

不同培养时间对杏鲍菇酯酶同工酶酶谱的影响

李 守 勉, 李 明, 田 景 花

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘 要:以‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’为试验菌株,在 24℃条件下分别培养 5、7、9、11、13、15 d,分析 2 个菌株酯酶同工酶酶带变化情况。结果表明:‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’均在培养 13 d 时酶带最多并且最为清晰,说明 13 d 为杏鲍菇酯酶同工酶最佳的培养时间。

关键词:杏鲍菇;培养时间;酯酶同工酶;电泳;酶谱

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0098-03

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii* DC. exFr.)属真菌门真担子菌纲伞菌目侧耳科侧耳属,由于其发生于伞形花科刺芹属刺芹枯死的植株上,所以又名刺芹侧耳,其菌肉肥厚,质地脆嫩,有杏仁香味,口感极佳,是味道上好的一种平菇^[1]。药用可以提高免疫功能,有抗癌、降血脂、润肠胃、美容的效果,也可促进人体对脂类物质的消化吸收和胆固醇的溶解^[2]。酯酶同工酶酶谱是受很多因素影响的,例如同一种菌株不同的培养时间所表现出来的酶谱酶带有差异,对于酶谱表现为酶带最多并且酶带最清楚的培养时间才可以准确反映食用菌菌株的基因表达规律^[3]。该试验通过比较‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’2 个不同菌株在不同的培养时间下酶谱酶带,确定能准确反映其酯酶同工酶电泳的最佳培养时间,以期为杏鲍菇菌种资源鉴定及新品种选育提供可靠的理论依据及实践参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试‘杏鲍菇 1 号’(PL7)、“杏鲍菇 2 号”(PL16)均为河北农业大学食用菌实验室保藏种。

培养基:棉籽皮 100 g,土豆 100 g(去皮),麸皮 50 g,葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 3 g, MgSO_4 1.5 g,维生素 B_1 20 mg,蛋白胨 5 g,水 1 000 mL,pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 采用液体发酵培养,将活化后的菌株接种于三角瓶(250 mL 装入 30 mL 液体培养基)中,每个菌株接种 12 瓶,25℃静置 12 h 后,于 25℃恒温条件下

分别培养 5、7、9、11、13、15 d(‘杏鲍菇 1 号’分别用 A5、A7、A9、A11、A13、A15 表示,‘杏鲍菇 2 号’分别用 B5、B7、B9、B11、B13、B15 表示),过滤发酵液,菌球用蒸馏水冲洗干净,滤纸吸干水分,称取 0.5 g 放入研钵中于-20℃冰冻 24 h,称取 0.5 g 放入研钵中,充分研磨至粉末状,用离心管分装,加入 0.5 mL 样品提取液,4℃、8 000 r/min 离心 10 min,上清液于 4℃条件下保存备用。

1.2.2 电泳 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳进行酯酶同工酶分析^[4],分离胶浓度 8%,浓缩胶浓度 5%,电极缓冲液 Tris-Gly 系统,pH 8.3,点样量 30 μL ,溴酚兰做指示剂,浓缩胶电压 120 V,分离胶电压 180 V,在 4℃下电泳 4 h。

1.2.3 染色 电泳结束后取下凝胶,放入染色液中,酯酶同工酶采用 α 、 β -醋酸萘酯和坚牢兰配制的染色液染色^[5],过氧化物酶同工酶使用联苯胺染色法,37℃下染色 30 min 左右,待显出清晰酶带后取出,用 7%的醋酸固定并脱色,至背景无色后用蒸馏水漂洗数次,照相,测量并构建酯酶同工酶模式图^[6]。

1.2.4 结果分析 根据酯酶同工酶电泳结果,测定谱带的相对迁移率并进行比较,观察出‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’出现酶带最多和最清晰的时间,比较相同培养时间‘杏鲍菇 1 号’、‘杏鲍菇 2 号’菌株酶谱酶带的差异。

2 结果与分析

2.1 不同培养时间对‘杏鲍菇 1 号’酯酶同工酶酶谱分析

酶带颜色深浅变化可以反映酯酶同工酶活性的差异,酶带色深表明酶活性高^[7]。由图 1、表 1 可知,培养 5 d 和 7 d 的‘杏鲍菇 1 号’由于菌丝量太小,没出现酶带;培养 9 d 的‘杏鲍菇 1 号’酯酶同工酶酶谱中虽有 7 条酶带,但颜色较浅;当培养时间延长至 11 d 时酶带颜色加深;培养 11、13、15 d 的酶带变化不大,总体而言,培养 13 d 的‘杏鲍菇 1 号’的电泳酶带清晰,且 Rf 为

第一作者简介:李守勉(1978-),女,博士研究生,讲师,研究方向为食用菌生物技术与遗传育种。E-mail:yyism@hebau.edu.cn.

