

松材线虫体外酶组成分析*

严东辉 杨宝君

摘要 将表面消毒的松材线虫,在 Tris-HCl 缓冲液中振荡培养,培养液经硫酸铵沉淀、透析、冷冻真空干燥,制成的干样,用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果表明,松材线虫能向体外分泌多种可溶性蛋白,对其中酶组成分析发现有纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、淀粉酶等。同样条件下未能检出 β -半乳糖酶、 β -木糖酶、 β -葡聚糖酶、漆酶等。

关键词 松材线虫 分泌物 蛋白 体外酶

为寻求松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle) 与拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya et Enda) 及假伞滑刃线虫(*Bursaphelenchus fraudulentus* (Ruhm) Goodey) 三者种间及其种内致病差异的原因,对松材线虫组织提取液中酶组成研究较多^[1-3],而对其向体外分泌的酶的组成,除纤维素酶外则未见报道。日本研究推测,松材线虫分泌的纤维素酶是寄主早期病理空洞化现象的原因^[3,4]。由于线虫的分泌物的组成和含量都影响着植物对病害的反应^[5],因此进行了对松材线虫分泌物成分,尤其是酶的种类的研究,以期进一步探索发病机制和寻求新的防治途径。

1 材料与方法

1.1 供试松材线虫来源

松材线虫采自南京,寄主为黑松(*Pinus thunbergii* Parl.)。

1.2 松材线虫分泌物的制取

用多毛孢(*Pestalotia* sp.) 培养松材线虫,以浅盘法收集线虫。1 500 rpm 离心 5 min,表面消毒和无菌水漂洗各 3 次,消毒液为 0.002% 放线菌酮(Serva 公司)及 0.1% 硫酸链霉素(Serva 公司)混合液,每次消毒时,线虫在消毒液中的时间不超过 10 min。线虫转入经灭菌的 100 mL 0.05 mol、pH 7.2 的 Tris-HCl(Tris: B. M. 公司, HCl: 分析纯,北京化工厂)缓冲液中振荡培养^[5],缓冲液分装于 3 个三角瓶中。培养条件为 25 ℃、150 rpm。72 h 后(线虫浓度 6×10^5 / mL) 5 000 rpm, 5 min 离心,取上清液经 0.22 μ m 微膜过滤后,4 ℃ 下,100% (NH₄)₂SO₄(分析纯,北京化学试剂三厂)沉淀,沉淀经离心后,重蒸馏水透析(透析袋 D21 mm),透析后的样品经 18 000 rpm, 20 min 离心。取上清液冷冻真空干燥,即得松材线虫分泌物干样品,样品保存于 -20 ℃ 下待用。

1.3 线虫体外蛋白及酶的分析

1996—12—20 收稿。

严东辉助理研究员,杨宝君(中国林业科学研究院森林保护研究所 北京 100091)。

* 本文为 1995~1997 年国家自然科学基金“松材线虫体外酶组成及作用的研究”课题部分内容;1995 年植物病虫害生物学国家重点开放实验室基金课题。

聚丙烯酰胺凝胶垂直板状电泳(DYY-III28A 电泳槽,北京六一仪器厂),30%丙稀酰胺溶液(丙稀酰胺: Serva 公司,双丙稀: Sigma 公司,丙 双丙= 29 1,TEMED: Serve 公司),过硫酸铵(Serva 公司)聚合,5%积层胶。电泳时积层胶电压 100 V,分离胶 200 V。

1.3.1 蛋白分析 硝酸银(分析纯,北京化工厂)染色法、考马斯亮蓝 R-250(Serve 公司)染色法^[7]。分离胶浓度为 8%。蛋白带迁移率 $R_f =$ 该带在分离胶上的迁移距离/电泳指示剂在胶上的迁移距离。

1.3.2 酶类分析

1.3.2.1 纤维素酶(E. C. 3.2. 1. 4) 参考 R. Goren 的方法^[8],分离胶浓度 10%,含 0.2% Na-CMC(300~800 cp,北京化学试剂公司经销)。37 下,胶在 0.2 mol 磷酸盐缓冲液(pH6.2)中浸 8 min,倾出缓冲液后胶继续在缓冲液饱和空间中温育 18 h。2%碘化钾-0.2%碘混合液中 10 min,60%硫酸显色至适宜,立即摄影。

1.3.2.2 过氧化物酶(E. C. 1.11.1.7) TMBZ(B. M. 公司)法^[9],分离胶浓度 10%,30 黑暗下温育 45 min,30% H₂O₂ 显色,适宜时立即摄影。

