

利用凝胶扩散法测定刺萼龙葵种子中 β -甘露聚糖酶的活性

赵丹丹[#], 杨 龙[#], 黄兆峰, 黄红娟, 姜翠兰, 魏守辉^{*}

(中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要 β -甘露聚糖酶是种子萌发过程中降解胚乳细胞壁的关键酶,明确其活性的动态变化可为揭示杂草种子的休眠萌发机制提供重要依据。以外来杂草刺萼龙葵 *Solanum rostratum* Dunal 种子为材料,建立了种子中 β -甘露聚糖酶活性的检测方法—凝胶扩散法。利用凝胶扩散法对不同贮存时间及贮存条件下刺萼龙葵种子中 β -甘露聚糖酶的活性进行了检测,发现贮存3年以上的种子中该酶的活性为0.03 nmol/(min·mg),显著低于贮存3年以下的种子中的酶活性0.15 nmol/(min·mg),而湿润冷藏的种子中 β -甘露聚糖酶的活性为0.12 nmol/(min·mg),显著高于干燥冷藏的种子的酶活性0.02 nmol/(min·mg)。实际应用结果表明,凝胶扩散法综合了传统方法的优势,检测特异性强、灵敏度高、重复性好,可同时检测大量种子样品,具有良好的实用性。

关键词 刺萼龙葵; β -甘露聚糖酶; 种子; 凝胶扩散法

中图分类号: S 451.0 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019027

Determination of endo- β -mannanase activity in seeds of *Solanum rostratum* by gel diffusion assay

ZHAO Dandan[#], YANG Long[#], HUANG Zhaofeng, HUANG Hongjuan, JIANG Cuilan, WEI Shouhui^{*}

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Endo- β -mannanase (EBM) is a key enzyme in degradation of endosperm cell walls during seed germination process. Understanding the dynamics of EBM activities will provide important guidance for elucidating the mechanisms of weed seed dormancy and germination. For determination of EBM activity in seeds of an invasive plant, *Solanum rostratum* Dunal (buffalobur), a gel diffusion assay was established. The EBM activities in buffalobur seeds with different storage time and under different storage conditions were detected by this method. The results showed that the EBM activity in seeds stored longer than 3 years [0.03 nmol/(min·mg)] was significantly lower than that of seeds stored less than 3 years [0.15 nmol/(min·mg)]. Whereas for seeds stored wet in the refrigerator [0.12 nmol/(min·mg)], the EBM activity was significantly higher than that of seeds stored dry in the refrigerator [0.02 nmol/(min·mg)]. The practical application verified that the gel diffusion assay, which took advantages of traditional methods, was a specific, highly sensitive and reproducible method, and could analyze a large number of seed samples simultaneously.

Key words *Solanum rostratum*; endo- β -mannanase; seed; gel diffusion assay

种子是杂草发生危害的根源和传播扩散的重要载体,关系到种群的生存和发展^[1-2]。种子内通常存在细胞壁加厚的胚乳细胞,可以阻碍胚根突破种皮,其细胞壁的降解是种子萌发的前提。 β -甘露聚糖酶是降解胚乳细胞壁主要成分半乳甘露聚糖

的关键酶,明确其活性的动态变化对揭示杂草种子的萌发调控机理,进而制定有针对性的杂草综合防控措施具有重要意义。半乳甘露聚糖是大多数种子胚乳细胞壁的主要成分,在茄科植物种子中可达60%^[3-4]。研究表明, β -甘露聚糖酶在番茄、莴苣、

收稿日期: 2019-01-15 修订日期: 2019-03-03

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0200602);国家自然科学基金(31572022, 31171867);北京市自然科学基金(6182033)

* 通信作者 E-mail: shwei@ippcaas.cn

为并列第一作者

曼陀罗^[5-7]等植物的种子萌发过程中发挥着重要作用,主要水解甘露聚糖主链之间的 β -1,4 共价键,侧链及水解产物可由同工酶 α -半乳糖苷酶及 β -甘露糖苷酶协同降解^[3,8]。由于 β -甘露聚糖酶与种子的休眠萌发密切相关,其在 20 世纪 70 年代已引起国内外的广泛关注,我国对该酶的研究主要集中在微生物发酵和饲料添加剂方面,在植物种子中的相关研究则较少^[9-11]。

