

肥城桃果实中过氧化物酶的特性研究

王 娟

(菏泽学院 园林工程系, 山东 菏泽 274000)

摘 要:以肥城桃果实为试材,分离纯化了引起酶促褐变的过氧化物酶(POD),并对其性质进行了分析。结果表明:POD仅存在于可溶性组织中,以绿原酸和过氧化氢(H_2O_2)为底物 POD的 K_m 值分别为 0.36 和 0.48 mmol/L,以 4-甲氧基- α -萘酚(4MN)和 H_2O_2 为底物 POD的 K_m 值分别为 0.39 和 0.17 mmol/L。以绿原酸为底物时 POD 对 H_2O_2 的催化效率(V_m/K_m)显著高于以 4MN 为底物时的催化效率。用等电聚焦和阳离子非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 POD,均检测到 2 条碱性 POD 同工酶条带,用 Western 分析不能区分 POD 的 2 种同工酶。

关键词:肥城桃;过氧化物酶;动力学特征;同工酶

中图分类号:TS 255.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0028-03

过氧化物酶(EC 1.11.1.7)是一种糖蛋白,能够在 H_2O_2 存在下氧化酚类物质。过氧化物酶广泛地分布在植物组织中,不仅可以引起褐变,而且会导致果实颜色、风味和营养的损失^[1]。

肥城桃(*Prunus persica* L. cv Feicheng)是我国著名的传统名果,果实汁多、味美、深受消费者的喜爱,具有广阔的国内外市场。但由于肥城桃采后极易褐变和腐烂变质,难于贮藏,限制了它的流通贸易。现在采用低温冷藏、药物处理、气调贮藏等方法,对控制肥城桃采后褐变和腐烂有一定效果,但仍未能完全满足生产上的要求。对于肥城桃果实的采后生理,前人已开展了多方面的研究^[2-4]。但是对于肥城桃果实中 POD 的性质了解很少。现以肥城桃果实为试材,分离纯化了果实中的 POD,并对其性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

肥城桃采自山东省肥城市仪阳乡果园。

抗坏血酸、绿原酸、抗辣根过氧化物酶抗体(Anti-HRP)、硫酸铵、Triton X-114 均购自 Sigma。其中, Triton X-114 用 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液(pH 7.3)浓缩 3 倍^[5]。其它化学试剂均为分析纯,购自 Fluka。

1.2 试验方法

1.2.1 酶的提取 取新鲜果实洗净去皮,取 50 g 果肉,加 50 mL 100 mmol/L 冷的磷酸钠缓冲溶液(pH 7.3,含 10 mmol/L 的抗坏血酸,1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF),1 mmol/L 盐酸苯甲脒,后二者在使用时加入),

匀浆 1 min。匀浆液经 8 层纱布过滤,4℃ 4 000 r/min 离心 10 min。所得上清液再次在 4℃ 12 000 r/min 离心 30 min。上清液中加入硫酸铵(pH 7.0)使其达 250 g/L,4℃ 下搅拌过夜。溶液再于 4℃ 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液并加入硫酸铵,使上清液的硫酸铵达 80%饱和,4℃ 搅拌 1 h。4℃ 12 000 r/min 再次离心,收集沉淀,并用 5 mL 10 mmol/L 的磷酸钠缓冲溶液(pH 7.3)溶解。用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.3)透析除盐,得到的溶液用于分析 POD 的活性。为避免任何内源蛋白酶和 POD 的水解作用,在透析前后要加入 PMSF 和盐酸苯甲脒(最终浓度为 1 mmol/L)。

1.2.2 底物对 POD 活性的影响 以 4-甲氧基- α -萘酚(4MN)和过氧化氢(H_2O_2)为底物测定 POD 活性^[6]。1 mL 反应液含有 50 mmol/L pH 5.0 的乙酸钠溶液、0.45 mmol/L H_2O_2 和 1 mmol/L 4MN。分光光度法测定反应生成的有色物质在 593 nm 吸光度值。以 pH 5.0 和 25℃ 条件下 1 min 产生 1 μmol 有色物质所需要的酶量定义为 POD 的 1 个活性单位(U)。过氧化物酶的活性测定也可以绿原酸和 H_2O_2 为底物,分光光度法测定 25℃ 绿原酸氧化作用在 400 nm 的吸光度。1 mL 反应液含有 50 mmol/L 乙酸钠溶液(pH 5.0)、0.5 mmol/L H_2O_2 和 2 mmol/L 绿原酸。

