pH 值对芽孢皮层裂解酶活性及结构的影响

郭洪伟， 马慧娇， 郭家俊， 曾朝玮， 章 中*
（宁夏大学 农学院，宁夏 银川 750021）

摘要：为探究酸性 pH 值条件抑制芽孢萌发的机理，研究了不同 pH 值处理对芽孢皮层裂解酶（CwlJ）的活性和结构的影响。采用傅里叶红外光谱法与荧光光谱法来分析芽孢皮层裂解酶（CwlJ）的二、三级结构与酶的活性之间的关系。实验所采用的 pH 值为 3、5、7、9、11，结果表明：1）pH 3、5 时，随着时间的推移，芽孢皮层裂解酶（CwlJ）被激活，活性很高；2）酶的活性与其二级结构域中的 α-螺旋相对含量紧密相关；当 pH 值从 3 增加到 5 时，α-螺旋相对含量不断的增大，由 36.15%增加到 37.29%，当 pH 值从 5 增加到 7 时，α-螺旋相对含量基本不变，当 pH 值从 7 增加到 11 时，α-螺旋相对含量不断的减小，即在 pH 3~5 之间酶可能被激活；3）随着 pH 处理条件的改变，pH 5 的荧光强度最强，内部蛋白质完全展开，空间结构更加松散扩张，三级结构更加稳定。综上所述，在酸性 pH 值条件下，皮层裂解酶（CwlJ）的结构稳定，活性高，故推测酸对芽孢萌发的抑制作用不是因为其抑制了皮层裂解酶的活性。

关键词：pH 处理，皮层裂解酶，酶活性，二级结构，三级结构
中图分类号：TS 20　**文章编号：**1673-1689(2020)06-0030-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.06.005

Effects of pH Treatments on the Activity and Structure of Cortical Lyase in Spores

GUO Hongwei， *MA Huijiao*， *GUO Jiajun*， *ZENG Chaowei*， *ZHANG Zhong**
(School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In order to explore the inhibitory mechanism of acidic pH conditions for spore germination, the study investigated effects of different pH treatments on the activity and structure of spore cortical lyase (CwlJ). Using Fourier transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy, the relationship between the secondary and tertiary structures of CwlJ and its activity was analyzed. The pH values were set to 3, 5, 7, 9 and 11 in the experiment. The results showed that: 1) CwlJ was activated over time with pH 3 and 5; 2) The activity of CwlJ was closely related to the content of alpha-helix in its secondary structure; when pH value increased from 3 to 5, the content of alpha-helix also increased from 36.15% to 37.29%; when pH increased from 5 to 7, the content of alpha-helix basically unchanged; when pH increased from 7 to 11, the content of alpha-helix decreased; therefore, the enzyme may be activated in the pH range of 3-5; 3) the fluorescence

收稿日期：2018-10-14
基金项目：国家自然科学基金项目（31460410，31760474）。
* **通信作者：**章中（1977—），男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事果蔬非热加工研究。E-mail：zhangzhong99@126.com

intensity in pH 5 was strongest, the internal protein was fully unfolded, and the spatial structure was more loosely expanded, and the tertiary structure was more stable. In conclusion, the structure of CwlJ was stable and its activity was high in acidic pH conditions, so it was speculated that the inhibition of acidity for spore germination was not due to its inhibition for the activity of cortical lyase.

Keywords: pH treatments, cortical lyase, enzyme activity, secondary structure, tertiary structure

芽孢是细菌营养体在缺乏营养的条件下形成的休眠态，对辐照、超高压、热、超声波、微波、化学物质等各类杀菌处理有极端抗性[1-2]，是导致食品腐败变质的根本原因。芽孢萌发后失去其极端抗性，有许多因素能诱导芽孢的萌发，如营养素、超高压、阳离子表面活性剂、机械擦伤、外源 DPA（2,6-吡啶二羧酸）、外源裂解酶等[3]。芽孢中最常见的皮层裂解酶是 CwlJ 和 SleB，这 2 种酶位于芽孢内膜和外膜上，它们对芽孢的萌发具有专一性。芽孢被激活后，这 2 种酶将芽孢皮层水解然后导致芽孢核心的完全水化。无论是 CwlJ 或 SleB 都可使皮层降解，缺乏这 2 种酶其皮层便无法降解和无法完成萌发。Brown W C[4]等报道 pH<7 的 N-乙酰胞壁酸会抑制芽孢孢子的萌发，该抑制剂还抑制了 2 种萌发相关酶的活性。Blocher J C[5]等报道在 pH 为 6.5 时，添加山梨酸完全抑制了肉毒梭菌孢子的萌发，在 pH 为 5.5 时，未添加山梨酸的菌株孢子的萌发并没有受到抑制作用。Sheng S 等[6]报道枯草芽孢杆菌孢子 CotA 的最大活性保持在 pH 4~5 之间，可以用于固定孢子的惰性基质中，在制备生物催化剂中，产率可以大大提高。Porebska I 等[7]报道芽孢杆菌孢子在酸性果汁中的萌发受到了抑制。但是萌发程度取决于菌种和时间、孵化和使用的营养化合物，并不全取决于 pH。由此可知，酸性条件会对菌体的生长和活性有影响，对细菌芽孢的萌发有一定的抑制作用，但其抑制机理是什么，是不是因为酸抑制了芽孢皮层裂解酶的活性，这尚不清楚，有待于深入研究。目前国内外研究芽孢皮层裂解酶的相关报道极少，且未见关于 pH 处理对芽孢皮层裂解酶活性和结构影响的相关报道，故推断存在 2 种可能性：其一是酸性 pH 值对皮层裂解酶有抑制作用，这种抑制作用导致细菌芽孢不萌发；其二是酸性 pH 值对皮层裂解酶无抑制作用，酸抑制芽孢的萌发另有原因。

