

花椰菜胞外钙调素的性质及促进植物生长作用^{*}

刘德龙 杨燕生

孙大业

(中山大学化学系, 广州 510275) (河北师范大学生物系)

关键词 花椰菜, 胞外钙调素, 花粉萌发, 花粉管伸长

分类号 Q 942.6

钙调素 (CaM) 是普遍存在于真核细胞中的一种重要的多功能胞内钙受体, 近年来也在细胞外区域被发现, 并且具有胞外作用位点. Biro 等^[1]首次在燕麦芽鞘细胞壁水溶性提取物中检出 CaM. 随后, 在动物和植物多种细胞的培养介质中均检出 CaM 活性, 并通过用 CaM 拮抗剂 W7-agarose, CaM 抗体的抑制实验及外加纯化 CaM 的试验结果提出 CaM 可以在胞外区域起促进 DNA 合成及细胞增殖的作用^[2], 促进或启动花粉萌发及花粉管伸长^[3]. 由于有关 CaM 胞外功能的研究结果均为使用外加胞内 CaM 而获得的, 而胞内外 CaM 的性质尤其是在胞外位点的功能是否一致则不清楚. 为此, 以花椰菜为材料纯化了胞外 CaM, 并对其性质及胞外功能进行了研究.

1 花椰菜胞外 CaM 的纯化和性质

花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* Linn) 细胞壁盐溶性蛋白的制备按照文献 [4] 的方法. 细胞壁盐溶蛋白提取液经 3% 三氯乙酸沉淀蛋白. 10 000 r/min 离心 30 min, 沉淀溶于缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EGTA, 20 mmol/L NaHSO₃, pH 7.6), 调 pH 至 8.0 以上均在 4℃ 进行. 然后在 95℃ 加热 3 min, 速冷后 2 000 r/min 离心 1 h, 上清液上 DEAE 柱, 用 0~0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱, 并检查 CaM 活性峰管 [NAD 激酶 (NADK)], 合并液调 Ca²⁺ 至 5 mmol/L, 上 Phenyl- Sepharose 4B 柱, 可获得纯化胞外 CaM. 纯化的胞外 CaM 在 SDS- PAGE 中显示一条带, 经薄层扫描测定纯度为 99%. 利用基本辅助激光解吸飞行时间质谱法 (MALDI- TOF- MS) 测定胞外 CaM 的分子量为 15 582.3, 而相应胞内 CaM 的分子量为 17 025.6. 推测胞内外 CaM 分子量的差别可能与 CaM 基因家族有关^[5], 即不同 CaM 基因编码的 CaM 适合在细胞的不同区域发挥功能. 靶酶激活实验表明, 花椰菜胞外 CaM 能完全激活 NADK, 但其半激活量 (0.15 μg) 明显高于胞内 CaM (0.10 μg). CaM 内源荧光实验表明, 胞 (内) 外 CaM 的荧光光谱为典型的 A 类蛋白的光谱, 即激发光谱峰为 280 nm, 而发射光谱峰为 307 nm, 说明胞 (内) 外 CaM 中均含有 Tyr, 与牛脑 CaM 的荧光光谱相似. 但胞外 CaM 的内源荧光强度较高, 由于 Tyr 荧光是其周围环境的灵敏探针, 因此

^{*} 国家自然科学基金 (29671034) 资助项目

收稿日期: 1996-12-17 刘德龙, 男, 3 岁, 博士生

可知胞（内）外 CaM 中 Tyr 周围环境并不相同，反映了它们构象的差别。

2 花椰菜胞（内）外 CaM 对花粉萌发和花粉管伸长的作用

为探索定位于胞外区域 CaM 功能的特异性，在花粉（新鲜草莓花粉）培养介质中加入花椰菜胞外或胞内 CaM，观察它们对花粉萌发和花粉管伸长的影响。花粉萌发和花粉管伸长测定按文献 [3] 的方法。试验的结果（表 1）表明外加花椰菜胞外 CaM 有促进花粉萌发及花粉管伸长的作用，而且比外加胞内 CaM 的促进作用还强。

表 1 花椰菜胞（内）外 CaM 对花粉萌发和花粉管伸长的影响
Tab. 1 The effects of extracellular and intracellular CaM on pollen germination and pollen tube extension

[CaM]	花粉萌发率 %		花粉管长度 μm	
	胞内	胞外	胞内	胞外
0	50	50	100	100
10^{-9}	57	59	111	117
10^{-8}	59	62	122	129
10^{-7}	63	66	125	136
10^{-6}	61	65	125	135

结果说明胞外 CaM 具有标准 CaM 的特点，但又与胞内 CaM 在性质和功能上有差别。

参 考 文 献

1 Biro R L, Sun D Y, Serlin B S, et al. Characterization of oat calmodulin and radioimmassay of its subcellular distribution. *Plant Physiol*, 1984, 75 382~ 386
2 孙大业, 唐军, 李红兵. 细胞外钙调素的研究及意义. *科学通报*, 1995, 40 (37): 1153~ 1159
3 马力耕, 孙大业. 钙调素启动和促进花粉萌发及花粉管伸长的细胞外作用位点研究. *自然科学进展*, 1996, 6 (4): 505
4 叶正华, 孙大业, 郭秀芳. 小麦细胞壁钙调素的研究初报. *科学通报*, 1988, 8 624~ 626
5 Roberts D M. Calcium-modulated proteins. *Ann Rev, Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43 375

Properties of Extracellular Calmodulin of Cauliflower and Its Promoting Effects on Plant Growth

Liu Delong* Yang Yansheng Sun Daye

Abstract The purification, properties and function of cauliflower extracellular calmodulin is reported for the first time. The result shows that extracellular CaM has general properties of CaM, though it is significantly different from intracellular CaM.
Keywords *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L., extracellular CaM, pollen germination, pollen tube extension

* Department of Chemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>