

# 琯溪蜜柚汁胞在发育与粒化过程中 APX 活性变化及同工酶分析

钟凤林<sup>a</sup>, 郭志雄<sup>a</sup>, 李开拓<sup>a,b</sup>, 王江波<sup>a,b</sup>, 潘东明<sup>a,b\*</sup>

(福建农林大学, a. 园艺学院; b. 园艺产品贮藏保鲜研究所, 福州 350002)

**摘要:** 对不同发育时期的琯溪蜜柚(*Citrus grandis* 'Guanximiyou')汁胞进行 APX 活性测定及同工酶分析。结果表明,随着汁胞的发育,APX 活性增大;而柚子衰老腐烂时,APX 活性迅速降低。APX 同工酶随着汁胞发育而发生变化,花后 150 d 的 APX 同工酶增加了 1 个组分(迁移率 0.66),且随着汁胞的成熟,其表达量增加。花后 230 d 时柚子开始衰老腐烂,花后 242 d 已难以看到大部分 APX 同工酶酶谱。粒化汁胞的 APX 活性比正常汁胞大,同工酶酶谱亮度和清晰度也大,推测琯溪蜜柚汁胞在粒化过程中 APX 可清除活性氧自由基,抵抗氧化损伤。

**关键词:** 蜜柚;汁胞;发育;粒化;APX;同工酶

中图分类号: Q554.6

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)01-0027-05

## Activity and Isozyme of Ascorbate Peroxidase in Pomelo (*Citrus grandis* 'Guanximiyou') during Juice Sac Development and Granulation

ZHONG Feng-lin<sup>a</sup>, GUO Zhi-xiong<sup>a</sup>, LI Kai-tuo<sup>a,b</sup>, WANG Jiang-bo<sup>a,b</sup>, PAN Dong-ming<sup>a,b\*</sup>

(a. College of Horticulture; b. Institute of Storage Science and Technology of Horticultural Products,  
Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The changes in activity and isozyme of ascorbate peroxidase (APX) in pomelo (*Citrus grandis* 'Guanximiyou') juicy sac were studied at different development stages. The results showed that APX activity increased gradually with juicy sac development and decreased rapidly at aging and rotting stages. The APX isozyme also changed during juicy sac development stages. A new APX isozyme was identified with mobility of 0.66 on 150 days after anthesis, and its expression enhanced with maturity of juicy sac. On 242 days after anthesis, most of APX isozyme disappeared. The APX activity in normal juicy sac was lower than that in granulated juicy sac. It suggested that APX could scavenge active oxygen free radicals and prevent the oxidative damage during pomelo juicy sac granulation stage.

**Key word:** *Citrus grandis*; Juicy sac; Development; Granulation; APX; Isozyme

植物在干旱失水、氧化、低温、高温和盐等胁迫下会产生  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$  等活性氧分子,它们具有细胞毒性,伤害膜、核酸和蛋白,破坏新陈代谢。植物细胞若不及时清除  $H_2O_2$  会转化为毒性更大的分子(如  $\cdot OH$ )。抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate

peroxidase, APX)是活性氧清除系统中的 1 个重要酶,它以抗坏血酸为底物,催化过氧化氢还原为水<sup>[1-2]</sup>。在高等植物中,抗坏血酸(ascorbic acid, ASA)-谷胱甘肽(glutathione, GSH)循环对于清除活性氧具有极其重要的作用;而 APX 作为 ASA-GSH

循环中分解  $H_2O_2$  的关键酶,与植物的生长和抵抗逆境胁迫有密切关系,同时其也是分解维生素 C 的酶之一。另外,在高等植物中,APX 存在多种同工酶,分别定位在细胞的不同部位<sup>[3]</sup>。

柑橘果实粒化是成熟期和采后贮藏期的生理病害,主要表现为汁胞异常膨大,变硬,汁胞木质化,风味变淡,一般情况下为囊瓣近蒂端汁胞先发生粒化,渐向果心发展,果心处长形汁胞最为严重。采后贮藏期表现为汁胞枯水、干瘪,并与采前粒化病并存于一果中,严重时汁胞颜色变为土黄色;果皮的海绵层变得疏松、绵烂,外果皮与正常果无明显区别<sup>[4]</sup>。为了解琯溪蜜柚 (*Citrus grandis* 'Guanximiyou') 汁胞在发育过程中,APX 与汁胞活性氧自由基清除和汁胞粒化的关系,本研究以琯溪蜜柚汁胞为材料,探讨在汁胞不同发育时期 APX 的活性和同工酶的变化,以期为琯溪蜜柚汁胞发育的生化研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

