

一种测定龙眼果柄离层纤维素酶活性的方法

杨子琴^{1,2}, 李建国¹, 王惠聪¹, 黄旭明¹

(1 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642;
2 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:介绍一种测定离层纤维素酶活性的新方法—凝胶扩散-组织印迹法. 给出了该测定方法的基本原理、流程、步骤及计算方法, 并以此方法测定了龙眼果实脱落过程中果柄离层纤维素酶活性的变化. 结果表明该方法需要材料少, 灵敏度高, 纤维素酶活性最低可检出 2×10^{-6} U.

关键词:纤维素酶; 离层; 凝胶扩散-组织印迹法
中图分类号:S667.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2012)02-0175-03

An Assay Method for Cellulase Activity in Longan Pedicle Abscission Layer

YANG Zi-qin^{1,2}, LI Jian-guo¹, WANG Hui-cong¹, HUANG Xu-ming¹

(1 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical
Agricultural Science, Danzhou 571737, China)

Abstract: A new determination method of cellulase activity—gel diffusion-tissue blot was described. This paper provided the basic principle, operation procedures and calculation methods for cellulase assay, and applied this method to analyze the activity of cellulase in the abscission layer in longan pedicle during fruit abscission. The results showed that this method had advantages such as less material requirement, high sensitivity, good reproducibility, simple operation, and saving time and labor, and it is very suitable for the determination of cellulase activity in abscission layer.

Key words: cellulase; abscission layer; gel diffusion-tissue blot method

组织形态学上将植物器官或组织对脱落响应的区域及其邻近部分称为“离区(Abscission zone)”. 将离区内仅发生组织与细胞分离的数层细胞叫“离层(Abscission layer)”. 在细胞水平上, 脱落是由离区细胞中间层的水解所致, 该现象主要依赖细胞壁修饰和水解酶的作用. 迄今为止, 已发现许多与脱落有关的细胞壁降解酶, 如多聚半乳糖醛酸酶、果胶甲酯酶、果胶酶及众所周知的纤维素酶—— β -1,4-葡聚糖酶^[1-2].
Bunya-atichart 等^[3]的研究发现乙烯处理的花蕾和即将发生脱落的花蕾中均可检测到 β -1,4-葡聚糖酶活性, 这些数据表明了 β -1,4-葡聚糖酶可能在脱

落过程中起作用. 已在番茄、桃及龙眼等多种植物中克隆到内切 β -1,4-葡聚糖酶基因并对其功能作了鉴定, 证实其在雌蕊、花蒂、叶片及果实的脱落中有作用^[1,4-5]. Patterson 等^[6]在对拟南芥的 5 个特异延迟花器官脱落突变体 (*dab1-1*, *dab2-1*, *dab3-1*, *dab3-2* 和 *dab3-3*) 的研究中发现这些突变体的纤维素酶表达模式有所改变. 脱落期间, 许多植物中均有纤维素酶表达且有活性^[7-9].
20 年来一直采用分光光度法来测定纤维素酶活性, 但该方法操作步骤繁多, 需要试验材料量较大. 我们对龙眼离层进行组织学观察, 结果表明离层由 4 ~ 10 层薄壁细胞构成^[5]. 由于组织区域微小及构成离区

的细胞数不确定,用分光光度法测定果柄离层纤维素酶活性难度大,结果的重现性不高,因此本文介绍凝胶扩散-组织印迹法测定离层纤维素酶活性.琼脂糖扩散法可用于微量样品的纤维素酶分析^[10],结合组织印迹法,实现直接分析离区组织纤维素酶活性,结果直观,利用标准酶,可进行精确定量分析.

1 原理

将离层组织置于含有纤维素酶底物——羧甲基纤维素钠的琼脂糖培养基上,离层组织中的纤维素酶接触到底物,催化其水解反应,产物丧失对刚果红的显色反应,因此,经刚果红染色后可在凝胶上形成一个透明圆圈,且透明圈直径与纤维素酶活性呈线性关系.

