

芥菜采后叶片中蛋白酶特性分析

徐杏连 姜微波 林琳

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 利用凝胶电泳技术分析芥菜叶片组织蛋白酶活性,结果显示:采后芥菜叶片中含有4个较强的蛋白酶活性条带(A、B、C、D),其中蛋白酶D的活性最强,A、C次之,B的活性在贮藏2~6d的叶片中才能观测到。蛋白酶D的活性占总蛋白降解活性的50%以上,其最适反应温度为50~60℃,在pH 6~10的条件下均有很强的活性。

关键词 芥菜叶片;衰老;蛋白酶;凝胶电泳

中图分类号 S 609.3

文章编号 1007-4333(2005)05-0049-03

文献标识码 A

Characterizations of proteases in harvested mustard leaves

Xu Xinglian, Jiang Weibo, Lin Lin

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract By improved SDS-gelatin-PAGE assay, 4 protease bands (A, B, C, D) in the mustard leaves were identified. Activity of the protease D in the leaves was the highest, activities of the protease A and C were modest, activities of the protease B was weak and only observed in the 2 - 6 d during storage. The protease D was the major protease in the leaves and its activity attributed to more than 50 % the total proteolytic activity in the leaves. The optimal temperature was in the range of 50 - 60 °C, and with optimal pH 6 - 10 for the protease D activity.

Key words mustard leaf; senescence; protease; gel electrophoresis

叶菜采收后容易衰老,其衰老阶段的主要特征之一是叶片蛋白质含量下降^[1]。叶片中蛋白质的快速降解会导致叶菜类产品品质的迅速下降^[2]。各个发育阶段植物组织中蛋白质合成与降解的代谢循环持续进行,但不同发育阶段,特别是植物衰老阶段,同一组织内所含有的蛋白酶种类及其活性会发生显著变化^[3-4]。

蛋白酶在植物的生长发育和衰老等生理过程中起着重要的调控作用,但目前对其在叶片中的确切作用机理尚缺乏了解,叶片衰老过程中蛋白酶活性的变化随植物种类的不同而有所不同^[3]。本试验以芥菜(*Brassica juncea* Coss.)为试材,利用近年来发展起来的蛋白酶活性凝胶分析方法,对与芥菜叶片衰老相关的蛋白酶的特性进行了研究,拟为进一步确定蛋白酶在叶片衰老过程中的作用方式提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

在最佳采收期采收芥菜,用地膜包装保湿运至实验室,挑选无机械伤、无病虫害、均一形状的作为试验材料。将挑选出的芥菜置于12L经消毒的塑料筐中,筐外加聚乙烯塑料膜密封袋包装,密封袋与塑料筐之间放置1块在1mol/L氢氧化钾溶液中浸泡过的海绵,用于吸收CO₂。将试验材料置于20℃、相对湿度85%~95%的恒温暗室中进行观测,每隔48h取样1次。叶片除去大叶脉后切成细丝混匀,-20℃保存备用。

1.2 蛋白酶提取与电泳分析

将3g叶片与2mL蛋白提取缓冲液(50mmol Tris-HCl,pH 7.5)放入预冷处理过的研钵中研磨,匀浆后12000g、4℃离心10min,收集上清液,-20℃

收稿日期:2005-02-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30430045);中国农业大学“研究生重点课程建设项目”

作者简介:徐杏莲,硕士研究生;姜微波,教授,通讯作者,主要从事果蔬采后生理与贮藏保鲜技术研究,E-mail:jwb@cau.edu.cn

cn

保存备用。

采用姜微波^[5]改进的凝胶电泳蛋白酶活性分析技术,将含有15 μg蛋白的提取样品液与15 μL样品缓冲液(100 mmol Tris-HCl, pH 6.8、20%甘油、2% SDS、0.01%溴酚蓝)混合,在38℃水浴下温浴10 min(样品预处理温度试验(图2)除外),然后对其进行电泳分析。电泳浓缩胶质量浓度为4 g/(100 mL),分离胶质量浓度为10 g/(100 mL)并含有0.2%明胶(蛋白酶分析底物)。4℃下完成电泳后,将分离胶置于复性缓冲液(2% Triton X-100, 50 mmol Tris-HCl, pH 7.5)中复性15 min,每隔5 min更换复性缓冲液1次;再将分离胶置于50 mmol Tris-HCl(pH 7.5, 酶反应缓冲液)中,37℃温浴下反应6 h;之后,将分离胶浸入氨基黑染色液(0.1%氨基黑、10%冰乙酸、30%甲醇)中染色2 h;最后用15%甲醇与5%乙酸溶液对分离胶进行脱色处理。

