

番茄果实成熟衰老相关蛋白酶鉴定

孙静¹, 沈瑾¹, 程勤阳¹, 姜微波², 刘清¹

(1. 农业部规划设计研究院, 北京 100125; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 为进一步研究蛋白酶与成熟衰老的关系, 试验以‘918’番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 918) 果实为材料, 采用改进的含明胶的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对番茄果实中的蛋白酶进行检测, 结果发现番茄果实中有 3 个蛋白酶, 命名为 SP-1、SP-2 和 SP-3, 其活性伴随着果实后熟衰老发生变化。乙烯处理可提高番茄果实蛋白酶 SP-2 的活性, 使 SP-1 和 SP-3 活性被提前检出, 而 1-甲基环丙烯处理对蛋白酶起相反作用。番茄果实蛋白酶受果实后熟衰老和乙烯的双重调控, 是衰老相关蛋白酶。该文为进一步研究蛋白酶与果蔬衰老的关系提供参考。

关键词: 蛋白, 酶, 电泳, 贮藏, 番茄, 成熟衰老

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2012.01.050

中图分类号: S641.2; Q816

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2012)-01-0282-05

孙静, 沈瑾, 程勤阳, 等. 番茄果实成熟衰老相关蛋白酶鉴定[J]. 农业工程学报, 2012, 28(1): 282-286.

Sun Jing, Shen Jin, Cheng Qinyang, et al. Identification of senescence related protease in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit[J]. Transactions of the CSAE, 2012, 28(1): 282-286. (in Chinese with English abstract)

0 引言

果实的后熟衰老是由基因调控的复杂的生理生化过程。近几年对衰老机理的研究偏重于生物大分子的变化, 特别是蛋白的合成与降解。植物组织中蛋白酶种类多、功能各异, 与植物体不同生长阶段的代谢反应密切相关^[1], 但尚不清楚究竟哪些蛋白酶主导了衰老组织中的蛋白质降解活动。衰老相关蛋白酶 (senescence related protease, SRP) 是在植物组织衰老阶段合成、表达或活性升高的蛋白酶^[2], 它在衰老组织的蛋白质降解反应中可能具有特殊的作用。有研究结果证实, 巯基蛋白酶抑制剂 E-64 能延缓小萝卜子叶死亡; 抑制剂 AEBSF 可抑制木霉菌素木聚糖酶诱导的烟草细胞死亡^[3], 还可阻断 H₂O₂ 诱导的大豆细胞死亡^[4]。这些都表明蛋白酶在衰老中起一定的作用。

番茄是典型的呼吸跃变型果实, 具有成熟衰老阶段明显、经济价值高、自花授粉、生长周期短、基因组结构相对简单等特点, 因而成为研究果实采后生理的一种经典材料。研究番茄果实成熟衰老过程中蛋白酶的活性, 不仅可以进一步了解蛋白酶与衰老的关系, 而且为了解蛋白酶在衰老中的作用提供了信息。

目前常用的蛋白酶分析方法有光谱法和电泳法。前者无法对同一样品中不同蛋白酶的特性进行分析^[3], 而后者则解决了这一问题。采用改进的含明胶的十二烷基硫

酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate-gelatin-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-gelatin-PAGE), 已成功地从欧芹、香菜、空心菜、茼蒿、乌塌菜、花椰菜、芥菜、油菜、青梗白菜、油麦菜、芹菜、菠菜和苦瓜^[2,3,5-10]等蔬菜中检测到蛋白酶活性, 利用该方法也成功的从番茄果实中检测到蛋白酶活性^[11]。

本研究以‘918’番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 918) 果实为试材, 采用改进的 SDS-gelatin-PAGE 方法, 从红熟番茄果实中检测到三个蛋白酶, 分别命名为 SP-1、SP-2 和 SP-3。研究了自然后熟衰老番茄果实, 乙烯 (ethylene, ETH) 和 1-甲基环丙烯 (1-methylcycloprop, 1-MCP) 处理番茄果实中这 3 个蛋白酶的变化规律, 揭示了它们与衰老的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要化学试剂

