

## 暗诱导衰老小麦叶片内一种耐热蛋白水解酶 的分离及其生化特性鉴定

王晓媛, 陈晨, 赵江哲, 芮琪, 张列峰, 汪瑾, 徐朗莱\*

(南京农业大学生命科学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 采用 30% ~ 50% 饱和度的硫酸铵沉淀、凝胶层析脱盐及聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳, 再通过直接切胶后用回收槽电洗脱回收的方法, 从暗诱导衰老小麦叶片中分离得到了 1 种耐热的蛋白水解酶。该酶具有良好的热稳定性, 且表现出相当宽的 pH 稳定范围。该酶的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 8。分离得到的酶液在 0 ~ 60 °C 处理 1 h 后, 酶活性无明显变化, 70 °C 处理 1 h 后仍有部分活性。酸性蛋白酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂和半胱氨酸蛋白酶抑制剂都不能抑制该蛋白水解酶的活性, 但丝氨酸蛋白酶抑制剂能部分抑制该酶的活性。

**关键词:** 小麦叶片; 暗诱导衰老; 蛋白水解酶; 热稳定性; 生化特性

**中图分类号:** Q945      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-2030 (2007) 04-0035-05

## Isolation and characterization of a kind of thermostable protease in dark-induced senescence wheat leaves

WANG Xiao-yuan, CHEN Chen, ZHAO Jiang-zhe, RUI Qi, ZHANG Lie-feng, WANG Jin, XU Lang-lai\*

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** A kind of thermostable protease from dark-induced senescence wheat leaves was isolated by ammonium sulfate precipitation (from 30% to 50% saturation), then by gradient-polyacrylamide gel electrophoresis after desalted by gel filtration, finally by electro-eluted out from the gel slices cut. The results showed that the protease was rather stable to heat and pH. The optimum temperature and pH of the enzyme were 50 °C and 8, respectively. The activity of the isolated protease had no evident change when the enzyme incubated from 0 °C to 60 °C for 1 h. Incubated at 70 °C for 1 h, it still had a part of activity. The enzyme could not be inhibited by acidic proteinase inhibitor, metall proteinase inhibitor and cysteine proteinase inhibitor, but partly inactivated by serine proteinase inhibitor.

**Key words:** wheat leaves; dark-induced senescence; protease; thermo-stability; biochemical characteristics

蛋白水解酶 (protease) 可分为内肽酶 (endopeptidase) 和外肽酶 (exo-peptidase) 两大类。内肽酶根据其活性基团类型一般可分为 5 类, 即: 丝氨酸蛋白酶 (EC 3.4.21)、半胱氨酸蛋白酶 (EC 3.4.22)、天门冬氨酸蛋白酶 (EC 3.4.23)、金属蛋白酶 (EC 3.4.24) 和苏氨酸蛋白酶 (EC 3.4.25)。

蛋白水解酶在植物生长发育的每一个阶段都发挥着重要作用, 如种子萌发、果实形成阶段等<sup>[1-2]</sup>。但近年来人们对植物叶片内蛋白水解酶研究较多的主要是其衰老期间蛋白水解酶的活性变化。在叶片衰老期间, 外肽酶中氨肽酶的活性在衰老早期就快速下降, 羧肽酶活性持续时间较长, 到衰老后期才有所下降; 而内肽酶 (有时也称蛋白酶, proteinase) 的活性在叶片衰老后期则显著上升, 所以, 内肽酶在叶片衰老期间的蛋白质降解中发挥主要作用<sup>[3-5]</sup>。近几年被发现的与植物衰老相关的内肽酶很多是半胱氨酸蛋白酶, 如在百合花瓣和番茄叶片中发现的衰老相关蛋白酶等<sup>[6-7]</sup>。也有研究者在植物衰老过程中检测到丝氨酸蛋白酶, 如在欧芹、香菜的衰老过程中检测到这类蛋白酶<sup>[8-9]</sup>。温度不同, 酶的活性也不同, Rui 等<sup>[10]</sup>在研究内肽酶的活性时发现绝大多数内肽酶在 50 °C 时活性就基本丧失。Jiang 等<sup>[8]</sup>研究发现, 大于 37 °C, 欧芹叶片中的内肽酶活性显著下降。所以温度是内肽酶发挥活性的重要因素之一。

收稿日期: 2007-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370851); 南京农业大学国家生物物理科基地开放基金 (KFJJ200507)

作者简介: 王晓媛, 硕士研究生。\* 通讯作者: 徐朗莱, 教授, 主要从事植物生物化学方面的研究, Tel: 025-84395773,

E-mail: xulanglai@njau.edu.cn.

