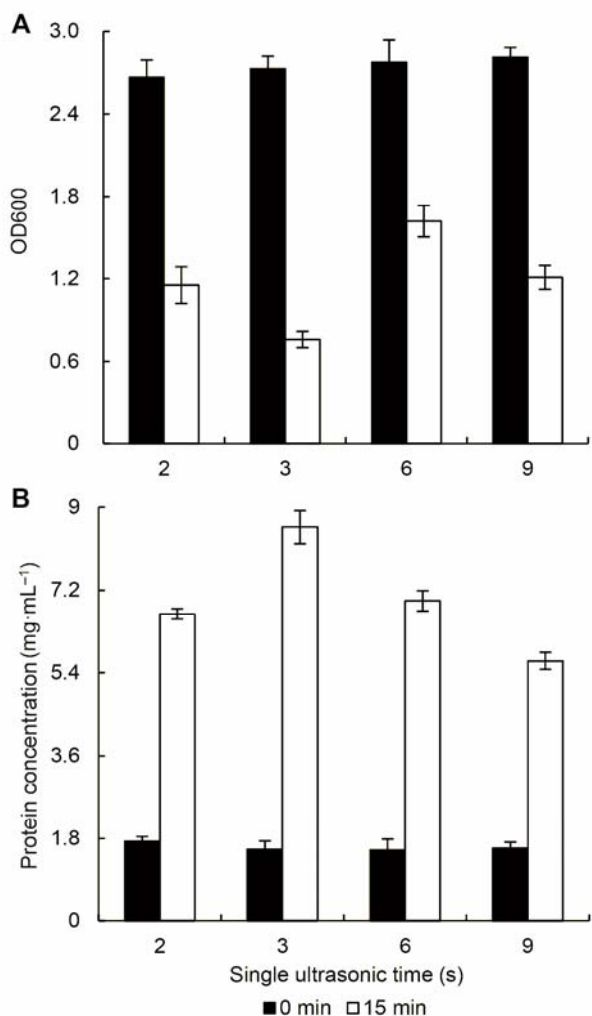


图4 单次破碎时长对菌悬液OD值(A)及蛋白质浓度(B)的影响

Figure 4 Effect of single ultrasonic time on the OD600 (A) and protein concentration (B) of bacterial resuspension in lysis buffer

果表明,第4次收集液中蛋白质的纯度已经很高,无明显杂带,达到ITC实验要求,置换后蛋白浓度达到 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,可用于后续实验。

2.3 不同浓度的ABA及蛋白质溶液的ITC实验结果

等温滴定微量热仪通过记录每一次滴定反应产生的热量变化得到反应活性图谱(图7),图中的连续等温线是不同浓度ABA滴定不同浓度受体蛋白所引起的补偿功率变化,用One Set of Sites模型对反应热函数进行拟合,得到ABA与ZmPYL1反应的拟合曲线(图7中黑色实线),其热力学特性表明,(±)-ABA与受体蛋