种子中 β -甘露聚糖酶活性的检测是研究甘露聚糖酶的关键,其活性受内外因素影响较大,检测结果也易受 β -甘露聚糖酶同工酶 α -半乳糖苷酶及 β -甘露糖苷酶的影响。传统 β -甘露聚糖酶活性的测定主要有黏度测定法和分光光度法,前者准确度较高,但操作繁琐、耗时长;后者对部分种子测定效果好,但通用性差、准确度低^[12]。 β -甘露聚糖酶对调控种子的萌发具有重要作用,明确种子萌发过程中 β -甘露聚糖酶活性的动态变化,可为揭示外来杂草刺萼龙葵 *Solanum rostratum* Dunal 种子的休眠萌发机制提供依据。采用传统方法测定 β -甘露聚糖酶活性时适用性和效率不高,因此有必要建立一种可靠、有效的检测方法。本研究以刺萼龙葵种子为研究对象,基于 Downie 等^[13]和 Still 等^[14]的凝胶扩散法,拟优化建立一种灵敏度高、操作简便的测定方法,实现对种子中 β -甘露聚糖酶活性的准确和高效检测。

1 材料与方法

1.1 种子来源与处理

2007 年—2011 年连续 5 年在北京采集成熟刺萼龙葵种子,并对 2007 年种子分别采用湿润冷藏(4℃)、干燥冷藏(4℃)和室温干燥(25℃)3 种贮存方式备用。待测种子处理时 2007 年—2011 年贮存的种子相应的贮存年限为 5 年~1 年。剔除有机械损伤的种子和杂物,每处理选取 30 粒种子用蒸馏水反复冲洗 3 次、1%次氯酸钠浸泡 10 min,再将种子转移至垫有两层滤纸、含 5 mL 蒸馏水的直径为 9 cm 的培养皿中,置于培养箱内 30℃、黑暗条件下培养。分别选取相同培养时间的种子进行 β -甘露聚糖酶活性的测定。

1.2 凝胶扩散法基本方法与原理

将含有 β -甘露聚糖酶的种子粗酶提取液置于含有该酶专一性底物-甘露聚糖的琼脂糖培养基

中,通过粗酶提取液中的 β -甘露聚糖酶与底物接触,培养催化种子粗酶液水解底物。由于 β -甘露聚糖酶的水解作用可使水解后的底物与染色剂刚果红的结合能力丧失,利用底物与刚果红结合能力的差异进行染色,可在凝胶上形成明显的透明消化圈。根据透明消化圈直径大小与 β -甘露聚糖酶活性的线性关系,可以确定待测种子中酶活性的强弱^[13,15]。

1.3 刺萼龙葵种子中 β -甘露聚糖酶活性的测定

参照 Downie 等^[13]和 Still 等^[14]的凝胶扩散法,按照以下试验步骤进行刺萼龙葵种子中 β -甘露聚糖酶活力的测定。

1.3.1 凝胶制作

用 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH=5)配制浓度为 0.05%(m/V) LBG (Locust bean gum)溶液,置于 95℃的水浴锅中保温并搅拌 30 min,随后停止加热,冷却并将悬浮液转移至 50 mL 离心管中,于 4℃、11 000 g 离心 15 min。取离心后上清液配制 0.8%(m/V)的琼脂糖溶液,微波加热溶解,冷却至 65℃左右,取 27 mL 上述溶液倒入水平放置的规格为 100 mm×100 mm×15 mm 的一次性方形培养皿中,凝胶厚度为 5 mm。室温下聚合 1 h 后,用直径为 2 mm 的凝胶打孔器在培养皿内的凝胶上均匀打 36 孔,移除孔中残留的凝胶,封闭培养皿保湿备用。

1.3.2 种子中 β -甘露聚糖酶粗酶液的提取

针对不同贮存时间和贮存方式的刺萼龙葵种子,各取培养 5 d 的种子 30 粒,用解剖刀将种子的胚(含胚乳,去除种皮)逐一分离,用研钵碾碎并转移至 1.5 mL 离心管中,加入 300 μ L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH=5),于 30℃黑暗孵育培养 2 h,得到含 β -甘露聚糖酶的种子粗酶液。

1.3.3 水解反应

分别向制好的培养皿凝胶小孔中加入 2 μ L 含 β -甘露聚糖酶的种子粗酶液上清液,以等体积的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH=5)为对照,然后用封口膜密封培养皿并将其转移至具盖白瓷盘,瓷盘中放入单层滤纸并加适量的蒸馏水保持湿度(必要时可补加蒸馏水),密闭瓷盘,于 30℃黑暗条件下保温、保湿处理 20 h。