1.2.3 阳离子非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE) 采用 Reisfeld 等^[7]的方法。

1.2.4 等电聚焦(IEF)电泳 双向电泳法^[8]检测 POD 同工酶。聚丙烯酰胺凝胶由 5%丙烯酰胺:双丙烯酰胺(29:1)、5%甘油、2% Ampholine(Pharmacia)和 0.06% 过硫酸铵组成。pH 梯度为 3.5~10。所用的酶提取液与含有 30%甘油和 15% Ampholine 的双蒸水等体积混合,4℃ 200 V 电泳 90 min 后于 400 V 电泳 15 min。电泳液为 20 mmol/L 乙酸和 25 mmol/L NaOH。

作者简介:王娟(1977-),女,博士,副教授,现主要从事植物生物技术的教学与科研工作。E-mail:wangjuan310@163.com。

基金项目:菏泽学院博士基金资助项目(XY06BS09)。

收稿日期:2012-05-08

1.2.5 PAGE 的 Western 分析 将蛋白质转膜到 PVDF 膜(Bio-Rad)上^[9]。4℃下在 25 mmol/L Tris (pH 8.3, 含 192 mmol/L 甘氨酸和 15% 甲醇)在 100 V 连续搅拌 1 h。转移结束后,加入含 30 g/L 白蛋白的 PBST (25 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液, pH 7.2, 含有 150 mmol/L NaCl 和 0.15% 吐温 20) 中于 25℃ 反应 1 h, 而后在含有 10 g/L 白蛋白的 PBST 中于 4℃ 培养过夜。最后,过氧化物酶在 50 mmol/L 的醋酸钠溶液 (pH 5.0, 含 1 mmol/L 4MN 和 0.45 mmol/L H_2O_2) 中用 POD 的染色液检测膜中的蛋白条带。

1.2.6 IEF 的 Western 分析 用 Mini Trans-Blot 仪 (Bio-Rad) 把蛋白质转到 PVDF 膜上。转移在 4℃ 下进行,在 0.7% 的醋酸溶液 (转膜液) 中连续搅拌,100 V 电泳 1 h。转移结束后,把膜浸在沸水中煮 5 min 使内源 POD 失活,然后于 4℃ 在含有 5% 脱脂奶的 PBST (0.025 mol/L 磷酸钠溶液, pH 7, 含有 150 mmol/L NaCl 和 0.1% 吐温 20) 中培养过夜,而后在含有 HRP 抗体的 PBST (含 10 g/L BSA) 中培养 1 h,检测蛋白质。最后,在 50 mmol/L 的醋酸钠溶液 (pH 5.0, 含 1 mmol/L 4MN 和 0.45 mmol/L H_2O_2) 中用 POD 的染色液检测膜中的蛋白条带。

2 结果与分析

2.1 POD 的提取

只能从可溶性组织中检测到 POD,其活性为 6.3 U。因此,可以认为可溶性组织是 POD 的来源。

2.2 POD 的动力学特征

在 H_2O_2 存在条件下研究桃果实 POD 动力学特性,选择 2 种底物,1 种为非生理物质 4MN,1 种是果实组织成分绿原酸。图 1 为固定 H_2O_2 浓度后 POD 活性随绿原酸浓度变化情况,其中的小图为固定绿原酸浓度后 H_2O_2 浓度对 POD 活性的影响。根据 Michaelis-Menten 方程,可以得到 POD 动力学常数。由表 1 可知,2 种处理的 K_m 值相近,分别为 0.48 和 0.36 mmol/L。

以 4MN 和 H_2O_2 为底物测定 POD 的动力学指标,得 V_m 和 K_m 值。由表 1 可知,POD 对 H_2O_2 的 K_m 为 0.17 mmol/L,而对 4MN 的 K_m 为 0.39 mmol/L,表明 POD 表现出对 H_2O_2 很强的结合力,大于与 4MN 之间的作用。以 H_2O_2 为底物的 K_m 值与甜菜根 (0.14 mmol/L)^[9] 和黄瓜 (0.15 mmol/L)^[10] 中的结果相近,而以 4MN 为底物的 K_m 值与这些蔬菜中的 POD 却不同。