目前，傅立叶变换红外吸收光谱仪（FT-IR）有高灵敏度、高分辨率、高效扫描及高度计算机化等长处，是研究蛋白质分子内氢键的一种有效方法，常用来估测多肽和蛋白质二级结构[8-10]。荧光分光光度计能够扫描液相荧光标记物发射出的荧光光谱，近年来经常被用来分析蛋白质的三级结构。酶有最适的 pH 值范围，并且对酸碱度的调节极其敏感，pH 值能导致盐桥的变化，并加强其三级结构，故利用这些仪器研究不同 pH 处理后皮层裂解酶（CwlJ）的结构变化非常有必要。

为研究酸性 pH 值对芽孢萌发的抑制机理，本文作者从研究 pH 处理对皮层裂解酶（CwlJ）的活性的影响规律着手，结合酶结构变化的研究，分析皮层裂解酶（CwlJ）的活性和结构是否受 pH 值的影响，进而揭示酸性 pH 值对芽孢萌发的抑制机理，这对研究芽孢的萌发有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

皮层裂解酶 CwlJ（纯度>90%）：南京钟鼎生物技术有限公司产品；脱芽孢衣溶液，作者所在实验室制备；Tris-HCl 缓冲液：北京索莱宝科技有限公司产品；溴化钾（色谱纯）：美国 Sigma-Aldrich 公司产品。

1.2 仪器与设备

Spectrum Two 型红外光谱仪：美国 PerkinElmer 公司产品；Scientz-1LS 真空冷冻干燥离心浓缩仪：宁波新芝生物科技股份有限公司产品；DHG-9245A 电热鼓风干燥箱：上海一恒科学仪器有限公司产品；XMTD-6000 型电子恒温不锈钢水浴锅：上海宜昌仪器纱筛厂制造；UV-2450 型紫外可见分光光度计：日本岛津公司产品；970CRT 荧光分光光度计：上海仪电分析仪器有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 CwlJ 冻干粉的前处理 将 CwlJ 冻干粉混入摩尔浓度为 0.02 mol/L 的Tris-HCl 缓冲液中，配成质量浓度为 0.1 mg/mL 的酶溶液，为 pH 的处理，测酶活和酶的二三级结构提供原材料。

1.3.2 pH 处理 CwlJ 酶溶液 用稀 HCl 和稀 H_2SO_4 调节其溶液体系的 pH 值，将 CwlJ 溶液分别处理成 pH 3、5、7、9、11 的酶溶液体系。

1.3.3 酶活性的测定 CwlJ 的酶活计算方法可用 Makino[11]的方法。在 32 ℃下，通过测出 1 cm 光路内脱芽孢衣的芽孢悬浮液的 OD_{600} 值的减少量来分析酶活。反应终产物体积为 5 mL，包含 1 mL 脱芽孢衣芽孢混合液和 4 mL 酶液，酶液包含 Tris-HCl 缓冲液和皮层裂解酶 CwlJ，酶活性单位(U/L)定义为：每分钟 OD_{600} 值降低 0.001 所需的酶量。每 10 min 测一次 OD_{600} 值，根据 80 min 内 OD_{600} 值变化量计算酶活。

计算公式为：

$$X=\frac{\Delta OD_{600}}{0.001\times t\times V}\times 1\ 000$$

式中：X 为酶活(U/L)，t 为反应时间(min)，V 为参与反应的酶量(mL)。

1.3.4 傅里叶红外光谱分析 采用 KBr 压片法制样[12]：溴化钾达到色谱纯纯度，溴化钾取 200 mg，样品取 2 mg，在玛瑙研钵中研磨，在 170 ℃烘箱中烘 24 h 以上，干燥密封保存。用无水乙醇酒精棉球对傅里叶红外变换光谱仪以及研钵等器皿进行消毒。使用波长为 400~4 000 nm 的傅里叶红外变换光谱仪对 CwlJ 进行全波段扫描，扫描次数为 32 次，分辨率为 4 cm^{-1}，每个样品测量重复 3 次，取平均值。

1.3.5 FT-IR 谱图处理 选用 Omnic 8.0 软件处理，采集酰胺 I 带的波段，进行 FT-IR 去卷积，标峰，做基础红外光谱图分析。利用 Peakfit 4.12 软件对谱峰进行标准化，平滑，去基线，求二阶导数，寻找峰，在二阶导数原谱和酰胺 I 带红外原谱的基础上进行 Gauss Amp 连续拟合，进行多次拟合使残差值最小化($R^2\geqslant 0.999$)，直至 R^2 值不变为止[13]。得到子峰数目为 9~13 之间，确定各个子峰的峰面积与 CwlJ 的二级结构之间的比例关系，根据峰面积计算各种条件下峰的二级结构归属[14]。

1.3.6 荧光光谱分析 配制质量浓度为 0.1 mg/mL 的 CwlJ 溶液，扫描其荧光值。设定荧光分光光度计条件：扫描范围为 200~500 nm，扫描速度为 200 nm/min，激发狭缝和发射狭缝宽均为 10 nm，响应时间为 0.1 s，记录数据波长间隔为 1 nm。

1.3.7 数据统计分析 所有实验最少重复 3 次，再用统计软件 Origin 9.0 作图和分析数据。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 处理对 CwlJ 的活性的影响