本实验室在以前研究工作中,发现了小麦叶片衰老期间叶片内存在多种与衰老相关的蛋白酶同工酶,在对这些蛋白水解酶的生化特性研究中,还发现了小麦叶片中一种性质很特殊的蛋白水解酶,这种蛋白水解酶具有良好的热稳定性<sup>[10]</sup>,它在小麦幼苗期和衰老期都具有活性,在衰老期间活性显著上升。因此,进一步开展该蛋白酶生化特性方面的研究,不仅可以深入了解该蛋白酶结构和性质方面的特殊性,而且对了解和掌握小麦生长发育中,尤其在叶片衰老过程中的蛋白质降解具有重要意义。本研究从暗诱导衰老小麦叶片中分离出了这种耐热的蛋白水解酶,并对其生化特性进行了研究及分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

扬麦 158 (*Triticum aestivum* L. 'Yangmai 158'),田间常规栽培,自然条件下生长。待小麦幼苗长至三叶一心期后,取其主茎上的全展叶片,将叶片剪成约 1 cm 长的片段,置于湿盒内,并在 25 °C 恒温箱中进行暗诱导处理,48 h 后取出叶片待用。

### 1.2 粗酶液的提取

10 g 暗诱导处理叶片加 50 mL Tris-HCl 提取缓冲液 (50 mmol · L<sup>-1</sup>, pH 7.5, 含 EDTA 1 mmol · L<sup>-1</sup>, β-巯基乙醇 15 mmol · L<sup>-1</sup>, 1% PVP) 于冰浴上研磨,然后离心 (10 000 g, 4 °C), 30 min 后取上清液。上清液即为粗酶液。

### 1.3 蛋白水解酶活性电泳

参照芮琪等<sup>[11]</sup>的方法,采用含 0.2% 明胶的 10% ~ 20% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳,电泳参数为 2 000 V · h。电泳结束后将凝胶移入 pH 5.6 的醋酸反应缓冲液中 (200 mmol · L<sup>-1</sup>), 40 °C 恒温反应 2 h 后取出,用 0.1% 氨基黑溶液 (含体积分数为 30% 甲醇和 10% 乙酸) 染色 3 h,然后脱色 (脱色液: 体积分数为 30% 甲醇和 10% 乙酸),其中亮带即为蛋白水解酶活性条带。

### 1.4 耐热蛋白水解酶的分离

1.4.1 硫酸铵沉淀 将硫酸铵粉末研磨细后缓慢加到暗诱导叶片粗酶液中,使硫酸铵终浓度达到 30%, 4 °C 静置 3 h 后,冷冻离心 (10 000 g, 4 °C), 30 min 后收集上清液;在上清液中再缓慢加入硫酸铵,使其终浓度达到 50%, 4 °C 静置 3 h 后冷冻离心 (10 000 g, 4 °C), 30 min 后收集沉淀。

1.4.2 Sephadex G-25 层析脱盐 将沉淀用酶提取缓冲液溶解后,上 Sephadex G-25 层析柱进行脱盐,收集蛋白部分。

1.4.3 电泳分离和回收槽电洗脱回收 将脱盐后的样品用含 0.2% 明胶的 10% ~ 20% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳进行分离,电泳结束后,竖向切下凝胶的一条 (其余凝胶置于 4 °C 冰箱中),移入 pH 5.6 的醋酸反应缓冲液中,40 °C 恒温反应 2 h 后取出,然后染色、脱色 (同 1.3 方法)。对照所切胶条活性染色的结果,在余下的凝胶上切下目标蛋白水解酶条带对应的胶条,放入透析袋中,加入 2 mL 酶提取缓冲液,将透析袋放入蛋白回收槽中进行电洗脱,80 V 恒压 2 h 后取出透析袋,将回收的酶液装入离心管中待用。

