

ACC 氧化酶的测定方法^{*}

宋松泉¹⁾

叶永健²⁾

(1) 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2) 香港大学植物学系)

摘 要 利用番木瓜 *Carica Papaya* L. 果实为材料, 研究了 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 氧化酶的体内和体外测定方法. 在 ACC 氧化酶的体外分析中, 甘油体积分数为 10% ~ 30% 时能稳定酶的活性; $h(\text{CO}_2)$ 为 0.3% ~ 20% (反应体系气相中) 和 0.5 ~ 12 mmol/L ACC 提高酶的活性; 较适宜的 pH 值为 7.2.

关键词 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 氧化酶, 体内和体外测定, 甘油, CO_2 , 番木瓜 *Carica papaya* L.

分类号 Q 223.25

植物激素乙烯调节植物的生长、发育和衰老等许多生理过程^[1]. 在高等植物中乙烯生物合成的途径是: 甲硫氨酸 → S-腺苷甲硫氨酸 → 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) → 乙烯. ACC 氧化酶催化 ACC 氧化成为乙烯, 是乙烯生物合成的关键酶. 本文以番木瓜 *Carica papaya* L. 果实为材料, 研究了 ACC 氧化酶的体内和体外测定方法及其影响因子.

1 材料与方法

1.1 材 料

取成熟的番木瓜果实为实验材料.

1.2 ACC 氧化酶的体内测定

用刀片将 0.1 g 番木瓜组织切成 1 mm^3 的小块, 放入 15 mL 的试管中, 加入 0.5 mL 反应混合液 A. 用橡皮塞密封试管, 并加入 CO_2 , 使试管气相中的 CO_2 体积分数达到 3%. 反应混合液 A 含 1 mmol/L ACC, 100 mmol/L Mops (pH 7.2). 将组织块和反应混合液 A 混匀后, 35°C 保温 20 min. 用注射器从试管顶部取 1 mL 气体样品, 于 HP5890 型气相色谱仪上测定乙烯的含量. 酶活性以每小时每毫克蛋白产生乙烯的纳摩尔数 ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 表示.

1.3 ACC 氧化酶的体外测定

ACC 氧化酶的提取参照文献 [2, 3], 取新鲜成熟的番木瓜果实, 切成 2 mm 厚的薄片, 加入 2 体积的提取缓冲液. 提取缓冲液含 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2), 0 ~ 30% 体积分数的甘油, 30 mmol/L 抗坏血酸, 2.5% 的不溶性聚乙烯吡咯烷酮 (m/v), 1 mmol/L CaCl_2 , 4 mmol/L α -巯基乙醇, 2 mmol/L PM SF (phenylmethanesulfonyl fluoride). 高速匀浆 2 min. 匀浆液用

* 香港研究资助局基金 (390/94M) 资助项目

收稿日期: 1996-10-21 宋松泉, 男, 39 岁, 副教授

4层纱布过滤.滤液用 45 000 $\times$ g 离心 30 min.上清液即为酶粗提取液, - 20 $^{\circ}$ C 保存备用.以上操作均在 4 $^{\circ}$ C 下进行.

酶活性的体外测定参照文献 [2],在密封的试管中加入 0.5 mL 反应混合液 B,适量的酶提取液(大约 200 μ g 蛋白)和 CO₂(试管气相中 CO₂的体积分数为 5%).混匀后 35 $^{\circ}$ C 保温 20 min.从试管顶部取 1 mL 气体样品测定乙烯的含量.反应混合液 B 含 1 mmol/L ACC, 20 μ mol/L FeSO₄, 1 mmol/L 抗坏血酸, 100 mmol/L Mops(pH 7. 2).酶活性的计算同体内测定法.

番木瓜组织块和粗酶提取液中的蛋白质含量测定按照文献 [4],以牛血清蛋白作标准. CO₂的含量利用 Li-6251型 CO₂分析仪测定.