1-MCP 是 EthylBloc[®] 商品粉剂, 购自美国罗门哈斯公司;

ETH 购自北京氮普北分气体工业有限公司;

丙烯酰胺 (Acrylamide, Acryl)、牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 和 SDS 购于美国 Sigma 公司。

三羟基氨基甲烷 (Trishydroxymethyl amino methane, Tris)、β-巯基乙醇、考马斯亮蓝 G-250 购于美国 Amresco 公司。

其他常用试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

气相色谱 GC7890F 购自上海天美公司; DYY-7C 型电泳仪、DYDCZ-24D 型电泳槽购于北京六一仪器厂; Sartorius 标准型 PB-10 酸度计购于德国 Sartorius 公司。TGL-20bR 高速冷冻离心机购于上海安亭科学仪器厂。

收稿日期: 2011-07-19 修订日期: 2011-09-02

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903009)

作者简介: 孙静 (1982-), 女, 黑龙江省穆棱市人, 工程师, 博士, 主要从事农产品贮藏保鲜和农产品物流研究。北京市朝阳区麦子店街 41 号农业部规划设计研究院, 100125。Email: cynthiasj@163.com。

中国农业工程学会会员: 孙静 (E040100071M); 沈瑾 (E041200109S); 程勤阳 (E041200190S)

1.1.3 植物材料

供试‘918’番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 918) 购自中国农业大学西校区。采摘绿熟期番茄果实, 并迅速运至实验室。采摘、运输过程中避免机械伤害。挑选大小均一, 成熟度相对一致, 无病虫害、无机械伤的果实。

材料成熟度划分^[12]: 绿熟期 (Mature Green): 全果浅绿或深绿, 已成熟; 发白期 (Breaker): 外观首次微显红色, 显色小于 10%; 转色期 (Turning): 外观发红, 显色 10%~60%; 粉红期 (Pink): 近红色, 显色 60%~90%; 红熟期 (Red): 深红色, 果实略发软。

1.2 方法

1.2.1 ETH 和 1-MCP 处理

处理在室温(20±1)℃、相对湿度 85%~95%、自然光照条件下进行。

ETH 处理: 先将番茄果实密闭于 0.1 mm 厚的塑料薄膜帐中, 从纯 ETH 钢瓶中用注射针抽取已计算好体积数的纯 ETH 气体, 将其注入帐内, 使帐内 ETH 气体终体积分数达 100 μL/L, 保持 24 h 后开帐。果实置于(20±1)℃、相对湿度 85%~95%的恒温暗室中贮藏。每个处理每次用果 120 个, 重复 3 次。

1-MCP 处理: 将新鲜采收的番茄果实置于密闭塑料薄膜帐中(厚度为 0.1 mm), 向帐内注入已折算好体积数的 1-MCP, 使帐内 1-MCP 气体终体积分数达到 1 μL/L, 保持 24 h 后开帐透气, 并将处理果实置于(20±1)℃、相对湿度 85%~95%的恒温暗室中贮藏。每个处理每次用果 120 个, 重复 3 次。

对照果实处理方式和贮藏条件同 ETH 及 1-MCP 处理。

1.2.2 蛋白的提取

将 2.0 g 果皮组织与 1.0 mL 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 7.8) 提取缓冲液在预冷处理过的研钵中研磨, 匀浆全部转移到离心管中, 在 10 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液备用。操作在 4℃ 下进行。