### 1.5 温度和 pH 对酶活性的影响

将电洗脱回收的酶液进行活性电泳 (同 1.3 方法),上样量为 30 μL。一方面,将电泳后的凝胶浸入 pH 5.6 的醋酸反应缓冲液中,分别放置在 0、20、30、40、50、60、70 和 80 °C 的恒温水浴中保温 2 h;另一方面,将电泳后的凝胶分别浸泡在 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10 的缓冲液中,然后放置在 40 °C 的恒温水浴中保温 2 h。酶活性按照 1.3 染色、脱色法进行检测。

### 1.6 蛋白水解酶的热稳定性研究

电洗脱回收后的酶液在电泳前分别放置在温度为 0、20、30、40、50、60、70 和 80 °C 的水浴中保温 1 h,然后进行酶活性梯度凝胶电泳 (同 1.3 方法),电泳上样量为 30 μL。按照 1.3 方法检测该蛋白水解酶活性变化情况。

### 1.7 蛋白水解酶类型的确定

抑制剂处理参照 Michaud 等<sup>[12]</sup>的方法。选用了 4 种蛋白水解酶抑制剂,分别为 10 mmol · L<sup>-1</sup> 的丝氨酸蛋白酶抑制剂 AEBSF (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), 25 μmol · L<sup>-1</sup> 的半

胱氨酸蛋白酶抑制 E-64 (traps-epoxysuccinyl-Lle ucyamido (4-guanidine) butane), 10 mmol · L<sup>-1</sup> 的金属蛋白酶抑制剂 EDTA 和 1'10-Phenan throline, 25 μmmol · L<sup>-1</sup> 的酸性蛋白酶抑制剂 pepstatin, 以上浓度均为处理的终浓度<sup>[10,13]</sup>, 以上试剂均购于 Sigma 公司。各种抑制剂分别加入酶液后, 混匀, 并在冰浴上放置 30 min, 然后进行酶活性电泳。电泳后凝胶浸入 pH 5.6 的醋酸反应缓冲液中, 40 °C 恒温 2 h 后取出, 按照 1.3 方法染色、脱色后检测蛋白酶活性变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶的分离

从图 1 可以看出, 暗诱导衰老处理后的小麦叶片粗酶液中至少有 4 种蛋白酶同工酶; 硫酸铵沉淀后, 经 Sephadex G-25 层析脱盐后电泳, 由于上样的蛋白浓度加大, 因此各蛋白酶同工酶活性均增强; 但经过切胶电泳回收后凝胶条上只见到 1 条蛋白酶同工酶条带, 即为目标蛋白酶。

### 2.2 温度和 pH 对蛋白酶活性的影响

不同温度条件处理下该蛋白酶的活性变化如图 2-A 所示。利用软件 (Amersham Bioscience Scanner) 分析表明, 该蛋白酶的最适温度为 50 °C。其在 0~20 °C 时不表现活性, 30 °C 时活性只有最高活性的 36%; 随着温度的升高, 其活性也不断增强; 当温度高于 50 °C, 其活性开始下降, 到 80 °C 时, 其活性只相当于最高活性的 11%。

在不同 pH 条件处理下, 该蛋白酶的活性变化如图 2-B 所示。利用软件分析表明, 该蛋白酶的最适 pH 为 8。在 pH 3 时就表现有一定的活性, 为最高活性的 15%; 在 pH 3~8 范围内, 其活性随着 pH 的升高也呈上升趋势; 在 pH 8~10 范围内, 其活性随着 pH 的升高而有一定的下降, 在 pH 10 时其活性仍表现出相当于最高活性的 66%。

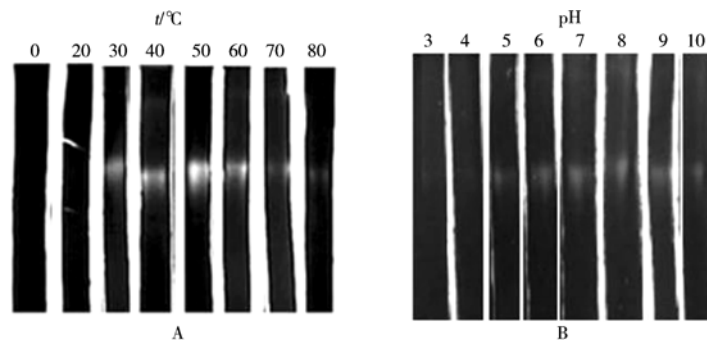


图 2 温度 (A) 和 pH (B) 对蛋白酶活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature (A) and pH (B) on the activity of the purified protease