1.3.4 刚果红显色

取出经保温、保湿处理后的培养皿,加入 10 mL

0.5%(m/V)的刚果红染色液,置于水平摇床60 r/min、30℃染色 20 min,移出染色液,蒸馏水轻柔洗涤 1 min,接着将凝胶用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH=7)缓慢振荡洗涤 1~2 min,可清楚地显示出水解消化圈,然后用 80%乙醇洗涤使消化圈边缘清晰。将显色凝胶置于扫描仪(EPSON STD 4800)中进行图像扫描,消化圈直径利用 WinSeedle 系统进行测量。

1.3.5 β-甘露聚糖酶标准曲线的制作

为建立β-甘露聚糖酶活性与底物消化圈直径间的定量关系曲线,将β-甘露聚糖酶标准品(酶活性 46 U/mg, Megazyme 公司)用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH=5)梯度稀释至 5 000、50 000、100 000、200 000、400 000、800 000、1 600 000 倍。分别取 2 μL 稀释的标准β-甘露聚糖酶酶液,以稀释所用的缓冲液为对照,按 1.3.3、1.3.4 的步骤进行水解和刚果红显色反应。根据β-甘露聚糖酶标准品说明及酶活性相关规定^[16],酶活性单位 U 定义为:在一定条件下每分钟水解底物甘露聚糖形成 1 μmol 甘露糖时所需的β-甘露聚糖酶为 1 个酶活性单位,即

1 U=1 μmol/(min•mg)=1 000 nmol/(min•mg)。β-甘露聚糖酶标准品的活性为 46 000 nmol/(min•mg),则梯度稀释后的酶活性依次为 9.2、0.92、0.46、0.23、0.115、0.057 5、0.028 75 nmol/(min•mg)。以水解消化圈的直径为横坐标,不同稀释倍数的标准β-甘露聚糖酶的活性为纵坐标作图,拟合方程可得β-甘露聚糖酶的标准曲线。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的拟合和建立

不同稀释倍数的标准β-甘露聚糖酶可在含专一性底物甘露聚糖的凝胶上水解产生不同大小的透明消化圈,消化圈直径与酶活性呈显著的正相关,酶活性越高消化圈直径越大,酶活性越低则消化圈直径越小。对不同标准β-甘露聚糖酶的梯度酶活性与消化圈直径进行线性拟合,分析比较不同的拟合方程,发现底物消化圈直径(x)与酶活性(y)的拟合曲线为指数方程时效果最佳,据此建立了相关的标准曲线方程为 $y=0.0041e^{0.3926x}$ ($R^2=0.967$) (图 1)。

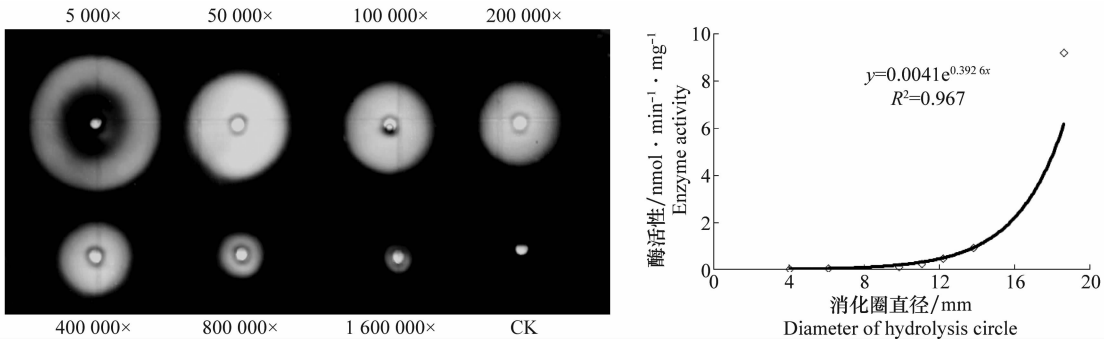


图 1 标准β-甘露聚糖酶活性与消化圈直径的关系

Fig. 1 Relationship between standard endo-β-mannanase activity and the diameter of the hydrolysis circle