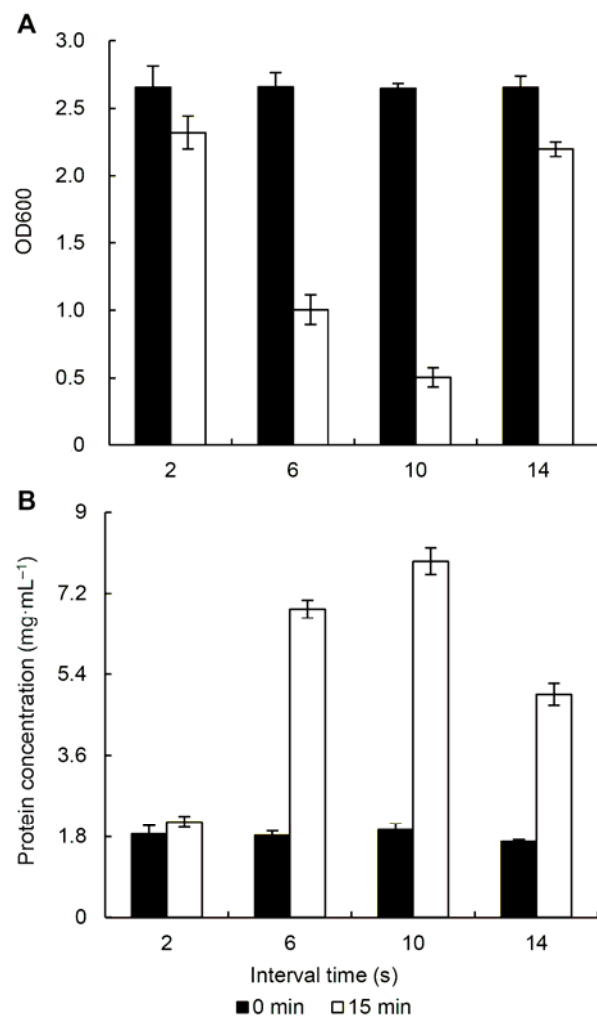


图5 间歇时长对菌悬液OD值(A)及蛋白质浓度(B)的影响

Figure 5 Effect of interval time on the OD600 (A) and protein concentration (B) of bacterial resuspension in lysis buffer

白的结合是吸热反应(图7)。

在对照(不含受体蛋白质)样品中,稀释热小于 $0.08 \text{ }\mu\text{cal}\cdot\text{sec}^{-1}$,每一滴滴定后热量均没有变化,反应热曲线呈散点状,说明并没有发生结合反应(图7 D)。当利用 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (±)-ABA滴定 $0.005 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 受体蛋白质溶液时,每一滴的热量均变化较小,反应热曲线呈散点状,化学计量数(N)为15.5,即结合1分子的(±)-ABA需要约15.5分子的蛋白质,该组的解离常数 K_d 值约是B、C两组的2倍,说明在低浓度受体蛋白条件下,(±)-ABA与受体蛋白结合的亲和力较弱(图7A;表1);当增加受体蛋白质浓度至 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

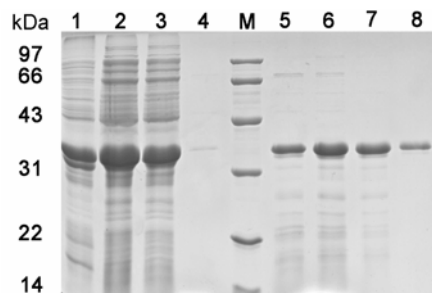


图6 SDS-PAGE检测蛋白质纯化结果

泳道1: 超声波破碎前的菌体沉淀中的蛋白质; 泳道2: 超声波破碎前上清液中的蛋白质; 泳道3: 上清液通过镍柱后的收集液; 泳道4: Wash buffer通过镍柱后的洗脱液; 泳道5-8: 分别是elution buffer第1、2、3和4次通过镍柱后的收集液。

Figure 6 SDS-PAGE detection of purified ZmPYL1 protein
Lane 1: The protein level in sediment after ultrasonic treatment; Lane 2: The protein level in supernatant after ultrasonic treatment; Lane 3: The collecting liquid of the supernatant through Ni-NTA; Lane 4: The collecting liquid of wash buffer through Ni-NTA; Lane 5-8: The collecting liquid of elution buffer through Ni-NTA for the first, second, third and fourth time, respectively.

时, 同时改变 (\pm) -ABA滴定浓度(分别为2和4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm) -ABA), 每一滴热量均变化较大, 解离常数 K_d 值大大降低, (\pm) -ABA与受体蛋白质间均发生了结合反应, 其中4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm) -ABA与0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白结合吸收的热量较高, 同时拟合曲线与实验点更接近, 表明拟合结果越可信(图7B, C), 化学计量数N值更接近1, 说明 (\pm) -ABA与受体蛋白质以1:1比例结合, 因此从检测的灵敏度来看, 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm) -ABA滴定0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 受体蛋白质更为合适。此外, 由于 (\pm) -ABA与受体蛋白的结合是吸热反应, 因此推测玉米ABA受体蛋白ZmPYL1为二聚体。