在氧化绿原酸过程中 POD 与 H_2O_2 的 K_m 值是氧化 4MN 时的 K_m 的 2.8 倍,而以绿原酸为底物时 POD 对 H_2O_2 的催化效率 (V_m/K_m) 显著高于以 4MN 为底物时的催化效率,且最大反应速率 V_m 显著高于以 4MN 为底物时的 V_m 。桃果实 POD 在氧化绿原酸等生理物质时显示出来的高的催化效率,与果实褐变和酚降解过程中 POD 的功能一致。

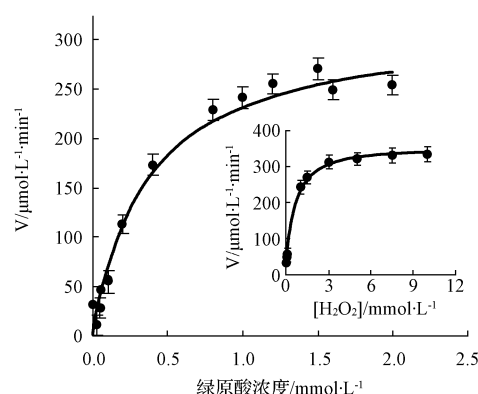


图 1 不同绿原酸和 H_2O_2 浓度对桃 POD 活性的影响

表 1 桃 POD 的动力学指标

	$V_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_m/K_m/\text{min}^{-1}$
H_2O_2	327.0	0.48	0.69
绿原酸	315.4	0.36	0.88
H_2O_2	17.1	0.17	0.10
4MN	26.0	0.39	0.05

2.3 POD 的同工酶分析

2.3.1 阳离子非变性 PAGE 用阳离子非变性 PAGE 来分析可溶性组织。由图 2 可知,POD 有 2 个同工酶条带,其表观分子量约为 50 和 34 kD,且 50 kD 的同工酶表现出很高的 POD 活性。

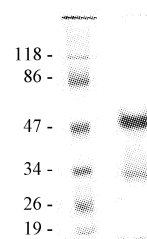


图 2 POD 的阳离子非变性 PAGE 分析

2.3.2 IEF 分析 POD 同工酶的功能由其酸碱性和亚细胞定位而确定。利用 IEF 技术已经在辣根^[11]、碗豆^[12]和白菜^[13]中鉴定出多种 POD 同工酶。Flurkey^[14]鉴定了蘑菇中几种 PPO 同工酶的等电点 pI 在 4~4.8 之间。用 IEF (pH 3.5~10) 分析肥城桃的 POD 结果见图 3。非变性 IEF 分析 POD,染色后发现 2 个高等电点 (>9) 的碱性 POD (图 3-1),这与阳离子非变性 PAGE 检测到的结果是一致的,从而确证了桃果实中存在 2 种电泳迁移率不同的 POD 同工酶。这种迁移率的差异可能是由同工酶的糖基化差别造成的。事实上,POD 同工酶的不均一性取决于酶中糖基团的不均一性,和报道的其它 POD 的性质相似^[15]。对 POD 进行抗体试验,用 HRP 和番茄 POD 抗体时检测到了很多非特异条带 (图 3-2)。具有碱性等电点的 POD 同工酶不仅存在于桃果实中,而且广泛的存在于所有植物中,在植物进化过程中处于保守状态^[16]。碱性 POD 具有异常的生化特征,能以很高的效率催化氧化生理物质如对羟基肉桂酸及

其衍生物绿原酸。这就决定了其在木质素形成和植物次生代谢中发挥着重要作用^[17]。

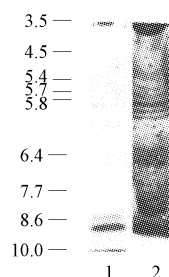


图3 POD的IEF分析

注:1. IEF得到的POD, 2. Western杂交的POD。

3 结论

该研究表明,POD仅存在于可溶性组织中。在氧化绿原酸过程中POD与 H_2O_2 的 K_m 值大于氧化4MN时的 K_m 值,以绿原酸为底物时POD对 H_2O_2 的催化效率(V_m/K_m)显著高于以4MN为底物时的催化效率,且最大反应速率 V_m 显著高于以4MN为底物时的 V_m 。IEF检测到2种强碱性的POD同工酶,与阳离子非变性PAGE得到的2个POD同工酶一致。由于POD多克隆抗体的非特异反应,用Western分析不能区分POD的2种同工酶。