在最适反应温度 32 ℃的条件下，分别测定不同 pH 值(3、5、7、9、11)的体系中 CwlJ 的活力，确定最适反应 pH 值[15]。CwlJ 会造成脱芽孢衣芽孢的萌发，芽孢萌发时，其核心水化，造成折光性发生变化，表现为脱芽孢衣溶液的 OD_{600} 值明显下降，下降水平越大，芽孢的萌发率就越高，皮层裂解酶活性也就越高[16-17]。

CwlJ 对 pH 值的变化极其敏感见图 1。当对照是无菌水和脱芽孢衣溶液的混合液时，随着时间的变化，对照组的 OD_{600} 值基本不变；pH 为 3 和 pH 为 5 的 OD_{600} 值下降最明显，说明 CwlJ 的活性保持较好，pH 为 5 是活性最高点；pH 为 7 和 pH 为 9，pH 为 11 的 OD_{600} 值的变化基本相同，都有显著下降，但下降幅度较低，说明当溶液中酸碱度开始趋近于中性和碱性时，酶活已经开始受到一定的抑制作用，随着处理时间的增长，酶活的降低更显著。Miyata 等[18]研究发现：当 pH 值在 7.2~8.4 时，皮层裂解酶活力最佳，当 pH 值为 4.2 时，皮层裂解酶基本失活，这一研究报道也是关于皮层裂解酶的，但实验结果与本文有一定差异，可能因为菌种不同，本实验是从枯草芽孢杆菌中分离纯化得出的皮层裂解酶，而皮层裂解酶中有 CwlJ 和 SleB，皮层裂解酶的相对分子质量，分子结构均不同，对 pH 变化的耐受程度也不同，而本实验研究的是 CwlJ，所以推测皮层裂解酶中的 SleB 可能会在酸性条件下失活，而 CwlJ 的活性在 pH 为 3~5 左右最高，非常适宜在弱酸性条件下水解芽孢皮层而导致芽孢萌发。可以推测，在酸性pH 条件下芽孢不萌发的原因不全是因为皮层裂解酶活受到影响[19]，有可能和营养素受体、DPA 释放等原因有关，原因有待进一步研究。

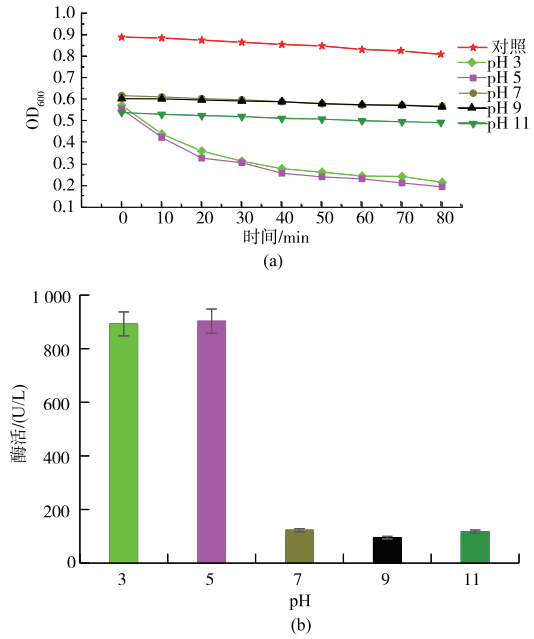


图 1　不同 pH 处理条件下皮层裂解酶 CwlJ 活力的变化趋势

Fig. 1　Change trend of CwlJ activity of skin lyase under different pH treatment conditions

2.2　不同 pH 处理下 CwlJ 的 FT-IR 谱图的变化

利用傅里叶红外光谱仪对不同 pH 处理下的 CwlJ 进行全波段扫描，得到如图 2 的 FT-IR 谱图以及各谱带特性(表 1)，从图 2 中能够看到全波段的 FT-IR 谱图的结构变化。如图 3 可看到不同 pH 处理条件下的 CwlJ 的谱型基本相同，但在 3 600~3 300 cm^{-1} 的宽吸收峰强度不断加强，表明不同 pH 处理能引起 CwlJ 的分子内和分子间的氢键增强。最常用的分析蛋白质的二级结构即是在 1 700~1 600 cm^{-1}，酰胺 I 带的震动频率主要取决于 C=O 之间氢键的性质，随着 pH 的增大，羰基(C=O)的伸缩震动越来越微弱，故可观察1 700~1 600 cm^{-1} 的波长范围的变化来研究 CwlJ 的二级结构。

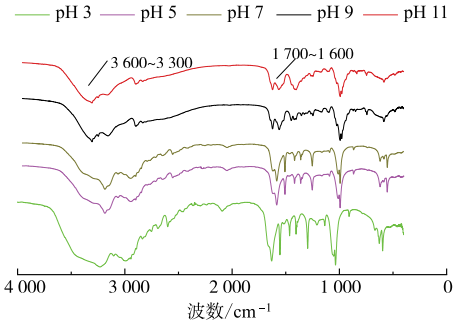


图 2　不同 pH 处理条件下皮层裂解酶 CwlJ 的 FT-IR 谱图

Fig. 2　FT -IR spectra of cortical lyase CwlJ under different pH treatment conditions

表 1　FT-IR 谱图的各谱带特性[20-21]