2 结果与讨论

2.1 ACC氧化酶的体内测定

番木瓜果实具有明显的呼吸跃变期,其成熟过程受植物激素乙烯的调节.本实验结果表明成熟果实的果皮和果肉中 ACC氧化酶的活性 (nmol $\cdot$ mg⁻¹ $\cdot$ h⁻¹)分别为 9.42和 6.18,果皮的酶活性明显高于果肉.

2.2 ACC氧化酶的体外测定

2.2.1 h(甘油) ACC氧化酶活性的影响 含有不同 h(甘油)的酶液放在 30 $^{\circ}$ C 中保温处理,分别在 0, 0.5, 1, 2和 4 h 后取样测定 ACC氧化酶的活性.图 1表明, ACC氧化酶的活性在体积分数为 30%的甘油中,其活性丧失较慢,酶活性丧失 50%的时间约为 1.8 h;而在体积分数为 0% , 10% 和 20%的甘油中,酶活性丧失较快,酶活性丧失 50%的时间分别是 0.25, 0.32和 1.3 h.甘油能维持较高酶活性的原因是能防止酶液中的蛋白质水解(未引用数据),从而保护酶的活性.

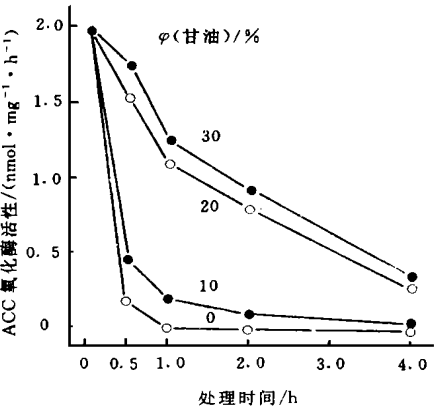


图 1 h(甘油)对番木瓜 ACC氧化酶活性的影响

Fig. 1 Effect of glycerol on activity of ACC oxidase

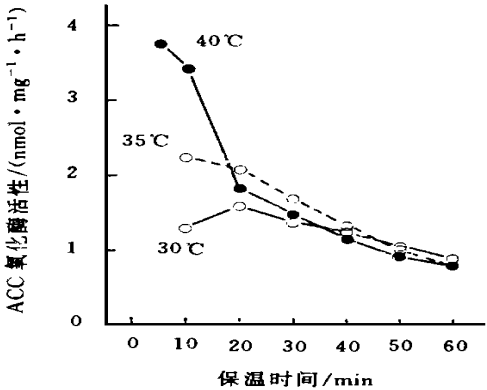


图 2 温度对番木瓜 ACC氧化酶活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on activity of ACC oxidase

2.2.2 温度和 pH 对酶活性的影响 温度对酶活性的影响与酶反应的时间有关. 在反应时间为 20 min 时, 适宜的温度为 35°C ; 当反应时间缩短时, 温度可适当增加 (图 2).

图 3 表明, ACC 氧化酶的适宜 pH 为 7.2, 与苹果果实 ACC 氧化酶^[2,5]的结果一致. Mizutani 等^[5]发现, ACC 氧化酶的最适 pH 还与反应体系中的 $h(\text{CO}_2)$ 有关, 随着 $h(\text{CO}_2)$ 的增加, 酶的最适 pH 下降.

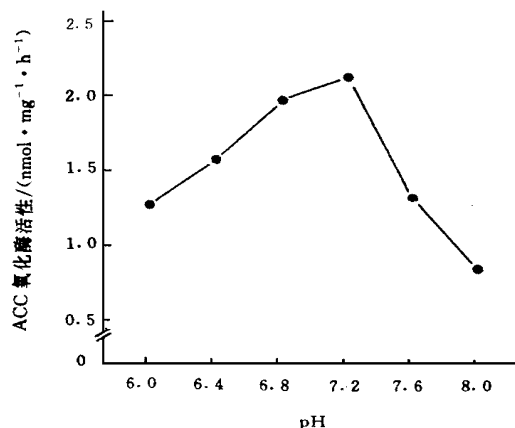


图 3 pH 对番木瓜 ACC 氧化酶活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on activity of ACC oxidase

