

番茄果实中多聚半乳糖醛酸酶的 纯化及其基本性质*

沈全光 刘存德 阎田 鞠戎 王飞澜

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

关键词 番茄果皮; 多聚半乳糖醛酸酶 (PG)

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE POLY- GALACTURONASE FROM TOMATO FRUITS

Shen Quan-guang, Liu Cun-de, Yan Tian, Ju Rong and Wang Fei-lan

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044*)

Abstract

The polygalacturonase (PG) isolated from the pericarp of fully ripe tomato fruits was purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, carboxymethylsepharose ion-exchange column and sephadex G-75 gel filtration. Specific activity of purified PG was $1.5 \mu\text{mol galacturonic acid mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$, which was 30 times as high as that of the crude extract with 1.7 mol NaCl. When the elution separated by second sephadex G-75 column was analyzed by SDS-PAGE, only a single protein band was detected. It was shown by heat and pH experiments of the purified enzyme that the enzyme activity retained 50%, after treatment with heat at 50°C for 10 min, and that the optimal pH was 4.6.

Key words Tomatoes pericarp; Polygalacturonase

由于番茄成熟后很快变软,极难保鲜和贮藏运输。采收的绿熟果实,用较先进的低温气调技术也只能贮存 45 天^[4]。早在 60 年代初 Hobson^[9,10]指出多聚半乳糖醛酸酶与番茄果实软化密切相关,继后许多研究证明,该酶是一种细胞壁蛋白,它的主要功能是将果实细胞壁中多聚半乳糖醛酸降解为半乳糖醛酸,使细胞壁结构解体导致果实软化^[7,12,17]。

近年来英国和美国一些科学工作者从分子遗传角度进行了大量工作,现已获得 cDNA 克隆,并用于研究果实成熟及逆境基因表达^[5,13,16]。他们采用反意 RNA 技术创造出转基因番茄,其果实在成熟后变软的过程比普通番茄果实推迟,从而延长了果实的货架

寿命, 获得显著经济效益和反意植物专利 (Calgene Receikes Antisense Plant Patent, 1989: Genetic engineering News, 9(3): 33)。

国内关于多聚半乳糖醛酸酶的研究报道还很少^[3], 尚未见番茄果实 PG 的报道, 近几年我们对番茄果实的 PG 进行了较系统的研究^[1,2], 同样证明 PG 是番茄果实成熟变软的关键酶。绿熟果中无 PG 存在, 只有到果实转红时 PG 才表达, 其活性随着成熟而增大。本文主要报道番茄果实的 PG 纯化及基本性质。用我们纯化的 PG 已获得兔子免疫血清(另文报道), 这项工作为进一步研究 PG 基因表达及调控机理奠定了基础。

材 料 和 方 法

实验材料来自北京郊区四季青乡。品种为“强丰”番茄(*Lycopersicon esculentum*)。将采收的新鲜红熟番茄(或绿熟果实放在室温下贮存到全红), 按照 Wills (1979)^[13]的方法, 将果实颜色分成五个成熟时期。我们用相当于第五期的全红果为材料进行 PG (polygalacturonase E. C. 3.2.1.15) 分离。因在这时多聚半乳糖醛酸酶活性最高。

(一) PG 的提取与纯化

参照 Zainon 等(1982)的方法^[19], 切取洗净的全红熟番茄果皮组织, 加入适量的研磨介质(含 Tris-HCl 0.017 mol/l、巯基乙醇 5m mol/l pH 10), 用组织捣碎机破碎, 将匀浆的 pH 调至 6—6.5, 在 8000×g 离心 30 分钟; 弃去上清液, 沉淀物加入提取介质(含 NaCl 1.7 mol/l、柠檬酸钠 50m mol/l 和 EDTA 15m mol/l, pH 5.5) 在 4℃ 下提取 1.5 小时, 15000×g 离心 15 分钟。将上清液进行硫酸铵分级分布, 40—80% 饱和度的 (NH₄)₂SO₄ 沉淀物, 在 15000×g 离心 30 分钟。收集沉淀物溶于乙酸钠缓冲液 0.125 mol/l pH 6.0, 并以此溶液为背景透析过夜, 更换透析液, 得到的酶液作进一步纯化; 通过羧甲基-琼脂糖 CL 6 B (Sigma 产品) 阳离子交换柱 (0.9 × 27cm), 用乙酸钠 0.125 mol/l pH 6.0 平衡, 乙酸钠 0.125 mol/l—0.5mol/l 进行梯度洗脱, 流速每小时 24ml, 收集其活性馏分, 以 80% 饱和度 (NH₄)₂SO₄ 沉淀蛋白, 离心分离, 收集的蛋白悬浮于含有乙酸钠 0.1 mol/l 和二硫苏糖醇 (DTT) 1m mol/l 的介质; 然后过葡聚糖 G-75 凝胶柱 (1.5 × 90cm), 并用上述介质洗脱, 流速每小时 6ml, 收集其活性部分, 再过一次葡聚糖凝胶柱, 全部操作在 0—4℃ 下完成。

