

紫外照射诱导采后番茄苯丙氨酸解氨酶的分离纯化

荣瑞芬, 郭 堃, 厉重先, 李丽云, 李祖明

(北京联合大学 师范学院 北京 100011)

摘要: 为了解苯丙氨酸解氨酶(PAL)在紫外诱导采后果蔬抗病性中的作用,以番茄为试材,经 2.4 kJ/m² 短波紫外线(UV-C)照射,取果皮经冰浴研磨、硫酸铵分级沉淀、凝胶过滤和离子交换层析,分离纯化 PAL,测得 UV-C 照射组 PAL 总蛋白含量为 0.030 mg,较对照组高 0.002 mg,酶比活为 11 466.0 U/mL,比对照组高 1 109.0 U/mL,分离纯化倍数为 16.4 倍,对照为 15.0,表明 UV-C 照射可诱导 PAL 产生,提高活性。纯化获得的 PAL 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,呈现一条带,其分子量约为 304 kD。

关键词: 番茄; UV-C; 苯丙氨酸解氨酶; 分离纯化

中图分类号: S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)12-0001-04

近年来,有关果蔬产品采后诱导抗性的研究报道较多,生物及非生物因子(如微生物、化学物质、物理因素以及天然物质等)都能够诱导果蔬产品采后的抗病性^[1],其中低剂量短波紫外线(ultraviolet-C, UV-C)照射在诱导多种采后果蔬抗病性、延缓成熟、控制腐烂方面表现出较好的效果^[2-6],前人对 UV-C 诱导抗病性机理也做了较深入的研究,表现在诱导抗病基因表达^[7]、果皮组织防御酶活性提高^[5,8,9]、形成抗病物质^[10-11]。番茄经 3.7 kJ/m² 的 UV-C 照射后,过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶、脂氧合酶、抗坏血酸过氧化物酶等防御酶活性提高^[8],细胞降解酶系活性降低^[8],植保素 Rishitin 积累^[10],从而提高了对灰葡萄孢菌的抗性。而防御酶活性的提高对提高抗病性起着很重要的作用。

苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是植物次生物质代谢系统中的一种关键酶。许多研究表明:植物品种自身的抗病性与苯丙氨酸代谢途径有密切关系,植物受病原菌感染后,抗病品种的 PAL 活性提高比感病品种提高的幅度大,并能迅速合成与抗病有关的生化物质如生物碱、植物保卫素、木质素等,有效地阻止了病原菌的扩展, PAL 活性可作为植物抗病性的生化指标^[12]。因此,研究以番茄为试材,对 UV-C 照射采后番茄果皮 PAL 进行分离纯化,并进行活性分析测定,以便了解 PAL 在 UV-C 在控制病害中的作用,对进一步了解植物采后诱导抗病性机理与 PAL 的作用有着

重要的理论意义和现实意义。为今后进行该酶的结构与功能分析及酶基因克隆等研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料与试剂

1.1.1 材料 于 2006 年 4 月 19 日采摘北京通州“加州阳光”番茄,选八成熟、无病虫害、无机械损伤、大小均匀的果实进行试验。

1.1.2 试剂 考马斯亮兰 G-250 和 R-250 为 Fluka 分装、DEAE-纤维素为 Whatman 分装、葡聚糖凝胶 G-25 为 Pharmacia 分装、聚乙烯吡咯烷酮为 Sigma 分装、β-巯基乙醇为 Genview 分装、四甲基乙二胺为 Aldrich 分装,其余为国产分析级试剂或生化试剂。

1.1.3 试验设备 柱层析装置包括层析柱(1 cm×20 cm)(上海锦华层析设备厂)、BSZ-100 电脑全自动部分收集器、HD-II 紫外检测仪、HD-A 电脑采集器、HL-2 恒流泵均为上海青浦沪西仪器厂。电泳仪: DYY-8C 型电泳槽: DYCZ-24D 型(北京市六一仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 紫外线处理方法与取样 试验分紫外照射组与对照组,各 20 个果,重复 2 次。根据前期研究番茄适宜紫外线剂量为 2.4 kJ/m²,用紫外线强度计(ZJQ-254 型上海宝山顾村电光仪器厂)测定紫外照射强度,根据照射时间确定照射剂量。当照射时间为一半时将番茄翻转,使照射均匀,对照组也放于柜中同样进行翻转。照射后将处理果与对照番茄装于塑料框内外套黑色塑料袋,存于室温下(18℃),第 3 天取果皮及其下 2 mm 厚果肉混匀切碎存于-25℃冰箱中备用。