琯溪蜜柚 (*Citrus grandis* 'Guanximiyou') 于 2007 年 8 月 8 日至 10 月 8 日(即花后 110 d、140 d、150 d、160 d 和 170 d)上午 9 点采自福建省平和县小溪村大坑果园,以 30 a 树龄的易发生粒化、挂果量大的老龄树为材料,选择大小均匀,色泽一致、无病虫、无损伤的果实,当日从平和寄回福州,掰开果实,液氮处理、 $-40^{\circ}\text{C}$  保存备用;10 月 8 日(花后 170 d)部分果实室温放置备用。对花后 110 d、140 d、150 d、160 d、170 d、230 d 和 240 d 的琯溪蜜柚进行 APX 活性测定和同工酶分析;从花后 110 d 样品中选取正常琯溪蜜柚汁胞、粒化汁胞、严重粒化汁胞进行 APX 活性测定和同工酶分析。

**试剂** Tris、HCl、Acr、Bis、TEMED、 $H_2O_2$ 、Triton、 $\beta$ -巯基乙醇、甘氨酸、PVPP、溴酚兰、联苯胺、无水乙醇、乙酸钠,乙酸等均为国产分析纯试剂。

**仪器** 紫外分光光度计 TU-1901;高速台式冷冻离心机 Beckman Avanti 30;北京 61 厂 DDY-6C 型电泳仪;宁波江南仪器厂 RXZ 型人工气候箱;上海申生 SHB-3 循环水真空泵。

### 1.2 APX 活性的测定

取汁胞 0.5 g,加 3 mL 50 mmol/L pH 7.5 的磷酸缓冲液,0.1% Triton,0.1 mmol/L EDTA- $Na_2$ , $4^{\circ}\text{C}$

下 15 000  $\times g$  离心 20 min,上清液为酶粗提液。3 mL 反应液中含 50 mmol/L PBS、0.3 mmol/L 抗坏血酸、0.1 mmol/L EDTA- $Na_2$  和 0.1 mL 酶液,加入 0.06 mmol/L 的  $H_2O_2$ ,立即测定 10~30 s 的  $OD_{290}$  的变化。酶活性单位为  $\mu\text{mol AsA g}^{-1} \text{FW h}^{-1[5]}$ 。重复 3 次。

### 1.3 APX 同工酶电泳

APX 同工酶电泳条件参照汪家政等<sup>[6-7]</sup>方法。电泳首先用 100 V 预电泳 10 min,120 V 进行分离胶电泳,200 V 进行浓缩胶电泳。在前沿指示剂距底部 1~2 cm 时结束电泳。

APX 同工酶染色参照 Mittler<sup>[8]</sup>的方法进行,略加改良。用含 2 mmol/L 抗坏血酸的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)平衡凝胶 30 min,然后用含 4 mmol/L 抗坏血酸和 2 mmol/L  $H_2O_2$  的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)浸泡凝胶 20 min,进行酶催化反应;再用 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液冲洗 1 min,最后将凝胶放入含有 28 mmol/L 四甲基乙二胺(N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine, TEMED)以及适量氮蓝四唑(4-Nitro blue tetrazolium chloride, NBT)的 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.8)中温和摇动进行显色反应,10 min 左右显色,观察凝胶图像并保存与分析。重复 3 次。

相对迁移率  $R_f = \text{酶带迁移距离} / \text{溴酚蓝迁移距离}$ ,根据迁移率的不同,计算琯溪蜜柚汁胞 APX 同工酶所有的扩增酶带数。

## 2 结果和分析

### 2.1 APX 活性变化

琯溪蜜柚果实发育过程可分为细胞分裂期、细胞增大期和汁胞充实、肉质转变期。谢花后 7~15 d,子房迅速膨大,进入细胞分裂期,该阶段种子长大很慢,种子的内容物为稀浆状。6 月果皮增厚,果实增大。7~8 月为果实细胞增大期,果实海绵层逐渐增厚,果瓢增大。9 月是汁胞迅速充实期,果实增重最为明显。9 月下旬至 10 月上中旬果实转色和内质转变。果汁中糖和可溶性固形物增加,果实组织软化,果汁增多,果皮颜色由绿色-淡绿色-黄绿色-橙黄色,达到成熟固有的颜色<sup>[9]</sup>。一般 9 月中下旬开始转色,10 月中下旬达到成熟。本试验以花后 110 d、140 d、150 d、160 d、170 d、230 d 和 240 d 分别代表果实细胞增大期、汁胞迅速充实期到成熟的阶段,对琯溪蜜柚汁胞的 APX 活性进行

