

植物多酚氧化酶的研究进展

许传俊, 李玲

(华南师范大学 生命科学学院, 中国广东 广州 510631)

摘要: 阐述了多酚氧化酶的分子结构、生物功能、基因表达等方面的研究进展。

关键词: 多酚氧化酶; 防御反应; 基因表达

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2002)S0-0045-04

A Review of Recent Advances on Polyphenol Oxidase in Plant

XU Chuan-jun, LI Ling

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China)

Abstract: The molecular structure, physical functions and gene expression of polyphenol oxidase (PPO) are reviewed in this paper.

Key words: polyphenol oxidase; defence response; gene expression

(Life Science Research, 2002, 6(Suppl.): 45~48)

多酚氧化酶(PPO)是植物体内普遍存在的一种酚氧化酶。羟化单酚为双酚(单酚氧化酶 EC 1.14.18.1), 氧化双酚为醌(儿茶酚氧化酶, EC 1.10.3.2)。在高等植物中, PPO 是由核编码的含铜的金属蛋白酶, 定位于质体内囊体, 而它的底物定位于在液泡, 正常情况下二者是分离的, 只有当植物受到伤害如动物啃食、昆虫噬咬、病原菌入侵打破隔离, PPO 才会与底物接触相互作用, 氧化底物产生活性的醌, 醌自发聚合并和细胞内的蛋白质氨基酸基团反应, 产生黑色和褐色物质。这也是组织中酶促褐变的主要原因。

1 PPO 的生理功能

PPO 是一种酚氧化酶, 自从发现以来, 它在植物体内的生理功能还不是很清楚, 大多数人认为它的功能与植物抗病有关。因为 1) PPO 活性在不

相容反应中增加; 2) 诱导抗营养防御反应, 在受到昆虫等动物伤害时, 由 PPO 催化形成的醌可以与植物蛋白质作用, 降低对食草动物的营养作用; 3) 产生的醌对细菌有抑制作用, 阻止病菌扩散。还有一种观点认为 PPO 在光合组织中存在, 可能在光合反应中起作用, 更精确地调节假循环磷酸化。

对于 PPO 是否与茉莉酸甲酯和系统素等信号转导途径有关, 是否是伤诱导下游信号分子等问题仍然存在较多争议, 也是研究热点, 已有越来越多的证据证明 PPO 与植物的防御反应有关。Constabel^[3] 将杂交杨 (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) 用茉莉酸甲酯处理, 幼叶 PPO mRNA 大量表达。在伤诱导时, 处理 8 h 就可检测到 PPO mRNA, 说明 PPO 属于从头合成的酶。这是伤诱导 PPO 活性增加的最可能的机制。通过激活转录和诱导从头合成酶产生防御蛋白, 说明它对组织损

收稿日期: 2002-04-26; 修回日期: 2002-05-20

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(003062)

作者简介: 许传俊(1970-), 女, 安徽固镇县人, 华南师范大学研究生, E-mail: crystal8899@sina.com; 李玲(1958-), 女, 湖南湘潭人, 华南师范大学教授, 博士生导师, 从事植物生理和植物激素研究, E-mail: lilin@scnu.edu.cn, 通讯作者。

杏	H C A Y C N G A Y P Q V G F T D N D I Q V H F S W L F F P F H R M Y L Y F Y E R I L G K L I D D P T F A L P Y W N W
苹果 D D P E L E L . L . N Y F . K N F
葡萄	. . T D Y L E L A L Y N A A
蚕豆 G S . I P . L K L G W S . N F Y
美洲商陆 D T . T P N L E L F F N S I . F
番茄 G . K L G K E L R S . N
杂交杨 E O P K L E I D S C . F W Y N F
烟草 K I G K E L W S . N G
土豆 K I G K E L W S . N G

图 3 几种植物 PPO CuA 结合区氨基酸序列比较

Fig.3 Comparison of amino acid sequences of copper-binding domain A (CuA) of PPO in some plants

从植物中提取出的 PPO 分子量约 40~45 kDa 或 60 kDa,也有报导说 PPO 同工酶的分子量达 72 kDa.对苹果 PPO N 端序列分析发现,在 N 断附近有 6 个半胱氨酸,证实 PPO 分子存在 3 个二硫键^[12],约在 350 个氨基酸范围左右,包括两个保守的 Cu 结合区,因此它的 C 端对蛋白酶敏感,从植物中提取的 PPO 蛋白多为 42 kDa,为体内 PPO 60 kDa 左右的分子裂解的产物。