2.4 讨论

2.4.1 超声波破碎条件的优化

超声波破碎技术主要是利用超声波产生的与细胞震

动频率不同的高频振动, 造成细胞周围环境局部真空, 使细胞膜产生空穴作用, 引起冲击波和剪切力, 从而使细胞结构破坏, 释放出胞内物质(邓洁等, 2006; 周洁等, 2013), 对设备要求低、使用便捷, 因此广泛应用于破碎原核(吴蕾等, 2002)及真核细胞(李永霞等, 2010)。超声波破碎的效率取决于声频、声能、处理时间、细胞浓度及细胞类型等, 其中重悬液浓度是影响超声波破碎的重要因素之一。菌悬液浓度过高可能会减弱超声波破碎所形成空穴效应的强度, 导致破碎效果减弱(邓洁等, 2006)。本研究中, 当受体蛋白ZmPYL1菌悬液浓度低于100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时破碎效果较好, 破碎过程中声音清脆, 最终的菌液澄清, 呈蛋清状(图2A2-A4), OD600值由近2.5下降至1.7左右(图2B); 当重悬液浓度达到200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 由于浓度过高, 菌液泡沫多, 破碎声音微弱, 细胞裂解效果较差(图2A1, B)。已有研究表明, 超声波破碎法不但改善了蛋白质的提取效果, 而且增加了蛋白质的溶解性(Canas et al., 2007)。本研究中, 菌悬液浓度为70-100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 破碎后上清中的蛋白浓度增加了80%, 目的蛋白表达量较高(图2C); 而当菌悬液浓度达到200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 目的蛋白表达量不但没有增加, 反而出现较多不溶解的蛋白(图2C, D), 表明菌液浓度是影响超声破碎效果和蛋白产率的关键因素。如果菌株表达的蛋白形成包涵体时, 即使菌液超声破碎30分钟仍呈浑浊状态, 菌体破碎效果较差, 蛋白主要集中在沉淀中(图3A-C), 不能进行蛋白纯化及下一步实验。

使用超声波破碎还必须注意控制一定的强度, 强度过高, 散热比较困难, 容易引起蛋白失活; 超声强度过低则细胞破碎不彻底, 蛋白产率较低(李永霞等, 2010)。本研究中, 当超声破碎工作总时长在0-15分钟范围内, 随着破碎时间延长, 菌液上清中蛋白质浓度增加, 破碎至15分钟时达到初始蛋白浓度的2.61倍(图1), 说明玉米受体蛋白菌液超声破碎15分钟时, 绝大部分菌体已释放出蛋白质, 如再延长破碎时间,

表1 不同浓度 (\pm) -ABA和ZmPYL1蛋白热力学结合常数

Table 1 The thermodynamic parameters of (\pm) -ABA and ZmPYL1 protein in different concentrations

Thermodynamic parameters	2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm) -ABA+ 0.005 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZmPYL1	2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm) -ABA+ 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZmPYL1	4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm) -ABA+ 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZmPYL1
N (sites)	15.5 \pm 5.52	0.651 \pm 0.190	0.821 \pm 0.069
K_d ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	135.32	72.99	72.46