1.2.2 PAL 粗酶液提取及活性测定 参照薛应龙方法^[13]。规定 1 h 内该反应体系条件下 OD₂₉₀ 变化 0.01 为 PAL 的一个活力单位。蛋白质含量测定采用 Bradford

第一作者简介: 荣瑞芬(1964-),女,博士,副教授,研究方向为农产品贮藏加工。E-mail: rongnuifenlaoshi@yahoo.com.cn。
基金项目: 北京市教育委员会科技发展计划面上资助项目(SM200411417004)。
收稿日期: 2007-06-27

的考马斯亮蓝 G-250 比色法^[14]。

1.2.3 PAL 的分离纯化 硫酸铵分级沉淀: 参照范淑琴方法^[15], 粗酶液在冰浴条件下, 加入硫酸铵使溶液达 40% 饱和度; 搅拌、静止 10 min, 10 000 r/min 冷冻离心 20 min, 取上清液再用 70% 硫酸铵的饱和度处理, 冷冻离心弃上清液, 沉淀备用。Sephadex G-25 层析与 DEAE-纤维素层析: 将处理好的 Sephadex G-25 装柱平衡后, 将硫酸铵沉淀获得的样品复溶于 6 mL、0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液后上柱, 0.5 mol/L 的 NaCl、0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 紫外检测仪检测, 收集活性峰部分, 将脱盐的样品再经过同样处理平衡好的 DEAE-纤

维素层析进行纯化。收集的洗脱液进行酶活性测定、SDS-PAGE 电泳和特性分析。PAL 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分子量分析: 参照段玉权、于自然等^[16-17] 的方法, 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%。取纯化前后的 PAL 酶液各 20 μ L, 加入 20 μ L 的样品缓冲液(含有 SDS、巯基乙醇、甘油和溴酚兰)混合后沸水浴 5 min, 冷却后点样。同法处理标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 PAL 的分离纯化

番茄粗酶液经 Sephadex G-25 凝胶层析和 DEAE-纤维素阴离子交换层析结果见图 1、2。

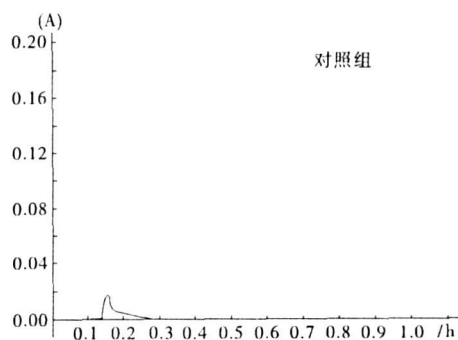
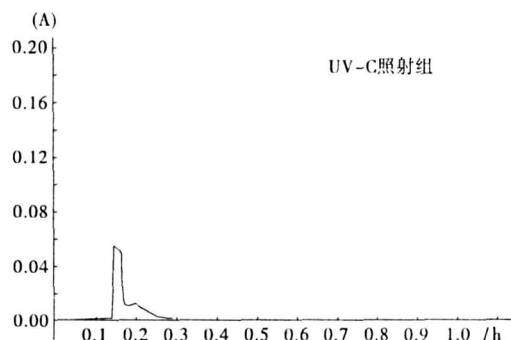


图 1 UV-C 照射番茄和对照组 PAL 的 Sephadex G-25 层析柱洗脱图

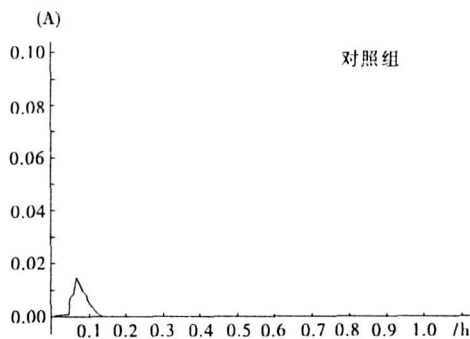
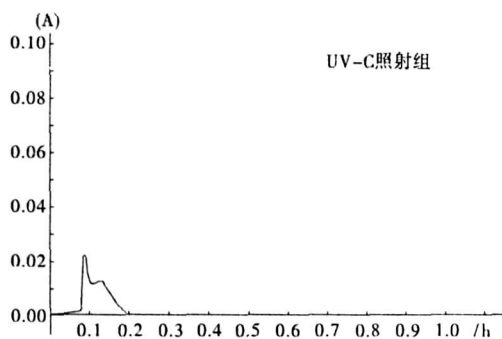


