

张 健,王景景,谢逸萍,等. 甘薯几丁质酶的性质研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(12):55-57.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.012

甘薯几丁质酶的性质研究

张 健¹,王景景¹,谢逸萍²,刘美艳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. 中国农业科学院甘薯研究中心,江苏徐州 221121)

摘要:从南京-92 块根内分离纯化得到了甘薯几丁质酶,在不同浓度的 PAGE 电泳中均显示该酶为单一条带,据此推断该酶为电泳纯单一蛋白;对该酶进行了性质鉴定,结果表明,该酶分子量为 23 ku 左右,最适温度为 45 ℃,最适 pH 值为 5.5,等电点 pI 为 7.2,为碱性几丁质酶。

关键词:甘薯;几丁质酶;性质鉴定;酶活性;黑斑病

中图分类号:S435.313⁺.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)12-0055-03

甘薯 (*Iomoea batatas* Lam) 属旋花科甘薯属,是重要的粮食、经济和饲料作物,在全世界范围内广泛种植^[1-3]。我国是甘薯种植面积最大的国家,占世界种植面积的一半以上。甘薯黑斑病是危害甘薯种植和储藏的重要病害之一,在世界各地甘薯产区均有发病^[4]。甘薯黑斑病使幼苗期和生长期苗茎基部黑根烂死,储藏期感染则会使薯块出现黑斑,味苦,最后全部腐烂^[5],使甘薯失去应用价值。甘薯黑斑病病原菌为 *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted,属于真菌病害。植物病程相关蛋白 (pathogenesis-related protein, PRs) 是当植物体受病原菌等刺激物刺激后产生的一类蛋白质,正常情况下含量并不高,一旦被诱导,含量迅速增加从而提高植物对病虫害等逆境的防御抵抗能力^[6-7]。国内外的研究表明,植物几丁质酶被认为是一类与植物抗病有着密切关系的病程相关蛋白,它参与了植物体内防御机制的很多方面^[8-9]。大量研究表明,植物几丁质酶是一类次生代谢物,只有在真菌或病毒的诱导刺激下才会大量积累,积累到一定量时作用于真菌等病害,抑制其生长或直接将之杀死来提高植物的抗逆能力^[10-12]。本试验的前期工作已经利用甘薯黑斑病菌诱导甘薯大量表达了几丁质酶,说明甘薯黑斑病抗性甘薯块根几丁质酶活性有相关关系。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,说明甘薯几丁质酶是一

种诱导酶。体外抑菌试验结果显示,甘薯几丁质酶对甘薯黑斑病菌具有很强的抑制作用^[13]。进一步研究甘薯几丁质酶的性质,能为甘薯抗黑斑病育种^[14]、新型抗黑斑病药物的开发和生产上黑斑病的防治^[15]提供理论根据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

甘薯黑斑病菌、南京-92 块根 (高抗黑斑病品种) 由江苏省徐州市农业科学院中国甘薯研究中心提供。

1.2 黑斑病菌孢子悬液的制备

取灭菌过的 PDA 液体培养基 200 mL,接种甘薯黑斑病菌于其中,在 (30 ± 1) ℃ 下,以 120 r/min 振荡 3 d,过滤除去菌丝,以 3 000 r/min 离心 10 min,重复 3 次,直至沉淀基本为白色,经镜检确认为黑斑病菌内分生孢子,加适量水悬浮。试验时,将上述内分生孢子配成 1 × 10⁷ 个孢子/mL 的浓度供接种用。

1.3 薯块染菌处理

试验时,选取大小均匀、表面光洁无病斑的块根,用蒸馏水冲洗 3 次。将块根切成 1 ~ 2 cm 厚的圆片,然后将黑斑病菌内分生孢子悬浮液涂于块根圆片的两侧,于 (30 ± 1) ℃ 暗箱中保温 4 d。

1.4 甘薯几丁质酶的提取和活力测定

将甘薯外表层去除,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,甘薯质量和缓冲液体积的比例为 1 : 1,用组织捣碎机将甘薯磨碎,4 层纱布过滤,滤液于 4 ℃ 下以 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^[16]进行。DNS 溶液的配制按照李合生的方法^[17]进行。几

展望[J]. 玉米科学,2016,24(3):147-152.