(二) 酶活性分析

以多聚半乳糖醛酸 1% (Sigma 产品) 为底物, 加适量的酶液, 和酶液等体积的 NH₄Cl 2 mol/l, pH 4.5。在 37℃ 保温 30 分钟, 用 3, 5-二硝基水杨酸法^[11]测定还原基数量, 以 α , D-半乳糖醛酸 (Sigma 产品) 作标准样, 酶活性以每分钟 μmol 半乳糖醛酸 mg^{-1} 蛋白 ($\mu\text{mol Gal. acid mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$) 表示。

(三) 蛋白含量的测定

按照 Bradford (1976) 的方法^[6], 以考马斯亮蓝 G-250 为染料, 国产电泳纯牛血清蛋白作标准。用岛津 UV-190 型双波长分光光度计, 波长 595nm 测定蛋白含量。以层析柱洗脱的馏分, 在 280nm 直接记录 A 值。

(四) SDS-聚丙烯酰胺电泳

参照 Chua (1975) 等^[8]和 Reisfeld 等 (1962)^[15]的方法, 制备 SDS-不连续缓冲系

统 10% 的分离胶;电泳后胶片用蒸馏水漂洗,然后以 0.2% 考马斯蓝 R-250 染色(溶于 50% 甲醇和 30% 乙酸中)。脱色用 7.0% 乙酸和 5% 甲醇溶液,在 50—60°C 下脱色至背景无色,用岛津 CS-190 薄层层析光密度扫描仪,在波长 550nm 处进行扫描。

结果与讨论

(一) 完熟番茄果皮组织中 PG 的纯化

用充分成熟的番茄果皮组织,在 pH 5.5 和高盐浓度 1.7 mol/l NaCl 介质中提取的粗酶液,经过硫酸铵分级沉淀,阳离子交换柱层析和葡聚糖 G-75 凝胶过滤两次,获得具有高纯度和较高活性的酶蛋白(表 1),与粗酶比较 PG 活性提高了 30 倍,酶的比活性 $1.5 \mu\text{mol}$ 半乳糖醛酸 mg^{-1} 蛋白。这一结果与 Zainon (1982)^[19] 用完全红熟番茄果皮组织得到的纯化酶比活 $1.7 \mu\text{mol mg}^{-1}$ 蛋白接近。

表 1 完熟番茄果皮组织纯化的 PG 组分

Table 1 Purification of PG from pericarp tissue of ripe tomato fruits

步 骤 Step	总蛋白 Total Protein (mg)	总活性 Total Activity (μmol)	比活性 Specific Activity ($\mu\text{mol mg}^{-1}$)	产 率 Yield (%)	纯化度 Purification- fold
1.7M NaCl 提取 Extract	935	46.8	0.05	100	1.0
40—80% (NH_4) ₂ SO ₄	262.5	34.1	0.13	73	2.6
透 析 Dialysis	158.4	28.5	0.18	61	3.6
羧甲基-琼脂糖 Carboxymethyl-Sephrose	32.8	16.7	0.51	36	10.2
葡聚糖 G-75(I) Sephadex G-75	7.4	9.6	1.30	21	26.0
葡聚糖 G-75 (II) Sephadex G-75	5.8	8.7	1.50	19	30.0

用完熟番茄提纯的 PG,经变性处理,用 SDS-聚丙烯酰胺电泳分析,电泳图谱上呈现一条带,即 PG 蛋白带(图 1),表明我们制备的 PG 纯度较高。

(二) 纯化 PG 的热稳定性

将酶液分别在 30、40、50、60、70、80°C 下处理 10 分钟,置于冰浴中冷却,再按上述方法,在 37°C 保温测定酶水解底物的剩余活性。结果(图 2)表明,在 50°C 保温 10 分钟,酶活性丧失 50%,这与 Zainon 等(1982)^[19]的结果相同。

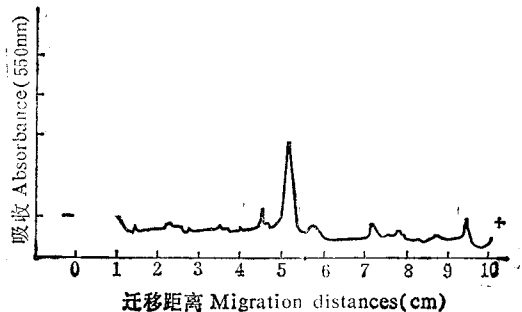


图 1 纯化的 PG, SDS-PAGE 电泳谱的光密度扫描
Fig. 1 Photometric scanning profile of PG after SDS-PAGE