2 材料与方法

2.1 材料与处理

试验于 2010 年进行,供试材料为种植于华南农业大学试验果场内的花期一致的 10~11 年生‘储良’龙眼树.分别选取 4 株生长势相当的龙眼树.自盛花后 50 d(果实发育中期)起,每株选取 5~8 mm 直径的 10 个结果母枝,在距果穗基部约 10 cm 处环割,宽度 2 mm,深达木质部,同时摘除环割口以上的叶片,中断果实碳素营养供应,人为制造果实饥饿胁迫,以诱导果穗上全部果实在短时间内脱落,追踪脱落过程中果柄离层纤维素酶的活性变化.同时,以未环割果穗作对照.处理后跟踪观察果实脱落情况,同时每天采集处理和对照的果穗进行纤维素酶活性分析.

2.2 凝胶扩散-组织印迹法测定离层纤维素酶活性

琼脂糖胶板的制作参照罗长才等^[10]的方法并作调整:先用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 5.0)配制 1 g/L 的羧甲基纤维素钠溶液,每 100 mL 加入 1.2 g 琼脂糖,微波加热溶解,冷却到 65℃左右,将加热溶解后的琼脂糖注入 65℃预热的凝胶聚胶板中(195 mm×120 mm×0.5 mm),室温冷凝 1 h.取出胶块放置在具盖的白磁盘中,胶块周围铺满湿巾.

反应:切取果柄离层上下 1 mm 段,沿离层切开,切面向下,放置在琼脂糖胶块上,间隔 20 mm.然后盖上磁盘盖,放置在人工气候箱中,40℃下保温、保湿 18 h.

显色:移除果柄离层,将胶板置于 2 g/L 的刚果红溶液中,染色 30 min,并依次用自来水和 1 mol/L 的 NaCl 彻底洗去染液.然后用 φ 为 5% 的醋酸溶液

固色 8 min. 测量并拍照.

凝胶扩散法测纤维素酶活性的标准曲线的制作:将纤维素酶标准品用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液梯度稀释 10 倍点样.显色步骤同上,以透明圈的直径为横坐标,纤维素酶活力为纵坐标作图,可得到琼脂糖扩散法测定纤维素酶活的标准曲线.

3 结果与分析

3.1 标准曲线的制作

利用不同剂量标准纤维素酶可在含底物的凝胶上产生不同大小的水解反应圈,其直径与酶剂量呈显著的正相关(图 1).通过酶剂量与水解圈直径的拟合分析,得到水解圈直径-酶活性的标准曲线为指数方程: $y=1 \times 10^{-8} e^{9.8082x}$ ($R^2=0.9939$)(图 2).

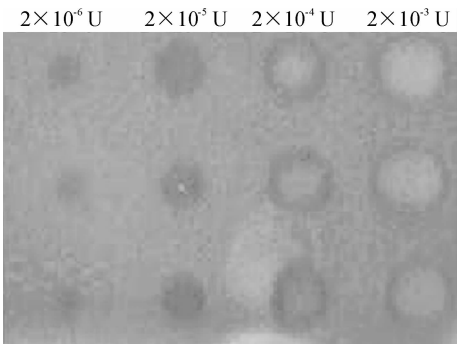


图 1 不同剂量标准纤维素酶的水解圈
Fig. 1 The hydrolysis circles of different doses of standard cellulase

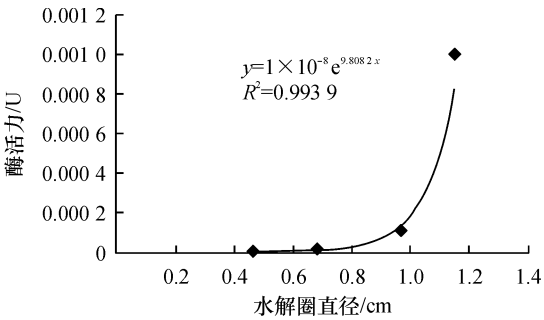


图 2 纤维素酶活性标准曲线
Fig. 2 Standard curve of cellulase activities

3.2 脱落过程中果柄离层纤维素酶活性变化

凝胶扩散-组织印迹法用于检测龙眼果柄离层组织纤维素酶活性的效果如图 3 所示,在处理的过程(以饥饿胁迫诱导)中,果柄离层组织产生纤维素酶水解圈随脱落进程而逐渐扩大,表明该酶在这一过程中明显积累,活性提高.而非脱落的果实(对照)纤维素酶水解圈始终很小.通过标准曲线计算得到各样品的实际酶活性如表 1 所示.