Table 1　Characteristics of FT-IR spectra

光谱范围/cm^{-1}	特征吸收峰/cm^{-1}	化学结构表征
3 600~3 300	3 418.73	O-H 伸缩振动、N-H 伸缩振动；结合水中 O-H 基团与氨基酸中 C=O 所形成的分子内和分子间氢键
2 980~2 850	2 925.47、2 927.69	饱和碳 C—H 伸缩振动
1 700~1 600	1 649.33	酰胺Ⅰ带(C=O 伸缩振动)
1 600~1 500	1 547.40	酰胺Ⅱ带 (C—N 伸缩振动和 N—H 变形振动)
1 420~1 350	1 384.79	C—OH 振动
1 350~1 200	1 245.13	酰胺Ⅲ带(C—O 和 C—O—C 振动)
1 100~1 060	1 075.93	P=O 或 P—O—C 对称伸缩振动

注：表 1 表示的是 FT-IR 谱图中各谱带的特性以及化学结构表征，可以具体的表示其蛋白质的结构信息。

随着 pH 的增大，从峰形变化分析，峰形由大的波动逐渐变为小的波动，见图 3。从峰位变化分析，pH 为 3 的 CwlJ 的酰胺 I 带为 1 629.5 cm^{-1}，随着 pH 值的逐渐增大，在对其进行酸碱度的调节过程中，酸碱度由 pH 为 3 到 pH 为 5 时，CwlJ 的酰胺 I 带向低波数方向进行不断的平移，红移约0.5 cm^{-1}，即由 1 629.5 cm^{-1} 移至 1 629.0 cm^{-1}；当 pH 为 7 时，酰胺 I 带的波数保持不变趋于稳定状态。随着 pH 调节为碱性状态的过程中，从 pH 为 7 调节到pH 为 9 时，CwlJ 的酰胺 I 带向高波数方向不断的平移，红移约 35 cm^{-1}，即由 1 629.0 cm^{-1} 移至 1 664.0 cm^{-1}，红移波数值比较大；当 pH 为 9 调节到 pH 为 11 时，酰胺 I 带向高波数不断的平移，红移约 0.5 cm^{-1}。这表明 CwlJ 的结构会随着 pH 的改变而改变，具有酸碱不稳定性，这是因为蛋白质中氨基酸肽链与外围介质构成氢键，当氢键作用较强时，C=O 的电子云密度下降，吸收带向低波数红移；当氢键作用较弱时，C=O 的电子云密度加强，吸收带向高波数红移[22-23]。说明 pH 处理会直接影响 CwlJ 的原空间结构，在调节酸碱度的过程中 CwlJ 的分子内氢键会受到影响，对 CwlJ 的活性也会产生抑制作用。

2.3　不同 pH 处理下 CwlJ 酰胺 I 带的拟合

酰胺 I 带是评价与分析蛋白质二级结构的重要分析手段。研究表明[24]，FT-IR 中酰胺Ⅰ带的峰形受蛋白质主链结构即二级结构的影响，酰胺Ⅱ带和酰胺Ⅲ带与二级结构只存在间接的影响。在蛋白质

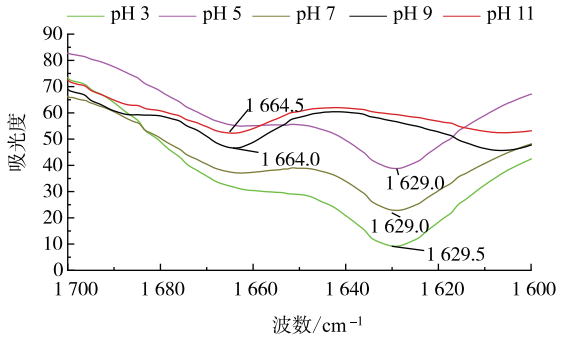
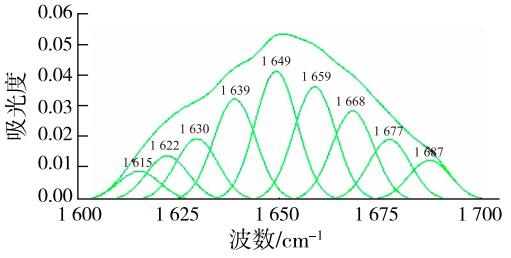


图 3　不同 pH 处理条件下皮层裂解酶 CwlJ 的酰胺 I 带红外原谱

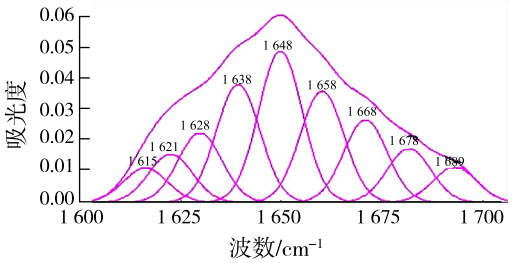
Fig. 3　IR spectra of the amide I band of CwlJ in the skin under different treatment conditions

的 FT-IR 图谱中，蛋白质的 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲等二级结构对应的振动吸收峰互相折叠形成一宽峰，即酰胺 I 带[25]。在对酶进行傅里叶红外光谱分析其二级结构时，酶的二级结构全部表现在酰胺 I 带图谱中，酰胺 I 带的二阶导数表明其各个波数所对应的不同的积分面积[26]，在蛋白质的二级结构分析中，一般采用曲线拟合的方法，对 CwlJ 酰胺 I 带进行基线修正，高斯去卷积，求二阶导数，曲线拟合，求出峰面积，确定分峰数量是否正确，依据峰面积估算各二级结构的相对含量[27]。其中酰胺 I 带各峰位为：1 615~1 637 cm^{-1} 和 1 682~1 700 cm^{-1} 为 β-折叠特征峰；1 646~1 664 cm^{-1} 为 α-螺旋特征峰；1 637~1 645 cm^{-1} 为无规卷曲特征峰；1 664~1 681 cm^{-1} 为 β-转角特征峰[28]。