可溶性蛋白含量的测定采用 Bradford^[11]方法, 以 BSA 为标准底物。可溶性蛋白含量表示为每克番茄果实中所含可溶性蛋白质量。

1.2.3 蛋白质组成和蛋白酶活性电泳分析

参照 Sun 等人^[11]的方法分析样品中的蛋白质组成和蛋白酶活性。胶片上的透明条带表示蛋白酶活性。

1.2.4 数据统计与分析

Excel 2007 统计分析所有数据, 计算标准偏差并制图。

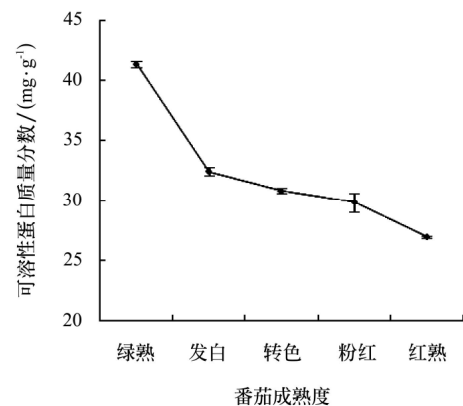
电泳试验结果均重复 3 次以上。

2 结果与分析

2.1 番茄果实成熟衰老过程中可溶性蛋白含量、蛋白质组成和蛋白酶活性变化

番茄果实成熟过程中的蛋白含量呈不断下降趋势(图 1)。其中绿熟期到发白期之间番茄果实可溶性蛋白含量下降最快, 发白期番茄果实中的蛋白含量仅为绿熟番茄果实的 78%, 此后伴随着成熟衰老, 番茄果实可溶性蛋白含量的下降趋势变得平缓, 粉红期到红熟期时又

有一个显著的下降, 红熟番茄果实中的可溶性蛋白含量约为绿熟番茄的 65%。

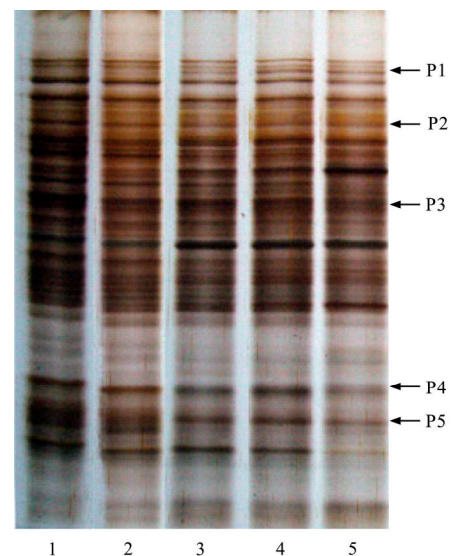


注: 结果表示为平均值±标准偏差 (n=3), 下同

图 1 番茄果实成熟过程中可溶性蛋白含量分析
Fig.1 Analysis of soluble protein content of tomato fruit during natural ripening

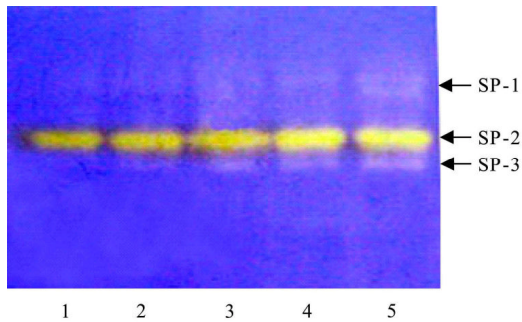
番茄果实成熟过程中可溶性蛋白组成变化如图 2a 所示。与可溶性蛋白含量测定结果一致, 番茄果实在成熟过程中, 其可溶性蛋白含量总体上呈下降趋势。另外, 在成熟衰老过程中伴随着蛋白质的合成与降解(合成的蛋白, 如蛋白 P1; 降解的蛋白, 如蛋白 P2-P5)。

利用 SDS-gelatin-PAGE 在番茄果实中检测到 3 个蛋白酶, 分别命名为 SP-1, SP-2 和 SP-3 (图 2b)。如图所示, 在绿熟番茄果实中只检测到蛋白酶 SP-2 活性(泳带 1), 此酶伴随着番茄果实的成熟活性逐渐升高。在发白期番茄果实中开始检测到蛋白酶 SP-3 (泳带 2), 但活性较低。在转色番茄中检测到了蛋白酶 SP-1、SP-2 和 SP-3 活性(泳带 3), 且随着番茄的后熟衰老这 3 个蛋白酶的活性逐渐增强, 在红熟番茄中 3 个蛋白酶的活性达到最高(泳带 5)。