[10] 马存金,刘 鹏,赵秉强,等. 施氮量对不同氮效率玉米品种根系时空分布及氮素吸收的调控[J]. 植物营养与肥料学报,2014,20(4):845-859.

[11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2000.

[12] 丁民伟,杜 雄,刘梦星,等. 氮素运筹对夏玉米产量形成与氮

素利用效果的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2010,16(5):1100-1107.

[13] 王友华,许海涛,许 波,等. 施用氮肥对玉米产量构成因素及其根系生长的影响[J]. 中国土壤与肥料,2010(3):55-57.

[14] 蔡红光,米国华,张秀芝,等. 不同施肥方式对东北黑土春玉米连作体系土壤氮素平衡的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2012,16(1):89-97.

丁质酶活性测定参照 Boller 等的方法^[7]进行。以每小时分解胶体产生 1 μmol *N*-乙酰氨基葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位(U/mL)。

1.5 甘薯几丁质酶的分子量测定

采用 SDS-PAGE 测定分子量,按蔡武成等的方法^[18]进行。

1.6 甘薯几丁质酶的等电点测定

采用圆盘电泳,按蔡武成等的方法^[18]进行等电点测定,两性电解质 pH 值为 7~10。

1.7 甘薯几丁质酶的最适温度测定

分别于 10、20、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 ℃下测定几丁质酶活性,3 次重复。以温度为横坐标,几丁质酶活性为纵坐标,得出甘薯几丁质酶活性随温度变化的曲线。

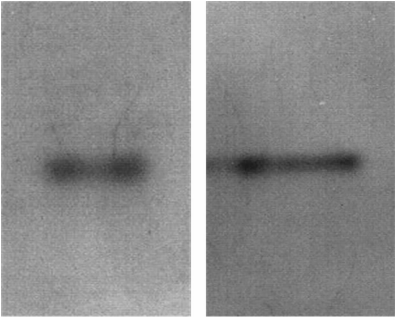
1.8 甘薯几丁质酶的最适 pH 值测定

几丁质酶活性测定体系的 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0。其中 pH 值 2.0~6.5 是用 0.02 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液,pH 值 7.0~12.0 是用 0.02 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。3 次重复。以 pH 值为横坐标、几丁质酶相对活性为纵坐标,得出甘薯几丁质酶活性随 pH 值变化的曲线。

2 结果与分析

2.1 甘薯几丁质酶的分子量

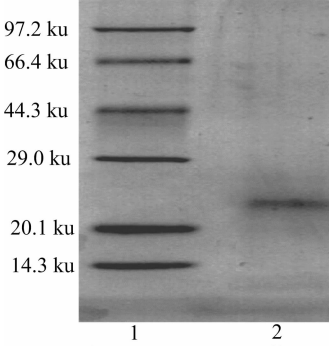
从高抗甘薯黑斑病品种南京-92 块根得到粗酶液。经热变性、硫酸铵分级沉淀、DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析、SephadexG-75 凝胶层析纯化后,将有几丁质酶活性的条带进行 10%、12% PAGE 电泳,均显示为单一条带(图 1);说明制备得到了电泳纯级的甘薯几丁质酶单一组分。将割胶纯化后得到的几丁质酶进行 SDS-PAGE 电泳(图 2),根据低分子量标准蛋白计算可知甘薯几丁质酶相对分子量为 23 ku。