### 2.3 蛋白酶的热稳定性和抑制剂对蛋白酶活性的影响

分离后的酶液在不同温度条件下温浴 1 h 后进行蛋白酶活性电泳, 该蛋白酶的活性变化如图 3-A 所示。利用软件分析表明, 与对照 (0 °C) 的蛋白酶活性相比, 在 20~60 °C 保温 1 h 后, 其活性呈下降趋势, 但下降幅度较小, 60 °C 时其活性仍表现出相当于对照活性的 64%; 酶液在 70 °C 保温 1 h 后, 其活性才表现出明显下降的趋势, 为对照活性的 17%; 80 °C 处理后其活性完全丧失。表明该蛋白酶具有良好的热稳定性。

不同类型的蛋白酶抑制剂对该酶的活性影响如图 3-B 所示。软件分析结果表明, 与对照相比, 经金属蛋白酶抑制剂 EDTA 处理后该蛋白酶活性为对照活性的 92%, 酸性蛋白酶抑制剂 pepstatin 处理后其活性为对照活性的 84%, 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64 处理后该蛋白酶活性为对照活性的 89%, 另

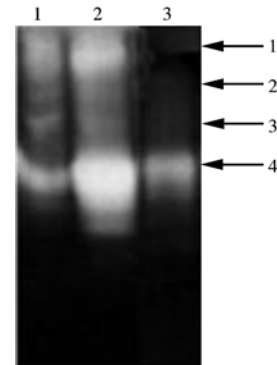


图 1 不同分离步骤后蛋白水解酶梯度凝胶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoregram of the proteases from dark-induced senescence wheat leaves after different isolated steps by proteases activity dyeing method

泳道 1~3 分别表示暗诱导衰老后叶片粗酶提取液、硫酸铵沉淀脱盐后的样液、电泳回收后样液。

Lane 1-3 represent the crude enzyme extracts from dark-induced senescence wheat leaves, the desalted enzyme solution after gel filtration and the enzyme solution after electro-elution, respectively.

一种金属蛋白酶抑制剂 1'10-Phenanthroline 处理后该蛋白酶活性与对照相比没有下降, 而经丝氨酸蛋白酶抑制剂 AEBSF 处理后该蛋白酶活性仅为对照活性的 60%。

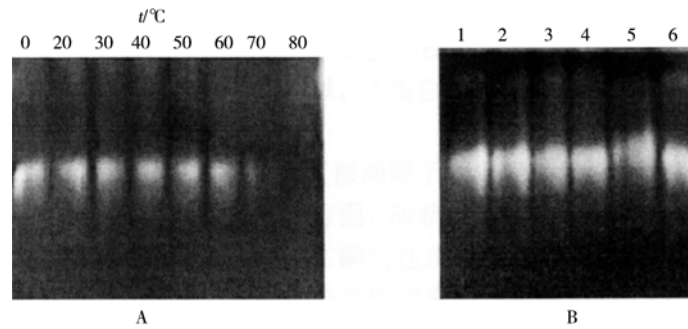


图3 蛋白酶的热稳定性 (A) 和蛋白酶抑制剂对蛋白酶活性的影响 (B)

Fig.3 Thermal stability of the purified protease (A) and effect of proteinase inhibitors on the purified protease activity (B)

B: 泳道 1~6 表示分离的酶液在电泳前用双蒸水、EDTA ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、pepstatin ( $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、E-64 ( $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、AEBSF ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、1'10-Phenanthroline ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 分别处理 30 min 后活性电泳染色的结果。

B: Lane 1-6 represent the purified protease treated with water, EDTA ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), pepstatin ( $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), E-64 ( $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), AEBSF ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 1'10-Phenanthroline ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 30 min before electrophoresis, then dyed by protease activity respectively.