基金项目:河北省现代农业产业技术体系食用菌创新团队资助项目。

收稿日期:2014-03-13

0.0910 的酶带颜色也比其它天数的深。相比之下,培养 13 d 时‘杏鲍菇 1 号’酯酶同工酶酶带最多,显色最深,表明酶多态性和活性好。

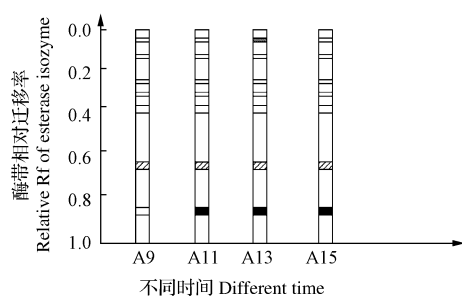


图 1 ‘杏鲍菇 1 号’在不同培养时间的酯酶同工酶电泳图谱

Fig. 1 Esterase isozyme electrophoresis pattern of different culture time of ‘*Pleurotus eryngii* No. 1’

表 1 ‘杏鲍菇 1 号’菌株酯酶同工酶谱带相对迁移率

Table 1 The relative Rf of esterase isozyme bands of ‘*Pleurotus eryngii* No. 1’

菌株 Strains	相对酶带迁移率 Relative Rf of esterase isozyme bands	A5	A7	A9	A11	A13	A15
—	—	—	—	0.091	0.091	0.091	0.091
—	—	—	—	0.182	0.182	0.182	0.182
—	—	—	—	0.272	0.272	0.272	0.272
‘杏鲍菇 1 号’ ‘ <i>Pleurotus eryngii</i> No. 1’	—	—	—	0.345	0.345	0.345	0.345
—	—	—	—	0.418	0.418	0.418	0.418
—	—	—	—	0.655	0.655	0.655	0.655
—	—	—	—	0.856	0.856	0.856	0.856

2.2 不同培养时间对‘杏鲍菇 2 号’酯酶同工酶酶谱分析

由图 2 和表 2 可知,培养 5 d 时‘杏鲍菇 2 号’的酯酶同工酶酶谱中只有 Rf 为 0.200、0.345 和 0.455 的 3 条酶带,且染色很浅;培养 7 d 时,增加了 Rf 为 0.691 的酶带,但染色较浅,Rf 为 0.200 和 0.345 的酶带颜色稍有加深;培养 9 d 时,又增加了 Rf 为 0.873 和 0.945 的 2 条酶带,且 6 条酶带的颜色都有所加深;培养 11 d 时,酶带与 9 d 时相比没有什么变化;当培养时间延长至 13 d

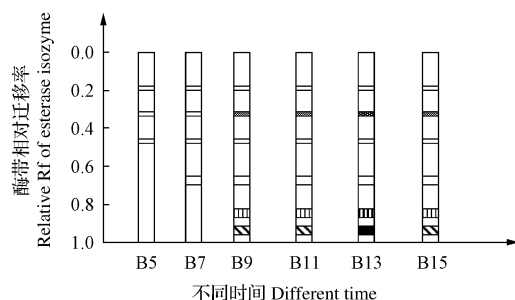


图 2 ‘杏鲍菇 2 号’在不同培养天数的酯酶同工酶电泳图谱

Fig. 2 Esterase isozyme electrophoresis pattern of different culture time of ‘*Pleurotus eryngii* No. 2’

时,Rf 为 0.945 的酶带颜色有明显加深且清晰;培养 15 d 时,Rf 为 0.945、0.345 和 0.200 的酶带与 13 d 时相比颜色明显变浅。相比较之下,培养 13 d 时‘杏鲍菇 2 号’的酯酶同工酶酶谱谱带最多,染色最深也最清晰。

表 2 ‘杏鲍菇 2 号’菌株酯酶同工酶谱带相对迁移率

Table 2 The relative Rf of esterase isozyme bands of ‘*Pleurotus eryngii* No. 2’

菌株 Strains	相对酶带迁移率 Relative Rf of esterase isozyme bands	B5	B7	B9	B11	B13	B15
—	—	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
‘杏鲍菇 2 号’ ‘ <i>Pleurotus eryngii</i> No. 2’	—	0.345	0.345	0.345	0.345	0.345	0.345
—	—	0.455	0.455	0.455	0.455	0.455	0.455
—	—	—	0.691	0.691	0.691	0.691	0.691
—	—	—	—	0.873	0.873	0.873	0.873
—	—	—	—	0.945	0.945	0.945	0.945

2.3 相同培养时间下‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’酯酶同工酶酶谱分析

由图 1~3 和表 1~2 可知,‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’存在比较相近的酶带即‘杏鲍菇 1 号’的 Rf 为 0.345 的酶带和‘杏鲍菇 2 号’的 Rf 为 0.345 的酶带,这 2 条酶带在所有的培养天数中都存在;此外还有‘杏鲍菇 1 号’Rf 为 0.182 和‘杏鲍菇 2 号’的 0.200 的酶带;当培养 9 d 及以后时,‘杏鲍菇 1 号’出现 Rf 为 0.856 的酶带,‘杏鲍菇 2 号’在培养 9 d 后都有 1 条 Rf 为 0.873 的酶带。观察后发现,‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’之间出现一些相近的酶带和 Rf 值,这表明以上的酶带为杏鲍菇特征性酶带。‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’均在培养 13 d 时酶带最多并且最为清晰。