图 2 UV-C 照射番茄和对照组 PAL 的 DEAE-纤维素层析柱洗脱图

从图 1 可看出: 对照组的峰高约为 0.02, UV-C 照射组的峰高约为 0.06, 明显高于对照组, 并且峰宽度大于对照, 表明经脱盐后 UV-C 照射组的蛋白含量高于对照组。从 PAL 在 DEAE-纤维素层析柱上的洗脱图(图 2)中可以看出: UV-C 照射组的峰高在 0.02 之上, 对照组的峰高在 0.02 之下, 峰宽也宽于对照组, 表明经离子交换剂去除杂蛋白后, UV-C 照射组的 PAL 酶蛋白含量仍高于对照组。

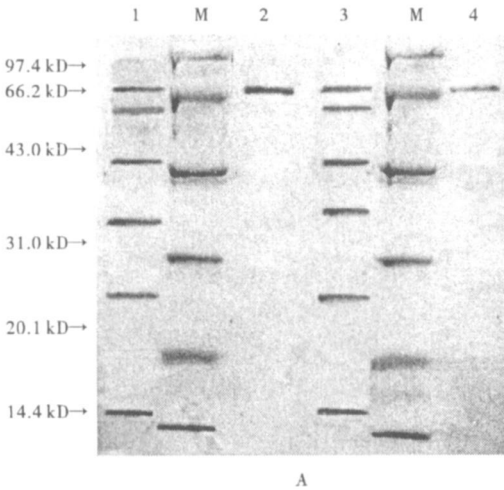
20 g 番茄果皮经粗提、分离纯化后 PAL 蛋白含量、总酶活、纯化倍数及酶比活见表 1。对照组的比活力为 10 357 U/mg, UV-C 照射组的比活力达到 11 466 U/mg, 较对照高 1 109 U/mg, UV-C 纯化倍数达到 16.4 倍, 较

对照纯化倍数 15.0 倍高, 说明 UV-C 照射组纯化去掉的杂蛋白较对照组多, 表明可能 UV-C 照射同时诱导了其它蛋白质产生, 但纯化后 UV-C 照射组总蛋白含量为 0.030 mg, 高于对照组的 0.028 mg, 表明 UV-C 照射诱导了 PAL 产生。

2.2 PAL 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

取 UV-C 处理组粗酶液和纯化后的酶液, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果显示为: 粗酶液中有 6 条带, 分离纯化酶液为一条带(图 3A), 表明分离纯化结果较好, 此条带位置与粗酶液第一条相同, 与标准蛋白比较, 其亚基分子量介于 66.2~97.4 kD 之间, 根据标准蛋白的迁移率绘制的标准曲线(图 3B), 由该酶亚基的相对

迁移率得出该酶亚基分子量约为 76 kD, 多数 PAL 由 4 个相同大小的亚基组成^[18], 由此可推测全酶的分子量在 304 kD 左右, 在大多数已知 PAL 的分子量 300 ~ 340 kD 范围内^[18]。从分离纯化的电泳蛋白带可看出: UV-C 照射组 PAL 蛋白带颜色比对照组的颜色深。说明 UV-C 照射组的酶液中蛋白质含量高于对照组, 证明了 UV-C 照射对番茄果皮中 PAL 的诱导作用。



纯化步骤	UV-C			CK		
	总蛋白含	酶比活	纯化	总蛋白含	酶比活	纯化
	量/mg	/U · mg ⁻¹	倍数	量/mg	/U · mg ⁻¹	倍数
粗酶液	19.370	698.5	1.00	16.280	689.2	1.00
40%上清	8.070	1453.5	2.08	7.730	1350.6	1.96
70%沉淀	0.063	6571.4	9.41	0.060	5400.0	7.83
脱盐纯化	0.030	11466.0	16.40	0.028	10357.0	15.00