### 3 讨论

本课题组以前的研究发现, 小麦叶片自然衰老过程中新增的内肽酶同工酶在暗诱导衰老过程中均有表达, 且暗诱导衰老过程较自然衰老过程简单并容易控制, 因此, 暗诱导衰老可以作为一种模式用来代表叶片自然衰老过程<sup>[11]</sup>; 进一步的研究发现, 在小麦叶片暗诱导衰老期间, 这种耐热的蛋白酶活性迅速上升, 而叶片总蛋白量却呈迅速下降趋势<sup>[10-13]</sup>, 所以, 本试验采用了暗诱导衰老的小麦叶片为研究材料。在该蛋白酶的分离过程中, 主要采用了梯度凝胶电泳分离, 再切胶通过回收槽电洗脱回收的方法, 分离得到了相对较纯净的目标蛋白酶。2004年, 王东辉等<sup>[14]</sup>将切下的凝胶装入透析袋后放在电泳槽中回收蛋白也取得了较好的效果。我们将装有凝胶的透析袋放在电泳槽中电洗脱回收与将透析袋放在蛋白回收槽中电洗脱回收进行了比较, 发现后者的蛋白酶回收效率更高 (结果未列出)。因此, 该方法不仅比较简单和分离效果好, 而且还适用于其他蛋白的分离纯化。

进一步研究该蛋白酶的生化特性后, 发现其性质十分特殊, 表现为对温度和 pH 具有相当好的稳定性。1999年, Jiang 等<sup>[8]</sup>在衰老的欧芹叶片中发现一种丝氨酸蛋白酶, 其最适温度为  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ , 但在  $45 \text{ } ^\circ\text{C}$  时这种蛋白酶就基本丧失活性。Rui 等<sup>[10]</sup>在研究小麦内肽酶的活性时发现绝大多数内肽酶的活性在  $50 \text{ } ^\circ\text{C}$  时就基本丧失。本实验室 Zhang 等<sup>[15]</sup>在对衰老黄瓜叶片的内肽酶同工酶研究中发现, 大多数内肽酶同工酶的活性在  $50 \text{ } ^\circ\text{C}$  时也基本丧失。所以, 一般的蛋白酶在温度超过  $50 \text{ } ^\circ\text{C}$  时, 活性下降很大或基本没有活性, 而我们所分离得到的这种蛋白酶, 在  $20 \sim 60 \text{ } ^\circ\text{C}$  保温 1 h 后其活性同对照相比均下降不大, 在  $70 \text{ } ^\circ\text{C}$  保温 1 h 后活性仍能表现为对照活性的 17%, 说明该蛋白酶对热表现出相当好的耐受性。进一步的研究结果显示, 该蛋白酶还具有非常宽的 pH 稳定范围, 在 pH 3~10 之间都能表现出良好的活性。Chassin 等<sup>[16]</sup>从拟南芥的类囊体内腔上克隆出一种丝氨酸蛋白酶, 其最适 pH 为 6, 在 pH 8 时活性基本丧失; Roberts 等<sup>[17]</sup>从小麦叶片中分离到一种类似枯草杆菌蛋白酶的丝氨酸蛋白酶, 但该酶在 pH 4~5 时就几乎没有活力。本试验中分离到的蛋白酶 pH 稳定性研究结果暗示, 这种蛋白酶在叶片衰老后期液泡破裂的环境中仍能发挥活性, 它可能在叶片的生长发育, 尤其在衰老过程中对于叶片蛋白质的降解具有重要的功能。另外, 2004年 Fahmy 等<sup>[18]</sup>从发芽的小麦种子中纯化到一种性质稳定的半胱氨酸蛋白酶, 此酶最适 pH 在 4 左右, 热稳定性也较好, 但其活性几乎被半胱氨酸蛋白酶抑制剂完全抑制。而本试验的蛋白酶抑制试验结果表明, 一般的蛋白酶抑制剂, 包括半胱氨酸蛋白酶抑制剂都不能抑制或完全抑制这种蛋白酶活性, 所以, 该蛋白酶可能是小麦叶片内的一种新发现的蛋白酶同工酶。

