

萌发花生种子子叶肽链内切酶的纯化和性质

宾金华* 沈芸 傅家瑞

(中山大学生物系, 广州 510275)

摘要 萌发花生种子子叶的肽链内切酶经硫酸铵沉淀, Sephadex G-100 凝胶层析, DEAE-纤维素 23 阴离子交换层析和 DEAE-Sephadex A 50 层析, 得到纯化的酶, 该酶有两条同工酶, 分子量分别为 58 和 55KD, K_m 为 $9.9\mu\text{mol/L}$, 是半胱氨酸型肽链内切酶(EC3. 4. 22), 对未萌发生花生种子的贮藏蛋白没有明显降解作用。

关键词 花生; 种子萌发; 肽链内切酶; 同工酶

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CYSTEINE ENDOPEPTIDASE IN COTYLEDONS OF GERMINATED PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA* L.) SEEDS

Bin Jinhua Shen Yun Fu Jiarui

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract A cysteine endopeptidase (EC 3.4.22) was purified from cotyledons of germinated peanut seeds by buffer extraction, ammonium sulfate precipitation and successive chromatographies on Sephadex G-100, DEAE-cellulose and DEAE-Sephadex A-50 columns. The overall purification and final recovery were 28.1 fold and 15.9%. This endopeptidase exists in two isoenzymic forms and SDS-PAGE revealed two polypeptides of 58 and 55KD. The optimum temperature was 50 °C at 8.1 pH for degrading BAPNA (Benzoylarginine-p-nitroanilide) in Tris-HCl buffer. Inhibitor studies demonstrated that the endopeptidase belongs to the cysteine class of endopeptidase. This enzyme hydrolysed only 5-10% of arachin or coarachin I or 2s protein of ungerminated peanut seeds *in vitro*. The characterization of the endopeptidase was almost consistent with the peptide hydrolase in the study of Cameron and Mazelis who purified from cotyledons of ungerminated peanut seeds. The results of present paper and our other studies suggested that the cysteine endopeptidase of peanut cotyledons which plays an important role during seed germination was synthesized during seed development and can only degrade the modified storage

国家自然科学基金资助课题

* 现工作地址: 华南师范大学生物系, 广州 510631

缩略语: β -ME 巯基乙醇; pCMB: 对氯汞苯甲酸; BAPNA: 苯甲酰精氨酸对硝基苯胺; PMSF: 苯甲酰磺酰氟;

NEM: n-乙酰马来酰胺; SDS: 十二烷基硫酸钠; PAGE: 聚丙烯酰胺凝胶电泳; STI: 胰蛋白酶抑制剂

1995-07-05 收稿; 1996-08-26 修回

proteins.

Key words Peanut; Germinated seed; Cysteine endopeptidase; Isoenzyme

种子萌发时贮藏蛋白质的降解为幼苗生长提供能量和营养, 研究证实, 肽链内切酶在这一过程中起关键作用^[1-4]。已从许多植物种子中提纯了肽链内切酶, 如绿豆^[5], 大麦^[6-8], 小麦^[9,10], 玉米^[11], 蓖麻^[12], 羽扇豆^[13]。50年前 Irving 和 Fortaine^[14]曾从萌发花生子叶中提纯一种类似胰蛋白酶(Trypsin-like)的花生仁蛋白酶(arachain), 但 Cameron 和 Mazelis^[15]认为 arachain 是一种肽水解酶(peptide hydrolase)。除此之外, 有关萌发花生种子子叶肽链内切酶提纯未见报道。我们研究室以前的工作表明, 花生种子蛋白质含量及萌发时肽链内切酶活性均与幼苗活力密切相关^[4,16]。花生种子肽链内切酶是在种子发育过程中合成并贮存于成熟种子中, 酶活性不受胚轴调控(待发表), 但此酶是以酶原形式存在或受抑制剂控制, 是何种类型肽链内切酶, 目前尚不清楚。为深入探讨花生种子贮藏蛋白降解的调控机理和种子活力的生理生化本质, 我们从萌发 5d 花生种子的子叶中提纯了肽链内切酶, 并测定了它的一些生理生化性质。

