

刘美艳,王景景,谢逸萍,等. 甘薯几丁质酶的分离与纯化[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):186-188.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.047

甘薯几丁质酶的分离与纯化

刘美艳¹, 王景景¹, 谢逸萍², 张健¹

(1. 江苏师范大学生命科学学院整合植物生物研究所,江苏徐州 221116;2. 江苏徐淮地区徐州农业科学研究所,江苏徐州 221121)

摘要:以高抗甘薯黑斑病品种南京-92块根为材料,从染菌6 d的甘薯块根中得到粗酶液;经热变性、硫酸铵分级沉淀后,采用高流速二乙基氨基琼脂糖交换剂(DEAE Sepharose Fast Flow)阴离子交换层析,分离出3个蛋白峰,活性检测可知峰2为活性峰;将峰2经葡聚糖凝胶G-75(Sephadex G-75)凝胶层析纯化后得到4个蛋白峰;将具有几丁质酶活性的峰2经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),凝胶上显示2条蛋白条带,分别割胶纯化测定活性,然后将有活性的条带进行10%、12% PAGE电泳,均显示为单一条带;本试验分离纯化过程中得到了电泳纯级的几丁质酶,为后续的研究奠定了基础。

关键词:甘薯;黑斑病;几丁质酶;分离;纯化

中图分类号: S435.313+.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0186-03

甘薯 (*Iomoea batatas* Lam) 别称番薯、红薯、山芋等,属旋花科甘薯属。甘薯的营养价值很高,我国的种植面积占世界种植面积的一半以上。甘薯黑斑病是由子囊菌亚门长喙壳菌属 (*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted) 侵染引起的真菌病害,是严重危害甘薯生产的主要病害,产量损失高达 20% ~ 50%^[1]。黑斑病的侵染能力极强,病菌通过破坏细胞壁,侵入甘薯细胞,在甘薯的幼苗生长阶段和地窖储藏阶段均能使甘薯染病^[2]。黑斑病的预防和控制已成为甘薯种植和储藏研究中的重要任务之一。目前对甘薯抗黑斑病的研究主要集中在筛选抗病品种和杂交育种方面,对甘薯抗黑斑病机制方

面的研究较少^[3-4]。几丁质酶是广泛存在于微生物和植物体内的一类蛋白质,能水解真菌细胞壁中的几丁质,从而抑制真菌的生长增殖,提高植物的抗真菌能力,是一类重要的病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins,简称PP)^[5-6]。本试验的前期工作表明,甘薯块根几丁质酶是一种诱导酶,核黄素、脱乙酰几丁质、黑斑病菌处理均能诱导甘薯块根几丁质酶活性的提高,甘薯几丁质酶与甘薯抗黑斑病有着密切的关系^[7]。因此,本试验分离纯化几丁质酶、探究甘薯几丁质酶的生理特性,以期从病程相关蛋白角度探究甘薯对黑斑病的抗性机制,同时也能为甘薯几丁质酶进行末端测序、克隆甘薯几丁质酶基因做准备。

收稿日期:2016-03-25

基金项目:国家甘薯产业技术体系协作课题(编号:CARS-11-B-09-A);江苏省高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介:刘美艳(1969—),女,江苏徐州人,硕士,副教授,主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。E-mail:liumeiyan@jsnu.edu.cn。

通信作者:张健,硕士,副教授,主要从事植物生理学方面的教学与科研工作。E-mail:zhangjian@jsnu.edu.cn。

1 材料与方 法

1.1 供试材料及薯块染菌处理

供试甘薯品种南京-92(高抗黑斑病),甘薯黑斑病病原物由江苏徐州农业科学院中国甘薯研究中心提供。黑斑病菌悬浮液的制备按照王景景等的方法^[4]进行。选取正常无病斑薯块,用自来水冲洗干净,晾干。将块根切成1.5 cm厚度

3 结 论

采用GC-MS法在猕猴桃酒中共检出174种香气成分,其中醇类19种、酯类29种、酸类18种、胺类49种、烷烃烯炔类23种、醛酮类10种、其他类23种,普通猕猴桃发酵酒、红心猕猴桃发酵酒主要呈香成分都为辛酸乙酯,含量分别为31.67%、15.74%,而软枣猕猴桃发酵酒的主要呈香成分为苯乙醇,含量为29.59%。猕猴桃酒的香气成分是由原料果香和酵母发酵共同产生的,其赋予不同猕猴桃发酵酒独特的风味和风格。

参 考 文 献:

[1]徐小彪,张秋明. 中国猕猴桃种质资源的研究与利用[J]. 植物学通报,2003,20(6):648-655.

