植物学通报 2002，19（6）：739～742
Chinese Bulletin of Botany

研究简报

苹果果肉中抗氰氧化酶（AOX）的分离鉴定

[1]雷晓勇 [2]黄 蕾 [3]田梅生 [2]胡小松 [1]戴尧仁

[1]（清华大学生物科学与技术系 北京 100084）

[2]（中国农业大学食品学院 北京 100094） [3]（新西兰园艺与食品研究所 奥克兰）

摘要 水果果肉的组织特征决定了从果肉中抽提线粒体的方法与其它组织有所不同。采用平面细孔瓜果刨破碎果肉、差速离心、密度梯度纯化等方法能够得到活性较高的线粒体。Brother 氧电极能够判断线粒体膜是否完整。利用 PAGE 凝胶电泳、Western Blot（AOX 单克隆抗体）等分析手段，对‘Royal Gala’苹果中 AOX 进行了分离和鉴定。结果表明：Royal Gala’苹果果肉线粒体中 AOX 单体的分子量约在 35～37 kD 之间，二聚体约为 90 kD 左右。这与其它已分离鉴定的产热植物或烟草等线粒体中 AOX 蛋白的分子量基本一致。

关键词 苹果果肉，线粒体，抗氰氧化酶，单克隆抗体

Isolation and Identification of AOX (Alternative Oxidase) in ‘Royal Gala’ Apple Fruits

[1]LEI Xiao-Yong [2]HUANG Lei [3]TIAN Mei-Sheng [2]HU Xiao-Song [1]DAI Yao-Ren

[1]（*Department of Biological Sciences & Biotechnology, Tsinghua University*, Beijing 100084）

[2]（*College of Food Science, China Agricultural University*, Beijing 100094）

[3]（*The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd.*）

Abstract Since fruit texture differs completely from other tissues such as leaf, root and flower due to its unique properties, the method for mitochondrion extraction is different. Using a special grater to grind the fruits, combination with gradient centrifugation, mitochondria with much higher activity can be obtained. The Brother oxygen electrode was introduced to judge whether the mitochondrion membrane was intact or not. In addition, PAGE gel electrophoresis and Western Blot (AOX monoclonal antibody) were used in this paper to isolate and identify AOX in Royal Gala apple fruits. The results suggested that these proteins have apparent molecular masses of 35～37 kD which are similar to those of Tobacco and *Sauromatum guttatum* Schott.

Key words Apple fruits, Mitochondria, AOX, Monoclonal antibody

植物细胞线粒体内膜上除了细胞色素电子传递链外，还存在着另外一条电子传递途径，即抗氰呼吸电子传递链，又称交替途径（alternative pathway，AP）。对抗氰呼吸的研究可以说从很早就已经开始。Genevois（1929）在豌豆中观察到抗氰性和汤佩松（1932）观察到

作者简介：雷晓勇，男，1997 年 9 月考入中国农业大学研究生院，1999 年 1 月至 1999 年 9 月赴新西兰皇家科学院园艺与食品研究所进行合作研究。2000 年 7 月毕业于中国农业大学食品学院果蔬采后生理专业，获硕士学位。2000 年 9 月入清华大学生物科学与技术系细胞与发育生物学研究所攻读博士学位。

收稿日期：2001-09-20 接受日期：2001-10-26 责任编辑：刘 晖，崔郁英

CO 不能完全抑制细胞色素氧化酶都表明了 AP 的存在。抗氰呼吸不仅在高等植物中存在,在许多真菌、藻类、酵母中也相继发现了抗氰呼吸的运行(Lambowitz and Slayman, 1971;de Troostemvergh and Nyns, 1978)。还有报道说在动物组织中也可能有抗氰呼吸(McIntosh, 1994)。

虽然植物的抗氰呼吸很早就被大家所认识,但其具体的作用和机理却一直不清楚。只知它是从细胞色素途径泛醌处分出来的一种非磷酸化的产热途径。而对其末端氧化酶 AOX 更是知之甚少。但有一点是可以肯定的,那就是生物体的许多特殊的现象与功能都与交替途径的存在有着直接或间接的联系。如:佛焰花絮的产热、果蔬的成熟衰老、呼吸跃变、愈伤组织分化、种子发芽等。由于 AOX 极不稳定,离体后很容易失活,所以长期以来大家一直致力于对它的分离纯化,但最终都没有成功(Berthold *et al*, 1993;余叔文和汤章城, 1998)。苹果作为一种典型的呼吸跃变型水果,其成熟衰老与抗氰呼吸有着某种联系。但苹果果肉线粒体中 AOX 的分离还没有报道。为此,我们根据果肉组织的特征,改进了线粒体分离方法,结合单克隆抗体技术,对苹果中 AOX 进行分离与鉴定,结果表明该方法稳定可靠,可以用于随后利用氧电极测定线粒体呼吸的一系列实验中。