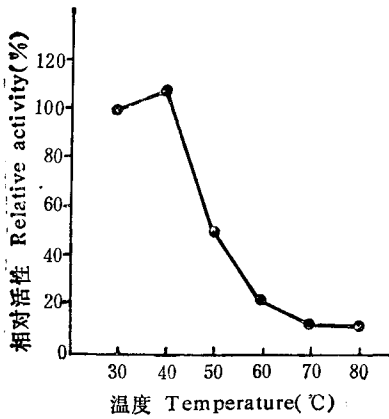


图2 纯化 PG 的热稳定性

Fig. 2 Heat stability of purified PG

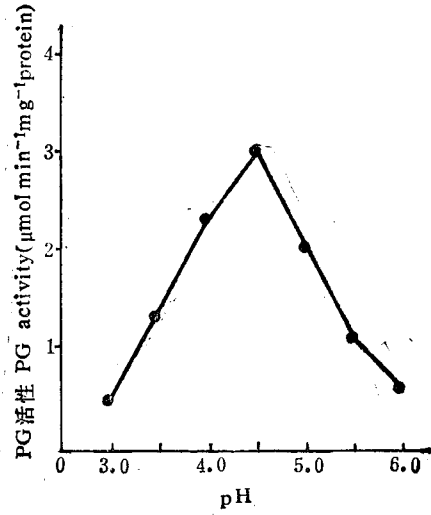


图3 pH 对 PG 活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on PG activity

(三) pH 对纯化 PG 活性的影响

用磷酸氢二钠和柠檬酸盐缓冲液, pH 值的范围 3—6, 以多聚半乳糖醛酸为底物与酶液在 37°C 下反应, 按上述方法测得的酶活性, 结果 (图 3) 指出, pH 4—5 范围内酶活性均较高, 最适 pH 4.6, 这与 Zainon (1982)^[19] 和 Pressey (1982)^[14] 等的试验结果相一致。

以上结果说明我们用完熟番茄果皮为材料, 采用的提纯步骤可以得到纯度与酶活性均较高的 PG; 用这种酶制剂检验其基本性质, 得的结果与前人的报道相符合。

参 考 文 献

- [1] 卢春彬、刘存德、沈全光、梁厚果, 1990: PG 在番茄果实成熟中的作用及二价金属离子与乙烯对 PG 活性的影响。植物学报, 32: 337—340。
- [2] 卢春彬、刘存德、沈全光、梁厚果, 1989: 钙处理不同成熟期番茄果实对 PG 活性与合成影响的比较研究。植物学报, 32。
- [3] 梁玉法、敖良德、王明鑫、易文吉, 1982: 多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 在苹果成熟过程的作用。植物学报, 24: 143—146。
- [4] 中国科学院植物研究所, 1976: 西红柿贮藏保鲜的研究 I. 气调贮藏的效果及其对果实某些生理过程的影响。植物学报, 18: 278—283。
- [5] Bird, C. R., C. J. S. Smith, J. A. Ray, P. Moureau, M. J. Bevan, A. S. Birds, S. Hughes, P. C. Morris, D. Grierson and W. Schuch, 1988: The tomato PG gene and ripening specific expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 11: 651—662。
- [6] Bradford, M. M., 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。
- [7] Crooks, P. R. and D. Grierson, 1983: Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol.*, 72: 1088—1093。
- [8] Chua, N. H. and P. Bennoun, 1975: Thylakoid membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii* Wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 72: 2175—2179。
- [9] Hobson, G. E., 1964: Polygalacturonase in normal and abnormal tomato fruit. *Biochem. J.*, 92: 324—332。

- [10] ———, 1965: The firmness of tomato fruit in relation to polygalacturonase activity. *J. Hort. Sci.*, 40: 66—72.
- [11] Luchsinger, W. W and R. A. Cornesky, 1962: Reducing power by the dinitrosalicylic acid method. *Anal. Biochem.*, 4: 346—347.
- [12] Moshrefi, M. and B. S. Luh, 1983: Carbohydrate composition and electrophoretic properties of tomato PG isoenzymes. *Eur. J. Biochem.*, 135: 511—514.
- [13] Picton, S. and D. Grierson, 1988: Inhibition of expression of tomato ripening genes at high temperature. *Plant Cell Envir.*, 11: 265—272.
- [14] Pressey, R. and J. K. Avants, 1982: Pectic enzymes in 'Long Keeper' tomatoes. *Hortscience*, 17: 398—400.
- [15] Reisfield, R. A., U. J. Lewis and D. E. Williams, 1962: Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195: 281—283.
- [16] Sinith, C. J. S., C. F. Watson, P. C. Morris, C. R. Bird, G. B. Seymour, J. E. Gray, C. Arnold, G. A. Tucker, W. Schuch and D. Grierson. 1990: Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol. Biol.*, 14: 369—379.
- [17] Tucker, G. A. and D. Grierson, 1982: Synthesis of polygalacturonase during tomato fruit ripening. *Planta*, 155: 64—67.
- [18] Wills, R. B. H. and S. I. H. Tirmazi, 1979: Effect of calcium and other minerals on ripening of tomatoes. *Aust. J. Plant Physiol.*, 6: 221—227.
- [19] Zainon, M. A. and C. J. Brady, 1982: Purification and characterization of polygalacturonase of tomato fruits. *Aust. J. Plant Physiol.*, 9: 155—169.

更正 本刊 32 卷 12 期, 李晓萍、胡文玉《光和激素对叶片衰老的影响》一文中, 图 3 内 MDA 含量的单位应为 nmol/30 pieces.

Correction: In the paper "The effect of light and hormones on leaf senescence" by Li Xiaoping and Hu Wenyu, Vol.32(12), Fig. 3 the unit of MDA content should be nmol/30 pieces.