

# 聚丙烯酰胺凝胶电泳配合荧光增白剂显色 检测木霉几丁质酶同工酶谱<sup>\*</sup>

夏洪志<sup>1</sup> 杨合同<sup>2\*\*</sup> 黄玉杰<sup>2</sup>

(1 山东省科学院生物研究所 山东省应用微生物重点实验室 济南 250014 2 山东理工大学 淄博 255049)

**摘要** 为提高木霉几丁质酶检测方法的准确性和灵敏度,建立一种快速检测几丁质酶同工酶的方法。采用活性凝胶电泳、变性凝胶电泳、原位显色凝胶电泳结合荧光增白剂(Calcofluor white M2R)显色从绿色木霉 LTR-2 发酵产物中检测几丁质酶同工酶。活性凝胶电泳在粗酶液浓缩 5 倍时显示两条活性谱带,变性凝胶电泳在浓缩 10 倍时显示一条活性谱带,原位显色凝胶电泳在浓缩 20 倍时显示两条不清晰的活性谱带,SDS-PAGE 显示这两条活性谱带的分子量分别为 65kDa 和 42kDa。结果表明活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Calcofluor white M2R 显色相结合的方法在几丁质酶上样量为 0.47U 时具有较好的分辨能力,是检测木霉几丁质酶同工酶的有效的方法。

**关键词** 木霉 几丁质酶 聚丙烯酰胺凝胶电泳 荧光增白剂

**中图分类号** Q814

木霉(*Trichoderma* spp.)作为一种重要的植病生防因子一直受到普遍关注。研究表明,重寄生(mycoparasitism)是木霉主要作用机制之一<sup>[1]</sup>。在重寄生过程中,木霉产生的几丁质酶可以破坏含几丁质骨架成分病原真菌细胞壁,从而达到防治植物病害的效果。因此,系统地研究木霉几丁质酶系对于了解木霉的生防机制具有重要的意义。

Harman 等<sup>[2]</sup>利用变性凝胶电泳首先从 *T. harzianum* 粗酶液中检测到几丁质酶。由于此法操作简便,分辨率高,逐渐成为几丁质酶检测的常用方法,许多文献报道利用此法检测几丁质酶<sup>[3~6]</sup>。但最近有资料显示,一些几丁质酶在变性电泳后不能复性,从而显示不出活性电泳条带<sup>[7]</sup>。绿色木霉 LTR-2 是我所筛选出的一株在国家农业部登记的植病生防菌(登记证号为 LS97348),该菌株能够产生大量的几丁质酶,对蔬菜灰霉病和棉花立枯病等植物病害有明显的防治效果。本实验目的是研究木霉 LTR-2 的几丁质酶同工酶系,

建立一种快速检测几丁质酶同工酶的灵敏方法,为深入了解木霉的作用机理,克隆高效几丁质酶编码基因,进而构建基因工程菌提供有力工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及其培养基

绿色木霉(*Trichoderma viride*) LTR-2 由本实验室保存。

PDA 培养基:马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 17~20g,加水至 1000ml。

液体发酵培养基<sup>[8]</sup>: KNO<sub>3</sub> 10g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5g, FeCl<sub>3</sub> 2mg, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 10g,蔗糖 5g,胶体几丁质 5g,加水至 1000ml, pH=6.0。

胶体几丁质的制备<sup>[9]</sup>:称取 20g 粉状几丁质溶于 800ml 预冷的浓盐酸中,静置 4h,然后倒入 2L 预冷的 50% 的乙醇中过夜。后用蒸馏水冲洗至中性,并用水定容到 1000ml 备用。

### 1.2 粗酶液的制备

将绿色木霉 LTR-2 接种在 PDA 固体培养基上,28℃ 培养 6d 后,用无菌水洗下孢子,四层无菌纱布过滤,滤液为孢子悬浮液。调整孢子浓度为 10<sup>6</sup> 个/ml,然后以 2% 的接种量接种到装有 100ml 液体培养基的

