

Fe²⁺ 和 CO₂ 对番木瓜 ACC 氧化酶活性的影响^{*}

叶永健

宋松泉

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

摘 要 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 氧化酶催化 ACC 氧化成为乙烯. 通过 DEAE-Sephrose 和 Phenyl-Sephrose 柱层析后, ACC 氧化酶被纯化 19.5 倍. 在体外分析中, ACC 氧化酶活性被 Fe²⁺ 和 CO₂ 促进; Co²⁺、Ni²⁺ 和 Mn²⁺ 抑制 ACC 氧化酶的活性, 但这种抑制效应能部分地被 Fe²⁺ 所拮抗. CO₂ 对 ACC 氧化酶活性的促进作用与反应体系中氧的浓度有关, 在 21% 的氧浓度下, CO₂ 的促进作用较显著.

关键词 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 氧化酶, Fe²⁺, CO₂, 番木瓜

分类号 Q 233.25

植物激素乙烯调节植物的许多生理反应, 除了作为“成熟激素”外, 还涉及从种子萌发到各种器官衰老的发育过程以及对环境胁迫的许多反应^[1]. 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 氧化酶催化 ACC 氧化成为乙烯, 是乙烯生物合成的关键酶. 到目前为止, 已经研究了苹果^[2]、西瓜^[3]、鳄梨^[4]和香蕉^[5]等的 ACC 氧化酶活性及其部分特征. ACC 氧化酶活性的体外测定需要 Fe²⁺ 和抗坏血酸^[1]. CO₂ 能显著地提高苹果果实 ACC 氧化酶活性^[6]. 本文以番木瓜果实为材料, 研究了 ACC 氧化酶的部分纯化, 以及 Fe²⁺ 和 CO₂ 等对酶活性的影响.

1 材料与方法

取成熟的番木瓜 (*Carica papaya* L.) 果实的果皮和果肉作实验材料.

ACC 氧化酶的提取和部分纯化: 参照文献 [2, 6]. 取新鲜成熟的番木瓜果实, 除掉种子后切成 2 mm 厚的薄片, 加入 2 体积 (w/v) 的提取液. 提取液含 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2), 30% 甘油, 30 mmol/L 抗坏血酸, 2.5% 的不溶性聚乙烯吡咯烷酮 (w/v), 1 mmol/L CaCl₂, 4 mmol/L α-巯基乙醇, 2 mmol/L PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride). 高速匀浆 2 min, 匀浆液用 4 层纱布过滤, 滤液用 45 000× g 离心 30 min, 上清液即为酶粗提取液. 酶粗提取液直接上到经缓冲液 A 平衡过的 DEAE-Sephrose 柱 (250 mL 床体积) 上. 缓冲液 A 含有 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2), 30% 甘油, 10 mmol/L 抗坏血酸, 4 mmol/L 巯基乙醇和 1 mmol/L PMSF. 用 2 体积缓冲液 A 洗涤后, ACC 氧化酶用缓冲液 B (含 250 mmol/L (NH₄)₂SO₄ 的缓冲液 A) 洗脱. 含有 ACC 氧化酶活性的部分被收集, 并上到经缓冲液 B 平衡后的 Phenyl-Sephrose 柱 (50 mL 床体积) 上, ACC 氧化酶再用缓冲液 A 洗脱. 含

* 香港研究资助局基金 (390/94M) 资助项目

收稿日期: 1996-08-26 叶永健, 男, 36 岁, 助理教授

有 ACC 氧化酶活性的洗脱液即为部分纯化的酶液, -20°C 保存备用. 以上步骤均在 4°C 下进行.

ACC 氧化酶活性的测定: 参照文献 [2]. 在密封的试管中加入 0.5 mL 反应混合液, $10\text{--}50\mu\text{L}$ 部分纯化的酶液和 CO_2 (使密封试管上部气相中的 CO_2 浓度达到 5%). 反应混合液含 (mmol/L): Mops (100, pH 7.2), ACC (1), FeSO_4 (0.02) 和抗坏血酸 (1), NaHCO_3 (5). 混匀后 35°C 保温 20 min. 从试管顶部取 1 mL 气体样品于 HP 5890 型气相色谱仪上测定乙烯的含量. 乙烯测定条件同文献 [2]. 酶活性以 35°C 下每 min 每 mg 蛋白产生 nmol 乙烯表示.