该研究旨在为桃POD生理机制的完善提供理论依据,以此来寻找POD活性的内源调控物质,降低果实的褐变率,提高果实的耐贮性,延长其货架期。

参考文献

- [1] 吴振先,苏美霞,陈维信,等.贮藏荔枝果皮多酚氧化酶及过氧化物酶与褐变的研究[J].华南农业大学学报,1998,19(1):12-15.
- [2] 李富军,翟衡,杨洪强,等.1-MCP和AVG对肥城桃果实采后衰老的影响[J].果树学报,2004,21(3):272-274.
- [3] Zhu S H, Liu M C, Zhou J. Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage[J]. Post-harvest Biology and Technology, 2006, 42: 41-48.
- [4] 朱树华,刘孟臣,周杰.一氧化氮熏蒸对采后肥城桃果实细胞壁代谢的影响[J].中国农业科学,2006,39(9):1878-1884.
- [5] Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution[J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(4): 1604-1607.
- [6] Ferrer M A, Calderon A A, Munoz R, et al. 4-Methoxy- α -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities[J]. Phytochemical Analysis, 1990(1): 63-69.
- [7] Reisfeld R A, Lewis U J, Williams D E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels [J]. Nature, 1962, 195(4838): 281-283.
- [8] O'farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [9] Escobedo J, Gandia-herrero F, Caballero N, et al. Subcellular localization and isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(21): 6123-6129.
- [10] Gandia-herrero F, Jimenez M, Cabanes J, et al. Tyrosinase inhibitory activity of cucumber compounds; Enzymes responsible for browning in cucumber [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(26): 7764-7769.
- [11] Hoyle M C. High resolution of peroxidase-indoleacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing [J]. Plant Physiology, 1977, 60(5): 787-793.
- [12] Lee H C, Klein B P. A simple method of identifying peroxidase isoenzymes from crude pea seed extracts [J]. Food Chemistry, 1988, 29(4): 275-282.
- [13] Mclellan K M, Robinson D S. The heat stability of purified spring cabbage peroxidase isoenzymes[J]. Food Chemistry, 1987, 26(2): 97-107.
- [14] Flurkey W H. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing[J]. Journal of Food Science, 1991, 56(1): 93-95.
- [15] Gabaldon C, Lopez-serrano M, Pedreno M A, et al. Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis [J]. Plant Physiology, 2005, 139(3): 1138-1154.
- [16] Barcelo A. R, Gomezros L V, Gabaldon C, et al. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution[J]. Phytochemistry Reviews, 2004, 3(1): 61-78.
- [17] Lopez-serrano M, Fernandez M D, Pomar F, et al. Zinnia elegans uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(396): 423-431.

Nature of Peroxidase in Feicheng Peach Fruit

WANG Juan

(Department of Landscape Engineering, Heze University, Heze, Shandong 274000)

Abstract: The peroxidase (POD) involved in enzymatic browning reactions was extracted from Feicheng peach fruit and its characteristics were analyzed. The results showed that POD was found only in the soluble tissues. The K_m value were 0.36 mmol/L and 0.48 mmol/L respectively with the substrate of chlorogenic acid and H_2O_2 . The K_m value were 0.39 mmol/L and 0.17 mmol/L respectively with the substrate of 4-methoxyl- α -naphthol and H_2O_2 . The catalytic efficiency (V_m/K_m) of POD on H_2O_2 with the substrate of chlorogenic acid was much higher than that with the substrate of 4-methoxyl- α -naphthol. The characteristics of POD were also analyzed with isoelectric focusing and cationic native polyacrylamide gel electrophoresis. Two POD alkaline isoenzymes were detected and they were not distinguished with western blotting.

Key words: Feicheng peach; peroxidase; kinetic characteristics; isoenzyme