[2]陈昆松,吕均良,张上隆. 猕猴桃的采后生理及其贮藏[J]. 农业科技译丛,1991(3):34-37.

[3]宋圃菊,徐勇. 中华猕猴桃的防癌作用(五)阻断大鼠和健康人体内N-亚硝基脯氨酸的合成[J]. 营养学报,1988,10(1):50-55.

[4]Hafezi F, Rad H E, Naghibzadeh B, et al. Actinidia deliciosa (kiwifruit), a new drug for enzymatic debridement of acute burn wounds[J]. Burns,2010,36(3):352-355.

[5]贾青青,邵威平,辛秀兰,等. 黑加仑果与果酒香气成分的GC-MS分析[J]. 中国酿造,2014,33(3):141-146.

[6]刘玮,陈亮,吴志明,等. 不同酵母发酵的桑葚果酒香气成分的分析[J]. 食品研究与开发,2013,34(24):212-216,217.

[7]Torrens J, Urpí P, Riu - Aumatell M, et al. Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine[J]. International Journal of Food Microbiology,2008,124(1):48-57.

的圆片,将0.1 mL 黑斑病菌内生孢子接种于块根圆片的表面,放置于28℃恒温箱中培养,以蒸馏水处理的切伤块根圆片为伤害对照组。

1.2 几丁质酶的提取和活力测定

去除甘薯外表面,切成小块,并迅速将其浸泡于0.02 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH值5.5)中,甘薯质量和缓冲液的比例为1:1(质量浓度),用组织捣碎机将甘薯磨碎,4层纱布过滤,滤液4℃、8 000 r/min、离心15 min,上清即为几丁质酶粗酶液。胶体几丁质的制备按照李世贵等的方法^[8]进行。3,5-二硝基水杨酸(DNS)溶液的配制按照李合生的方法^[9]进行。几丁质酶活力测定参照Boller等的方法^[10]进行。以1 h分解胶体产生1 μmol N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为1个酶活性单位(U/mL)。

1.3 甘薯几丁质酶的纯化过程

从染菌6 d的1 000 g甘薯块中得粗酶液800 mL,50℃水浴中热变性30 min,10 000 r/min冷冻离心10 min;于上清液中加入硫酸铵使溶液达到20%饱和度,4℃下放置24 h,10 000 r/min冷冻离心10 min,取上清,加入硫酸铵使溶液达到60%饱和度,4℃下放置24 h,10 000 r/min冷冻离心10 min,保留沉淀,加入少量缓冲液,摇匀;透析脱盐;将透析脱盐后的酶液依次经高流速二乙氨基琼脂糖交换剂(DEAE Sepharose Fast Flow)阴离子交换层析,葡聚糖凝胶G-75(Sephadex G-75)凝胶过滤,分别收集洗脱峰,检测其活性,并将具有几丁质酶活性的洗脱峰进行超滤浓缩;之后将纯化浓缩的样品经不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE,分离胶浓度5%,浓缩胶浓度12%),经染色后切取电泳胶上的蛋白条带,将这些蛋白条带浸泡在1.0 mL pH值为7.9的0.02 mol/L Tris-HCl缓冲液中,尽量捣碎,4℃浸泡36 h,离心取上清,测定几丁质酶活性;最后经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯度几丁质酶。

2 结果与分析

2.1 纯化过程中甘薯几丁质酶活性的变化

对分离纯化过程每一个阶段的甘薯几丁质酶的活性进行比较。可以看出,随着分离纯化过程的深入,甘薯几丁质酶的活性不断升高,表明甘薯几丁质酶逐步得到纯化(表1)。

表1 甘薯几丁质酶纯化倍数表

步骤	体积(mL)	蛋白含量(mg)	酶总活性(U)	比活性(U/mg)	活力回收率(%)	纯化倍数
粗酶液	1 000	12 833.4	17 880	1.39	100.0	1.00
热变性	992	8 139.2	15 516	1.91	86.7	1.40
20%硫酸铵	770	3 380.7	14 626	4.32	81.8	3.10
60%硫酸铵	58	2 210.4	14 234	6.44	79.6	4.63
DEAE SepharoseFF	25	524.5	12 032	22.96	67.3	16.52
SephadexG-75	10	320.7	9 942	31.06	55.6	22.34
割胶纯化	8	167.3	8 530	51.07	47.7	36.74