测定。从表 1 可以看出 APX 活性随着汁胞发育而变化, 花后 110~150 d 果实细胞增大期成上升趋势, 推测在汁胞发育早期, 生长力旺盛, 调节抗逆能力强。花后 150~170 d 是汁胞充分膨大至完全成

熟时期, APX 活性缓慢上升, 处在一个相对平稳的水平。花后 230 d 后柚子开始衰老腐烂, APX 活性迅速降低。

表 1 汁胞发育不同时期 APX 活性变化

Table 1 Changes in APX activity of pomelo juice sacs at different development stages

	花后时间 Days after anthesis						
	110	140	150	160	170	230	240
APX ( $\mu\text{mol AsA g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$ )	1758a	2609a	3566ab	3576a	3588a	3653a	312b

数字后相同字母表示差异不显著。Data followed the same letters present no significant difference.

## 2.2 正常汁胞与粒化汁胞的 APX 活性变化

对花后 150 d 的正常琯溪蜜柚汁胞、粒化汁胞、严重粒化汁胞进行 APX 活性的测定, 其中正常汁胞 APX 活性为  $3566 \mu\text{mol AsA g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$ 、粒化汁胞 APX 活性为  $4257 \mu\text{mol AsA g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$ 、严重粒化汁胞 APX 活性为  $4763 \mu\text{mol AsA g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$ 。花后 150 d 为琯溪蜜柚汁胞肉质转变至成熟的时期, 可见随着粒化程度增加 APX 活性上升, 正常汁胞 APX 活性小于粒化汁胞, 粒化汁胞 APX 活性小于严重粒化汁胞的。这可能是由于细胞处在损伤状态, 造成细胞内活性氧增加, 此时细胞启动内源抗逆系统诱导了该酶活性上升。

## 2.3 APX 同工酶变化

本试验以琯溪蜜柚花后 110 d、140 d、150 d、160 d、170 d、230 d 和 240 d 代表从细胞分裂期、细胞增大期和汁胞充实、肉质转变期、成熟到衰老的过程, 对其 APX 同工酶进行测定。结果表明在汁胞中共出现 7 条 APX 同工酶谱带, APX 同工酶随汁胞发育而变化, 在花后 150 d 的 APX 同工酶增加了 1 个组分 ( $R_f = 0.66$ ), 而且随着汁胞的成熟其亮度和清晰度不断增加, 表明其表达量不断增加。花后 230 d 后柚子开始衰老腐烂, 到花后 240 d 已经看不到大部分 APX 同工酶酶谱 (图 1)。

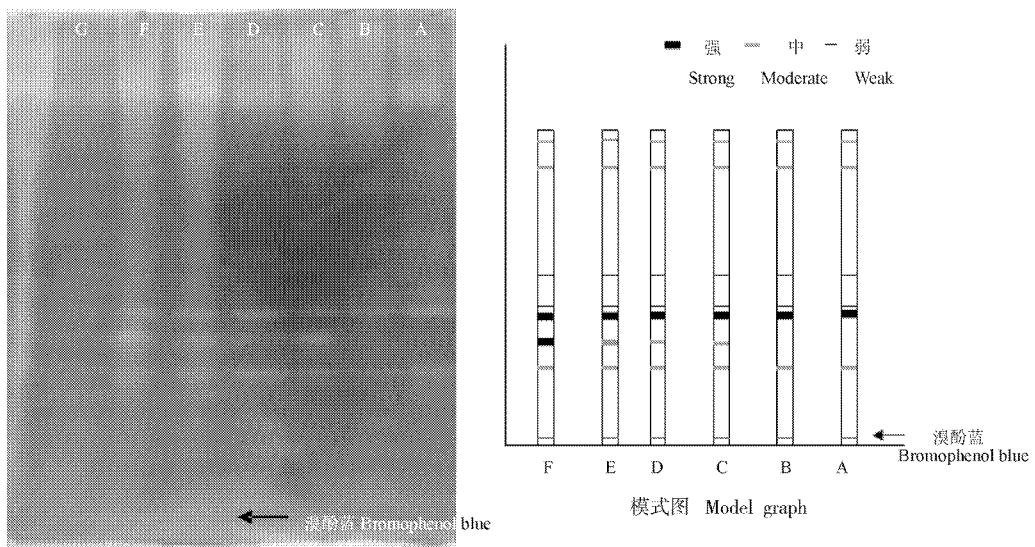


图 1 琯溪蜜柚汁胞不同发育时期 APX 同工酶变化

Fig. 1 The changes in APX isozymes of pomelo juice sacs at different development stages