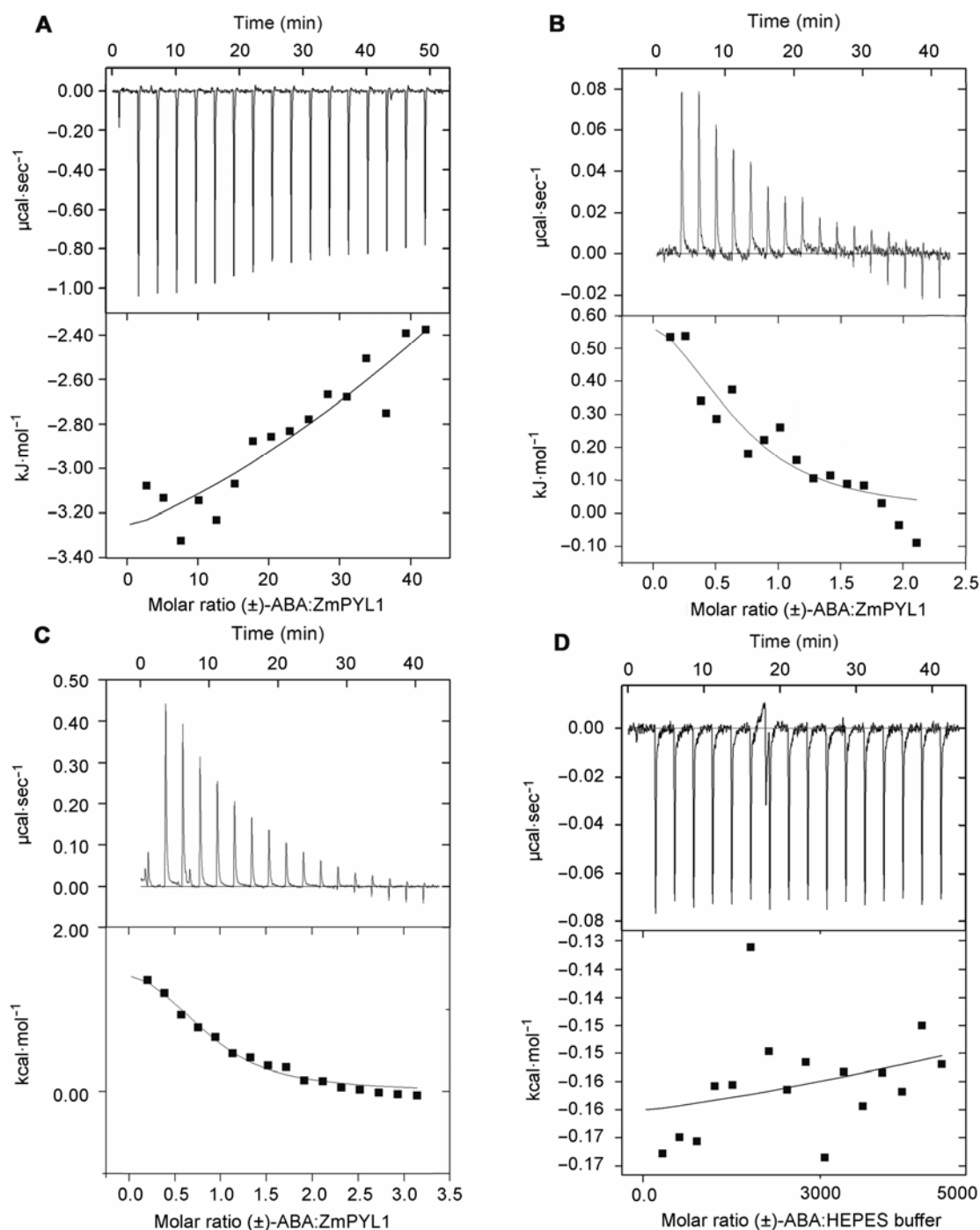


图7 等温滴定反应中补偿功率随时间变化及反应热随摩尔比变化的曲线图

(A) $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm)-ABA滴定 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZmPYL1; **(B)** $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm)-ABA滴定 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZmPYL1; **(C)** $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm)-ABA滴定 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZmPYL1; **(D)** $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm)-ABA滴定不含蛋白质的HEPES溶液。**(C)**和**(D)**中下方实线是非线性拟合曲线, 拟合曲线与实验点越接近表明拟合结果越可信。

Figure 7 The variation of differential power with time and the heat variation of injection with the molar ratio

(A) $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm)-ABA was titrated into $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZmPYL1; **(B)** $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm)-ABA was titrated into $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZmPYL1; **(C)** $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm)-ABA was titrated into $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZmPYL1; **(D)** $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm)-ABA was titrated into HEPES solution without protein. The solid lines in bottom panels represent the fitting curves, and the closer the fitting curve is to experimental dots, the more credible the fitting result is.

菌液破碎效果虽好, 但将导致超声波热效应增强, 极易造成蛋白失活。在破碎总时长一定的情况下, 单次破碎时长也影响蛋白的破碎效果(图4A, B)。本研究中, 单次破碎时长为3秒时菌悬液破碎效果好, 悬液上清中蛋白质含量较高。设置适当的间歇时长也是消除热效应防止蛋白失活的有效手段。在总时长不变的情况下, 间歇时间延长, 相应的破碎次数就会减少, 同样影响破碎效果。本研究中, 随着间歇总时间(在2–10秒范围内)延长, 蛋白质提取效果增加, 但间歇时间延长至14秒时, 破碎总时间缩短, 破碎效果变差(图5A, B)。