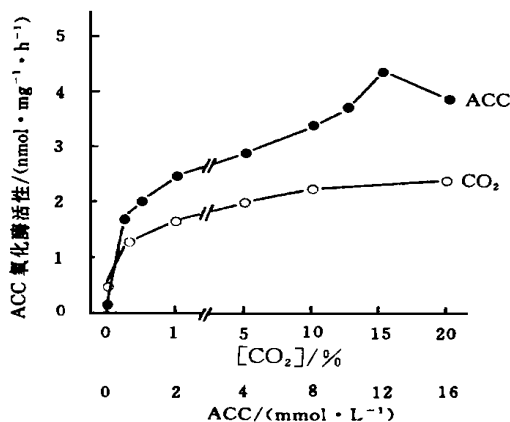


图 4 ACC 和 CO_2 对番木瓜 ACC 氧化酶活性的影响

Fig. 4 Effect of ACC and CO_2 on activity of ACC oxidase

2.2.3 ACC 和 $h(\text{CO}_2)$ 对酶活性的影响 0.5~12 mmol/L ACC 能提高其氧化酶的活性, 但当 ACC 的浓度超过 12 mmol/L 时, 则表现出抑制效应 (图 4). CO_2 是 ACC 氧化酶的激活剂, 在 $h(\text{CO}_2)$ 为 0.3%~20% 的范围内, 随着 $h(\text{CO}_2)$ 的增加酶活性提高 (图 4).

ACC 氧化酶是一种双氧化酶 (dioxygenase)^[6], 它利用 ACC、 O_2 和抗坏血酸作为底物, CO_2 和 Fe^{2+} 作为激活剂^[2]. 番木瓜 ACC 氧化酶活性的体内测定结果 ($6.83 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 约为体外测定结果 ($2.02 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 的 3.4 倍, 说明该酶在提取过程中活性易丧失, 和或者体外分析体系还不够理想. $h(\text{甘油})$ 为 30% 时对酶的活性有稳定作用 (图 1), 但其作用方式还不清楚, 且甘油浓度增加时还会影响其后的纯化速率. 所以进一步研究 ACC 氧化酶的稳定因子, 对于酶的纯化和作用机理等的研究都具有重要意义.

参 考 文 献

- 1 Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 1984, 35: 155~189
- 2 Dong J G, Fernández-Maculeit J C, Yang S F. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9789~9793
- 3 Dupille E, Rombaldi C, Lelèvre J-M, et al. Purification, properties and partial amino-acid sequence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruits. *Planta*, 1993, 190: 65~70

- 4 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72 248~ 254
- 5 Mizutani F, Dong J G, Yang S F. Effect of pH on CO₂-activated l-aminocyclopropane-l-carboxylate oxidase activity from apple fruit. *Phytochemistry*, 1995, 39 751~ 755
- 6 Yip W K, Jiao X Z, Yang S F. Dependence of in vivo ethylene production rate on l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid content and oxygen concentrations. *Plant physiol*. 1988, 88 553~ 558

A Kind of Assay Methods for ACC Oxidase

Song Songquan^{*} Yip Wingkin

Abstract Using papaya(*Carica papaya* L.) fruit as the experimental material, assay methods for l-aminocyclopropane-l-carboxylate(ACC) oxidase *in vivo* and *in vitro* were studied. *In vitro*, ACC oxidase activity could be stabilized by 10% ~ 30% h(glycerol), and could be increased by 0.3% ~ 20% h(CO₂)(in the gas phase of reaction system) and by 0.5~ 12 mmol / L ACC. The optimum pH was 7.2 for ACC oxidase *in vitro*.

Keywords ACC oxidase, assay methods *in vivo* and *in vitro*, glycerol, CO₂, *Carica papaya* L.

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275