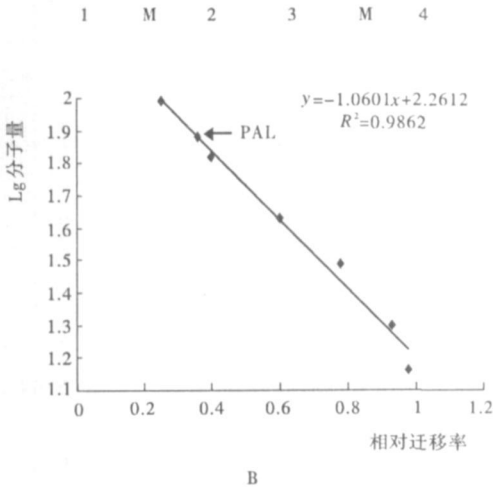


图3 分离纯化的 PAL 电泳图谱

注: 图中 1: UV-C 照射组 PAL 粗酶液; 2: UV-C 照射组纯化后 PAL; 3: 对照组 PAL 粗酶液; 4: 对照组纯化后 PAL; M: 标准蛋白分子量; A、B 为 2 次重复。标准蛋白分子量(kDa 从上到下): 兔磷酸化酶 B 97.4; 牛血清白蛋白 66.2 兔肌动蛋白 43.0 牛碳酸酐酶 31.0; 胰蛋白酶抑制剂 20.1; 鸡蛋清溶菌酶 14.4。

3 讨论

目前已成功地从水稻、小麦、马铃薯、松树、草莓、芥菜、大豆、茶树、豌豆和杨树等多种植物中分离纯化得到 PAL, 对多种植物 PAL 基因进行了 cDNA 克隆和序列分析^[18]。PAL 是一种诱导酶, 且这种诱导是在转录水平上的诱导, 用真菌诱导子接种欧芹叶细胞悬浮培养液 6 ~ 8 h PAL mRNA 在大范围内高度表达, 明显高于对照, 在约 12 h 后, 坏死斑形成, 并在此区域内, PAL 酶蛋白有少量增加; 接种后约 25 h, PAL mRNA 表达基本恢复到原来水平, 而 PAL 酶蛋白在坏死斑周围被强烈地诱导合成^[19]。刘红卫从银杏叶中获得了纯化倍数和蛋白含量较低的 PAL, 认为与没有诱导有关^[20]。研究中 UV-C 诱导组 PAL 酶蛋白含量高于对照组, 表明诱导了 PAL 增加, 与前人研究结果一致。

不同来源的 PAL 分子量有差异, 活性不同, 如水稻中的 PAL 酸性成分少于小麦、玉米、马铃薯, 而中性成分高于以上 3 种植物, 活性远比小麦的高^[21], 这在中性中也得到证实。UV-C 照射后获得了纯化倍数为 16.4 的 PAL, 分子量为 304 kD, 较红酵母的 PAL 小(320 kD)^[21]。

由于 PAL 在植物次生代谢和抗病中有重要作用,

目前对其进行提取纯化、基因克隆研究较多, 但通过基因工程构建高 PAL 植物, 提高抗病性的相关报道较少, 关于它的基因表达和调控方面的研究还不多, 需要进一步展开更深入更广泛的研究, 以便为将来的基因工程育种工作(特别是抗病虫育种)提供理论依据。

参考文献

[1] 田世平, 产祝龙. 诱导抗性在果蔬采后病害防治中的研究与应用[J]. 植物病理学报, 2004, 34(5): 385-394.

[2] Wilson C L, Ahmed E C, Droby S, et al. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables[J]. Plant Disease, 1994, 78(9): 837-844.

[3] Jeronimo P, Vicente A R, Martinez G A, et al. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84(14): 1831-1838.

[4] Ariel R V, Carlos P, Laura L, et al. UV-C treatment reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper[J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35(1): 69-78.

[5] Ahmed E G, Charles L W, Ann M C. Induction of Chitinase β -1,3-Glucanase and Phenylalanine Ammonia Lyase in Peach Fruit by UV-C Treatment[J]. Phytopathology, 2003, 93(3): 349-355.

[6] Gustavo G A, Chien Y W, George J B. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84(50): 415-422.

- [7] Ajmon L, Shaul B, Lomanic S, et al. The expression of a grapefruit gene an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 36: 847-856.
- [8] Essaid A B, Siamak K, Joseph M, et al. Impact of UV-C Irradiation on the Cell Wall-Degrading Enzymes during Ripening of Tomato Fruit[J]. Journal Agricultural Food Chemical, 2000, 48: 667-671.
- [9] Essaid A B. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato fruits in response to low amounts of UV-C[J]. Australia Journal of Plant Physiology, 2001, 28: 785-791.
- [10] Marie T G, Ronan G, Dominique R. Effect of Maturity and Storage Conditions on Riboflavin Accumulation and Disease Resistance to Botrytis cinerea in UV-C Treated Tomato Fruit[J]. Acta Horticulture, 2003, 599: 573-576.
- [11] Anne C, Douilet B, Philippe J, et al. Changes in the Phytoalexin Content of Various Vitis Spp. In Response to UV-C Elicitation[J]. Journal Agricultural Food Chemical, 1999, 47: 4456-4461.
- [12] 崔彦珍, 张环. 番茄叶霉病抗性与其苯丙氨酸解氨酶的相关性[J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 79-82.
- [13] 薛应龙, 欧阳光察, 澳绍根. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究[J]. 植物生

理学报, 1993, 9(3): 301-305.