1 材料和方法

实验所用花生(*Arachis hypogaea* L.)为粤油 116 品种, 种子由广东省农科院经济作物研究所提供。

酶的纯化 花生种子于 28℃ 暗萌发 5d, 剥取子叶, 按每片子叶加 2.5ml 含 10mmol/L β -ME 的 0.02mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2), 高速捣碎 10min (7000rpm), 4 层纱布过滤, 滤液离心 20min (25000×g), 上清液即为粗酶液。向粗酶液加入研细的固体硫酸铵至饱和度达 80%, 静置 4h, 25000×g 下离心 20min, 沉淀用含 0.2mol/L NaCl, 10mmol/L β -ME 的 0.02mol/L 磷酸缓冲液(pH6.5, 称为缓冲液 A)溶解, 对同一缓冲液透析过夜, 透析液用 PEG-6000 浓缩后, -40℃ 贮存过夜。离心(20000×g, 10min)后取上清液过 Sephadex-G100 柱(2.6cm×50cm)。洗脱液为缓冲液 A, 流速为 27ml h⁻¹, 每 10min 收集一管, 汇集酶活性峰洗脱液, 对含 10mmol/L β -ME 的 0.01mol/L 磷酸缓冲液(pH6.5, 称缓冲液 B)透析过夜, 透析液用 PEG-6000 浓缩后离心(20000×g, 10min)上清液过 DEAE-纤维素 23 柱(2.6cm×45cm), 用 0.5mol/L NaCl 溶液线性洗脱, 流速为 30ml h⁻¹, 每 10min 收集一管。汇集酶活性峰溶液后对缓冲液 B 透析过夜, 透析液用 PEG-6000 浓缩后离心(20000×g, 10min), 然后取上清液过 DEAE-Sephadex A50 柱(2.6cm×35cm), 用 0.5mol/L NaCl 溶液线性洗脱, 流速为 24ml h⁻¹, 每 10min 收集一管, 汇集酶活性峰对缓冲液 B 透析过夜。透析液离心(20000×g, 10min), 上清液即为纯化的酶液, -20℃ 中保存备用。操作均在 0-4℃ 下进行。

肽链内切酶活性测定 以 BAPNA 为底物测定肽链内切酶活性, 参照 Harris 和 Chrispeel^[17]的方法, 以波长 410nm 下的 OD 值每分钟变化 0.01 为 1 个酶活性单位。

电泳后检测肽链内切酶活性 按 Jameel 等^[18]方法进行。

蛋白质含量测定 按 Bradford^[19]方法进行, 用牛血清白蛋白做标准曲线。

分子量测定 用 SDS-PAGE 方法, 标准蛋白质分子分别为磷酸化酶 B(94KD), 牛血清白蛋白(67KD), 肌动蛋白(43KD), 碳酸酐酶(30KD), 烟草花叶病毒外壳蛋白(17.5KD)。

酶反应最适温度 以 BAPNA 为底物, 不同温度下按 Harris 和 Chrispeels^[17] 方法测定酶活性。

酶反应最适 pH 分别用 0.03mol/L 磷酸缓冲液 (pH5.8-8.0), 0.03mol/L 乙酸缓冲液 (pH3.6-5.9) 和 0.06mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.1-8.9) 系统测酶最适反应 pH, 反应体系为 0.1ml 酶液 + 0.1ml 的 0.01mol/L BAPNA (蒸馏水配制) + 0.8ml 缓冲液 (含 10mmol/L β -ME), 37℃ 水浴中反应 20min, 酶活性单位同上。

Km 值测定 用 Hanes-Woolf 作图法, 在 722 型分光光度计上监测 OD₄₁₀ 变化。

抑制剂对肽链内切酶活性的影响 亮肽素和抗痛素 (Sigma 产品), 大豆胰蛋白酶抑制剂 (上海生化所产) 和花生 2s 蛋白直接用含 10mmol/L β -ME 的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.1, 称缓冲液 C) 配制。PMSF 用 1ml 异丙醇溶解, 连吡啶用 1ml 无水乙醇溶解, 然后分别用缓冲液 C 补足至 10ml。pCMB 先用 1ml 0.2mol/L NaOH 溶解, 然后用含 10mmol/L β -ME 的 0.02mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2, 称缓冲液 D) 补足至 10ml, NEM 直接用缓冲液 D 溶解。同时也用这些溶剂配制溶液作为对照。