注: 泳带 1, 绿熟期番茄果实; 泳带 2, 发白期番茄果实; 泳带 3, 转色期番茄果实; 泳带 4, 粉红色番茄果实; 泳带 5, 红熟期番茄果实。P1 为合成的蛋白, P2-P5 为降解的蛋白。下同

a. 番茄果实成熟过程中可溶性蛋白组成



b. 番茄果实成熟过程中蛋白酶活性

注：胶片上的透明条带表示蛋白酶活性。下同

图2 番茄果实成熟过程中可溶性蛋白组成和蛋白酶活性分析

Fig.2 Protein assay and protease assay during senescence of tomato fruit

番茄是典型的呼吸跃变型果实，是研究果实采后生理的一种经典材料。本研究发现随着番茄果实的后熟衰老，其可溶性蛋白含量和种类呈下降趋势，这与大多植物组织衰老的研究结果相一致^[1]。蛋白质降解速率加快、蛋白质含量下降是植物离体器官，如叶片、花和果实采后衰老的一个显著特征。衰老时蛋白质含量下降是蛋白质合成速率降低，蛋白水解酶比活上升和蛋白质水解酶在空间上与蛋白质接近程度改变的共同结果^[1]。

关于番茄果实采后成熟过程中蛋白酶活性变化的研究很少，本试验采用改进的 SDS-gelatin-PAGE 方法在番茄果实中检测到 3 个蛋白酶，它们的活性随着番茄果实的成熟衰老不断增强，这一特性与已知的 SRP 类似。SRP 是在植物组织衰老阶段合成、表达或活性升高的蛋白酶，这些酶可能在衰老组织的蛋白质降解、蛋白质加工、信号转导中具有特殊的作用^[13-15]。

2.2 ETH、1-MCP 处理对番茄果实采后贮藏期间可溶性蛋白含量和蛋白酶活性的影响

ETH 和 1-MCP 处理对番茄果实贮藏期间可溶性蛋白含量的影响如图 3 所示，番茄果实贮藏过程中可溶性蛋白含量呈逐渐下降趋势，1-MCP 处理延缓了这一趋势，ETH 处理则加速了这一趋势。在贮藏第 20 天，1-MCP 处理、对照和 ETH 处理的番茄果实的可溶性蛋白含量分别为初始的 71%、58%和 51%。

1-MCP 处理和 ETH 处理的番茄果实贮藏期间蛋白酶活性变化的研究结果见图 4b 和 4c。1-MCP 处理可有效延缓番茄果实成熟过程中蛋白酶 SP-3 的出现时间，对照组果实在贮藏第 8 天时即可观测 SP-3 活性，而 1-MCP 处理果实在贮藏第 12 天才检测到该酶。1-MCP 处理对 SP-1 和 SP-2 的影响相似，在未改变两个酶的检出时间的基础上，有效降低了它们在果实贮藏后期的活性。ETH 处理的番茄果实在贮藏第 4 天即可观测到微弱的蛋白酶 SP-1 和 SP-3 活性，随着贮藏天数的增加，SP-1 活性呈现先下降后上升的趋势，在贮藏第 12 天达到最低；SP-3 活性逐渐增强，但在贮

藏的最后一天减弱。

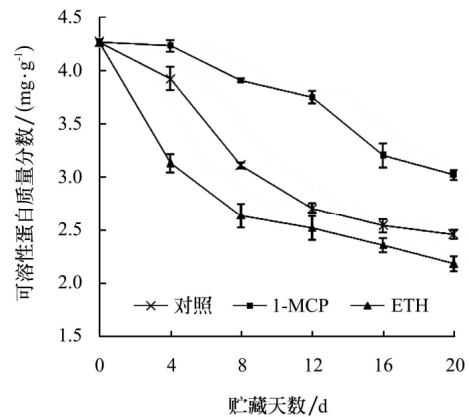


图3 ETH 和 1-MCP 处理对番茄果实贮藏期间可溶性蛋白含量的影响

Fig.3 Effects of ETH and 1-MCP on soluble protein content of tomato fruit during storage