2.2 刺萼龙葵种子中β-甘露聚糖酶活性的检测

2.2.1 贮存时间对β-甘露聚糖酶活性的影响

应用改进的凝胶扩散法测定了不同贮存时间的刺萼龙葵种子中β-甘露聚糖酶的活性。结果表明,种子中β-甘露聚糖酶的活性随贮存时间的增加呈现下降的趋势,其中贮存 5 年(2007 年)的种子中该酶的活性为 0.03 nmol/(min•mg),显著低于贮存 1 年(2011 年)的种子中酶的活性 0.15 nmol/(min•mg)。总体来看,贮存 3 年以内的种子(2009 年—2011 年)中β-甘露聚糖酶的活性差异不显著,但均显著高于贮存 3 年以上的种子中该酶的活性,说明刺萼龙葵种子

贮存 3 年以后,种子中β-甘露聚糖酶的活性开始出现显著降低(图 2)。

2.2.2 贮存条件对β-甘露聚糖酶活性的影响

对不同贮存条件下刺萼龙葵种子中β-甘露聚糖酶的活性进行了测定,结果表明,不同处理间种子中β-甘露聚糖酶的活性存在显著差异。湿润冷藏的种子中该酶活性为 0.12 nmol/(min•mg),高于干燥冷藏和干燥室温贮存的种子中的酶活性,后二者分别为 0.02 和 0.03 nmol/(min•mg)(图 3)。从以上结果可以看出,贮存条件会显著影响刺萼龙葵种子中β-甘露聚糖酶的活性,进而影响其种子的休眠萌发特性。

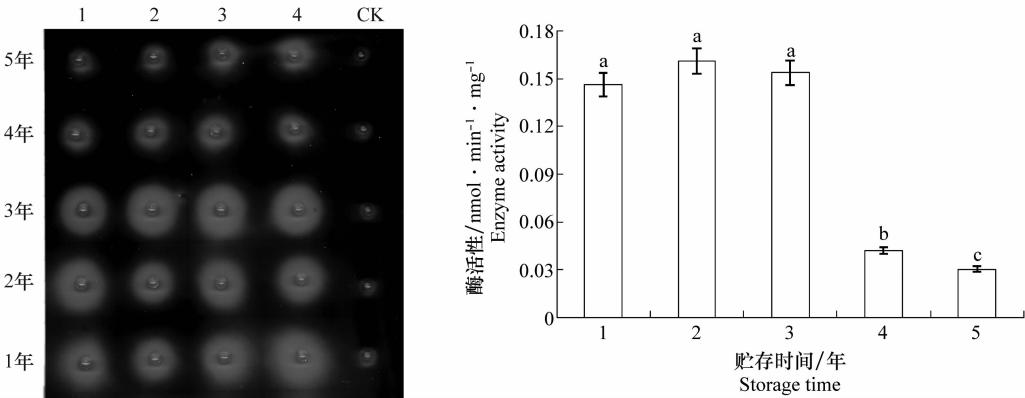
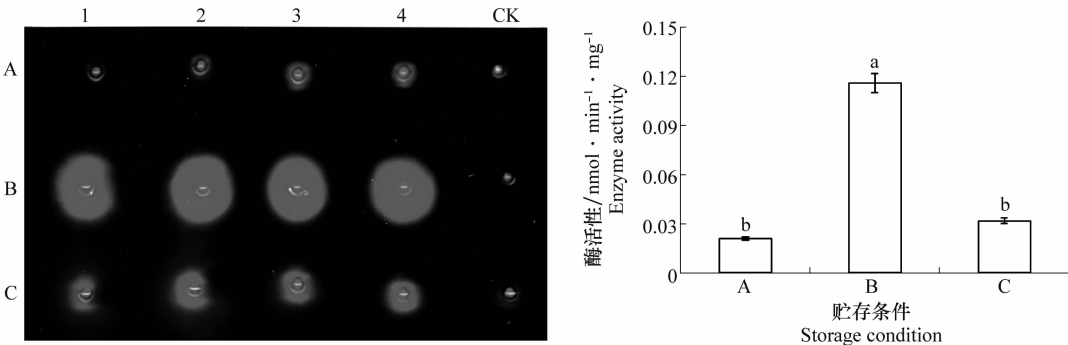


图 2 贮存时间对刺萼龙葵种子β-甘露聚糖酶活性的影响

Fig. 2 Effects of storage time on endo-β-mannanase activities in buffalobur seeds