收稿日期:2007-01-26 修回日期:2007-03-13

\* 国家“863”计划现代农业技术领域重大资助项目(2006AA10A211)

\*\*通讯作者,电子信箱:yanght@keylab.net



2.3 变性凝胶电泳

5 倍浓缩的粗酶液经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳并复性后,在含有荧光增白剂的平板上没有检测到清晰条带;10 倍浓缩液和 20 倍浓缩液电泳并复性后只显示 CHI65 一条活性谱带(图 3),说明变性凝胶电泳的灵敏度不如活性电泳凝胶高,检测到的酶种类减少,不适合于同工酶谱的检测。



图 1 LTR-2 粗酶 5 倍浓缩液经活性凝胶电泳后在含 calcofluor white M2R 的几丁质平板染色图谱

Fig.1 Chitinase activity staining of electrophoretically resolved native protein after chitin grown culture 5 times concentrated of *T. viride* LTR-2 by solid plate containing chitin and calcofluor white M2R



图 2 LTR-2 粗酶 20 倍浓缩液活性凝胶电泳后在几丁质平板染色图谱

Fig.2 Chitinase activity staining of electrophoretically resolved native protein after chitin grown culture 20 times concentrated of *T. viride* LTR-2 by solid plate containing chitin

2.4 原位显色电泳

5 倍和 10 倍浓缩的粗酶液经原位水解电泳后在含有荧光增白剂的平板上基本检测不到活性条带。20 倍浓缩液电泳后显色结果如图 4。几丁质酶电泳谱带呈弥散形,并且条带不清晰。这表明,原位显色电泳可以保持同工酶的活性,但是需要较大的酶量。程大也

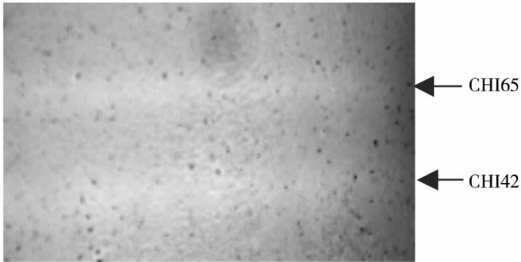


图 3 LTR-2 粗酶 10 倍浓缩液变性凝胶电泳复性后在含 calcofluor white M2R 的几丁质平板染色图谱

Fig.3 Chitinase activity staining of renatured protein of denatured electrophoretically resolved protein after chitin grown culture 10 times concentrated of *T. viride* LTR-2 by solid plate containing chitin and calcofluor white M2R

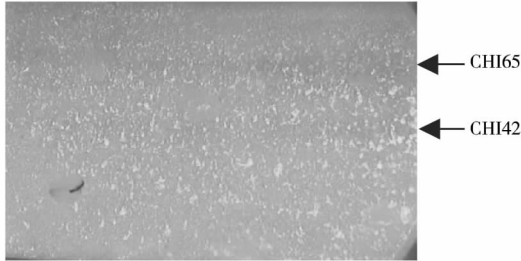


图 4 LTR-2 粗酶 20 倍浓缩液经原位电泳后在含 Calcofluor white M2R 的几丁质平板染色图谱

Fig.4 Chitinase activity staining of renatured protein of in situ electrophoretically resolved protein after chitin grown culture 20 times concentrated of *T. viride* LTR-2 by solid plate containing chitin and calcofluor white M2R

2.5 分子量的确定

切胶纯化后的几丁质酶经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分别呈现一条单一的谱带,结果如图 5,两种几丁质酶的分子量分别是 65kDa 和 42kDa。分子量为 42kDa 的几丁质酶在木霉中普遍存在,许多文献报道了对该种酶的分离纯化<sup>[3,14]</sup>。而对于分子量为 65kDa 的几丁质酶在木霉中未见报道,可能为一种新的几丁质酶。

3 讨论

在几丁质酶活性研究中应用最多的是变性凝胶电泳。但是该方法有一些不足之处。首先,变性凝胶电泳结束后要进行复性才能进行酶活性检测,复性过程中酶的活性有损失,这将导致一些含量低的几丁质酶