花生球蛋白和伴花生球蛋白提取和体外降解 按照黄上志和傅家瑞^[4] 的方法, 提取花生种子的贮藏蛋白, 0-40% 硫酸铵沉淀的是花生球蛋白, 40-65% 硫酸铵沉淀的是伴花生球蛋白 I, 65-85% 硫酸铵沉淀的是 2s 蛋白。硫酸铵沉淀的蛋白先对蒸馏水透析, 再对含 10% NaCl, 10mmol/L β -ME, 10mmol/L PMSF 的 0.01mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.9) 透析, 透析液用 PEG-6000 浓缩, 浓缩液离心 (20000 × g, 10min) 后过 Sephadex-G100 柱 (2.6cm × 50cm)。洗脱液同透析缓冲液, 洗脱速率为 27ml h⁻¹, 每 10min 收集一管。汇集蛋白质洗脱峰对蒸馏水透析过夜, 然后对含 10mmol/L β -ME 的 0.05mol/L 磷酸缓冲液透析, 离心 (20000 × g, 10min) 取上清液, 贮存于 4℃ 中备用。

取 3 种花生贮藏蛋白溶液, 加入纯化的肽链内切酶 (18 单位, 0.1mg 蛋白), 37℃ 水浴中反应 24h, 用 Bradford 方法测定蛋白质含量, 反应体系中蛋白质含量分别为花生球蛋白 4mg ml⁻¹, 伴花生球蛋白 I 15mg ml⁻¹, 2s 蛋白 15mg ml⁻¹。

表 1 萌发生花生种子子叶肽链内切酶的纯化

Table 1 The purification of endopeptidase from the cotyledons of germinated peanut seeds

步骤 Step	蛋白量 Protein (mg)	总活性 Activity (units)	比活性 Specific activity (units mg ⁻¹)	产率 Yield (%)	纯化倍数 Purification (fold)
粗提液 Crude extract	300.1	654.4	2.18	100	1.0
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation	155.2	398.2	2.56	60.8	1.2
透析和 -40℃ 保存 Dialysis and -40℃ storaged	38.5	184.9	4.80	28.2	2.2
葡聚糖凝胶 G-100 柱 Sephadex G-100	12.6	151.3	12.0	23.1	5.5
DEAE-纤维素 23 柱 DEAE-Cellulose 23	2.66	111.6	41.9	17.1	19.2
DEAE-葡聚糖 A-50 柱 DEAE-Sephadex A-50	1.69	104.4	61.8	15.9	28.1

2 实验结果

2.1 萌发生花生种子子叶肽链内切酶的纯化

经过硫酸铵沉淀和 3 次柱层析, 酶比活提高到 61.8, 纯度提高 28 倍 (表 1)。图 1 表示过 DEAE-葡聚糖 A 50 柱的情况。

电泳后检测肽链内切酶活性, 所纯化的酶在凝胶上仍表现出两条酶带 (图 2-A), 靠近负极的酶带活性强, 靠近正极的酶带弱, 说明纯化对酶没有损害。用 SDS-PAGE 法测该酶分子量, 表明这两种同工酶的分子量分别为 58 和 55KD (图 2-B)。

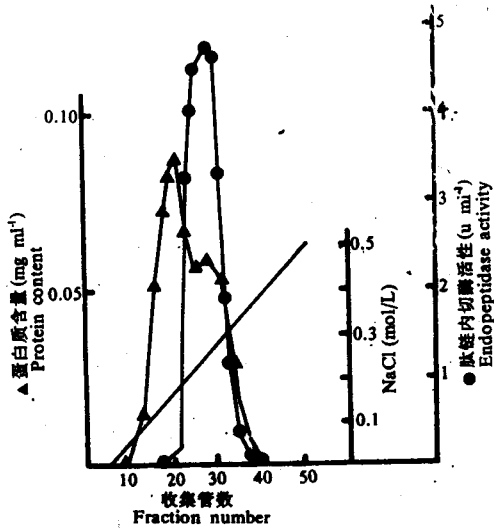


图1 萌花生种子子叶肽链内切酶的 DEAE-Sephadex A-50 柱层析

Fig.1 Purification of the endopeptidase by DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography

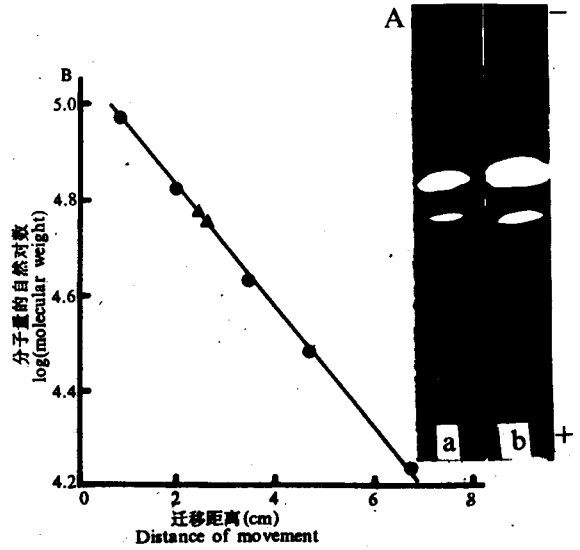


图2 萌花生种子子叶经 DEAE-Sephadex A-50 柱层析纯化后的肽链内切酶活性的凝胶图谱(A)和 SDS-PAGE 测定的分子量(B)

Fig. 2 Proteinase activity gel analysis (A) and SDS-PAGE for the determination of molecular weight of the endopeptidase (B)

A: a—未纯化的酶 Unpurified endopeptidase; b—纯化后的酶 Purified endopeptidase

2.2 萌花生子叶肽链内切酶的 Km, 最适反应温度和 pH

用 Hanes-Woolf 作图法求得萌花生种子子叶肽链内切酶的 Km (BAPNA) 值为 9.9 μmol/L (图 3), 经 t 检验此 Km 可信。

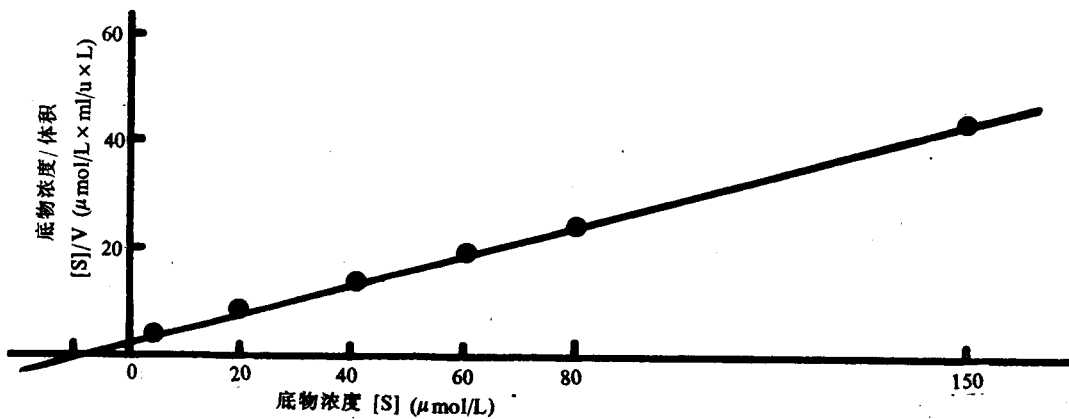


图3 萌花生种子子叶肽链内切酶的 Km 值
Fig. 3 Hanes-Woolf plot of the endopeptidase

$Y=2.652+0.2684X \quad r=0.999 \quad t=49.96$

在 pH8.1, 含 10mmol/L 的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液中, 萌发花生种子子叶肽链内切酶分解 BAPNA 的最适温度为 50 ℃, 在 0-50 ℃, 酶活性随温度升高而增加, 温度超过 55 ℃ 后酶活性急剧下降(图 4)。