1.3 蛋白酶特性分析

按姜微波^[5]改进的方法,将分离胶“复性”浸洗处理后纵向切成同等宽度的凝胶条,再分别将凝胶条置于不同温度酶反应缓冲液、含有蛋白酶活性抑制剂苯甲基磺酰氟化物(PSMF, 2 mmol)的酶反应缓冲液、含有2 mmol EDTA的酶反应缓冲液、不同pH缓冲液(pH 3~6, 为0.2 mol的柠檬酸缓冲液; pH 7~12, 为0.2 mol Tris-HCl缓冲液)中,分析预处理温度对蛋白酶活性的影响、蛋白酶活性的最适温度、pH和抑制剂的作用效果。

1.4 蛋白质含量测定

按Bradford^[6]的方法,以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白。

2 结果与讨论

2.1 芥菜叶片中蛋白酶活性的变化

采用凝胶电泳分析技术由芥菜叶片中检测出A、B、C、D(电泳迁移速率由慢到快)等4个蛋白酶活性条带(图1),其中蛋白酶D的活性最强,A、C次之,B的活性在贮藏2~6 d的叶片中才能观测到。

凝胶电泳密度分析软件(Scion Image 4.02)计算结果显示,蛋白酶D的活性占总蛋白酶活性的50%以上,是芥菜叶片中的主导蛋白酶。

2.2 芥菜叶片中蛋白酶特性分析

将贮存6 d的芥菜叶片提取样品与电泳样品缓冲液混合,在不同温度下加热处理10 min后进行电泳分离并检测蛋白酶活性,结果见图2。可以看出:

芥菜叶片中的4种蛋白酶在20~40℃预处理温度范围内均呈现很高的活性;而经45℃处理后蛋白酶B完全失去活性,C的活性也明显受到抑制,A的活性在45~55℃时随温度升高而逐渐降低,60℃时完全失去活性,D的活性在45~60℃范围内随温度升高而逐渐降低,70℃时完全失去活性。

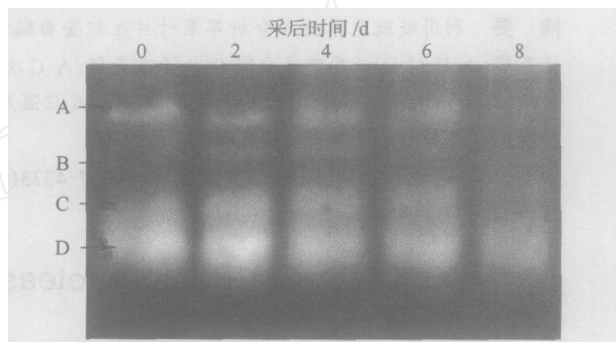


图1 芥菜叶片蛋白酶活性变化分析

Fig. 1 Assay of protease activities in mustard leaves

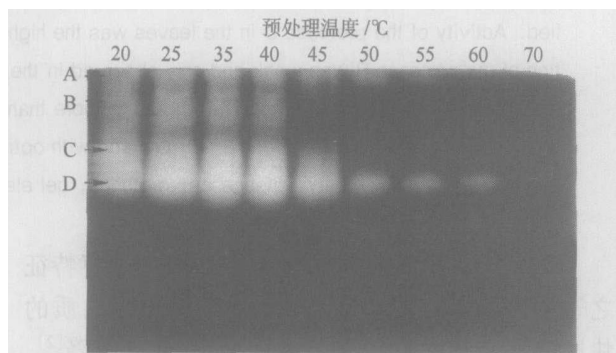


图2 电泳样品预处理温度对芥菜叶片蛋白酶活性的影响

Fig. 2 Effect of sample pretreating temperature on the protease activities in mustard leaves

用于样品预处理的电泳缓冲液中含有较高浓度的蛋白变性剂SDS,处理温度越高,蛋白解聚作用越强,电泳分离效果越好。分析蛋白酶对预处理的耐受温度是进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白酶活性的基础。

将贮存6 d的芥菜叶片提取样品与电泳样品缓冲液混合,在40℃条件下处理10 min后进行电泳分离,分析蛋白酶的反应温度范围。结果显示,芥菜叶片中的4种蛋白酶在50~60℃范围内活性最强,80℃时仍能观测到微弱的活性(图3)。

芥菜叶片蛋白酶的最适pH分析结果(图4)表明:蛋白酶A在pH 6~10的条件下有较强的活性,B和C在pH 5~7时有一定的活性,D的适应范围较广,在pH 6~10的条件下均有很强的活性,而在