因此, 本实验以玉米AS-9自交系ABA受体基因(*ZmPYL1*)重组菌株为材料, 建立的超声波破碎体系为: 菌悬液浓度 $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 超声波破碎15分钟, 单次破碎时间3秒, 单次间歇时间10秒。此时菌液破碎后澄清, 蛋白产率高, 破碎效果较好。

2.4.2 ITC检测玉米ABA受体蛋白条件筛选

微量热技术(ITC)是近年来发展起来的一种研究生物热力学和生物动力学的重要结构生物学方法, 灵敏度和自动化程度高, 连续性和抗干扰性强, 且无需对分子进行标记或修饰(Pierce et al., 1999; Wang et al., 2014), 同时在实验过程中不会损失反应物和产物(Volkova et al., 2012)。因此ITC是一种用于发现和估测反应未知步骤或过程的先进分析技术(Madrid and Jardim, 2005; Hanson et al., 2007; Hytonen et al., 2007; Privalov and Dragan, 2007)。ITC方法是在一定的温度下, 匀速向样品溶液中逐滴滴加反应物溶液, 同时记录反应中热交换的热力学, 实验中需提供给分析软件2个反应物的浓度值(黄卓楠, 2013; 周洁等, 2013), 因此对待测样品的纯度要求较高, 样品浓度也需要准确定量。本研究通过将超声破碎的受体蛋白的上清液进行4次镍柱纯化, 并准确定量蛋白质的实际浓度, 同时用HEPES溶液对第4次elution buffer过柱收集液进行置换, 蛋白浓度达到 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 实现了“相对零背景”的反应系统, 最终ITC的检测效果较好(图7), 因此纯度较高的蛋白质样品对获得有效的检测结果十分必要。

ITC通过1次实验测定反应中的热量, 就可以获得精确的结合常数(K_b)及反应的化学计量数(N)等分子相互作用相关的完整信息(周洁等, 2014; 石会刚

和陈东戎, 2015), 而且通过ITC计算的结合常数十分可信(Hao et al., 2011; 周洁等, 2014; 石会刚和陈东戎, 2015)。已有文献报道, 拟南芥中(+)-ABA与受体RCAR的解离常数 K_d 为 $0.66 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ma et al., 2009)。研究还表明, $0.58 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)-ABA与 $33 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PYL5反应的 K_d 值为 $1.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)-ABA与 $30 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PYL2反应的 K_d 值为 $58.5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Hao et al., 2011), 而在葡萄(*Vitis vinifera*)中, $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)-ABA与 $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VvPYL1反应的 K_d 值为 $78.3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Li et al., 2012), 说明不同浓度的ABA和受体蛋白在不同植物中的结合常数存在差异。值得注意的是, (+)-ABA和(-)-ABA对PYLs的亲合力不同, 在拟南芥所有PYLs家族中, PYL5对(-)-ABA的亲合力最强(Santiago et al., 2009; Zhang et al., 2013), PYL9只结合(+)-ABA, 而PYL3可以结合2种构象的ABA, 但PYL3与(-)-ABA的亲合力(K_d 值为 $358.42 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)低于其与(±)-ABA的亲合力(K_d 值为 $15.70 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Zhang et al., 2013)。本研究采用不同浓度的(±)-ABA和不同浓度的受体蛋白进行滴定, 结果表明, $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (±)-ABA与 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 玉米受体蛋白PYL1反应的 K_d 值为 $72.46 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与(+)-ABA和VvPYL1的结果($78.3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相近(Li et al., 2012), N值接近1, 滴定曲线拟合较好(图7; 表1), 说明ABA与玉米受体蛋白按1:1比例结合, 与文献中报道的对拟南芥等研究结果较为一致(Santiago et al., 2009; Li et al., 2012), 同时也表明实验中原核表达的蛋白ZmPYL1确为玉米ABA受体蛋白, 能与(±)-ABA相互作用。