1.3.2.3 淀粉酶(E. C. 3.2.1.1) 分离胶浓度 8%,含 0.5% 可溶性淀粉,碘-碘化钾^[9]显色摄影。

1.3.2.4 漆酶(E. C. 1.10.3.2) 分离胶浓度 8%,儿茶酚,4-氨基苯磺酸钠法^[9]。

1.3.2.5 β -木糖酶(E. C. 3.2.1.37) 分离胶浓度 8%,4-甲基伞形酮- β -D-木糖(Sigma 公司)法^[9]。

1.3.2.6 β -半乳糖酶(E. C. 3.2.1.23) 分离胶浓度 8%, α -萘基- β -D-半乳糖(Sigma 公司)法^[9]。

1.3.2.7 β -葡聚糖酶(E. C. 3.2.1.21) 分离胶浓度 8%,6-溴-2-萘- β -D-葡萄糖(Sigma 公司)法^[9]。

1.3.2.8 蛋白酶 参考 C. E. Vallejos 的方法^[10],稍加改动。分离胶组成:30%丙稀酰胺(29 1)溶液(3.30 mL),含 0.4% SDS(W/V)的 1.5 mol Tris-HCl, pH8.8(2.25 mL),1%明胶(化学纯,北京化工厂)(W/V)(0.9 mL),10%过硫酸铵(0.02 mL),TEMED(0.01 mL),蒸馏水(2.45 mL)。积层胶组成:30%丙稀酰胺(29 1)溶液(0.2 mL),含 0.4% SDS(Serva 公司)(W/V)的 0.5 mol Tris-HCl, pH6.8(0.25 mL),10%过硫酸铵(0.02 mL),TEMED(0.01 mL),蒸馏水(1.55 mL)。分离胶压层液:0.05%明胶的 0.3 mol Tris-HCl, pH8.8。电极缓冲液:0.025 mol Tris,0.192 mol 的甘氨酸(Sigma 公司)-氢氧化钠(分析纯,北京化工厂), pH8.5,其中含 0.1% SDS。样品液含 2.5% SDS 和 1% 蔗糖(分析纯,北京化学试剂三厂),苯酚红(分析纯,北京旭东化工厂)为电泳指示剂。电泳后,胶在 2.5% 曲通 X-100(Farco 公司)中 1 h 缓慢振荡移去 SDS,再转至 37 的 0.1 mol, pH8.3 甘氨酸-氢氧化钠中 5 h,最后在含 0.1% 氨基黑(上海试剂三厂)的甲醇(分析纯,北京化工厂) 乙酸(分析纯,北京化工厂) 水(3 1 6)中染色 1 h,并用甲醇 乙酸 水(3 1 6)溶液褪色至适当,立即摄影。

2 结 果

2.1 蛋白分析

松材线虫分泌物凝胶电泳的银染色法结果显示出 23 条可见蛋白带(图 1-Ag),其中最前

一条可辨蛋白带迁移率 $R_f = 0.06$, 最远一条的 $R_f = 0.94$ 。同样样品浓度下, 考马斯亮蓝染色无蛋白带谱呈现; 而样品浓度加倍时, 考马斯亮蓝法可出现 3 条可辨蛋白带, 其迁移率分别为 0.1、2.8、3.4。将样品加至 $200 \mu\text{g}$ 下, 则呈现 11 条蛋白带(图 1-C₀)。由此可见, 松材线虫能向体外分泌多种可溶性蛋白, 只是每种组成蛋白的含量十分微量。

2.2 体外酶分析

根据松材线虫侵染时可能分解取食寄主细胞壁、细胞质等的组分, 体外酶组成的分析主要集中在纤维素酶、半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、淀粉酶、木质素酶等酶上。酶染色反应显示, 松材线虫体外分泌物中有纤维素酶(图 1-C₁)、过氧化物酶(图 1-P₂, P₃)、蛋白酶(图 1-P₁)、淀粉酶(图 1-A₁)。从图 1-C₁ 可以看出, 松材线虫体外纤维素酶至少有两条带存在。图 1-P₃ 说明分泌物量少时, 过氧化物酶显示出不清晰的带。

在上样量分别为 50 、 $200 \mu\text{g}$ 条件下, 均未能检测到半纤维素酶的 β -木糖酶、 β -半乳糖酶; β -葡聚糖酶和木质素分解酶中的漆酶。实验中这些酶的显带观察时间均超过 12 h。