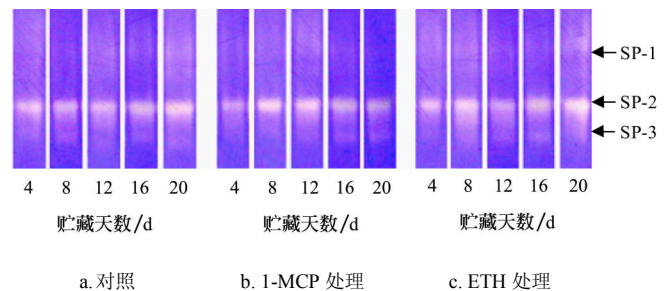


图4 ETH 和 1-MCP 处理对番茄果实贮藏期间蛋白酶活性的影响

Fig.4 Effects of ETH and 1-MCP on activities of proteases from tomato fruit

ETH 和 1-MCP 是常用的植物生长调节剂，ETH 可以加速跃变型果蔬的成熟衰老^[16]，1-MCP 的作用则正好相反^[17]。研究采用 ETH 和 1-MCP 处理番茄绿熟果实，进一步探讨番茄果实蛋白酶与成熟衰老的关系。结果表明无论是对照组、ETH 处理组还是 1-MCP 处理组，蛋白酶 SP-3 的检出时间均比呼吸高峰的出现时间^[18]提前 4 d，推测它可能与呼吸高峰的出现有关。ETH 处理的番茄果实在贮藏期间，蛋白酶 SP-1 和 SP-2 的活性并不是持续上升的，但其变化趋势与 1-MCP 处理的番茄果实蛋白酶相反，推测它们可能与 ETH 诱导的番茄果实衰老有关系，但这些酶的具体生理功能，还需通过分离纯化、内源底物分析等进一步研究确定。

目前已知的番茄果实中与成熟衰老有关的蛋白酶是一种金属蛋白酶，该酶参与到 ETH 合成关键酶 ACC 合成酶加工中^[19]。本文中检测到的 3 个蛋白酶与之前发现蛋白酶的关系，以及前者在番茄成熟衰老过程中的作用应通过进一步酶学特性分析和蛋白（酶）鉴定加以研究。

3 结 论

1) 采用改进的含明胶的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析方法分析红熟番茄果实样品时, 在不排除其他蛋白(酶)干扰的情况下, 直接在电泳胶片上准确地鉴定出 3 个蛋白酶, 分别命名为 SP-1、SP-2 和 SP-3; 试验中的 3 个蛋白酶受番茄果实的采后后熟和乙烯双重调控, 是衰老相关蛋白酶。

2) 本次研究从对照组、乙烯处理组和 1-甲基环丙烯处理组中 3 个蛋白酶和呼吸高峰出现规律判断出蛋白酶可能与呼吸高峰的出现有关。

[参 考 文 献]