来自不同植物的信号肽序列同源性不是很高,但一般都富含羟基氨基酸和疏水的小氨基酸,含有 Ala-X-Ala 加工位点. Goldman 在烟草花^[4]中提取的 PPO 的 cDNA, Tobp1, 全长约 1975 bp, 根据序列推导出的氨基酸顺序 N 端富含羟基氨基酸 Ser 和 Thr 以及一些小的疏水氨基酸 Ala 和 Val, 这具有信号肽的性质的, 切除位点在二个 Ala 残基之间, 产生一个约 57.5 kDa 的多肽。

Chevalier 也从杏^[6]中得到了一个全长的 PPO cDNA, PA-PPO, 全长 2 070 bp, 含有一个开放的阅读框 1 794 bp. 将提取的蛋白质与由 cDNA 推导出的蛋白质相比较发现从 102 位 Hsp 开始序列完全一样, 100% 同源. 说明 PPO 在合成中是以前体的形式存在的. 预计编码的前体肽约 597 个氨基酸, Mr 为 67.1 kDa, 加工成熟的蛋白质为 56.2 kDa. 前体蛋白含质体转运肽, 转运肽含二个区分二步加工成成熟的蛋白质, 裂解位点可能在 Ala101 与 Asp102 之间. 成熟的蛋白质分子大小、PI 与苹果、蚕豆、马铃薯、番茄、美洲商陆等植物非常相似。

Sommer^[10]也说明 PPO 转运肽分两步进入质体, 第一步进入质体的基质, 在基质肽酶作用下, 由 67 kDa 转变成 62 kDa 的中间体, 此过程需要

ATP; 第二步进入质体的类囊体腔, 由 62 kDa 变成 59 kDa 的成熟形式, 此过程需要光. 而且在成熟蛋白和中间体之间的比例依据不同的植物、植物年龄、生长条件、光而变化. 照光 30 min, 10 天龄豌豆以类囊体的形式为主, 照光 10 h, 以基质的形式为主. 在运输到质体时, Cu^{2+} 抑制 PPO 的转运^[12].

从众多植物材料中提取出的 PPO cDNA 克隆不含内含子, 这与其原本是质体编码的在进化过程中转移到核中有关. 唯一一个例外是 Gooding 从香蕉中提取的 PPO cDNA 克隆, 进行分析发现其含有 85 bp 长的内含子, 内含子 3' 和 5' 含有切割的共有序列, 这也是到目前为止在植物材料中第一个报导有内含子的 cDNA. 作者认为这可能是因为所用的材料不同所致, 因为他人所用的都是双子叶植物而他用的是单子叶植物, 双子叶植物与单子叶植物同源性要低一些, 同种植物同源性高. 如茄科植物^[4]番茄、土豆、烟草序列相似性高达 76%~88%, 蔷薇科^[7]桃、苹果、梨等同源性达到 88% 以上, PPO 在高等植物中高度保守。

3 PPO 活性

免疫印迹分析表明, PPO 存在于植物不同的发育阶段, 但其活性在幼叶、发育中的果实中最高, 在叶伸展和果实成熟过程中逐渐下降, 说明 PPO 只在幼龄的组织中合成^[1,5,6,13]. 在一些植物中 PPO 以潜伏形式存在, 用蛋白酶、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等处理, 可以激活, 一些人发现低浓度的 SDS 也可以激活酶的活性^[5]. 这可能是因为酶在细胞内以酶原的形式存在, 或者是因为去除了 PPO 结合的抑制子, 或者是因为构象的改变^[6]. 在植物中已成

功的提取了位于液泡的 Cys 蛋白酶 cDNA 克隆, 此酶对植物体内潜伏的 PPO 酶的激活起作用^[8]. 同时也有材料显示 PPO 的 C 端对蛋白酶是敏感的^[5], 说明酶以酶原形式存在需要激活.

