

苹果果实中蛋白质磷酸化对淀粉酶的激活

张凌云 张娜* 潘秋红 段长青 张大鹏**

(中国农业大学果树分子发育实验室, 植物生理生化国家重点开放实验室, 北京 100094)

摘要: 用红富士苹果进行的研究表明, 果实淀粉酶测定介质中加入 ATP 可显著激活淀粉酶活性, 激活的幅度与 ATP 浓度有关。结合蛋白激酶抑制剂试验, 表明苹果果实淀粉酶受到蛋白质磷酸化的激活。

关键词: 苹果; 果实; 淀粉酶; 蛋白磷酸化

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 04-0455-02

1 目的、材料与方法

果实中淀粉的合成和分解与果实的产量和品质密切相关。我们的研究已经证实, 定位于苹果果实质体中的 α -淀粉酶和 β -淀粉酶参与了果实中淀粉的水解^[1,2], 生长过程中苹果果实的淀粉酶活性受到果糖和葡萄糖的负调节^[3]。本研究发现, 苹果果实中的淀粉酶受到蛋白质磷酸化的激活。

选 10 年生红富士苹果 (*Malus domestica* Borkh 'Red Fuji')/海棠为试材, 采取生长中期 (7 月 20 日左右) 的果实, 基本参照文献 [1, 2] 进行果实淀粉酶的提取和活性测定, 按照文献 [4], 在测定淀粉酶的介质中加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$, 加入一定浓度的 ATP, 或加入 ATP 的同时加入 K252a 或 W7, 以判断磷酸化对淀粉酶活性的影响。

2 结果与分析

2.1 ATP 对淀粉酶活性的影响

如图 1 所示, 在测定淀粉酶的介质中加入 ATP, 淀粉酶总活性显著升高, 而且, 随着 ATP 浓度的增加, 激活效应增大; $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 使激活效应达到最大, 比不加 ATP 时升高约 4 倍, 而 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 时激活效应不再增大或有下降趋势。淀粉酶总活性是 α -淀粉酶和 β -淀粉酶活性之和。其中, α -淀粉酶被 ATP 激活的表现与淀粉酶总活性相似, 但 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时激活效应已达到最大, 比不加 ATP 时亦升高约 4 倍, 一直到 $50 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 呈现与 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相同幅度的激活效应, 而 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 时激活效应显著下降。 β -淀粉酶的表现有所不同, 在 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 浓度范围内, 该酶被激活的程度与 ATP 浓度呈现正相关, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 时, β -淀粉酶活性比不加 ATP 时升高约 4 倍。

2.2 W7 对淀粉酶活性的影响

W7 是钙调素抑制剂。如图 2 所示, W7 显著抑制了 ATP 所激活的 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和总淀粉酶活性, 淀粉酶活性下降的幅度随 W7 浓度的增大而增大。

蛋白激酶所催化的蛋白质磷酸化在调控植物细胞信号转导中的作用越来越成为植物生物学所关注的焦点^[5]。淀粉酶功能的细胞生物学虽研究不少^[1,2], 然而其翻译后活性在细胞内的调节机理还不清楚。本研究表明, 用 ATP 作为基质, 苹果果实细胞中的蛋白激酶^[4]使淀粉酶磷酸化, 从而使 α -淀粉

收稿日期: 2002-07-16; 修回日期: 2002-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070532, 39730340); 国家重点基础研究计划资助项目 (G1999011700)

* 并列第一作者。 ** 通讯作者。E-mail: zhangdp@95777.com

酶和 β -淀粉酶都得到显著的激活 (图 1)。钙调素抑制剂 W7 以浓度依赖的方式显著抑制了 ATP 对淀粉酶的激活效应 (图 2), 结合蛋白激酶抑制剂 K252a 抑制淀粉酶激活, 以及淀粉酶激活过程依赖钙但不依赖钙调素的特点 (结果未示), 推测钙依赖蛋白激酶可能是淀粉酶激活的细胞内上游信号。这需要进行进一步研究。本研究提示, 可以通过调控蛋白激酶的途径调节果实内淀粉酶的活性, 从而作用于果实的发育。