1—10% PAGE; 2—12%PAGE
图1 甘薯几丁质酶 PAGE 电泳

2.2 甘薯几丁质酶的等电点

以凝胶距正极的距离为横坐标,每 0.5 cm 凝胶的 pH 平均值为纵坐标制作 pH 值梯度曲线(图 3)。得出回归方程为 $y = 0.2532x + 7.0195$, $r^2 = 0.9929$ 。几丁质酶经圆盘等电聚焦电泳得到 1 条蛋白带(图 4),圆盘等电聚焦电泳胶总长 8 cm,蛋白条带距负极端 0.7 cm。根据等电聚焦的标准曲线确定等电点为 pH 值 7.2,说明该蛋白为碱性蛋白质。



1—蛋白质 marker; 2—甘薯几丁质酶
图2 甘薯几丁质酶 SDS-PAGE 电泳

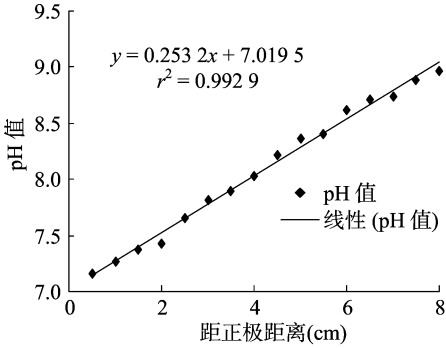


图3 pH 值梯度曲线



图4 甘薯几丁质酶等电聚焦电泳

2.3 甘薯几丁质酶的最适温度

从图 5 中可以看出,甘薯几丁质酶在 10~70 ℃之间都有较强的活性,45 ℃时酶活性达到最大,说明 45 ℃为是甘薯几丁质酶的最适温度。

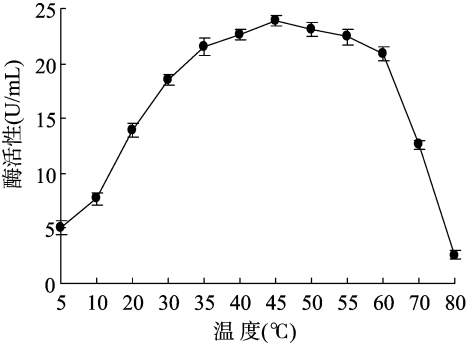


图5 温度对几丁质酶活性的影响

2.4 甘薯几丁质酶最适 pH 值

从图 6 中可以看出,甘薯几丁质酶在 pH 值 4.0~10.0 之间都有较强的活性,说明甘薯几丁质酶对于酸碱的耐受力较强;在 pH 值为 2.0 时,此酶完全失去活性,而在 pH 值为 12.0 左右时几丁质酶还保留一些活性;在 pH 值为 5.5 时,酶活性达到最大,说明 pH 值 5.5 为此酶的最适 pH 值。酶活性在