CO_2 用 Li-6251 型 CO_2 分析仪测定. 蛋白质含量按文献 [7] 测定, 以牛血清蛋白作标准.

2 实验结果

(1) ACC 氧化酶的部分纯化: 番木瓜 ACC 氧化酶的部分纯化结果见表 1.

表 1 成熟番木瓜果实 (500 g) ACC 氧化酶的部分纯化

Tab. 1 Partial purification of ACC oxidase from 500 g of ripe papaya fruit

纯化步骤	总活性 ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$)	总蛋白 (mg)	比活性 ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	回收率 (%)	纯化倍数
酶粗提取液	465	2 582	0.18	100	—
DEAE-Sephrose	175	70	2.50	38	13.9
Phenyl-Sephrose	79	22	3.51	17	19.5

(2) Fe^{2+} 和 Co^{2+} 对 ACC 氧化酶活性的影响: ACC 氧化酶的体外活性需要 Fe^{2+} . 在 $1\text{--}50\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} 浓度范围内, ACC 氧化酶活性随着 Fe^{2+} 浓度的增加而提高; 当 Fe^{2+} 浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 时, 酶活性有所下降, 但仍为 $0\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} 处理的 4.8 倍. Co^{2+} 抑制 ACC 氧化酶的活性, 随着 Co^{2+} 浓度的增加, 抑制作用越大. Fe^{2+} 对 Co^{2+} 抑制 ACC 氧化酶的效应有拮抗作用, 当 Co^{2+} 的浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 时, Fe^{2+} 的拮抗作用较小 (图 1).

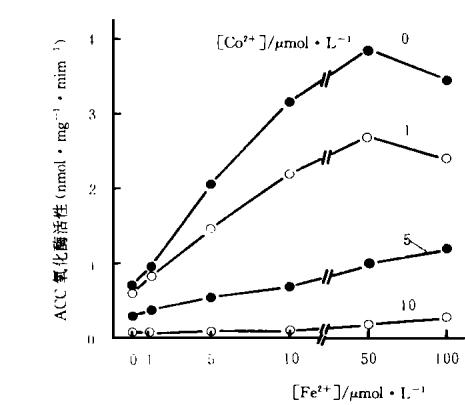


图 1 Fe^{2+} 和 Co^{2+} 对 ACC 氧化酶活性的影响

Fig. 1 Effect of Fe^{2+} and Co^{2+} on activity of

ACC oxidase

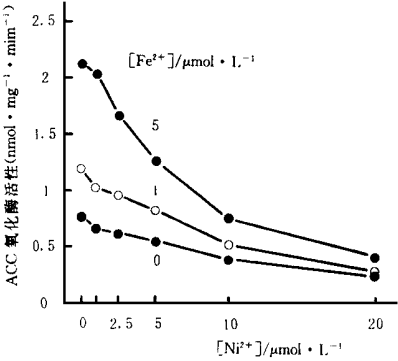


图 2 Ni^{2+} 对 ACC 氧化酶活性的影响及 Fe^{2+} 的拮抗作用

Fig. 2 Effect of Ni^{2+} on ACC oxidase activity and

antagonism of Fe^{2+} to Ni^{2+}

(3) Ni^{2+} 和 Mn^{2+} 对 ACC 氧化酶活性的影响以及 Fe^{2+} 对 Ni^{2+} 和 Mn^{2+} 的拮抗作用: 图 2 表明, Ni^{2+} 对 ACC 氧化酶活性有明显的抑制作用. 酶活性随 $[\text{Ni}^{2+}]$ 的增加而下降, Fe^{2+} 对 Ni^{2+} 抑制 ACC 氧化酶活性有拮抗作用, 其中 $[\text{Fe}^{2+}]$ 为 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的拮抗作用明显大于 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$. Mn^{2+} 对 ACC 氧化酶活性的影响类似于 Ni^{2+} , 不同 $[\text{Fe}^{2+}]\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 Mn^{2+} 的抑制效应具有拮抗作用, $10>5>1>0$ (图 3).