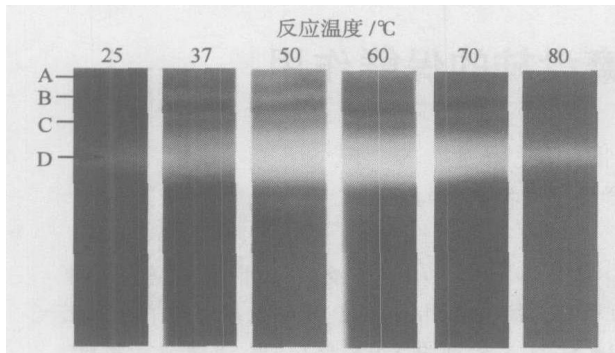


图 3 芥菜叶片蛋白酶的最适反应温度
Fig. 3 Assay of the optimal temperature for the protease activity in mustard leaves

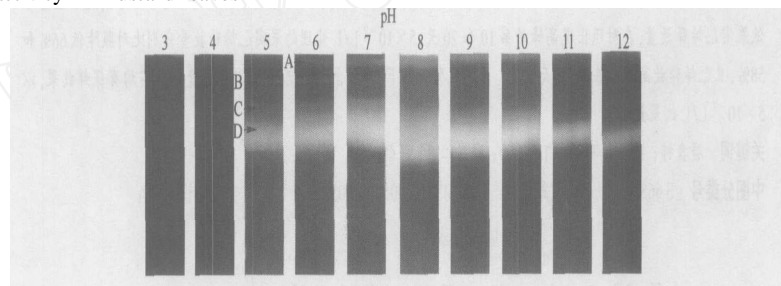


图 4 芥菜叶片蛋白酶的最适 pH

Fig. 4 Assay of the optimal pH for the proteases activities in mustard leaves

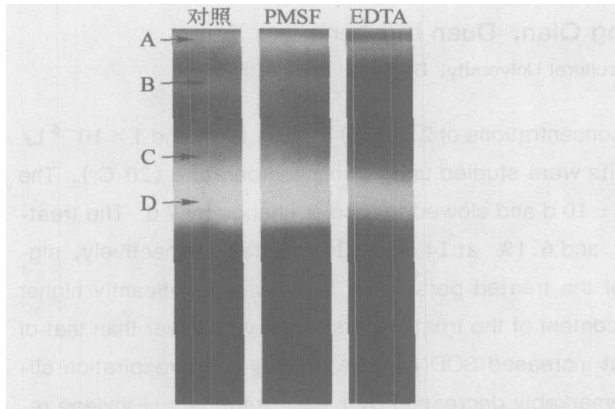


图 5 PMSF 和 EDTA 对芥菜叶片蛋白酶活性的影响
Fig. 5 Effects of PMSF and EDTA on protease activities in mustard leaves

中发现的蛋白酶都属于丝氨酸蛋白酶^[7-8],很多研究表明,丝氨酸蛋白酶在植物衰老过程中起着重要作用^[3];而本试验中未能观测到 PMSF 对芥菜叶片蛋白酶活性的影响,说明芥菜叶片中的主要蛋白酶类型不同于其他植物叶片中存在的蛋白酶。

本文中报道的芥菜叶片蛋白酶活性变化与特性的分析结果,将有助于更加深入研究不同种类蛋白酶在叶片采后衰老中的作用,并为分离纯化蛋白酶奠定基础。

pH 11~12 时依然能检测到活性。

利用蛋白酶抑制剂对蛋白酶活性测定结果进行分析,结果显示,丝氨酸蛋白酶专一性活性抑制剂 PMSF 对芥菜所含蛋白酶活性均无影响(图 5),表明这些蛋白酶不属于丝氨酸蛋白酶类;而蛋白酶 B、C 的活性明显受金属蛋白酶抑制剂 EDTA 的抑制,表明这 2 种蛋白酶可能属于金属蛋白酶类。

对蛋白酶类型的鉴定是了解蛋白酶作用机理的一个重要方面。根据蛋白酶活性中心的催化机制,蛋白酶分为丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、天门冬氨酸蛋白酶和金属蛋白酶等类型。目前在多种植物组织

参 考 文 献

- [1] Lipton W J. Senescence of leafy vegetables [J]. Hort Sci, 1987, 22:854-859
- [2] Huffaker R C. Proteolytic activity during senescence of plants [J]. New Phytologist, 1990, 166:199-231
- [3] Callis J. Regulation of protein degradation [J]. Plant Cell, 1995, 7:845-857
- [4] Lalonde L, Dhindsan R S. Altered protein synthesis during oat leaf senescence [J]. Physiol Plant, 1990, 80:619-623
- [5] 姜微波. 凝胶电泳分析蛋白酶活性的技术改进[J]. 植物学通报, 2002, 19 (4): 607-610
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of micro quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-258
- [7] Jiang W B, Lers A, Lomaniec E, et al. Senescence-related serine protease in parsley [J]. Phytochemistry, 1999, 50:377-382
- [8] Jiang W B, Zhou X, Zhao Y, et al. Identification of a senescence related protease in coriander leaves [J]. Chinese Science Bulletin, 2002, 47 (13):1096-1099