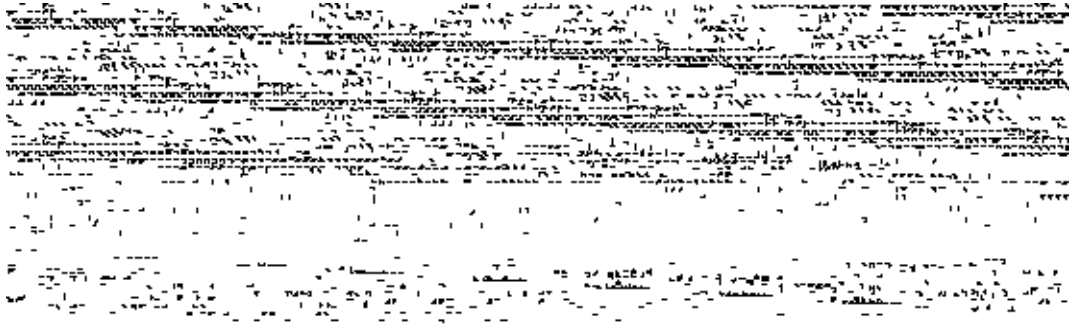


图 1 松材线虫分泌物的凝胶电泳结果

Ag: 银染蛋白带谱(上样体积 $40 \mu\text{L}$, 干样 $50 \mu\text{g}$); Co: 考马斯亮蓝染蛋白带谱(上样体积 $60 \mu\text{L}$, 干样 $200 \mu\text{g}$); C₁: 分泌物中的纤维素酶; C₂: 对照纤维素酶 Onozuka R-10(Serva) (上样体积 $40 \mu\text{L}$, 干样 $50 \mu\text{g}$, Onozuka R-10 $100 \mu\text{g}$); P₁: 分泌物中的蛋白酶(上样体积 $60 \mu\text{L}$, 干样 $75 \mu\text{g}$); A₁: 分泌物中的淀粉酶; A₂: 对照淀粉酶(ICN 公司, $75 \mu\text{g}$) (上样体积 $40 \mu\text{L}$, 干样 $50 \mu\text{g}$, 对照淀粉酶 $100 \mu\text{g}$); P₂、P₃: 分泌物中的过氧化物酶(上样体积 $40 \mu\text{L}$, 含干样 P₂ 为 $80 \mu\text{g}$, P₃ 为 $10 \mu\text{g}$)。

3 讨 论

(1) 通过表面消毒后对线虫培养液中的物质进行测定是目前分析研究线虫体外分泌物生化性质的一条途径^[11]。但是这方法存在一些不足, 一是不能区别被测定的线虫体外成分的来源, 线虫除了食道腺的分泌物通过口针排出体外, 还有排泄物。通常线虫的食道腺分泌物被认为对其致病作用更有重要意义。但线虫寄生时, 其分泌物和排泄物对寄主的影响作用是综合的^[5], 不分来源一并分析其体外成分会更符合实际情况。尤其是内寄生转移型植物线虫, 它在寄主内的迁移活动要有更强的代谢作基础, 这样排泄物占全部体外分泌物质的份量较之定居型植物寄生线虫就要大得多, 排泄物对寄主的影响作用应该不容忽视。松材线虫是内寄生性转

移型植物线虫,在树体内的活动扩散十分活跃迅速,因此未区分体外物质来源而进行了本实验的分析。二是理论上不能完全排除微生物,特别是线虫体内肠道细菌的污染。日本^[4,12]考虑到适温下的培养易发生微生物污染及加入的抗生素对线虫代谢的影响,而在 0℃ 下培养松材线虫取得分泌物研究纤维素酶。这却引起了另一个问题,温度对代谢过程及产物的影响是十分显著的。自然界发病期温度下线虫的代谢比零度下的代谢强烈得多,零度下线虫的代谢产物不能反映自然界发病期适温下的代谢产物,因此本研究选择了适温进行线虫体外分泌物的分析。抗生素制成的消毒液消毒线虫表面时,抗生素的影响可经多次无菌水的漂洗而消除;线虫体外的微生物因与线虫比重的差异,可通过离心被排除。振荡培养时间里偶尔检查到的细菌是来自松材线虫体内的,因其数量少,影响可以略去,或即便有影响,由于是线虫体内正常的习居菌,它产生的物质仍可视为线虫自身产生的物质。最后是线虫组织降解酶的问题,培养过程中虽有少量的线虫死亡,但未见解体的,死亡线虫组织降解酶还没有释放到线虫体外,其影响可以不考虑。鉴于上述分析,认为实验获得的分泌物制样仅来源于松材线虫。实验结果证明,松材线虫在生长发育代谢中,能向体外分泌多种蛋白活性物质,其中含有纤维素酶、蛋白酶、过氧化物酶、淀粉酶。