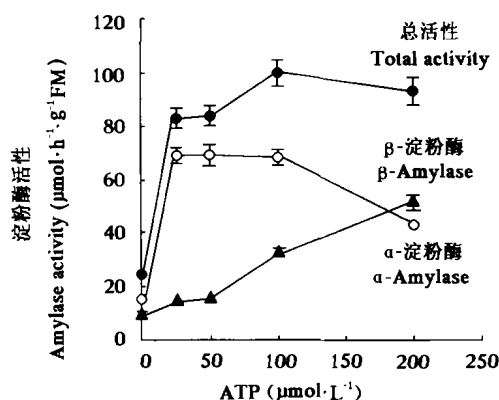


图 1 测定介质中 ATP 浓度与淀粉酶活性的关系
每个数据均为 5 次重复的均值 \pm SD。

Fig. 1 Effects of ATP concentration in the medium of amylase assay on amylase activities

Values represent the means \pm SD of five determinations.

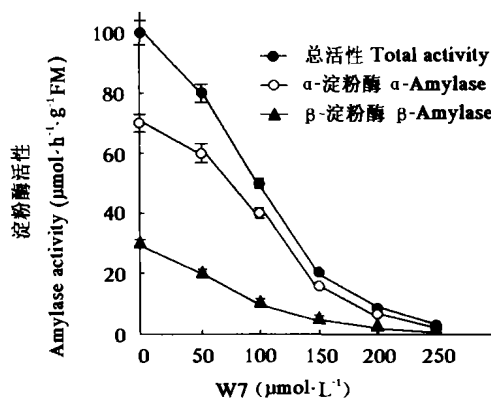


图 2 测定介质中 W7 浓度与淀粉酶活性的关系

测定介质中同时加入 ATP ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 W7, W7 浓度为 0 时指仅加入 ATP。每个数据均为 5 次重复的均值 \pm SD。

Fig. 2 Effects of W7 concentration in the medium of amylase assay on amylase activities

Both ATP ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and W7 were added in the reaction medium of amylase assay. Only ATP was present in the medium when W7 concentration was zero. Values represent the means \pm SD of five determinations.

参考文献

- 王永章, 张大鹏. 发育过程中苹果果实的 β -淀粉酶: 活性、数量变化和亚细胞定位. 中国科学 (C 辑), 2002, 32 (3): 201 ~ 210
- 王永章, 张大鹏. 苹果果实发育过程中 α -淀粉酶的活性、数量变化和亚细胞定位. 植物学报, 2002, 44 (1): 45 ~ 52
- 段长青, 王永章, 潘秋红, 等. 苹果幼果果糖和葡萄糖对淀粉酶活性的负调节. 园艺学报, 2003, 30 (1): 74 ~ 76
- 梁小娥, 张大鹏, 贾文锁. 苹果和葡萄果实发育过程中蛋白激酶特性的比较研究. 植物学报, 2000, 42 (11): 1131 ~ 1136
- Harmon A C, Gribskov M, Harper J F. CDPKs: a kinase for every Ca^{2+} signal. Trends Plant Sci., 2000, 5: 154 ~ 159

Amylase Activities are Stimulated by Protein Phosphorylation in Apple Fruit

Zhang Lingyun, Zhang Na, Pan QiuHong, Duan Changqing, and Zhang Dapeng

(Laboratory of Molecular Developmental Biology of fruit Trees, National Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The experiment conducted with Red Fuji apple (*Malus domestica* Borkh) showed that in vitro activities of both α -amylases and β -amylases of apple fruit significantly increased when adding ATP into the reaction medium of amylase assay, and this amylase activation was shown to be ATP dose-dependent. W7, an inhibitor of calcium-dependent protein kinases, significantly inhibited this amylase activation also in a dose-dependent manner. These data indicate that α -amylases and β -amylases are activated by protein phosphorylation in developing apple fruit.

Key words: Apple; Fruit; Amylase; Protein phosphorylation