图 4 为 pH 3、5、7、9、11 的 CwlJ 的酰胺 I 带经去卷积和二阶导数处理后获得的叠加峰分解为各个子峰的高斯曲线拟合峰图。由表 2 和表 3 的峰面积比例求出其结构归属。CwlJ 的二级结构主要组成为 α-螺旋，其次是 β-折叠、β-转角、无规则卷曲；大小为 α-螺旋>β-折叠>β-转角>无规则卷曲。经过 pH 处理后的 CwlJ 的二级结构发生如下变化：1）随着 pH 的增大，α-螺旋先增大后减小，pH 从 3 到 9，α-螺旋逐渐的增大；pH 从 9 到 11，α-螺旋不断的减小。α-螺旋是蛋白质的二级结构中最稳定的，随着 pH 的增大，蛋白质的二级结构发生重新排列[29]，蛋白质的结构稳定性下降，直接导致 CwlJ 的 α-螺旋中的 C=O 双键电子云密度不稳定，氢键直接断裂并与其他极性基团发生氢键键合，发生解螺旋，影响皮层裂解酶 CwlJ 活性中心的构象，活性变低；2）随着pH 的增大，无规则卷曲状态先增大后减小，pH 从 3 到 7，无规则卷曲状态由 15.13% 增加到 17.18%，pH 从 7 到 9，无规则卷曲状态由 17.18%降低到 15.46%，表明随着 pH 的增加，CwlJ 的二级结构先从有序状态逐渐向无规则状态转化，当 pH 达到 7 以上时，CwlJ 的二级结构即从无规则状态逐渐向有序状态转化[30]。由此可证明 pH 处理可能会导致 CwlJ 发生水解，空间结构呈无序状态，造成酶活降低；3）随着 pH 的增大，β-转角先减小后增大，pH 从 3 到 5，β-转角由 22.43%降低到 19.37%，当 pH 从 5 到 11，β-转角由 19.37%增加到 21.38%，β-转角本身属于无序结构，经处理后，β-转角结构很有可能会向无规则卷曲状态转化[31-32]。这种转化趋势与高 pH 处理下 CwlJ 的变性和逐渐形成分散体的形态有关，外界对芽孢的一些处理条件下，芽孢的不萌发和保持休眠态的特性可能也与CwlJ 的变性以及 CwlJ 的内部结构分散有紧密的联系；4）随着 pH 的增大，β-折叠先增大后减小，pH 从 3 到 7，β-折叠相对含量不断的增加，β-折叠由 26.29%增加到 26.31%，pH 从 7 到 11，β-折叠由 26.31%增加到 26.76%，由于 β-折叠比较常见于蛋白质的内部结构区域，pH 增加使得蛋白质发生解聚现象是 β-折叠先增加的原因，随着体系完全成为碱性时，蛋白质大分子因为碱性而聚集的现象导致 β-折叠结构减少，由此可推断 β-折叠结构在碱性聚集体形成的过程中起到重要作用，碱性聚集体的形成使 CwlJ 的活性中心被包埋，进而导致活性降低。



(a) pH 3



(b) pH 5

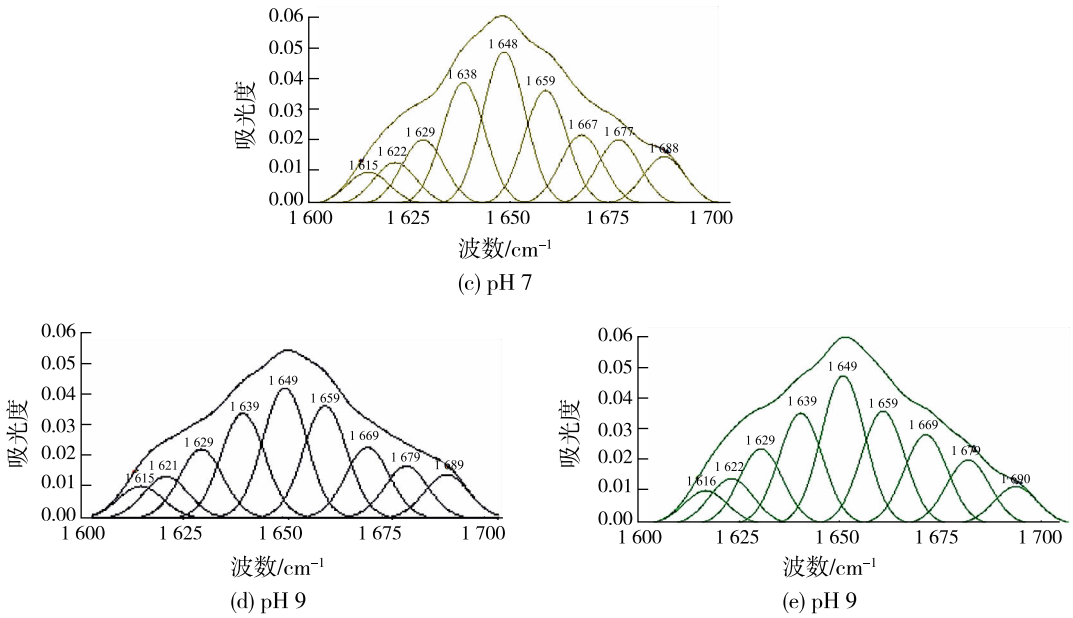


图 4　不同 pH 处理条件下皮层裂解酶 CwlJ 酰胺 I 带高斯曲线拟合图

Fig. 4　Gauss curve fitting of I band of CwlJ cleavage enzyme under different pH treatment conditions