(2) 现知道许多酶能被线虫产生于体外,最常见的是纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶^[5]。且这些酶类的产生和含量与线虫的寄生活动相关。内寄生转移型植物线虫的纤维素酶含量就明显高于内寄生定居型、噬真菌线虫的纤维素酶含量。由于发现商品纤维素酶和松材线虫的培养液分别能引致黑松针叶枯萎^[3,12],近来松材线虫的纤维素酶的作用因此受到关注。松材线虫产生纤维素酶的能力也已得到证实^[3,4,12],不仅发现松材线虫体内组织中含有纤维素酶,移动时向外产生纤维素酶,还发现松材线虫强致病性株系的纤维素酶含量及活性,较弱致病性株系和拟松材线虫的纤维素酶要高。但该酶的致病性未得到直接证实。本实验结果证实松材线虫常温下也能向体外分泌纤维素酶,同时还发现有过氧化物酶、蛋白酶、淀粉酶。线虫分泌的这些酶类都可能引起寄生代谢的异常反应^[5]。因此,松材线虫病害的初始病理反应可能不仅仅有纤维素酶的作用,可能还有其它酶的参与。

参 考 文 献

- 1 Georges de Guiran, Ming Jen Lee, Antoine Dalmasso, et al. Preliminary attempt to differentiate pine wood nematodes (*Bursaphelenchus* spp.) by enzyme electrophoresis. *Revue Nematol.* 1985, 8(1): 85~92.
- 2 胡凯基, 杨宝君. 松材线虫和拟松材线虫不同株系酶电泳的研究. *林业科学研究*, 1995, 8(1): 73~77.
- 3 Odani K, Sasaki S, Nishiyama Y, et al. Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematodes—Cellulase as a possible candidate of the pathogen. *J. Jpn. For. Soc.*, 1985, 67: 366~372.
- 4 小島克己, 上条厚, 益守真也, 等. 病原力の異なるマツノサイセンチュウの分泌するセルラーゼの性質. *J. Jpn. For. Soc.*, 1994, 76(3): 258~262.
- 5 Giebel J. Mechanism of resistance to plant nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1982, 20: 257~279.
- 6 林茂松, 方中达, 谢逸萍. 甘薯对马铃薯腐烂线虫分泌物的反应. *植物病理学报*, 1993, 23(2): 157~162.
- 7 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T (金冬雁, 黎孟枫等译). *分子克隆实验指南(第二版)*. 北京: 科学出版社, 1993. 880~887.
- 8 Goren R, Huberman M. A simple and sensitive staining method for the detection of cellulase isozymes in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1976, 75: 1~8.

- 9 Vallejos C E. Enzyme activity staining. In: Tanksley S D, Orton T J. Isozymes in plant genetics and breeding Part A. Amsterdam: Science Publishers B. V. Elsevier, 1983. 469 ~ 516.
- 10 Heussen E, Dowdle E B. Electrophoretic analysis of proteases. Anal. Biochem., 1980, 197~ 198.
- 11 Hussey R S. Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. Annu. Rev. Phytopathol., 1989, 27: 128 ~ 141.
- 12 Naoki Yamamoto, Keiji Odani, Satohiko Sasaki, et al. Cellulase exudation by the pine wood nematode-detection of activity in it crawling track. J. Jpn. For. Soc., 1986, 68(6): 237 ~ 240.

The Enzymes in the Secretions of Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)

Yan Donghui Yang Baojun

Abstract After surface-sterilization in the antibiotic solution of 0.002% actidion and 0.1% sulphostreptomycete, PWN, *Bursaphelenchus xylophilus*, were in the buffer of Tris-HCl, 0.05M, pH7.2, for shaking incubation at 25 °C for 72 hours. Then the suspension was centrifugated at 1500 rpm for 5 min. The supernatant, in which there were secretions of PWN, was filtered through 0.22 μm millipore and precipitated proteins in 100% of the saturation (NH₄)₂SO₄ solution. The sediments were dialysed in redistilled water and eventually dried to powder by freezing-vacuum drier. The powder, which was used to detect enzymes in polyacrylamide electrophoresis gel with the dye staining methods of some enzymes, showed that there were cellulases (E. C. 3. 2. 1. 4), protease, peroxidase (E. C. 3. 2. 1. 4) and amylase (E. C. 3. 2. 1. 1) in the secretions of PWN. It is considered from the results that the enzymes mentioned above not only just the cellulase, but all of them possibly take part in the primary reaction of pine wilt disease caused by the nematode of *Bursaphelenchus xylophilus*.

Key words *Bursaphelenchus xylophilus* secretions proteins enzymes

Yan Donghui, Assistant Professor, Yang Baojun (The Research Institute of Forest Protection, CAF Beijing 100091).