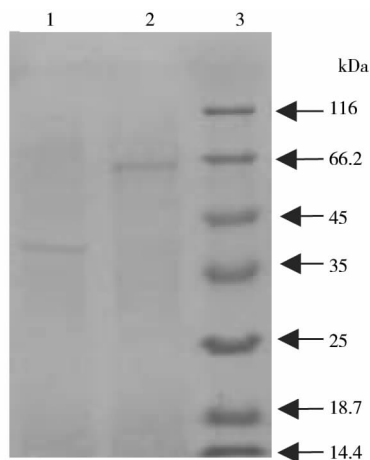


图5 几丁质酶活性谱带回收后变性凝胶电泳图谱

1:CHI42;2:CHI65;3:中分子量蛋白 marker

Fig.5 Chitinase isozymes on SDS-PAGE gel

同工酶检测不到,降低了电泳检测的灵敏度;其次,一些酶在变性电泳后不能复性,例如 CHIT73 在复性后就检测不到活性<sup>[7]</sup>。本研究中绿色木霉 LTR-2 的 CHI42 在复性后也没有检测到活性。

Trudel 等<sup>[15]</sup>曾经报道利用原位水解方法进行几丁质酶检测,但是这种水解方法需要一种昂贵的乙二醇几丁质来代替胶体几丁质作为反应底物,并且由于在电泳胶中加入的乙二醇几丁质能部分结合几丁质酶,影响了几丁质酶的电泳速率,从而使几丁质酶电泳谱带呈弥散形,很难形成明显的单一电泳谱带<sup>[8]</sup>。在本实验过程中,由于在凝胶中加入了不溶性胶体几丁质,它不仅部分结合了几丁质酶,还形成分子排阻现象,对几丁质酶的电泳的速率影响更大,导致在凝胶上看不到清晰的电泳图谱。但是在酶量足够大的情况下,该方法能够用来检测同工酶的种类,只是同活性电泳相比灵敏度较差。

活性凝胶电泳在几丁质酶检测过程中应用较少,但是该电泳不需要变性-复性这一过程,电泳后可直接将凝胶平铺到平板上显色,减少了丢失酶的可能性。本实验也证实了这一点。在染色方法相同的情况下,活性凝胶电泳的检测灵敏度是变性凝胶电泳的近 2 倍,是原位凝胶电泳的 4 倍,并且显色清晰。因此活性凝胶电泳适合于分离不同分子量的同工酶。

荧光增白剂 Calcofluor white M2R 能和胶体几丁质结合在紫外灯下显示蓝色背景,当几丁质被分解后失去荧光显黑色条带<sup>[16]</sup>。由于 Calcofluor white M2R 的分辨率非常高,所以广泛应用于荧光显微技术中。据

报道利用荧光增白剂进行几丁质酶活性显色的灵敏度可以达到 0.5U 左右<sup>[13]</sup>。从本实验结果来看,显色灵敏度为 0.47U,与文献报道数据相近,但是在总酶活相近的情况下利用荧光增白剂显色能够检测到两条活性带,所以该方法适合于同工酶的检测。

综上所述,活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Calcofluor white M2R 显色相结合的方法,在检测木霉几丁质酶同工酶时具有良好的分辨率和灵敏度。采用此种方法,在绿色木霉 LTR-2 发酵产物中分离得到了两种几丁质酶同工酶,分子量分别为 65kDa 和 42kDa。该方法简便、快捷、灵敏性高,是检测木霉几丁质酶同工酶的有效方法。