表 2　不同 pH 处理条件下皮层裂解酶 CwlJ 酰胺 I 带的不同波数的二级结构相对含量

Table 2　Two level structure of different bands of CwlJ amide I band of the skin lyase under different pH treatment conditions

编号	pH 3		pH 5		pH 7		pH 9		pH 11		归属
	υ/cm^{-1}	峰面积/%	υ/cm^{-1}	峰面积/%	υ/cm^{-1}	峰面积/%	υ/cm^{-1}	峰面积/%	υ/cm^{-1}	峰面积/%	
1	1 615	4.36	1 615	4.87	1 615	4.56	1 615	4.91	1 616	4.67	β–折叠
2	1 622	6.67	1 621	6.85	1 622	5.91	1 621	6.41	1 622	6.37	β–折叠
3	1 630	9.23	1 628	9.88	1 629	9.13	1 629	10.50	1 629	10.48	β–折叠
4	1 639	15.13	1 638	16.73	1 638	17.18	1 639	15.98	1 639	15.46	无规则卷曲
5	1 649	19.23	1 648	21.48	1 648	21.48	1 649	19.78	1 649	20.68	α–螺旋
6	1 659	16.92	1 658	15.81	1 659	16.11	1 659	17.05	1 658	15.72	α–螺旋
7	1 668	13.33	1 668	11.73	1 667	9.80	1 669	10.78	1 669	12.46	β–转角
8	1 677	9.10	1 678	7.64	1 677	9.13	1 678	7.91	1 679	8.92	β–转角
9	1 687	6.03	1 689	5.01	1 688	6.71	1 688	6.68	1 690	5.24	β–折叠

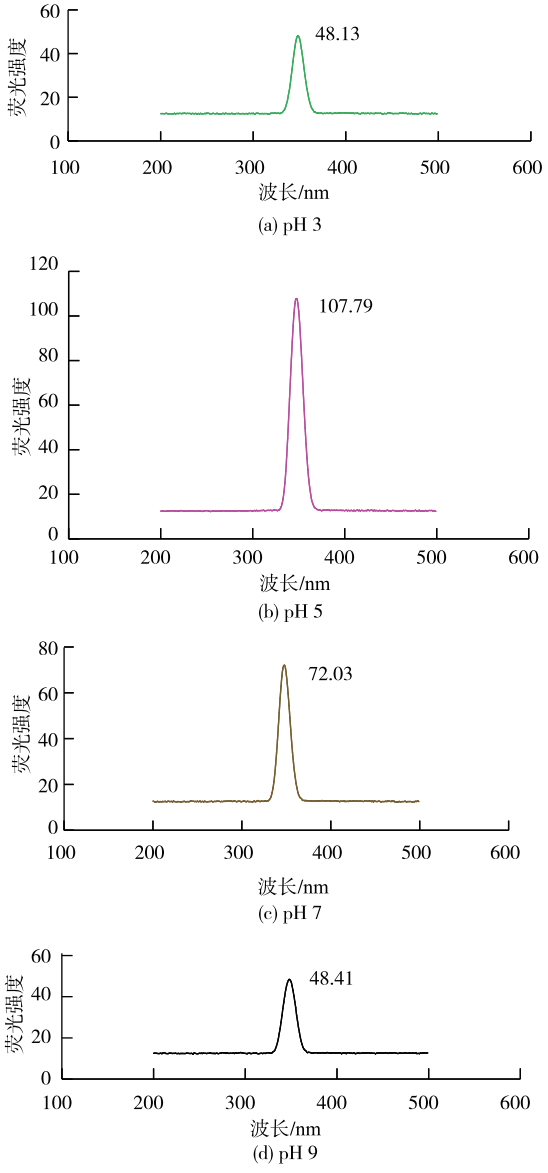
表 3　不同 pH 处理条件下皮层裂解酶 CwlJ 酰胺 I 带二级结构相对含量

Table 3　Secondary structure of I band of CwlJ amide I under different treatment conditions

处理条件	二级结构相对含量/%			
	α–螺旋	β–折叠	β –转角	无规则卷曲
pH 3	36.15	26.29	22.43	15.13
pH 5	37.29	26.61	19.37	16.73
pH 7	37.59	26.31	18.93	17.18
pH 9	36.83	28.5	18.69	15.98
pH 11	36.40	26.76	21.38	15.46

2.4 pH 处理对 CwlJ 的荧光光谱分析

由图 5 可知,样品在波长 300~400 nm 范围内,各个样品的峰位,峰形都基本没有发生变化,λ_{max} 没有发生红移,说明 pH 处理会导致 CwlJ 的 Trp 残基暴露于亲水环境中,所以推测酶并没有发生变性,相对来讲,λ_{max} 也没有发生蓝移,说明 Trp 残基自身的微环境并没有发生改变,荧光基团在亲水环境中以相对稳态的形式存在。有出现特征峰,所有出现特征峰的最大激发波长均为 348 nm,但是出现最大激发波长的峰强度显著不同。



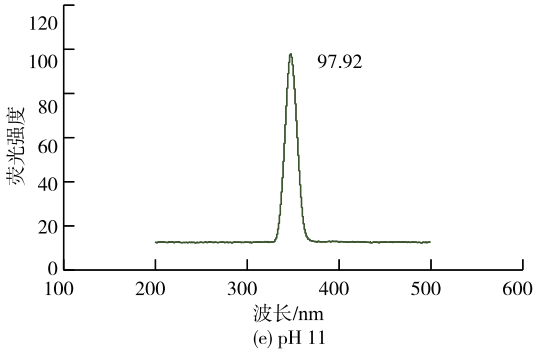


图 5 不同 pH 处理条件下皮层裂解酶 CwlJ 的荧光光谱

Fig. 5 Fluorescence spectra of cortical lyase CwlJ under different pH treatment conditions