在不同的缓冲液中, 萌发花生种子子叶肽链内切酶分解 BAPNA 的最适 pH 不同, 在 Tris-HCl 缓冲液中为 8.1, 磷酸缓冲液中为 7.6, 乙酸缓冲液中为 5.4, 此酶在 Tris-HCl 缓冲液中活性较稳定, 受 pH 变化影响不大, 在磷酸缓冲液和乙酸缓冲液中受 pH 变化影响较大(图 5)。此酶在不同缓冲液中降解 BAPNA 的最适 pH 不同可能与其含两条同工酶有关。

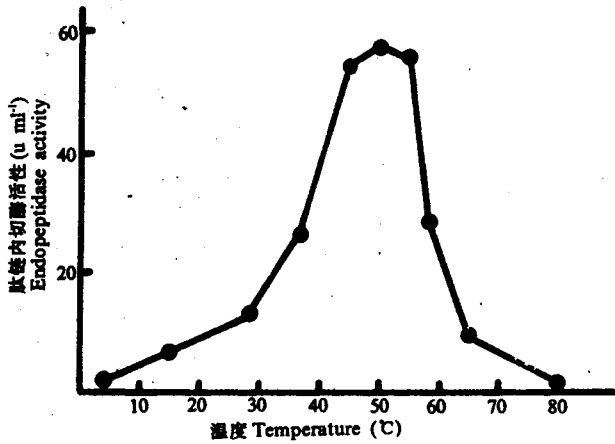


图 4 温度对萌发花生种子子叶肽链内切酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the endopeptidase activity

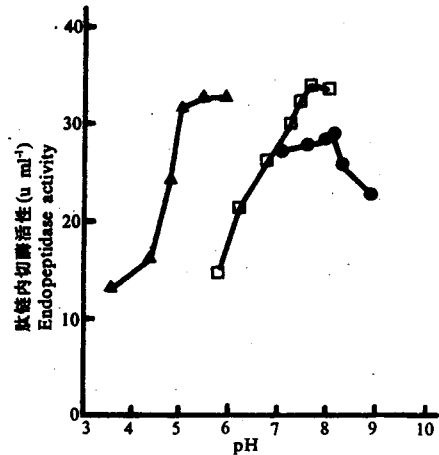


图 5 pH 对萌发花生种子子叶肽链内切酶活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on the endopeptidase activity
▲ Sodium acetate buffer; □ Sodium phosphate buffer; ● Tris-HCl buffer

2.3 蛋白酶抑制剂对萌发花生种子子叶肽链内切酶活性的影响

萌发花生种子子叶肽链内切酶主要受一些半胱氨酸型肽链内切酶抑制剂的抑制。亮肽素和抗痛素可以完全抑制酶活性, 对氯汞苯甲酸和 n-乙酰马来酰胺也抑制大部分酶活性, 而丝氨酸型肽链内切酶抑制剂, 金属型肽链内切酶抑制剂(连吡啶)以及 2s 蛋白对酶活性无明显影响(表 2)。

2.4 花生种子贮藏蛋白的体外降解

在不同 pH 的磷酸缓冲液中, 萌发花生种子子叶的肽链内切酶均不能明显降解未萌发花生种子的花生球蛋白, 37 ℃ 水浴中反应 24h, 只能降解 10% 左右的花生球蛋白, 该酶对未萌发花生种子的伴球蛋白 I 和 2s 蛋白降解更少, 37 ℃ 水浴中反应 24h, 只有约 5% 的蛋白被降解(表 3)。

3 讨论

植物种子的肽链内切酶也有同工酶, 如浩浩巴有 5 条同工酶^[20], 大麦有 3 条同工酶^[6]。实验结果表明, 萌发花生种子子叶肽链内切酶有两条同工酶, 分子量分别为 58 和 55KD(图 5), 经过 3 次柱层析, 仍不能将它们分离。以 BAPNA 为底物和 Tris-HCl 缓冲液中, 此酶最适反应温

度和 pH 分别为 50 ℃ 和 pH8.1, K_m 值为 $9.9\mu\text{mol/L}$ 。

表 2 蛋白酶抑制剂和 2s 蛋白对花生种子肽链内切酶活性的影响
Table 2 The effects of proteinase inhibitors and 2s protein on endopeptidase of cotyledons of germinating peanut seeds