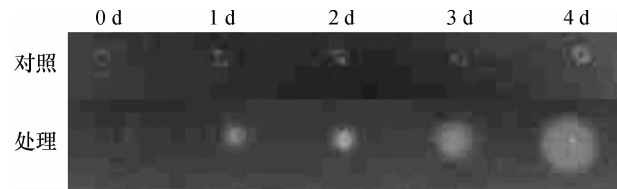


图3 果柄离区纤维素酶活性变化的凝胶扩散分析

Fig.3 Changes in cellulase activity in the abscission zone in longan pedicle

表 1 各样品的实际酶活性			U
Tab.1 The actual activities of each sample			
$t_{处理}/d$	对照	处理	
0	1.41×10^{-7}	1.41×10^{-7}	
1	1.41×10^{-7}	8.15×10^{-7}	
2	1.41×10^{-7}	1.09×10^{-6}	
3	1.41×10^{-7}	1.64×10^{-6}	
4	1.41×10^{-7}	1.92×10^{-2}	

以饥饿胁迫处理每天果柄纤维素酶活性与饥饿胁迫处理0 d酶活性的比值的对数计算出酶活性的相对值如图4所示.在脱落过程中,果柄离层纤维素酶相对活性持续增加,其中在处理第4天增加最为剧烈.

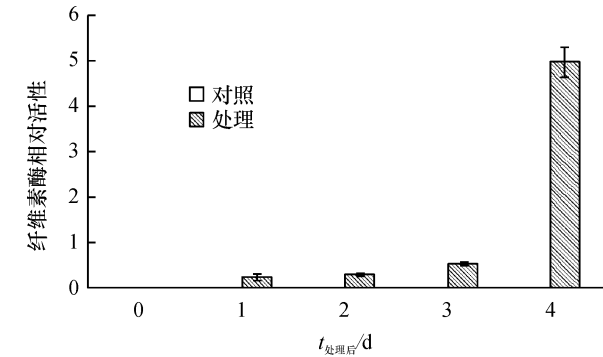


图4 龙眼脱落果(饥饿胁迫处理)和非脱落果(对照)果柄离区纤维素酶相对活性变化

Fig.4 Changes in relative activity of cellulase in the abscission zone in longan pedicle in abscising (starvation treatment) and non-abscising (control) fruit

4 结论

本试验所采用的凝胶扩散-组织印迹法可以直接分析单个果柄离层组织的纤维素酶,避免取材部

位的误差,这是比色法无法做到的,且操作简单,省时省工.与此同时,在每个胶块(195 mm×120 mm×0.5 mm)上可放置45个离层组织,因此可以同时对待批量样品进行检测,反应条件好控制,重现性好.

参考文献:

[1] KALAITZIS P, HONG S B, SOLOMOS T, et al. Molecular characterization of a tomato endo-beta-1, 4-glucanase gene expressed in mature pistils, abscission zones and fruit [J]. Plant Cell Physiology, 1999, 40(8): 905-908.

[2] PATTERSON S E. Cutting loose: Abscission and dehiscence in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 494-500.

[3] BUNYA-ATICHART K, KETSA S, VAN DOORN W G. Ethylene-sensitive and ethylene-insensitive abscission in *Dendrobium*: Correlation with polygalacturonase activity [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 60(1): 71-74.

[4] BONGHI C, RASCIO N, RAMINA A, et al. Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 20(5): 839-848.

[5] 杨子琴. 饥饿胁迫诱导龙眼果实脱落的信号发生与调控机理研究[D]. 广州:华南农业大学, 2011: 56-60.

[6] PATTERSON S E, BLEECKER A B. Ethylene-dependent and -independent processes associated with floral organ abscission in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2004, 134: 194-203.

[7] FERRARESE L, TRAINOTTI L, MORETTO P, et al. Differential ethylene-inducible expression of cellulase in pepper plants [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 29(4): 735-747.

[8] DEL CAMPILLO E, BENNETT A B. Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission [J]. Plant Physiol, 1996, 111(3): 813-820.

[9] BURNS J K, LEWANDOWSKI D J, NAIRN C J, et al. Endo-1, 4-β-glucanase gene expression and cell wall hydrolase activities during abscission in Valencia orange [J]. Physiologia Plantarum, 1998, 102(2): 217-225.

[10] 罗长才, 李莲, 刘亚力, 等. 琼脂扩散法测定加酶饲料中微量纤维素酶活力的研究 [J]. 饲料工业, 2003, 24(10): 39-41.

【责任编辑 李晓卉】