1 材料和方法

1.1 材料

不同成熟度的 Royal Gala 苹果,采摘于新西兰奥克兰郊区农场。选果树上层红色为成熟度高的苹果。

1.2 线粒体的提取

苹果去皮,用孔径约为 1.5 mm 的萝卜擦(商品名为平面细孔瓜果刨,英文名为 Grater)把苹果果肉擦入 250 mL 破碎介质[0.5 mol/L 蔗糖(青苹果用 0.45 mol/L),25 mmol/L 焦磷酸钠,2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L KH_2PO_4, 1% PVP-29, 25 mmol/L TES, 10% BSA(待其它试剂完全溶解后再加,以防泡沫产生),20 mmol/L Vc(用前再加),pH 7.5(青苹果为 7.2)]中。4 层纱布过滤,5 000 r/min 20 min,取上清液,12 000 r/min 20 min,沉淀悬浮于洗涤介质(0.5 mol/L 蔗糖,10 mmol/L TES, 0.1% BSA, pH 7.2),5 000 r/min 5 min,取上清液,12 000 r/min 20 min,将所得沉淀重新悬浮于 1.5 mL 洗涤介质中,即为线粒体粗提液。如此时颜色较绿,可再洗一次。

1.3 线粒体的纯化

重液:2 倍洗涤介质 8.75 mL, Percoll 4.9 mL,20% PVP-29 3.85 mL。轻液:2 倍洗涤介质 8.75 mL Percoll 4.9 mL,蒸馏水 3.85 mL。梯度仪制备梯度,将线粒体粗提液沿管壁轻轻放在梯度液面上,18 000 r/min 40 min,吸除上层杂质及叶绿体,取下层暗灰色线粒体层,加洗涤介质,15 000 r/min 15 min,重复 2 次。取沉淀分别用 1 mL 20 mmol/L TES(Western Blot 用)和 1 mL 洗涤介质(测线粒体呼吸)悬浮备用。

1.4 用 Brother 氧电极测线粒体膜的完整性

由于本实验所抽提的线粒体主要被用来测定线粒体两条途径对不同底物的利用情况以及判断电子在两条途径之间的分配情况,所以在测定之前知道线粒体是否有活性就显得尤为重要。因此,我们设计了该方法,目的在于尽量在较短时间内判断线粒体膜的完整

性(只需 2 ~ 3 min)，保证随后实验的顺利进行。如需定量，可根据加入 Triton X-100 后直线的斜率来计算。

首先，加 2 mL 反应介质(0.5 mol/L 蔗糖，5 mmol/L，10 mmol/L TES，10 mmol/L NaCl，2 mmol/L $MgSO \cdot 7H_2O$，0.1% BSA，pH 7.2)于 Brother 氧电极反应室，然后依次加入 50 μL 线粒体提取液，10 μL 20 mmol/L Vc，10 μL 2 mmol/L Cytc，10% Triton X-100，5 μL 2 mmol/L KCN，如图 1 所示。

1.5　线粒体蛋白 SDS-PAGE 以及 Western Blot 分析

线粒体蛋白含量的测定根据改进了的 Lowry 法(Larson *et al*，1986)。线粒体蛋白经 SDS-PAGE 分离后，转移到硝酸纤维素膜上，5% BSA 过夜，1∶50 AOX 单克隆抗体(Tom Elthon 赠，密歇根州立大学)摇床温育 2 h，随后用 1 倍 TBST 漂洗 3 遍。2 抗为 anti-[rabbit IgG(h + t)]-alkaline phosphatase，最后用 1-StepTM NBT/BCIP 显色。

2　结果与讨论

与传统上使用的 Blender 相比，采用平面多孔瓜果刨破碎苹果果肉细胞能够获得活性较高的线粒体，且线粒体获得量也大大提高(相同材料线粒体蛋白含量可提高 0.5 ~ 1 倍)。Percoll 和 PVP-29 组成的纯化梯度对线粒体的损伤较小。利用 Brother 氧电极能有效地判断线粒体膜的完整性，因为生物氧化的电子传递链位于线粒体内膜上，当向完整的线粒体悬浮液中加入 Cytc 时，由于膜的阻隔，Cytc 要进入线粒体必须有一个穿膜的过程，也就是说在一定时间内线粒体对底物的利用率很小，因而此时反映在 Brother 氧电极上几乎是一条直线。然而当加入非离子表面活性剂 Triton X-100 时，线粒体膜完全破裂，位于内膜上的电子传递链也就完全暴露出来，为电子经 Cytc 传递给 O_2 创造了条件。作为电子大量流经 Cytc 的结果，介质中线粒体对 O_2 的消耗量急剧增加，这时在氧电极曲线上表现为具有一定斜率的直线，这条直线的斜率可以反映线粒体膜的完整性。斜率越大，完整性越好，反之亦然。而 KCN 作为细胞色素途径的抑制剂，能够阻断电子从细胞色素 a3 向 O_2 的传递，因而加入 KCN 时，电子传递链对 Cytc 的利用立即被阻断，此时的氧电极曲线表现为直线，如图 1 所示。