A: 110 d; B: 140 d; C: 150 d; D: 160 d; E: 170 d; F: 230 d; G: 240 d

## 2.4 正常汁胞与粒化汁胞的 APX 同工酶变化

对花后 110 d 未成熟, 花后 150 d 未粒化、粒化和严重粒化的琯溪蜜柚汁胞进行 APX 同工酶分

析。结果表明, 汁胞粒化程度不同, APX 同工酶酶谱也不同, 当汁胞发生粒化时, APX 大量表达, 其同工酶组分亮度和清晰度不断增加, 粒化汁胞的 APX

同工酶比正常汁胞增加了 1 个组分( $R_f = 0.66$ )(图 2)。

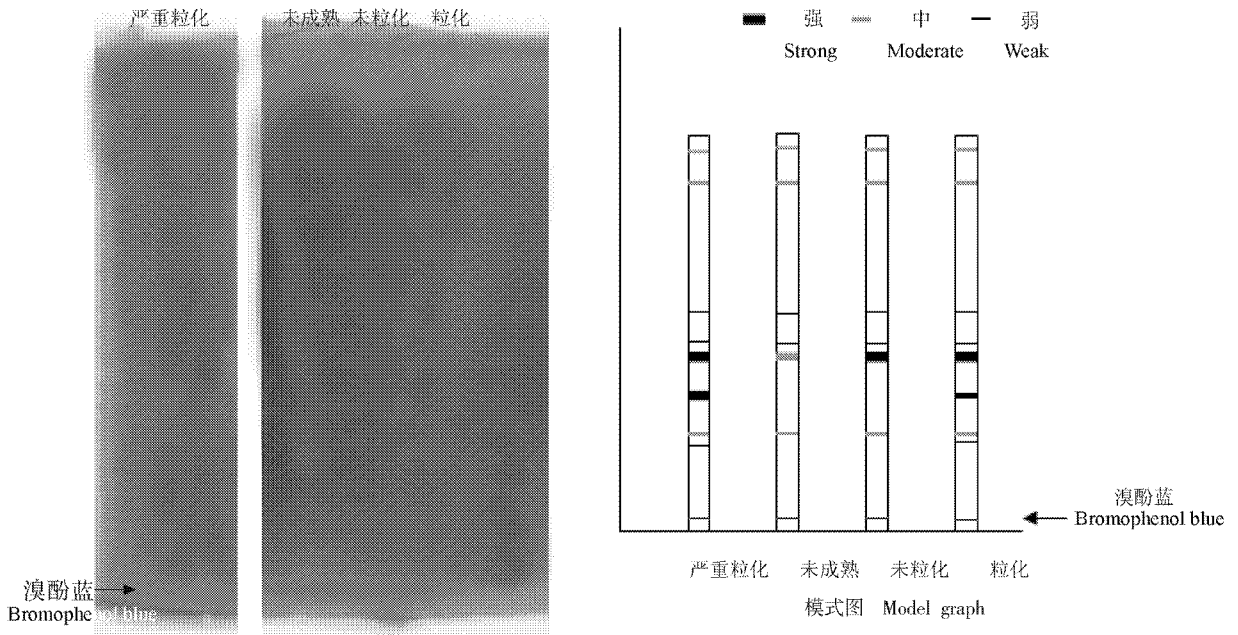


图 2 琯溪蜜柚汁胞不同粒化程度 APX 同工酶变化

Fig. 2 The change in APX isozymes at different granulation stages of pomelo juice sacs