A: 干燥冷藏(4℃); B: 湿润冷藏(4℃); C: 干燥室温贮存(25℃)
A: Seeds stored dry in the refrigerator (4℃); B: Seeds stored wet in the refrigerator (4℃); C: Seeds stored dry at room temperature (25℃)

图 3 不同贮存条件下刺萼龙葵种子中β-甘露聚糖酶活性的变化

Fig. 3 Changes of endo-β-mannanase activities in buffalobur seeds under different storage conditions

3 讨论

已有研究表明,β-甘露聚糖酶与植物种子休眠萌发密切相关,在种子细胞壁的降解和休眠解除方面具有重要作用^[5,17-18]。明确β-甘露聚糖酶影响杂草种子休眠和萌发的机制,对杂草发生和出苗进行预测和合理调控,将为杂草的综合治理提供重要依据^[19]。建立可靠、有效的种子中β-甘露聚糖酶活性检测方法,是开展相关研究的关键。

分光光度法(即 DNS 法)主要利用 3,5-二硝基水杨酸与还原糖在碱性条件下的颜色反应,对β-甘露聚糖酶活力进行测定。该方法尽管测定流程较为简单,但由于种子粗酶液中除了β-甘露聚糖酶外,还同时存在同工酶α-半乳糖苷酶及β-甘露糖苷酶,可以对β-甘露聚糖酶水解产物进一步消化产生还原糖,造成测定结果不准确^[3,12,20]。黏度测定法利用底物消化反应前后黏度的变化,对β-甘露聚糖酶活力进行测定。尽管可检测到较低的酶活,但同样易受β-甘露聚糖酶的同工酶影响,并且样品逐一检测,效率

较低^[15]。因而上述两种传统方法在测定β-甘露聚糖酶的实际应用过程中均受到不同程度的限制。

与传统方法相比,凝胶扩散法采用了刚果红显色和专一性底物 LBG,可降低种子粗酶液中同工酶的干扰,特异性强,降低了实验误差。凝胶扩散法检测灵敏度高,可检测稀释至 160 万倍的标准酶活力 0.029 nmol/(min·mg),且检测过程中重复性好,可同时对大批量种子样品进行酶活性测定,检测成本较低、效率较高。凝胶扩散法综合了传统分光光度法效率较高和黏度测定法灵敏度较高的优势,准确可靠,具有较好的实用和推广价值。由于种子大小及胚和胚乳成分不同,凝胶扩散法是否可用于其他种子中β-甘露聚糖酶活性的检测,不同种子的反应体系是否应做相应调整,还有待进一步的研究。

4 结论

本研究建立了检测外来杂草刺萼龙葵种子中β-甘露聚糖酶活性的凝胶扩散法,可同时检测多个种子样品,检测方法灵敏度高、重复性好,具有良好的实

用性。该方法的建立为不同贮存时间和贮存条件下刺萼龙葵种子中 β -甘露聚糖酶活性的检测提供了技术支撑,为刺萼龙葵种子休眠水平的动态监测及其种子季节性休眠机制的阐明提供了科学的参考依据。

参考文献

[1] 李香菊. 近年我国农田杂草防控中的突出问题与治理对策[J]. 植物保护, 2018, 44(5): 77-84.

[2] 强胜. 中国杂草生物学研究的新进展[J]. 杂草学报, 2018, 36(2): 1-9.

[3] 任艳芳, 何俊瑜, 王晓峰. 植物 β -甘露聚糖酶的研究现状[J]. 种子, 2007, 26(4): 44-49.

[4] MORRIS K, LINKIES A, MÜLLER K, et al. Regulation of seed germination in the close *Arabidopsis* relative *Lepidium sativum*: a global tissue-specific transcript analysis [J]. Plant Physiology, 2011, 155: 1851-1870.

[5] HALMER P, BEWLEY J D, THORPE T A. Enzyme to break down lettuce endosperm cell wall during gibberellin- and light-induced germination [J]. Nature, 1975, 258: 716-718.

[6] NONOGAKI H, NOMAGUCHI M, MOROHASHI Y. Endo- β -mannanases in the endosperm of germinated tomato seeds [J]. Plant Physiology, 1995, 94: 328-334.

[7] SANCHEZ R A, SUNELL L, LABAVITCH J M, et al. Changes in the endosperm cell walls of two *Datura* species before radicle protrusion [J]. Plant Physiology, 1990, 93: 89-97.

[8] 王傲雪, 张丙秀, 李景富. β -1,4-甘露聚糖内切酶在番茄发育中的作用[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 1157-1161.