- [14] 陈毓基. 生物化学研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [15] 范淑琴, 梁淑文. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社.
- [16] 段玉权. 中国寿桃采后生理及果肉褐变机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2002.
- [17] 于自然, 黄熙泰, 李翠凤. 生物化学习题及实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 309-312.
- [18] 江昌俊, 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(4): 425-430.
- [19] Susanne R, Klaus H. Biphasic temporal and spatial induction patterns of defense-related mRNA and protein in fungus-infected parsley leaves[J]. Plant Physiology, 1996(112): 131-140.
- [20] 刘卫红, 王燕, 杜何为, 等. 银杏叶苯丙氨酸解氨酶分离纯化条件的研究[J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(3): 196-198.
- [21] 欧阳光察, 应初衍. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究Ⅴ水稻、小麦 PAL 的纯化及基本特性[J]. 植物生理学报, 1985, 11(2): 204-214.
- [22] 江柯, 卢涛, 赵德立. 红酵母苯丙氨酸解氨酶的分离纯化及性质研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, 41(8): 865-868.

Purification and Properties of PAL From Harvested Tomato Induced by UV-C Irradiation

RONG Rui-fen, GUO Kun, LI Chong-xian, LI Li-yun, LI Zu-ming
(Teacher's College of Beijing Union University, Beijing 100011, China)

Abstract: Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) of tomato peel were studied after 2.4 kJ/m^2 ultraviolet light-C (UV-C) irradiation in order to know the roles of PAL inducing disease resistance in post-harvest fruits and vegetables. PAL was purified by ice rubbing, sulfate grade deposition, gel filtration and ion exchange chromatography. Induced PAL total protein content was 0.030 mg, more than 0.002 mg to control group, PAL activity was 11 466.0 U/mL, more than 1 109.0 U/mL to control group. Purification multiple was 16.4 and the control was 15.0. It showed PAL was induced to produce after UV-C irradiation. The enzyme was purified with SDS-PAGE and a single albumen strip was obtained, its molecular weight was identified to 304 kD.

Key words: Tomato; UV-C; PAL; Purification

蔬菜分类施肥安全降耗高产优质

蔬菜分类施肥, 可以充分有效地利用肥料, 降低肥料污染, 提高肥料的有效利用率, 从而使蔬菜生产达到安全、高效、优质、丰产, 降低生产成本的目的。

1 叶菜

叶菜类追肥一般以氮肥为主, 但生长盛期在施用氮肥的同时还需增施磷钾肥。如栽培大白菜, 抓住开始进入莲座期和包心期前的 2 次施肥, 是丰产优质的关键。如果生长期氮素供应不足, 则植株矮小, 茎叶粗硬, 春季栽培的叶菜还易早期抽苔, 结球类叶菜后期磷钾肥不足, 往往不易结球。

2 果菜

果菜类一般幼苗期需氮较多, 但过多氮肥易引起徒长, 反而延长开花、结果, 出现落花、落果现象; 果菜类进入生殖生长期, 需磷量剧增, 而需氮量略减, 因此要增施磷钾肥, 节制氮肥用量。如黄瓜坐果后, 就应重施肥, 以后每结一批瓜需补充肥水。

3 根菜

根菜类其生长前期主要供应氮肥, 以促使形成肥大的绿叶。根菜类到生长中后期, 即肉质根生长期, 则要多施钾肥, 适当控制氮肥用量, 促进叶的同化物质运输到根中, 以便形成强大的肉质

直根, 如果后期氮肥过多而钾肥不足, 则易使地上部分徒长, 根茎细小, 产量下降, 品质变劣。

4 棚室蔬菜

大棚、温室等保护地蔬菜, 比露地蔬菜单位面积施肥量大得多, 且因无雨水淋失, 致使剩余的肥料大部分残留于土壤中, 使土壤溶液浓度过高, 妨碍根系吸收养分或损伤根系。所以, 设施栽培蔬菜应充分考虑前茬肥料的后效, 多施有机肥, 适当少施化肥, 避免因盐类积聚而使作物受害, 从而进一步发挥保护地蔬菜的优势。