2.2 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析结果

DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析洗脱曲线结果如图1所示,可以看出共分离出3个蛋白峰,活性检测可知峰2为活性峰,收集该峰,透析、超滤、离心浓缩。

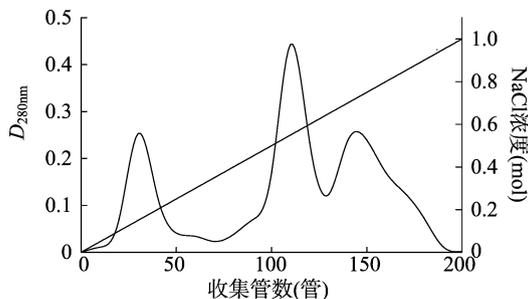
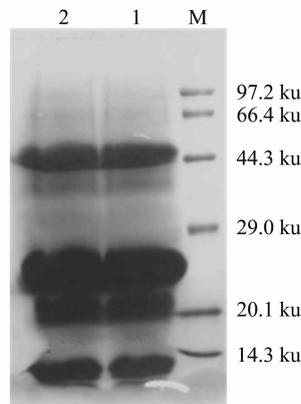


图1 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析 D_{280nm} 洗脱曲线

取具有几丁质酶活力的峰2浓缩样品进行SDS-PAGE,结果见图2,酶液得到初步纯化。



M—marker; 1、2—峰2浓缩样品

图2 DEAE Sepharose Fast Flow 峰2 SDS-PAGE 电泳分析

2.3 Sephadex G-75 凝胶层析结果

将DEAE Sepharose Fast Flow得到的活性峰2经Sephadex G-75凝胶层析纯化后得到4个蛋白峰(图3),活性检测发现峰2具有几丁质酶活性。

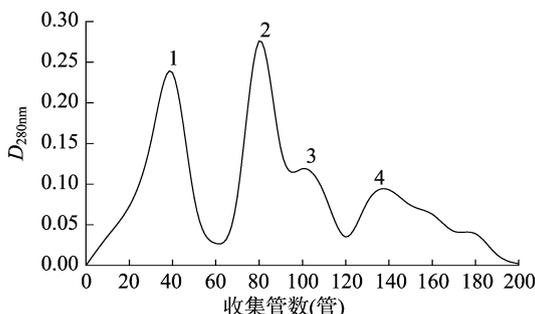


图3 Sephadex G-75 凝胶层析 D_{280nm} 洗脱曲线

取具有几丁质酶活力的峰2浓缩样品进行SDS-PAGE,结果见图4,酶液得到进一步纯化。

2.4 割胶纯化PAGE结果

将经Sephadex G-75凝胶层析纯化后的样品进行10%、12% PAGE,由图5、图6的泳道1可见,在12%、10% PAGE胶上都呈现2条蛋白条带。将上下2条蛋白条带分别割取纯化后,测定活性,结果显示下面蛋白条带有几丁质酶活性。将有活性的条带进行12%、10% PAGE电泳,图5、图6的泳道2显示12%、10% PAGE均为单一条带。由此可以得出,经电泳制备得到了电泳纯级的甘薯几丁质酶单一组分。

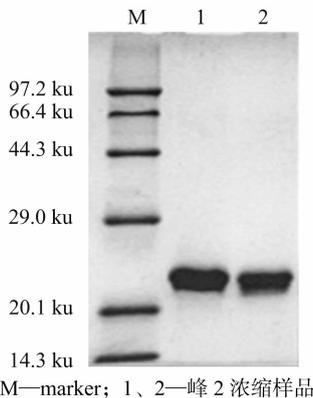


图4 Sephadex G-75 峰 2 SDS-PAGE 电泳分析

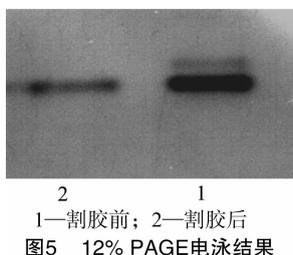


图5 12% PAGE电泳结果

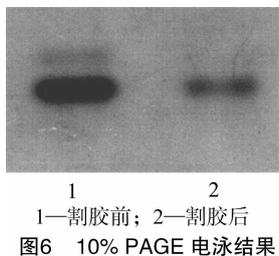


图6 10% PAGE电泳结果

3 结论与讨论

目前,生产上控制甘薯黑斑病的主要方法以药物防治为主,但农药残留会造成严重的环境污染及食品安全问题^[11-12]。因此培育和栽培抗性品种是最经济有效的方法。前期利用黑斑病菌对不同抗性品种甘薯几丁质酶进行诱导的试验结果表明,甘薯几丁质酶是一种诱导酶,高抗品种甘薯块内的几丁质酶比高感品种积累的量多,2个品种几丁质酶活性最大时达到极显著差异,这与前人的研究结果^[7,13]一致。说明甘薯几丁质酶与甘薯抗黑斑病有着密切的关系,几丁质酶对甘薯抵抗黑斑病的侵染具有重要作用。