## 参考文献

- [1] 徐同,柳良好. 木霉几丁质酶及其对植物病原真菌的拮抗作用. 植物病理学报,2002,32(2):97~102  
Xu T, Liu L H. Acta Phytopathologica Sinica, 2002, 32(2):97~102
- [2] Harman G E, Hayes C K, Lorito M, et al. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology, 1993, 83:313~318
- [3] Ulhoa J, Peberdy F. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. J Gen Microbiol, 1991, 23:285~289
- [4] Haran S, Schickler H, Oppenheim, et al. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. Mycol Res, 1995, 99:441~446
- [5] Lorito M, Hayes C K, Pitro D A, et al. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1, 3- $\beta$ -glucosidase and an N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 1994, 84:398~405
- [6] De la Cruz J, Hidalgo-Gallego A, Lora J M, et al. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry, 1992, (206):859~867
- [7] Jennifer L, Guthrie, Sagal K, et al. An improved method for detection and quantification of chitinase activities. Can Microbiol, 2005, 51:491~495
- [8] 杨合同,肖性龙,徐砚珂. 木霉菌平板抗菌几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性与病害防治效果. 山东科学, 2003, 16(2):1~6  
Yang H T, Xiao X L, Xu J K. Shan Dong Science, 2003, 16(2):1~6
- [9] 李华,刘开启,王革. 利用还原糖法测定木霉菌产几丁质酶特性. 仲恺农业技术学院学报, 2003, 16(1):19~22  
Li H, Liu K Q, Wang G. Journal Zhongkai Agrotechnical College, 2003, 16(1):19~22

- [10] Tsukamoto T, Koga D, Ide A, et al. Purification and some properties of chitinases from yam *Dioscorea opposita* Thunb. Agric Biol Chem, 1984, 48(4): 931 ~ 939
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann Biochem, 1976, 72: 1105 ~ 1112
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000. 112 ~ 123
- Wang J ZH, Fan M. Protein Technique Manua. Beijing: Science Press, 2000. 112 ~ 123
- [13] Vipul G, Vyas P R, Chhatpar H S. Chhatpar. Activity staining method of chitinase on chitin agar plate through polyacrylamide gel electrophoresis. African Journal of Biotechnology, 2005, 4(1): 87 ~ 90
- [14] 张世宏, 李多川, 刘开启, 等. 哈茨木霉 S30 胞外几丁质酶的纯化及特性. 中国生物防治, 2000, 16(3): 107 ~ 110
- Zhang SH H, Li D CH, Liu K Q, et al. Chinese Journal of Biological Control, 2000, 16(3): 107 ~ 110
- [15] Trudel J, Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem, 1989, 178: 362 ~ 366
- [16] Vaidya R J, Macmi S L A, Vyas P R, et al. The novel method for isolating chitinolytic bacteria and its application in screening for hyperchitinase producing mutant of *Alcaligenes xylosoxydans*. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36: 129 ~ 134

## Activity Detecting Method for Chitinase Isozymes of *Trichoderma* spp. Through Active Polyacrylamide Gel Electrophoresis with Calcofluor White M2R

XIA Hong-zhi<sup>1</sup> YANG He-tong<sup>2</sup> HANG Yu-jie<sup>2</sup>

(1 The Biology Institute of Shandong Academic of Sciences, The Key Lab of apply microorganism of Shandong Province, Jinan 250014, China 2 Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

**Abstract** In order to improve the accuracy and sensitivity in detecting of chitinase isozymes from *Trichoderma* spp., a rapid sensitive method is established. It was employed to detect chitinase isozymes from *Trichoderma viride* LTR-2 through native gel electrophoresis, denatured gel electrophoresis and in situ gel electrophoresis with Calcofluor white M2R. Two chitinase isozymes native bands CHI65 and CHI42 were revealed in solid plate containing chitin and Calcofluor white M2R with native gel electrophoresis after chitin grown culture was concentrated 5 times. The two bands showed a smear instead of well-defined band with in situ gel electrophoresis after 20 times concentration. While only CHI65 chitinase was found with denatured gel electrophoresis after 10 times concentration. The molecular weight of CHI65 and CHI42 was separately about 65kDa and 42kDa. As a result, it was suitable for detecting chitinase isozymes through active gel electrophoresis with Calcofluor white M2R. The result showed that it was effective for differentiation among chitinase isozymes when total chitinase loading amount was 0.47U.

**Key words** *Trichoderma* Chitinase Polyacrylamide gel electrophoresis Calcofluor white M2R