结合 CwlJ 的活性实验得出,pH 5 的荧光强度最强,则说明在 pH 5 的条件下,CwlJ 的内部蛋白质完全展开,空间结构更加松散扩张,环境相对处于稳定状态,CwlJ 的活性较高,其活性在这个处理条件下被完全激活,活性中心完全暴露,引起 CwlJ 的激活效应;pH 11 的条件下,CwlJ 的荧光强度较强,内部结构基本完全展开,空间结构比较疏松,其活性减少;pH 7 的条件下,CwlJ 荧光强度不高,蛋白质展开了一部分,空间结构比较紧密,活性减少的较强;在 pH 3 和 pH 9 的条件下,CwlJ 的荧光强度非常低,有可能是荧光基团发生过度的暴露,引起荧光猝灭,导致空间结构极其密集[33],在 pH 9 的条件下活性最低,但是在 pH 3 的条件下 CwlJ 的活性比较高,推测这有可能与 Trp 残基暴露于亲水环境中,肽链过度伸展有关。

3 结 语

实验表明不同 pH 处理会改变芽孢皮层裂解酶(CwlJ)的活性、二级结构和三级结构,CwlJ 的活性与结构呈正相关关系,结构越稳定,活性越强。当 pH 3 和 pH 5 时,CwlJ 的活性高,当 pH 9 时,CwlJ 活性最低,由此可推测酸对芽孢萌发的抑制作用并不是因为其抑制了 CwlJ 的活性,这证明酸性 pH 值抑制芽孢萌发的原因与其对皮层裂解酶(CwlJ)活性的作用无关。本实验推进了对细菌芽孢萌发机理的研究,为芽孢深层机理的进一步的探究夯实了基础。

参考文献：

[1] 章中，杨宏伟，胡济美，等. 化学物质辅助超高压处理对枯草杆菌芽孢的作用[J]. 中国食品学报，2015，15(5)：47-53.
[2] 钱静亚，马海乐，李树君，等. 温度、超声、nisin 协同脉冲磁场杀灭枯草芽孢杆菌的研究[J]. 现代食品科技，2013，29(12)：2970-2974.
[3] 高志奇，刘先凯，王恒樑. 炭疽芽孢杆菌芽孢萌发研究进展[J]. 军事医学，2014，38(10)：833-836.
[4] BROWN W C，MORRISON D，SANFORD W，et al. N-Acetylmuramic acid inhibits spore germination and germination enzymes [J]. **Journal of Basic Microbiology**，2010，30(2)：67-72.
[5] BLOCHER J C，BUSTA F F. Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate[J]. **Journal of Applied Bacteriology**，2010，59(5)：469-478.
[6] SHENG S，JIA H，TOPIOL S，et al. Engineering CotA laccase for acidic pH stability using *Bacillus subtilis* spore display[J]. **J Microbiol Biotechnol**，2017，27(3)：507-513.
[7] POREBSKA I，SOKOLOWSKA B，WOZNIAK Ł. Dipicolinic acid release and the germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under nutrient germinants[J]. **Polish Journal of Microbiology**，2017，66(1)：67-74.
[8] 谢孟峡，刘媛. 红外光谱酰胺 III 带用于蛋白质二级结构的测定研究[J]. 高等学校化学学报，2003，24(2)：226-231.
[9] 钟朝辉，李春美，顾海峰，等. 温度对鱼鳞胶原蛋白二级结构的影响[J]. 光谱学与光谱分析，2007，27(10)：1970-1976.
[10] 刘斌，马海乐，李树君，等.应用 FTIR 研究超声对牛血清白蛋白二级结构的影响[J]. 光谱学与光谱分析，2010，30(8)：2072-2076.
[11] MAKINO S，ITO N，INOUE T，et al. A spore-lytic enzyme released from *Bacillus cereus* spores during germination[J]. **Microbiology**，1994，140（Pt 6)(6)：1403.
[12] 张波波，王丹，马越，等. FT-IR 分析超高压处理对调配草莓汁蛋白二级结构的影响[J]. 中国食品学报，2014，14(11)：200-206.
[13] 孙佳悦，钱方，姜淑娟，等. 基于红外光谱分析热处理对牛乳蛋白质二级结构的影响[J]. 食品科学，2017，38(23)：82-86.
[14] 刘燕燕，曾新安，陈晓东. FTIR 分析脉冲电场和热处理后的大豆分离蛋白结构变化[J]. 光谱学与光谱分析，2010，30(9)：2340-2344.
[15] LONG G H，JI Y，PAN H B，et al. Characterization of thermal denaturation structure and morphology of soy glycinin by FTIR and SEM[J]. **International Journal of Food Properties**，2015，18(4)：763-774.
[16] MINH H N T，DANTIGNY P，PERRIER-CORNET J M，e tal. Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores induced by moderate hydrostatic pressure[J]. **Biotechnology & Bioengineering**，2010，107(5)：876.
[17] EVELYN，SILVA F V M. High pressure processing of milk：modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores at 38-70 ℃[J]. **Journal of Food Engineering**，2015，165：141-148.
[18] MIYATA S，MORIYAMA R，SUGIMOTO K，et al. Purification and partial characterization of a spore cortex-lytic enzyme of *Clostridium perfringens* S40 spores[J]. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**，1995，59(59)：514-515.
[19] HUMPHREYS C，COOPER A J，BARBU E，et al. Artemisinins as potential anticancer agents：uptake detection in erythrocytes using Fourier transform infrared spectroscopy and cytotoxicity against bladder cancer cells[J]. **Journal of Clinical Pathology**，2016，69(11)：962-967.
[20] PILATTI F K，RAMLOV F，SCHMIDT E C，et al. Metabolomics of Ulva lactuca *Linnaeus* （*Chlorophyta*）exposed to oil fuels：Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis as tools for metabolic fingerprint[J]. **Marine Pollution Bulletin**，2017，114(2)：831-836.
[21] RAO U M，SOOD Y R，JARIAL R K. Physiometric and Fourier transform infrared spectroscopy analysis of cellulose insulation in blend of mineral and synthetic ester oils for transformers[J]. **Iet Science Measurement & Technology**，2017，11(3)：297-304.
[22] 石燕，刘凡，葛辉，等. 微胶囊形成过程中蛋白质二级结构变化的红外光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析，2012，32(7)：1815-1819.
[23] 敖敦格日乐，杨体强，包斯琴高娃，等. 电场对脂肪酶二级结构及其活性的影响[J]. 食品与生物技术学报，2015，34(12)：1256-1261.
[24] ALLEN D，PALEN E，HAIMOV M，et al. Fourier transform infrared spectroscopy of aerosol collected in a low pressure impactor（LPI/FTIR）：method development and field calibration[J]. **Aerosol Science & Technology**，2016，21(4)：325-342.
[25] 顾小红，孟旭，汤坚. 豆浆凝固过程中大豆蛋白质二级结构的研究[J]. 分析科学学报，2006，22(6)：675-678.