类型 Class	抑制剂 Inhibitor	终浓度 Final concentration	酶活性 Activity (%)
丝氨酸型 Serine	苯甲酰磺酰氟 PMSF	Isopropyl alcohol control (0.01ml ml ⁻¹)	100
		1mmol/L	107
		5mmol/L	110
	胰蛋白酶抑制剂 STI	0.05mol/L Tris buffer control (pH8.1)	100
		0.05mg ml ⁻¹	105
		0.5mg ml ⁻¹	124
	亮肽素 Leupeptin	0.05mol/L Tris buffer control (pH8.1)	100
		0.05mg ml ⁻¹	0
		0.5mg ml ⁻¹	0
半胱氨酸型 Cysteine	抗痛素 Antipain	0.05mol/L Tris buffer control (pH8.1)	100
		0.01mg ml ⁻¹	0
		0.1mg ml ⁻¹	0
	对氯汞苯甲酸 pCMB	NaOH control (0.002mol/L)	100
		0.1mmol/L	44
		1.0mmol/L	30
	n-乙酰马来酰胺 NEM	0.02mol/L Phosphate buffer control (pH7.0)	100
		0.5mmol/L	49
		5mmol/L	36
		20mmol/L	29
金属型 Metallo	2,2-连吡啉 2,2-Dipiradyl	Absolute alcohol control (0.01ml ml ⁻¹)	100
		1mmol/L	100
		5mmol/L	96
蛋白质 Protein	2s 蛋白 2s Protein	0.05mol/L Tris buffer control (pH8.1)	100
		0.5mg ml ⁻¹	98
		5mg ml ⁻¹	100

表 3 萌发花生种子子叶肽链内切酶对未萌发花生子叶贮藏蛋白的体外降解
Table 3 Degradation of storage proteins of ungerminated peanut seeds by the endopeptidase of germinated peanut seeds *in vitro*

贮藏蛋白 Storage protein	Control	反应 pH Reaction pH			
		5.2	5.8	7.2	7.9
花生球蛋白 Arachin	100%	89.1%	89.6%	89.1%	95.2%
伴花生球蛋白 Coarachin I	100%	—	—	98.3%	—
2s 蛋白 2s Protein	100%	—	—	96.7%	—

亮肽素常被认为是丝氨酸型肽链内切酶的抑制剂, 但它也可以抑制半胱氨酸型肽链内切酶活性^[21]。尽管亮肽素可以完全抑制萌发花生种子子叶的肽链内切酶活性, 但丝氨酸型肽链内切酶的另一两种抑制剂 PMSF 和 STI 却没有抑制此酶的活性, 因而萌发花生子叶的肽链内切酶不是丝氨

酸型；也不是金属型，因为连吡啶对酶活性无明显抑制作用。而半胱氨酸型的抑制剂抗痛素，对氯汞苯甲酸和 *n*-乙酰马来酰胺均能明显抑制酶活性(表 2)，因而萌发花生种子子叶的肽链内切酶是半胱氨酸型(Cysteine endopeptidase, EC 3.4.22)。

近年来发现种子 2s 蛋白具有抑制蛋白酶活性^[22]。从未萌发花生种子子叶提取的 2s 蛋白对萌发花生子叶的肽链内切酶活性无影响(表 2)，说明 2s 不具蛋白酶抑制剂活性。

离体(*in vitro*)时萌发花生子叶的肽链内切酶只能部分降解未萌发花生种子的贮藏蛋白(5-10%)，说明未经修饰的贮藏蛋白不是此酶的适合底物。而此酶在种子萌发贮藏蛋白降解中起关键作用^[4]，因而认为此酶只能降解经修饰的贮藏蛋白。

Cameron和 Mazelis^[15]从未萌发花生种子的子叶中提纯了一种肽水解酶(pepti-dehydrodase)，以 BAPNA 为底物，在 Tris-HCl 缓冲液中的最适反应 pH 为 8.1, K_m 值为 10mmol/L BAPNA。我们从萌发花生种子子叶提纯的肽链内切酶与 Cameron 和 Mazelis 提纯的肽酶性质极为相似。以 BAPNA 为底物，在 Tris-HCl 缓冲液中，最适反应为 pH8.1, K_m 值为 9.9mmol/L。这两个酶在磷酸缓冲液中受 pH 变化的影响也极为相似(图 5)，在电泳凝胶上也表现两条酶活性带，我们认为两者是同一种酶。我们应用各种核酸合成抑制剂(放线菌素，3'-脱氧腺苷，5 氟尿嘧啶)和蛋白质合成抑制剂(亚胺环己酮)均不能阻止肽链内切酶活性在萌发过程中表现(待发表)，发育花生胚的子叶也可检测到肽链内切酶活性^[23]。因此，我们认为花生子叶的肽链内切酶不是在种子萌发过程中重新(*de novo*)合成，而是在种子发育过程中合成并贮存于成熟种子中。