近些年来, 人们对蛋白水解酶的研究一直都局限于测定粗酶液样品中总蛋白水解酶活性, 同工酶种

类和有关蛋白质降解的速率等方面, 所获得的试验结果往往是多种蛋白酶同工酶综合作用的结果, 而缺乏对单一蛋白酶同工酶的性质及其作用特点的研究。本试验采用初步分离的蛋白酶为研究材料, 排除了植物体内其他因素对该蛋白酶的干扰, 对我们深入了解这种蛋白酶的生化性质及降解机制具有重要意义。本实验室以前的研究发现, 在小麦叶片暗诱导衰老期间, 这种耐热的蛋白酶在小麦正常生长和暗诱导衰老期间都有活性, 且在衰老期间活性上升, 而有些蛋白酶的活性在衰老期间表现下降趋势<sup>[10]</sup>, 说明这种耐热的蛋白酶不仅在未衰老的小麦叶片中, 而且在叶片衰老过程中都可能具有重要的作用。此外, 该蛋白酶的细胞定位究竟于何处? 到底有什么重要的生理意义? 这些都有待我们更深入的研究。另外, 2002年, Jiang等<sup>[9]</sup>从香菜叶片中鉴定出一种耐热的蛋白水解酶, 本实验室 Zhang等<sup>[15]</sup>也发现在黄瓜叶片中有这种耐热的蛋白水解酶存在。这是否说明这种耐热的蛋白水解酶在植物叶片内具有普遍性? 所以, 进一步深入研究这种蛋白酶, 不仅能更好地弄清该酶的生理生化特性和小麦生长过程中蛋白质降解的相关机制, 而且对研究其他植物叶片蛋白质的降解和衰老的机制及以后在生产中实施调控手段都能提供重要的科学价值。

#### 参考文献:

- [1] Müntz K, Belozersky M A, Dunaevsky Y E, et al. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52: 1741-1752
- [2] Feller U. Proteolytic enzymes in relation to leaf senescence [C] //Dalling M J. *Plant Proteolytic Enzymes (Vol. II)*. Florida: CRC Press, 1986: 49-65
- [3] Huffaker R C. Proteolytic activity during senescence of plants [J]. *New Phytol*, 1990, 116: 199-231
- [4] 高玲, 叶茂炳, 张荣铤, 等. 小麦旗叶老化期间的内肽酶 [J]. *植物生理学报*, 1998, 24(2): 183-188
- [5] 沈成国, 张福锁, 毛达如. 植物叶片衰老过程中基因的表达与调控 [J]. *植物生理学通讯*, 1998, 34(4): 304-312
- [6] Guerrero C, de la Calle M, Reid M S, et al. Analysis of the expression of two thiolprotease genes from daylily ( *Hemerocallis*  spp. ) during flower senescence [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 36: 565-571
- [7] Drake R, John I, Farrell A, et al. Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 755-767
- [8] Jiang W B, Lers A, Lomaniec E, et al. Senescence-related serine protease in parsley [J]. *Phytochem*, 1999, 50: 377-382
- [9] Jiang W B, Zhou X J, Zhao Y M, et al. Identification of a senescence-related protease in coriander leaves [J]. *Chin Sci Bull*, 2002, 47(13): 1096-1099
- [10] Rui Q, Xu L L. Characterization of endopeptidases in wheat leaves during dark-induced senescence [J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(9): 1049-1054
- [11] 芮琪, 徐朗莱. 用凝胶电泳法研究小麦叶片衰老期间的内肽酶同工酶 [J]. *南京农业大学学报*, 2002, 25(3): 85-88
- [12] Michaud D, Faye L, Yelle S. Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors [J]. *Electrophoresis*, 1993, 14: 94-98
- [13] Zhang L F, Rui Q, Xu L L. Degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in wheat leaves [J]. *Acta Bot Sin*, 2005, 47(1): 60-66
- [14] 王东辉, 韩韬, 龚化勤, 等. 一种利用普通垂直电泳槽回收 PAGE 胶蛋白条带的简便方法 [J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(1): 75-77
- [15] Zhang P, Wang F, Zhang L F, et al. Endopeptidase isoenzyme characteristics in *Cucumis sativus* leaves during dark-induced senescence [J]. *Acta Bot Sin*, 2007, 49(4): 507-514
- [16] Chassin Y, Kapri-Pardes E, Sinvany G, et al. Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(2): 857-864
- [17] Roberts I N, Murray P F, Caputo C P, et al. Purification and characterization of a subtilisin-like serine protease induced during the senescence of wheat leaves [J]. *Physiol Plant*, 2003, 118: 483-490
- [18] Fahmy A S, Ali A A, Mohamed S A. Characterization of a cysteine protease from wheat *Triticum aestivum* (cv. Giza 164) [J]. *Bioresource Technol*, 2004, 91: 297-304

责任编辑: 夏爱红