- [1] Palma M P, Sandalio L M, Corpas F J, et al. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 4(6/8): 521—530.
- [2] 周相娟, 姜微波, 赵玉梅, 等. 香菜叶片衰老相关 63ku 蛋白酶的分析鉴定[J]. *科学通报*, 2002, 47(9): 693—696.
- [3] 王连祺. 热激活天冬氨酸蛋白酶特性及低温对鲜切苦瓜品质的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.
Wang Lianzheng. Properties of Aspartic Protease Activated by Heatreatment and the Effect of Low Temperature on Fresh-Cut Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.)[D]. Beijing: China Agricultural University, 2007. (in Chinese with English abstract)
- [4] Antão C M, Malcata F X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43(7): 637—650.
- [5] Jiang Weibo, Lers A, Lomaniec E, et al. Senescence-related serine protease in parsley[J]. *Photochem*, 1999, 50(3): 377—382.
- [6] 徐杏连. 几种叶菜衰老过程蛋白质降解与蛋白酶活性变化及特性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
Xu Xinglian. Protein Degradation and Characterization of Proteases of Several Vegetables During Senescence[D]. Beijing: China Agricultural University, 2004. (in Chinese with English abstract)
- [7] Wang Y T, Yang C Y, Chen Y, et al. Characterization of senescence-associated proteases in postharvest broccoli florets[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(7/8): 663—670.
- [8] 徐杏连, 姜微波, 林琳. 芥菜采后叶片中蛋白酶特性分析[J]. *中国农业大学学报*, 2005, 10(5): 48—51.
Xu Xinglian, Jiang Weibo, Lin Lin. Characterizations of proteases in harvested mustard leaves[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2005, 10(5): 48—51. (in Chinese with English abstract)
- [9] 徐杏连, 傅利军, 姜微波. 油菜叶片中蛋白酶的分析鉴定[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(1): 61—62.
Xu Xinglian, Fu Lijun, Jiang Weibo. Analysis of protease activity in rapeseed leaves during senescence[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(1): 61—62. (in Chinese with English abstract)
- [10] Wang Lianzhen, Wang Meng, Li Quanhong, et al. Partial properties of an aspartic protease in bitter gourd (*Momordica charantia* L.) fruit and its activation by heating[J]. *Food Chem*, 2008, 108(2): 496—502.
- [11] Sun Jing, Wang Meng, Cao Jiankang, et al. Characterization of three novel alkaline serine proteases from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruit and their potential application[J]. *J Food Biochem*, 2010, 34(5): 1014—1031.
- [12] Lai A, Santangelo E, Soressi G P, et al. Analysis of the main secondary metabolites produced in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) epicarp tissue during fruit ripening using fluorescence techniques[J]. *Postharvest Biol Technol*, 2007, 43(3): 335—342.
- [13] Chen T, Huang D, Lin Y. Isolation and characterization of a serine protease from the storage roots of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam)[J]. *Plant Sci*, 2004, 166(4): 1019—1026.
- [14] Barnaby N G, He Fanglian, Liu Xiaowen, et al. Light-responsive subtilisin-related protease in soybean seedling leaves[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(2): 125—134.
- [15] Coffeen W C, Wolper T J. Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(4): 857—873.
- [16] 尹金华, 高飞飞. ABA 和乙烯对荔枝果实成熟和着色的调控[J]. *园艺学报*, 2001, 28(1): 65—67.
Yin Jinhua, Gao Feifei. Roles of abscisic acid and ethylene in the regulation of Litchi ripening and coloration[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(1): 65—67. (in Chinese with English abstract)
- [17] Wang Baogang, Wang Jianhui, Feng Xiaoyuan, et al. Effects of 1-MCP and exogenous ethylene on fruit ripening and antioxidants in stored mango[J]. *Plant Growth Regul*, 2009, 27(2): 185—192.
- [18] 王蒙. 番茄果实脂氧合酶定位研究及乙烯、热处理的调控作用[D]. 北京: 中国农业大学, 2008.
Wang Meng. Localization of a Lipoyxygenase in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruit and Regulation by Ethylene and Blanching Treatments[D]. Beijing: China Agricultural University, 2008. (in Chinese with English abstract)
- [19] Li Jianfeng, Qu Lianghu, Li Ning. Isolation of a tomato protease that may be involved in proteolysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase[J]. *J Integr Plant Biol (Formerly Acta Bot Sin)*, 2005, 47(10): 1220—1227.

Identification of senescence related protease in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit

Sun Jing¹, Shen Jin¹, Cheng Qinyang¹, Jiang Weibo², Liu Qing¹

(1. Chinese academy of Agricultural Engineering, Beijing 100125, China;

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

Abstract: In order to find out the relationship between proteases and senescence, modified sodium dodecyl sulfate (SDS)-gelatin-polyacrylamide gel electrophoresis was exploited to analyze proteases activities of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 918) fruit. Three proteases, named as SP-1, SP-2 and SP-3, respectively, were detected in red-ripe tomato fruit. All activities of these three proteases were changed during ripening and senescence. Followed by ethylene treatment, the activity of SP-2 was enhanced and the activities of SP-1 and SP-3 were showed up earlier. The opposite effects were observed by 1-methylcycloprop treatment. These results suggested that all SP-1, SP-2 and SP-3, regulated either by nature ripening or ethylene treatment, were senescence related proteases. The study provides reference for the relationship between proteases and senescence.

Key words: proteins, enzymes, electrophoresis, storage, tomato, senescence