### 3 讨论

同工酶是基因表达的产物,它是生物体为适应细胞代谢的多方面要求而形成的。在细胞生长发育过程中,受到逆境胁迫时,植物细胞会从代谢的不同层次和水平上作出相应的应答,在遗传上则表现为基因表达的改变<sup>[10]</sup>。果实成熟衰老是一种复杂的生理生化过程。衰老过程是活性氧代谢失调与累积的过程;活性氧代谢加强,对细胞产生毒害,导致细胞膜结构的破坏,促进果实软化腐烂。APX 是植物体内的重要防御酶之一,清除  $H_2O_2$  的主要酶;它清除逆境下细胞内活性氧自由基,抑制膜内不饱和脂肪酸的过氧化作用,提高植物抗逆性,其表达的多少会直接影响植物的抗逆性能。目前,已经在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、豌豆 (*Pisum sativum*)、水稻 (*Oryza sativa*) 等模式植物中证实存在多种 APX 编码基因<sup>[11-13]</sup>。各同工酶分别承担不同的生物学功能,共同完成调节衰老及环境适应性的功能。本研究表明,汁胞中存在多种 APX 同工酶基因,在不同发育过程和不同粒化程度的汁胞中 APX 同工酶基因表达有明显不同,不同类型的 APX 同工酶分子质量存在较大差异,诱导产生了新的同工酶,可推测不同 APX 同工酶对氧化胁迫具有不同的酶学特性和生理功能;氧化胁迫下 APX

同工酶基因可能是通过控制转录、翻译影响表达,从而进行渗透调节,最终达到抵抗活性氧侵害的目的<sup>[13-14]</sup>。本研究还表明,随着汁胞的发育,APX 活性不断提高;柚子衰老腐烂时,APX 活性则迅速降低;APX 同工酶随着汁胞发育而变化,到花后 150 d,APX 同工酶增加了 1 个组分( $R_f = 0.66$ ),且亮度和清晰度不断增加,表达量不断增强,表明其在汁胞发育过程中在保护各种组织和保持组织最小伤害中起协调作用,同时也说明 APX 同工酶基因表达调控存在时空顺序特异性。花后 230 d 以后柚子开始衰老腐烂,花后 240 d 大部分 APX 同工酶酶谱已经看不到;粒化汁胞的 APX 活性比正常汁胞大,同工酶酶谱亮度和清晰度也大,推测琯溪蜜柚汁胞通过 APX 同工酶的表达来清除活性氧自由基,抵抗氧化损伤。

### 参考文献

- [1] Sharma P, Dubey R S. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: Properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes [J]. *Plant Sci*, 2004, 167: 541-550.
- [2] Yoshimura K, Ishikawa T, Wada K, et al. Characterization of monoclonal antibodies against ascorbate peroxidase isoenzymes: Purification and epitope-mapping using immunoaffinity column chromatography [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1526: 168-174.
- [3] Takeda T, Yoshimura K, Ishikawa T, et al. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris* [J].

- Biochimie, 1998, 80: 295-301.
- [4] Pan D M(潘东明), Zheng G H(郑国华), Chen G X(陈桂信), et al. Analysis of the reasons caused granulation of juice sacs in Guanximiyou pomelo variety [J]. J Fruit Sci(果树学报), 1999, 16 (3): 202-209.
- [5] de Leonadis S, Dipierro N, Dipierro S. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato mitochondria [J]. Plant Physiol Biochem, 2000, 38: 773-779.
- [6] Guo Y J(郭尧君), Yu T(余添). New rapid semi-dry technique used in anode PAGE and cathod PAGE [J]. Progr Biochem Biophy(生物化学与生物物理进展), 1996, 23(4): 359-364.(in Chinese)
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 124-145.
- [8] Mittler R, Zilinskas B. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase [J]. Plant Physiol, 1991, 97: 962-968.
- [9] 潘东明. 琯溪蜜柚无公害栽培 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2006: 115-116.
- [10] Storozhenko S, Pauw P D, Montagu MV, et al. The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis* APX1 gene promoter [J]. Plant Physiology, 1998, 118(3): 1005-1014.
- [11] Jespersen H M, Kjaersgrd I V, Ostergaard L, et al. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase [J]. Biochem J, 1997, 326(2): 305-310.
- [12] Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, et al. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings [J]. J Exp Bot, 2001, 52(1): 1-7.
- [13] Gadea J, Conejero V, Vera P. Developmental regulation of a cytosolic ascorbate peroxidase gene from tomato plants [J]. Mol Gen Gen, 1999, 262(2): 212-219.
- [14] Battistuzzi G, D'Onofrio M, Loschi L, et al. Isolation and characterization of two peroxidases from *Cucumis sativus* [J]. Arch Biochem Biophy, 2001, 388(1): 100-112.