[26] 李顺,张聚华,李秀艳,等. FT-IR 自去卷积法对丝织物蛋白酰胺Ⅲ带二级结构研究初探[J]. 北京服装学院学报(自然科学版),2011,31(2):68-73.
[27] MUNARIN F,TANZI M C,PETRINI P. Corrigendum to ‘Advances in biomedical applications of pectin gels’[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2013,55(4):307-307.
[28] LONG G H,JI Y,PAN H B,et al. Characterization of thermal denaturation structure and morphology of soy glycinin by FTIR and SEM[J]. **International Journal of Food Properties**,2015,18(4):763-774.
[29] GRILL A,NEUMANYER D A. Structure of low dielectric constant to extreme low dielectric constant SiCOH films:Fourier transform infrared spectroscopy characterization[J]. **Journal of Applied Physics**,2003,94(10):6697-6707.
[30] 刘艳红. 可降解大米生淀粉的 α- 淀粉酶 AmyP 的结构和功能关系[D]. 合肥:安徽大学,2017.
[31] 张根成,许洁艳. Cr(Ⅵ)与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 应用化学,2010,27(2):191-196.
[32] 闫春子,夏文水,许艳顺. 超高压对草鱼肌原纤维蛋白结构的影响[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(4):424-428.
[33] 程伟. 多酚氧化酶交联牛乳 α- 乳白蛋白的结构变化及其消化性与过敏原性的评估[D]. 南昌:南昌大学,2012.

科　技　信　息

研究发现番茄果实中叶绿素代谢调节基因

番茄果实成熟过程中伴随着叶绿素的降解,类胡萝卜素和类黄酮的积累。来自重庆大学的科研团队在研究中发现,SlMYB72 基因在调节叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮代谢方面具有重要作用,为园艺作物改善果实营养提供了潜在的靶点。相关成果近日发表在《植物生理学》杂志。

番茄基因 SlMYB72 属于转录因子 R2R3-MYB 亚家族,位于细胞核内,具有转录激活活性。科研团队发现,SlMYB72 基因的下调导致果实颜色不均匀,即在未成熟和成熟的绿色果实上出现深绿色斑点,而在红色果实上出现黄色斑点。

科研团队指出,SlMYB72 基因的下调增加了果实中叶绿素的积累、叶绿体的发生发育和光合作用速率。这种下调降低了番茄红素含量,促进了 β-胡萝卜素的产生和生色体的发育,增加了果实中类黄酮的积累。

转录组测序技术(RNA-seq)分析显示,SlMYB72 基因的下调改变了叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮生物合成相关基因的表达水平。SlMYB72 基因蛋白与生长素应答因子 SlARF4 相互作用。SlMYB72 基因直接靶向原叶绿体还原酶(POR)、Mg 螯合酶、H 亚基(CHLH)等,从而调控叶绿素生物合成和叶绿体发育。

SlMYB72 基因还直接与植物烯合酶(PSY)、胡萝卜素异构酶(ZISO)和番茄红素 β 环化酶(LCYB)基因结合,调控类胡萝卜素的生物合成。

此外,SlMYB72 基因直接靶向 4-香豆酸-CoA 连接酶(4CL)和查尔酮合成酶(CHS)基因,调控类黄酮和酚酸的生物合成。

而 RNAi-SlMYB72 果实颜色表型不均,是由于 SlMYB72 基因不均和叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮生物合成基因表达不均所致。

上述研究发现,揭示了番茄果实中 SlMYB72 基因的一系列重要调控作用,为园艺作物改善果实营养提供了潜在的靶点。

相关论文信息:DOI: https://doi.org/10.1104/pp.20.00156

[信息来源] 郑金武. 研究发现番茄果实中叶绿素代谢调节基因 [EB/OL]. (2020-05-18). http://news.sciencenet.cn/htmlnews/2020/5/439925.shtm