(4) CO_2 对 ACC 氧化酶的激活作用: CO_2 显著提高 ACC 氧化酶的活性, CO_2 对 ACC 氧化酶活性的促进效应与 $[\text{CO}_2]\%$ 有关, $21>5>1$, 而且 $[\text{O}_2]$ 不同, ACC 氧化酶呈最大活性时的 $[\text{CO}_2]$ 也不同(图 4).

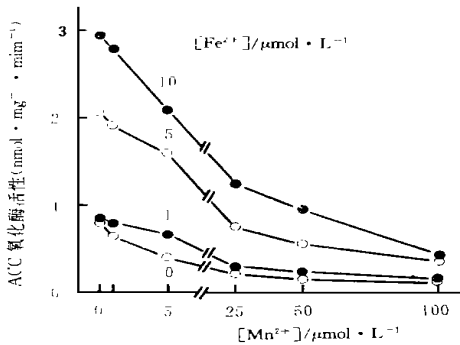


图 3 Mn^{2+} 对 ACC 氧化酶活性的影响及 Fe^{2+} 的拮抗作用

Fig. 3 Effect of Mn^{2+} on ACC oxidase activity and antagonism of Fe^{2+} on Mn^{2+}

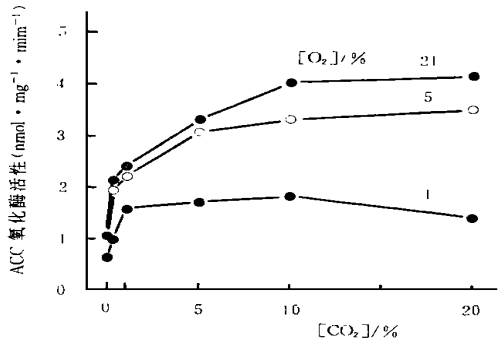


图 4 CO_2 和 O_2 对 ACC 氧化酶活性的影响

Fig. 4 Effect of CO_2 and O_2 on activity of ACC oxidase

3 讨 论

番木瓜果实成熟具有明显的呼吸跃变期, 受植物激素乙烯的调节. 番木瓜果实中 ACC 氧化酶主要存在于粗提取液的可溶性蛋白质中, 其活性比苹果中果皮高 3.4 倍. 在成熟的番木瓜中, 水溶性果胶的含量较高 (Arriola 等, 1975), 严重干扰随后的层析过程. 果胶能与 Ca^{2+} 结合生成果胶钙, 果胶钙能被离心而去掉. 番木瓜 ACC 氧化酶活性不稳定, 在提取和纯化过程中易丧失活性, 甚至在 4°C 下也迅速失活 (未列出数据), 30% 的甘油有稳定 ACC 氧化酶活性的作用. 在 30°C 下, ACC 氧化酶在含有 30%, 20%, 10% 和 0 甘油的缓冲液中, 其活性丧失 50% 的时间分别是 1.8, 1.3, 0.32 和 0.25 h (宋松泉和叶永健, 待发表).

Dong 等^[2]证明, ACC 氧化酶利用 ACC、 O_2 和抗坏血酸作为底物, CO_2 和 Fe^{2+} 作为激活剂. 部分纯化的番木瓜果实 ACC 氧化酶活性随着 $[\text{Fe}^{2+}]$ 的增加而提高 (图 1), 与纯化的苹果 [2, 6] ACC 氧化酶活性一致. 但 Fe^{2+} 的激活作用还与反应体系中 $[\text{CO}_2]$ 有关, Fe^{2+} 的激活作用随 $[\text{CO}_2]$ 的增加而提高, 且需要较高浓度的 Fe^{2+} 才能维持最大的 ACC 氧化酶活性^[6].