拟南芥ABA受体PYR家族14个成员可分为单体和二聚体(Park et al., 2009)。其中, ABA二聚体受体PYR与ABA的结合为吸热过程, 而单体PYR受体与ABA的结合为典型的放热过程(Florine et al., 2011)。Hao等(2011)通过多角度静态光散射法测定蛋白质分子量, 结果表明, 拟南芥PYL1、PYL2和PYR1为二聚体受体, 而PYL4–PYL10为单体受体, PYL3受体则兼具单体和二聚体形式。从ITC拟合结果来看, 本研究中的结合反应为吸热过程(图7), 这与拟南芥PYL1、PYL2、PYR1和葡萄VvPYL1等为二聚体受体的结果较为一致, 而与前人所研究的拟南芥单体受体PYL5结果相反(Santiago et al., 2009; Hao et al., 2011; Li et al., 2012), 推测玉米ABA ZmPYL1受体蛋白为二

聚体。

总之, ITC是近年来发展起来的一种研究生物分子相互作用的重要方法(Pierce et al., 1999; Wang et al., 2014), 利用该方法检测ABA与受体蛋白的相互作用是切实可行的。生物信息学分析显示, 玉米ABA受体蛋白有13个家族成员(Wei et al., 2014), 该研究成果为进一步对受体其它家族成员与不同类型ABA((+)-ABA、(-)-ABA、(±)-ABA)的相互作用及其它领域的ITC定量分析研究提供了参考。

参考文献

- 邓洁, 程龙, 刘谊, 白林含, 于昕, 鲍锦库, 曹毅, 乔代蓉 (2006). 根肿(*Plasmodiophora brassicae*)休眠孢子的纯化和超声波破碎方法研究. 应用与环境生物学报 **12**, 269–272.
- 黄卓楠 (2013). 微量热技术测定酶催化反应的研究进展. 分析仪器 **5**, 1–5.
- 金德善, 卢存福, 兰小中, 刘雪萍, 乔佩, 李红英, 陈玉珍 (2012). 雪莲愈伤组织蛋白质提取及双向电泳分析. 西北植物学报 **32**, 1903–1909.
- 李永霞, 曾海英, 秦礼康 (2010). 酵母细胞破碎条件优化及高肽酶菌株筛选. 食品科学 **13**, 302–306.
- 石会刚, 陈东戎 (2015). 等温滴定量热法研究核糖开关acc与氨基糖苷类抗生素的相互作用. 生物物理学报 **31**, 241–250.
- 吴蕾, 雷鸣, 洪建辉, 甘一如 (2002). 超声破碎重组大肠杆菌释放包含体的过程研究. 化学工业与工程 **19**, 422–425.
- 易文凯, 王佳, 杨辉, 田云, 卢向阳 (2012). 植物ABA受体及其介导的信号转导通路. 植物学报 **47**, 515–524.
- 周洁, 付强, 玉延华 (2013). 等温滴定微量热检测中样品预处理的优化研究. 化学与生物工程 **30**(9), 72–74.
- 周洁, 玉延华, 朱平川, 付强, 胡炜 (2014). 圆二色和等温滴定微量热技术研究盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱与人血清白蛋白的作用机制. 分析实验室 **33**, 432–435.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Canas B, Pineiro C, Calvo E, Lopez-Ferrer D, Gallardo JM (2007). Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *J Chromatogr A* **1153**, 235–258.
- Ding F, Sun Y, Diao JX, Li XN, Yang XL, Sun Y, Zhang L (2012). Features of the complex of food additive hesperidin to hemoglobin. *J Photochem Photobiol B* **106**, 53–60.
- Draczkowski P, Matosiuk D, Jozwiak K (2014). Isothermal titration calorimetry in membrane protein research. *J Pharm Biomed Anal* **87**, 313–325.
- Falconera RJ, Collinsb BM (2011). Survey of the year 2009: applications of isothermal titration calorimetry. *J Mol Recognit* **24**, 1–16.
- Florine D, Santiago J, Betz K, Twycross J, Park SY, Rodriguez L, Guzman MG, Jensen MR, Krasnogor N, Blackledge M, Holdsworth M, Cutler SR, Rodriguez PL, Márquez JA (2011). A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *EMBO J* **30**, 4171–4184.
- Hanson WM, Domek GJ, Horvath MP, Goldenberg DP (2007). Rigidification of a flexible protease inhibitor variant upon binding to trypsin. *J Mol Biol* **366**, 230–243.
- Hao Q, Yin P, Li WQ, Wang L, Yan CY, Lin ZH, Wu JZ, Wang JW, Yan SF, Yan N (2011). The molecular basis of ABA-independent inhibition of PP2Cs by a subclass of PYL proteins. *Mol Cell* **42**, 662–672.
- Hytonen VP, Maatta JAE, Niskanen EA, Huuskonen J, Helttunen KJ, Halling KK, Nordlund HR, Rissanen K, Johnson MS, Salminen TA, Kulomaa MS, Laitinen OH, Airene TT (2007). Structure and characterization of a novel chicken biotin-binding protein A (BBP-A). *BMC Struct Biol* **7**(8), 1–20.
- Li G, Xin H, Zheng XF, Li S, Hu Z (2012). Identification of the abscisic acid receptor VvPYL1 in *Vitis vinifera*. *Plant Biol* **14**, 244–248.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**, 1064–1068.
- Madrid KP, Jardim A (2005). Peroxin 5-peroxin 14 association in the protozoan *Leishmania donovani* involves a novel protein-protein interaction motif. *J Biochem* **391**, 105–114.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**, 1068–1071.
- Pierce MM, Raman CS, Nall BT (1999). Isothermal titration

- calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **19**, 213–221.
- Privalov PL, Dragan AI** (2007). Microcalorimetry of biological macromolecules. *Biophys Chem* **126**, 16–24.
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Márquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL** (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* **60**, 575–588.
- Volkova N, Ibrahim V, Hatti-Kaul R** (2012). Laccase catalysed oxidation of syringic acid: calorimetric determination of kinetic parameters. *Enzyme Microb Technol* **50**, 233–237.
- Wang WS, Ji JJ, Li X, Wang J, Li SS, Pan GH, Fan KQ, Yang KQ** (2014). Angucyclines as signals modulate the behaviors of *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 5688–5693.
- Wei KF, Wang YM, Zhong XJ, Pan S** (2014). Protein kinase structure, expression and regulation in maize drought signaling. *Mol Breed* **34**, 583–602.
- Zhang XL, Jiang L, Wang GQ, Yu L, Zhang Q, Xin Q, Wu W, Gong ZZ, Chen ZZ** (2013). Structural insights into the abscisic acid stereospecificity by the ABA receptors PYR/PYL/RCAR. *PLoS One* **8**, e67477.

Optimization of Detection Methods for *Zea mays* ABA Receptor ZmPYL1 by Isothermal Titration Calorimetry

Ruixue Yang[†], Haiyang Liu[†], Shengli Liu, Tingqiao Yu, Yuzhen Chen^{*}, Cunfu Lu^{*}

¹College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing 100083, China; ³Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Tree and Ornamental Plants of Education Ministry, Beijing 100083, China

Abstract Abscisic acid (ABA) is a key phytohormone involved in adaption to environmental stress and regulation of plant development. Identification of the ABA receptor has important theoretical and practical significance. Isothermal titration calorimetry (ITC) is one of the important techniques used to identify and select ABA receptors; however, high-quality receptor protein is needed in this method. In this study, we examined factors affecting the separation and purification of the *Zea mays* ABA receptor ZmPYL1 and the binding affinity of ZmPYL1 to ABA. ZmPYL1 was overexpressed in *E. coli*, and high-level ZmPYL1 was purified from sonicated *E. coli* cells. The optimized ultrasonification conditions were total time 15 min, single time 3 s, internal time 10 s, and concentration of bacterial suspension 100 mg·mL⁻¹. The binding affinity reaction of (±)-ABA to ZmPYL1 was an endothermic process, so ZmPYL1 is a dimer receptor. ITC results showed K_d of 72.46 μmol·L⁻¹ for the interaction between 4 mmol·L⁻¹ (±)-ABA and 0.1 mmol·L⁻¹ ZmPYL1. This study provides an important technical basis for screening and identifying plant ABA receptors.

Key words ABA receptor, isothermal titration calorimetry, ultrasonification, *Zea mays*

Yang RX, Liu HY, Liu SL, Yu TQ, Chen YZ, Lu CF (2016). Optimization of detection methods for *Zea mays* ABA receptor ZmPYL1 by isothermal titration calorimetry. *Chin Bull Bot* **51**, 790–800.

[†] These authors contributed equally to this paper

^{*} Authors for correspondence. E-mail: chenyzhen@bjfu.edu.cn; lucunfu@bjfu.edu.cn