然而, 并不是所有的材料都如此, 也有些材料不存在潜伏态的 PPO^[5,9]. 最近有一些研究资料显示, 在许多植物及果实中出现的由于组织损伤等原因 PPO 活性增加导致的酶促褐变, 原来认为是由于 PPO 的释放或激活潜伏的 PPO (在发育早期合成的), 而不是从头合成, 现在这些材料说明是由于酶的从头合成. 这可能因为 PPO 具有多种功能, 从而具有组成型表达和诱导型表达两种方式^[9]. 菠萝的 PPO 活性在发育中的果实和花序中都很低, 不可能存在潜伏的 PPO, 因此菠萝黑心病 PPO 活性增加是由于从头合成酶, 而不是激活存在的 PPO 酶原. 这个结果与 Constabel^[3]的结果基本一致, 他们用 Northern 分析证实, 系统诱导的 PPO 活性增加是由于 PPO 转录增加, 这一点也在许多植物中发现. 许多植物在伤诱导等情况下 PPO 的 mRNA 积累只出现在幼叶, 在老叶中没有明显的变化, 说明幼叶是为系统信号的目标, 它们对系统伤信号诱导反应更快, 因为幼叶是很强的代谢库.

4 PPO 基因表达的时空关系

到目前为止, 已鉴定了多种植物的 PPO 基因, 它们大多数是由多基因家族编码的, 如番茄 7 个^[11]、菠萝 4 个^[2]、马铃薯 7 个^[13]、香蕉中有 4 个^[1]、苹果至少有 4 个^[16]、杨树 2 个^[3], 只有葡萄藤^[21]中发现是 1 个. 从众多的植物材料中, 人们发现 PPO 的表达具有一定的时空关系. 在咖啡、杏、香蕉、杨树、菠萝等植物中人们发现 PPO 只在幼龄组织如幼叶、分生组织、发芽、果实发育早期等情况下合成, PPO 表达水平很高, 随着组织的发育成熟, PPO 的活性和表达降低. 香蕉^[1]中 PPO 由 BPO1、BPO11、BPO34 和 BPO35 四个基因编码, 属于多基因家族. Northern 分析表明在果肉发育早期检测 BPO1 mRNA 表达但在果皮没有, BPO1 在未伸展的叶、花、根、茎高度表达, 但在成熟的叶中没有一点表达, BPO11 与它相似但表达要弱的多, BPO11 只是在幼龄的果肉在有转录, 发育中的果实无 BPO35 和 BPO34 转录, 但可以在花和根检测到微弱的 BPO34 和 BPO35 mRNA 表达, 只有 BPO34 在成熟的叶中有表达.

Goldman 从烟草^[4]提取的 PPO cDNA tobP1, 一种花特异的基因, 只在花中表达, 在根、茎、叶、种子都检测不到, 在花中的表达也随花的发育而变化, 在花芽形成到花朵开放过程中, 早期子房的表达要强于柱头和花丝, 花粉和雄蕊较弱, 在开放的花中检测不到任何表达, 说明基因是严格调节的, 有转录因子或转录后调控控制 PPO 的表达和数量以及 mRNA 的稳定性.

PPO 在作物采收、储藏、加工、组织培养等方面都有重要影响, 如食品加工中的褐化现象, 影响到食品的品质、口味和商业价值. 了解它的生理活性、基因表达、在褐变中的作用以及负调控, 对控制食品加工、作物栽培、组织培养中的褐变现象将起重要作用. 已有利用反义 RNA 修饰多酚氧化酶基因而控制褐变的转基因作物方面的成功的报道, 预计在不远的将来会有更多的关于这方面的转基因作物出现, 通过转基因方式来得到改善.

参考文献 (References):

- [1] GOODING P S, BRID C, ROBINSON S P. Molecular cloning and characterization of fruit polyphenol oxidase [J]. *Planta*, 2001, 213: 748-757.
- [2] STEWART R J, SAWYER B J B, BUCHELI C S, *et al.* Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple [J]. *Aust J Physiol*, 2001, 28: 181-191.
- [3] CONSTABEL C P, YIP L, PATTON J J, CHRISTOPHER M E. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory [J]. *Plant physiology*, 2000, 124: 285-295.
- [4] GOLDMAN M H S, SEURINCK J, MARINS M, *et al.* A tobacco flower-specific gene encodes a polyphenol oxidase [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 36: 479-485.
- [5] MAZZAFERA P, ROBINSON S P. Characterization of polyphenol oxidase in coffee [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(4): 285-296.
- [6] CHEVALIER Tony, RICAÏ David de, MB&GUL&A-MB&GUL&E Didi&er, *et al.* Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase [J]. *Plant physiology*, 1999, 119: 1261-1269.
- [7] HARUTA M, MURATA M, KADOKURA H, *et al.* Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50(6): 1021-1025.
- [8] YOSHIDA Yukitaka, KANAZAWA Takharu, HASHIMOTO Hideyuki, *et al.* Characterization of polyphenol oxidase processing enzyme in sweet potato cells in suspension culture [J]. *Plant cell & physiology*, 2000, 165.
- [9] KNOWALSKI S P, EANNETTA N J, HIRZEL A T, *et al.* Purification and Characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *solanum berthaultii* [J]. *Plant physiology*, 1992, 100(2): 677-684.