参考文献

- Chrispeel M J, Boulter D. Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating Mung beans: Role of endopeptidase. *Plant Physiol*, 1975, 55:1031
- Mitsuhashi W, Koshiba T, Minamikawa T. Separation and characterization of two endopeptidase from cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Plant Physiol*, 1986, 80:628
- Boylan M T, Sussex I M. Purification of an endopeptidase involved with storage protein degradation in *Phaseolus vulgaris* L. cotyledons. *Planta*, 1987, 170:343
- 黄上志, 傅家瑞. 花生种子贮藏蛋白质与活力的关系及其在萌发时的降解模式. *植物学报*, 1992, 34:543
- Yamaoka Y, Takeuchi M, Morohashi Y. Purification and characterization of a endopeptidase in cotyledons of germinating Mung bean seeds. *Plant Physiol*, 1990, 94:561
- Koehler S, Ho D T H. Purification and characterization of gibberellic acid induced cysteine endopeptidases in barley aleurone layers. *Plant Physiol*, 1988, 87:95
- Pouille M, Jones B L. A proteinase from germinating barley: purification and some physical properties of a 30 KD cysteine endopeptidase from green malt. *Plant Physiol*, 1988, 88:1454
- Phillips H A, Wallace W. A cysteine endopeptidase from barley malt which degrades hordein. *Phytochemistry*, 1989, 28:3285
- Galleschi L, Capocchi A, Giannoni P et al. Proteinase activities in quiescent and germinating seeds of *xHaynaldoticum sardoum* L. *Physiol Plant*, 1989, 75:1
- Belozerky M A, Sarbakanova S T, Dunaevsky Y E. Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. *Planta*, 1989, 177:321
- Segundo B S, Casacuberta J M, Puidomech P. Sequential expression and differential hormonal regulation of proteolytic activities during germination in *Zea mays* L. *Planta*, 1990, 181:467

- 12 Tully R E, Beevers H. Proteases and peptidases of castor bean endosperm: enzyme characterization and changes during germinating. *Plant Physiol*, 1978, 62:746
- 13 Duranti M, Cerletti P. Purification and properties of an endospeptidase of the dormant Lupin seed. *Phytochemistry*, 1989, 28:1025
- 14 Irving C W, Fontaine T D. *Arch Biochem*, 1945, 6:351 come from [15]
- 15 Cameron E C, Mazelis M. A nonproteolytic "Trypsin-like" enzyme. *Plant Physiol*, 1971, 48:278-281
- 16 李黄金, 黄上志, 傅家瑞. 花生种子活力与贮藏蛋白降解的关系. *华南植物学报*, 1993, 试刊 II:78
- 17 Harris N, Chrispeels M J. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating Mung beans. *Plant Physiol*, 1975, 56:292
- 18 Jameel S, Reddy V V, Phodes W G et al. Gel electrophoretic profiles of proteinase in dark-germinated flax seed. *Plant Physiol*, 1984, 29:7
- 19 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
- 20 Woolf M J, Story R. Multiple forms of endopeptidase activity from Jojoba seeds. *Phytochemistry*, 1990, 29:2419
- 21 Alpi A, Beevers H. Effects of leupeptin on proteinase and germination of Castor beans. *Plant Physiol*, 1981, 68:851
- 22 张崇本, 吴显荣. 我国大豆种子中球蛋白 2s 组份的分离纯化及部分性质的研究. *生物化学杂志*, 1991, 7:230
- 23 黄上志, 宾金华, 林鹿等. 不同成熟度花生种子胚萌发时子叶中贮藏蛋白的降解. *植物生理学报*, 1993, 19:257