pH 值为 6.5~7.5 之间下降,主要原因是 pH 值接近等电点,蛋白质发生部分沉淀,造成酶活性减小。

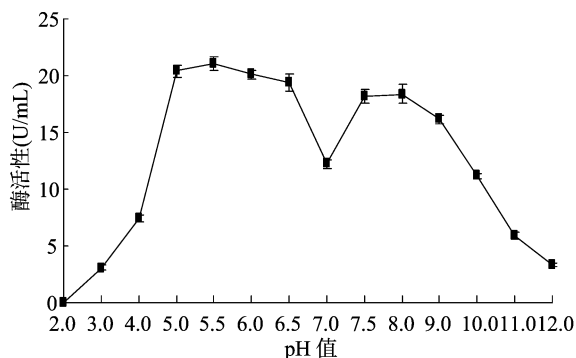


图6 pH 值对几丁质酶活性的影响

3 结论与讨论

本试验对纯化得到的甘薯几丁质酶的特性进行了研究。SDS-PAGE 电泳显示甘薯几丁质酶的分子量在 23 ku 左右,这与已报道过的植物几丁质酶的分子量在 20~40 ku 之间的结果一致。本试验结果表明,甘薯几丁质酶最适反应温度为 45℃,在 20~70℃时比较稳定,当温度超过 75℃,酶的活性急剧下降;该酶的最适 pH 值为 5.5,在 pH 值为 4.0~10.0 比较稳定,说明纯化的这种甘薯几丁质酶对酸碱的耐受性较强,当 pH 值小于或等于 2.0 时几丁质酶失去活性,pH 值超过 12.0 时活性接近于 0;该几丁质酶的等电点为 7.2,为碱性几丁质酶,这与在甘蔗^[19]和中国水仙^[20]中分离得到的几丁质酶的研究结果一致。

本试验只纯化了一种甘薯几丁质酶,由外切几丁质酶活性测定方法可知,这种几丁质酶为外切几丁质酶。很多研究表明,植物体内可能存在不止一种几丁质酶^[21],本试验的目的是要获得对甘薯黑斑病病菌有较强抑制作用的几丁质酶,并且通过体外抑菌试验证明这种几丁质酶对黑斑病有较强的抑制作用,对甘薯体内可能存在的其他同工酶将作进一步的研究。

参考文献:

- [1] 安霞,董月,吴建燕,等. 氮肥形态对甘薯产量和养分吸收的影响[J]. 江苏农业学报,2016,32(5):1049-1054.
- [2] 齐鹤鹏,安霞,刘源,等. 施钾量对甘薯产量及钾素吸收利用的影响[J]. 江苏农业学报,2016,32(1):84-89.
- [3] 董月,安霞,张辉,等. 不同品种甘薯的生物量累积、养分吸收和分配规律[J]. 江苏农业学报,2016,32(2):313-318.
- [4] 谢一芝,邱瑞镰,戴起伟,等. 甘薯抗黑斑病育种研究进展[J]. 国外农学(杂粮作物),1997(2):22-24.
- [5] 卢方林,汪志伟,王克贵. 甘薯黑斑病及其防治[J]. 甘肃农业,

- 2009,4(5):92.
- [6] 吴乃虎. 基因工程原理(下册)[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2001:209.
- [7] 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.
- [8] 邱永祥,柯玉琴,代红军,等. 甘薯抗蔓割病的酚类物质代谢的研究[J]. 中国生态农业学报,2007,15(5):167-170.
- [9] Takenaka Y, Nakano S, Tamoi M, et al. Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 2009, 73(5): 1066-1071.
- [10] 朱新产,王倩文,于群. 苦瓜几丁质酶的分离及生物学特征分析[J]. 华北农学报,2015,30(6):182-187.
- [11] 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 *Aiternaria brassicicola*[J]. Journal Plant Interactions, 2013, 8(2): 155-161.
- [12] Hawkins L K, Mylroie J E, Oliveira D A, et al. Characterization of the maize chitinase genes and their effect on aspergillus flavus and aflatoxin accumulation resistance[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0126185.
- [13] 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.
- [14] 闫文慧,王兵,楼康怡,等. 转几丁质酶基因烟草对三种真菌拮抗作用的研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2014, 39(10): 71-75.
- [15] Li J G, Jiang Z Q, Xu L P, et al. Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant[J]. BioControl, 2008, 53(6): 931-944.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 蔡武城,李碧羽,李玉民. 生物化学实验技术教程[M]. 上海:复旦大学出版社,1983.
- [19] 许颖,王竹青,吴期滨,等. 甘蔗几丁质酶基因 *ScChiIV1* 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.
- [20] 林晓红,潘鹤立,潘东明. 中国水仙几丁质酶基因的克隆与表达分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014, 42(12): 173-178.
- [21] 周樱,王凤平,肖湘. 豚鼠气单胞菌 CB101 中几丁质酶基因的克隆及其异源表达的全酶蛋白和酶片段的功能研究[J]. 自然科学进展,2002,12(8):852-856.