[9] 张蕊, 朱虹, 周峻沛, 等. β -甘露聚糖酶分子生物学研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(5): 34-46.

[10] 崔栩, 曹鹤鹤, 李瑞国. β -甘露聚糖酶研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(15): 69-72.

[11] 王瑶, 王睿琪, 那金, 等. 甘露聚糖酶协同水解甘露聚糖研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, 33(21): 21-26.

[12] BOURGAULT R, BEWLEY J D. Gel diffusion assays for endo- β -mannanase and pectin methylesterase can underestimate enzyme activity due to proteolytic degradation: a remedy [J]. Analytical Biochemistry, 2002, 300: 87-93.

[13] DOWNIE B, HILHORST H W M, BEWLEY J D. A new assay for quantifying endo- β -mannanase activity using Congo red dye [J]. Phytochemistry, 1994, 36: 829-835.

[14] STILL D W, DAHAL P, BRADFORD K J. A single-seed assay for endo- β -mannanase activity from tomato endosperm and radicle tissues [J]. Plant Physiology, 1997, 113: 13-20.

[15] 任艳芳. 水稻种子萌发过程中 β -甘露聚糖酶的表达[D]. 广州: 华南农业大学, 2005.

[16] 王晓丹, 郭丽琼, 赵力超, 等. 木聚糖酶活性测定方法及酶活性单位定义[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 128-131.

[17] BEWLEY J D. Breaking down the walls—a role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy? [J]. Trends in Plant Science, 1997, 2: 464-469.

[18] MO B, BEWLEY J D. The relationship between β -mannosidase and endo- β -mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison of seed populations and individual seeds [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(392): 2503-2510.

[19] 强胜. 我国杂草学研究现状及其发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 1-5.

[20] PINHO G P, MATOSO J R M, SILVERIO F O, et al. A new spectrophotometric method for determining the enzymatic activity of endo- β -mannanase in seeds [J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2014, 25(7): 1246-1252.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 147 页)

[13] 吴道军, 谭晏, 万涛. 内生细菌生防作用及机理简述[J]. 绿色科技, 2016(23): 5-6.

[14] 李俊州, 文才艺. 植物病害生防细菌研究进展[J]. 河南农业科学, 2015, 44(10): 1-7.

[15] 李艳琴, 申泉, 刘彬彬, 等. 番茄内生菌分离及其 ERIC-PCR 指纹图谱分析[J]. 微生物学通报, 2003, 30(5): 89-93.

[16] 黎起秦, 罗宽, 林纬, 等. 内生菌 B47 的定殖能力及其对番茄青枯病的防治作用[J]. 植物保护学报, 2006(4): 363-368.

[17] 黄敬瑜, 张楚军, 姚瑜龙, 等. 植物内生菌生物抗菌活性物质研究进展[J]. 生物工程学报, 2017, 33(2): 178-186.

[18] PURI A, PADDA K P, CHANWAY C P. Nitrogen-fixation by endophytic bacteria in agricultural crops: Recent advances [M] Nitrogen in Agriculture-Updates, 2018.

[19] 易龙, 马冠华, 肖崇刚. 烟草根黑腐病拮抗内生细菌的筛选及其抑菌作用[J]. 微生物学通报, 2012, 39(10): 1464-1470.

[20] BAIS H P, FALL R, VIVANCO J M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin pro-

duction [J]. Plant Physiology, 2004, 134(1): 307-319.

[21] JULKOWSKA D, OBUCHOWSKI M, HOLLAND I B, et al. Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(1): 65-76.

[22] 马佳, 李颖, 胡栋, 等. 芽胞杆菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2018(4): 639-648.

[23] 宋利沙, 蒋妮, 缪剑华, 等. 肺节风炭疽病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 植物保护, 2018, 44(6): 61-65.

[24] 杨定祥, 林巧玲, 卢乃会, 等. 拮抗辣椒疫霉菌海洋细菌菌株 SH-27 的筛选鉴定及其防病促生作用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 54-63.

[25] 魏立娟, 王玉琴, 杨成德, 等. 青海省海晏县线叶嵩草内生细菌的生物功能鉴定及测定[J]. 草地学报, 2018, 26(3): 764-769.

[26] 程怀月, 石先阳, 弗赖森. 草螺菌 RE3-3 合成生长素及其促生作用的研究[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(5): 20-26.

(责任编辑: 田 喆)