植物细胞壁不含几丁质,植物的几丁质酶通过水解真菌的菌丝生长点细胞壁中的几丁质以抵御病原菌侵染,因此几丁质酶被普遍认为是一种与抗病有关的酶^[14]。作为一种诱导型表达的病程相关蛋白,几丁质酶已经在一些植物上表现出抗真菌活性^[15-16]。随着分子生物学技术的迅速发展,许多植物几丁质酶已被克隆并被成功转化,过表达几丁质酶基因的转基因植株拥有更强的抵御病原体入侵的能力,几丁质酶能在抵御病原菌侵染中发挥重要的作用^[17-19]。本试验首次从甘薯块根内纯化得到1种几丁质酶,为后续开展甘薯几丁质酶性质、功能鉴定及甘薯抗黑斑病基因工程的研究奠定了

基础。

参考文献:

- [1]江苏省农业科学院,山东省农业科学院. 中国甘薯栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1984:201-203,265-270.
- [2]郝丽梅,王立安,马春红,等. 致病真菌与植物寄主相互作用关系的研究进展[J]. 河北农业科学,2001,5(2):73-78.
- [3]赵冬兰,张允刚,唐军,等. 抗甘薯黑斑病优异种质资源的筛选与评价[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(1):80-83.
- [4]王景景,刘美艳,谢逸萍,等. 黑斑病对甘薯叶酚类物质含量、PPO及PAL活性的影响[J]. 广西植物,2012,32(3):406-409.
- [5]董金泉. 农业植物病理学(北方本)[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [6]梁美霞,李景富,许向阳,等. 几丁质酶基因在植物抗真菌病基因工程中的应用[J]. 黑龙江农业科学,2005(5):29-31.
- [7]朱刘影,张健,刘倩倩,等. 核黄素和脱乙酰几丁质对甘薯几丁质酶的诱导作用研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):106-108.
- [8]李世贵,顾金刚,姜瑞波,等. 生防木霉菌产几丁质酶特性研究[J]. 生物技术通报,2009(4):135-138.
- [9]李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:197-199.
- [10]Boller T, Gehri A, Mauch F, et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function[J]. Planta,1983,157(1):22-31.
- [11]张德胜,乔奇,田雨婷,等. 5种杀菌剂对储藏期甘薯黑斑病的防效及对薯块的安全性评价[J]. 植物保护,2015,41(6):221-224.
- [12]杨冬静,孙厚俊,赵永强,等. 多种药剂对甘薯黑斑病菌的毒力测定及其对苗期黑斑病的防治效果研究[J]. 江西农业学报,2014,26(11):72-74.
- [13]Sharma I, Kumari N, Sharma V. Defense gene expression in *Sorghum bicolor* against *Macrophomina phaseolina* in leaves and roots of susceptible and resistant cultivars[J]. Journal of Plant Interactions,2014,9(1):315-323.
- [14]Veluthakkal R, Dasgupta M G. Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species[J]. Trees,2010,24(6):993-1006.
- [15]Gupta P, Ravi I, Sharma V. Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*[J]. Journal of Plant Interactions,2013,8(2):155-161.
- [16]陈鹏,彭海霞,张静. 水分胁迫对小麦叶片抗性相关酶活性的诱导[J]. 西北农业学报,2011,2(2):56-61.
- [17]王亚,贺爱欢,裴越琳,等. 草莓几丁质酶基因 *FaChil*-*FaChi4*的转录特性及其对干旱胁迫、外施脱落酸及灰霉菌的响应[J]. 中国农业大学学报,2015,20(6):108-116.
- [18]许颖,王竹青,吴期滨,等. 甘蔗几丁质酶基因 *ScChi IV1*的克隆、序列分析及其表达[J]. 基因组学与应用生物学,2015,34(6):1258-1266.
- [19]罗晶晶,张仁英,齐晓花,等. 黄瓜几丁质酶基因克隆及与白粉病抗性关系的初步研究[J]. 分子植物育种,2015,13(7):1584-1591.