(下转第 55 页)

- [55] GILMOUR S J, ZAIKA D G, STOCKINGER E J, *et al.* Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression[J]. *Plant J*, 1998, 16: 433-442.
- [56] MEDINA J, BARGUES M, TEROL J, *et al.* The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration[J]. *Plant Physiol*, 1999, 119: 463-469.
- [57] MANTYLA E, IANG V, PALVA E T. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LTI178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 141-148.
- [58] WARREN G, MCKOWN R, MARIN A, *et al.* Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111: 1011-1019.
- [59] KNIGHT H, TREWAVAS A J, KNIGHT M R. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involved two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation[J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 489-503.
- [60] MONROY A F, DHINDSA R S. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 321-331.
- [61] ORVER B L, SANGWAN V, OMANN F, *et al.* Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity[J]. *Plant J*, 2000, 23: 785-794.
- [62] KRATSCCH H A, WISE R R. The ultrastructure of chilling stress[J]. *Plant Cell and Environ*, 2000, 23: 337-350.
- [63] MONROY A F, SANGWAN V, SHINDSA R S. Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation[J]. *Plant J*, 1998, 13: 653-660.
- [64] KENNELLY P J, KREB E G. Consensus sequences as substrate specificity determinations for protein kinases and protein phosphatases[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 15555-15558.
- [65] HEINO P, SANDMAN G, LANG V, *et al.* Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 79: 801-806.
- [66] IANG V, MANTYLA E, WWLIN B, *et al.* Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104: 1341-1349.
- [67] GRAY G R, CHAUVIN L P, SARHAN F, *et al.* Cold acclimation and freezing tolerance[J]. *Plant Physiol*, 1997, 114: 467-474.

(上接第 48 页)

- [10] SOMMER A, NÉEMAN E, STEFFENS J C, *et al.* Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase[J]. *Plant physiology*, 1994, 105(4): 1301-1311.
- [11] NEWMAN S M, EANNETTA N Y, YUH, PRINCE J P, *et al.* Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family[J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 1035-1051.
- [12] MARI S, MARQUES L, BRETON Frédéric, *et al.* Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase[J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(5): 1213-1217.
- [13] THYGENSEN P W, DRY I B, ROBINSON S P. Polyphenol oxidase in potato[J]. *Plant physiology*, 1995, 109(2): 525-531.
- [14] CRAY J W, LAX A R, FLURKEY W H, *et al.* Clone and characterization of cDNAs coding for vicia faba Polyphenol oxidase[J]. *Plant Mol Biol* 1992, 20: 245-253.
- [15] THIPYAPONG P, JOEL D M, STEFFENS J C. Differential expression and turnover of the tomato Polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development[J]. *Plant physiology*, 1997, 113(3): 707-718.
- [16] BOSS P K. An apple Polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues[J]. *Plant Mol Biol* 1995, 27: 429-433.
- [17] THIPYAPONG P, HUNT M D, STEFFENS J C. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) Polyphenol oxidase[J]. *Phytochemistry*, 1995, 40: 673-676.
- [18] CONSTABEL C P, RYAN C A. A survey of wound-and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants[J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(4): 507-511.
- [19] HARUTA M, PEDERSEN J A, CONSTABEL C P. Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates[J]. *Physiologia plantarum*, 2001, 112(4): 552-558.
- [20] THIPYAPONG P, STEFFENS J C. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals[J]. *Plant physiology*, 1997, 115: 409-418.
- [21] DRY I B, ROBINSON S M, *et al.* Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase gene[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 495-502.