Co^{2+} 有效地抑制乙烯的生物合成, 但不影响组织中 ACC 水平的增加, 而是通过抑制 ACC 氧化酶的活性抑制 ACC 转化成为乙烯^[1]. Co^{2+} 的抑制效应是通过与蛋白质的巯基结合 (Yang 和 Hoffman, 1984). Co^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mn^{2+} 抑制 ACC 氧化酶的活性, Fe^{2+} 能部分地拮

抗这些离子的抑制作用 (图 1-3), 可能是这些二价离子能与 ACC 氧化酶的巯基结合, 竞争 Fe^{2+} 的结合位点, 从而抑制酶的活性. Ca^{2+} 延迟叶片衰老和抑制与衰老有关的乙烯产生 (Yang 和 Hoffman, 1984), 但 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对 ACC 氧化酶的体外活性影响较小 (未列出数据).

Kao 和 Yang (1982) 提出, CO_2 通过直接调节 ACC 氧化酶的活性促进体内乙烯的产生. 部分纯化的番木瓜 ACC 氧化酶活性随 $[\text{CO}_2]$ 的增加而提高 (图 4), 与纯化的苹果 ACC 氧化酶的活性变化相似^[2,6]. 但 CO_2 的激活机理还不清楚, Fernú ndez-Maculet 等^[8]发现, CO_2 能与酶的一种氨基形成氨基甲酸酯. CO_2 的激活作用与 O_2 的浓度有关, 是因为 O_2 是 ACC 氧化酶的底物之一; 在低氧水平下, CO_2 的激活效应较低是由于 $[\text{O}_2]$ 的限制; 当 $[\text{CO}_2]$ 较高时 (10%), 随着 $[\text{O}_2]$ 的增加, ACC 氧化酶的活性提高 (图 4). 此外, 当 $[\text{CO}_2]$ 增加时, 苹果 ACC 氧化酶的最适 pH 下降, 酶的最大活性增加^[6].

参 考 文 献

- 1 McKeon T A, Fernú ndez-Maculet J C, Yang S F. Biosynthesis and Metabolism of ethylene. In Davies P J, ed. Plant Hormones. Dordrecht Kluwer Academic Publishers, 1995. 118~ 139
- 2 Dong J G, Fernú ndez-Maculet 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 Smith J J, Ververidis P, John P. Characterization of the ethylene-forming enzyme partially purified from melon. Phytochemistry, 1992, 31 1485~ 1494
- 4 McGarvey D J, Christoffersen R E. Characterization and kinetic parameters of ethylene forming enzyme from avocado fruit. J Biol chem, 1992, 267 5964~ 5967
- 5 Moya-Leon M A, John P. Purification and Biochemical characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from banana fruit. Phytochemistry, 1995, 39(1): 15~ 20
- 6 Mizutani F, Dong J G, Yang S F. Effect of pH on CO_2 -activated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity from apple fruit. Phytochemistry, 1995, 39(4): 751~ 755
- 7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72 248~ 254
- 8 Fernú ndez-Maculet J C, Dong J G, Yang S F. Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by carbon dioxide. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 193 1168~ 1173

Effect of Fe^{2+} and CO_2 on ACC Oxidase from Papaya Fruit

Yip Wingkin* Song Songquan

Abstract 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase catalyzes the oxidation of ACC to ethylene. After DEAE-Sephadex and Phenyl-Sephadex column chromatography, ACC oxidase in the ripe papaya fruit was purified 19.5-fold. The ACC oxidase activity *in vitro* was enhanced by Fe^{2+} and CO_2 , and was inhibited by Co^{2+} , Ni^{2+} and Mn^{2+} . The inhibitory effect of Co^{2+} , Ni^{2+} and Mn^{2+} could be partially antagonized by Fe^{2+} . The effect of CO_2 on the activity of ACC oxidase was dependent on O_2 concentration in the assay system. The ACC oxidase activity which was increased by CO_2 was higher at 21% O_2 than at 5% O_2 and 1% O_2 .

Keywords 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, Fe^{2+} , CO_2 , *Carica papaya* L.

* Department of Botany, The University of Hong Kong, Hong Kong