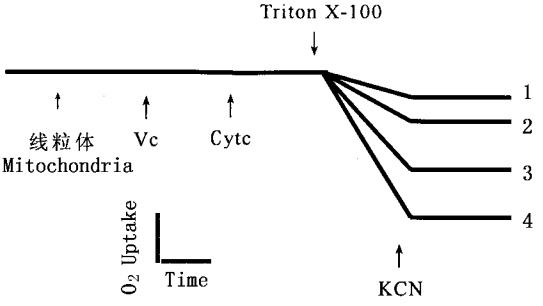


图 1　线粒体膜完整性的测定

Fig.1　Oxygen electrode trace for determination of mitochondria membrane integrity

1. blender；2. fine pore grater (Φ 1.0 mm)；3. fine pore grater (Φ 2.0 mm)；4. fine pore grater (Φ 1.5 mm)

Western Blot 分析表明：RoyalGala 苹果果肉线粒体中 AOX 蛋白的分子量约在 35 ~ 37 kD 之间，这与其他已分离鉴定的产热植物和烟草等线粒体中 AOX 蛋白分子量完全一致。同时在 35 ~ 37 kD 蛋白上方发现一条分子量约 90 kD 的带。Day 和 Wiskich (1995)认为生物线粒体内存在着两种形式的 AOX，一种为氧化型的，一种为还原型的。前者是以共价键结合的二聚体形式存在，是无活性的。原因是其中二聚体之间形成的二硫键是无活性的。由于氧化型 AOX 二聚体之间二硫键牢固结合，使其不易被打开，这就是在 Western

https://www.cnki.net

Blot 上出现 90 kD 的可能原因。另一方面,还原型 AOX 二聚体之间只是简单的非共价键结合,所以很容易降解为单体。另外,几乎所有的 Western Blot 或多或少都有反白带,其位置在单体的上方或下方。是显色剂的问题还是 AOX 蛋白自身的结构特征所致还需进一步研究。

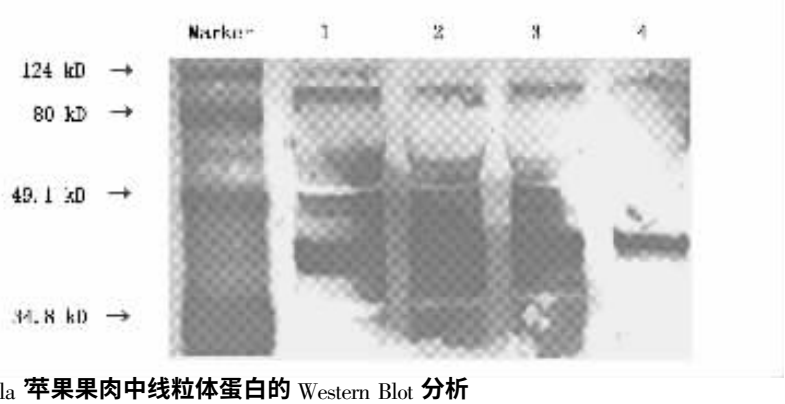


图 2 ‘Royal Gala’苹果果肉中线粒体蛋白的 Western Blot 分析

Fig. 2 Western Blot analysis of total mitochondrion protein from ‘Royal Gala’ apple fruits

An immunoblot from a 12% SDS-PAGE gel probed with the AOX monoclonal antibody is shown; Lane 1: tobacco as control; Lane 2: immature apple (Green); Lane 3: mature apple (Red); Lane 4: heat treated apple (38 ℃ for 1 h). The amount of protein loaded per lane was 30 μg. Molecular masses (in kD) are indicated on the left.

参 考 文 献

余叔文, 汤章城主编, 1998. 植物生理与分子生物学(第二版),北京:科学出版社

梁峥,1985. 植物线粒体抗氰电子传递链. 植物生理学通讯, **5**:1 ~ 9

Berthold D A, Siedow J N, 1993. Partial purification of the cyanide-resistant alternative oxidase of skunk cabage (*Symplocarpus foetidus*) mitochondria. *Plant Physiol*, **101**:113 ~ 119

Day D A, Wiskich J T, 1995. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **27**(4):379 ~ 385

de Troostembergh J C, Nyns E J, 1978. Kinetics of the respiration of cyanide – insensitive mitochondria from the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Eur J Biochem*, **85**:423 ~ 432

Lambowitz A M, Slayman C W, 1971. Cyanide-resistant respiration in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol*, **108**:1087 ~ 1096

Larson E, Howlett B, Jagendorf A, 1986. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Anal Biochem*, **155**:243 ~ 248

McIntosh L, 1994. Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol*, **105**:781 ~ 786

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t21-119