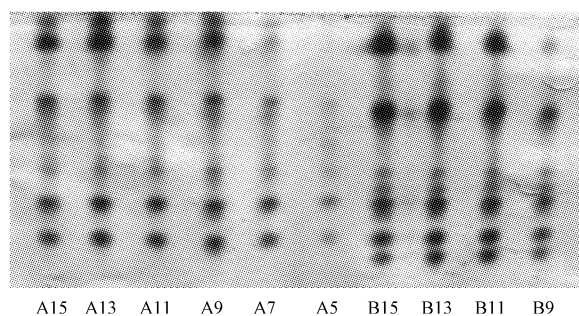


图 3 ‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’在不同培养天数的酯酶同工酶电泳图谱

Fig. 3 Esterase isozyme electrophoresis pattern of different culture time of ‘*Pleurotus eryngii* No. 1’ and ‘*Pleurotus eryngii* No. 2’

3 讨论与结论

由于酶是基因编码的产物,具有相当的稳定性和特异性,所以利用同工酶来鉴定食用菌的亲缘关系是可靠的,也是可行的^[8]。但是,酶并不是基因本身,根据中心

法则,酶谱的多态性是由基因决定的,但它同时还受试验条件和生物生长发育时期的影响,因此试验条件是极为重要的^[9]。该试验结果表明,培养时间对杏鲍菇酯酶同工酶酶谱有显著影响。随培养时间的延长,其酯酶同工酶的酶谱呈现不同的多态性,酶带数目有所增加,颜色深浅也有所不同,即酶活力不同^[10]。该试验中,‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’所选的 6 个培养时间中都各自有使酶带数目最多、最清晰、染色较好的一个培养时间,即酶活性最强的培养时间:‘杏鲍菇 1 号’、‘杏鲍菇 2 号’均为 13 d。该试验结果可知,不同菌株不同培养时间条件下酯酶同工酶酶谱变化规律较为一致。‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’均在培养 13 d 时酶带最多且最为清晰,培养 13 d 可作为杏鲍菇酯酶同工酶最佳的培养时间,并且不同的杏鲍菇品种之间没有差异。但今后应进一步测定‘杏鲍菇 1 号’及‘杏鲍菇 2 号’培养 12、14 d 条件下的酶谱酶带变化情况,才能真正选定出反映酶谱酶带的最佳培养时间。

在该试验中,发现同一菌株在不同培养时期其酶谱发生变化,这些变化可能是翻译后基因产物的修饰或是基因位点的变化^[7],同时这种变化与菌种的生物学特性有相关性。结果表明,在培养前期或中期时,菌丝生长快,酶带增加也多;后期生长迟缓,相应酶带染色有变浅或减少趋势。这充分体现了同工酶具有组织特异性和阶段特异性^[11]。因此,同工酶不可能在一个组织或一个种中稳定不变的表达,它受真菌的阶段发育和系统发育的影响。同时也说明,在利用同工酶进行真菌分类研究中,要注意同工酶基因、基因型、基因表达时间和空间位置以及其它可能因素的影响。

综上所述,同工酶在食用菌菌种选育的应用上应固定最佳的培养时间,并在所有操作条件都一致的情况下,才能得到稳定准确的分析结果^[12]。该试验结果表

明,不同菌株不同培养时间条件下酯酶同工酶酶谱酶变化规律较为一致,‘杏鲍菇 1 号’和‘杏鲍菇 2 号’均在培养 13 d 时酶带最多并且最为清晰,培养 13 d 可作为杏鲍菇酯酶同工酶最佳的培养时间,并且不同的杏鲍菇品种之间没有差异。在进行食用菌属内种间及品种之间的分类鉴定以及菌种选育等有关酯酶同工酶的研究工作中,要在固定最适培养时间和其它最适宜条件下,以保证分析中的同工酶酶谱稳定准确,从而快速有效地对真菌进行分类鉴定。只有这样才能充分发挥同工酶研究的优点,使其成为食用菌育种研究中强有力的工具。

参考文献

- [1] 张丽,彭晓列. 杏鲍菇多糖的提取及其抑菌作用[J]. 贵州农业科学, 2010,38(9):90-92.
- [2] 田景花,李明,李守勉. 我国杏鲍菇生产研究进展[J]. 北方园艺,2013(4):179-181.
- [3] 林群英,张锋伦,孙晓明,等. 杏鲍菇生物学特性及栽培技术研究进展[J]. 中国野生植物资源,2013,32(1):11-15.
- [4] 杨立红,黄清荣,刘新海,等. 食用菌菌种纯度的酯酶同工酶电泳测定[J]. 西南农业大学学报,2005,27(1):128-135.
- [5] 吴康云,边银丙. 培养时间对黑木耳单核菌株同工酶酶谱的影响[J]. 食用菌学报,2001,9(1):13-17.
- [6] 梁建光,杨丽红,王晓洁,等. 不同条件对食用菌酯酶同工酶谱多态性的影响[J]. 西南农业大学学报(自然科学版),2005,27(4):500-504.
- [7] 宿红艳,王磊,王仲礼,等. 十个白灵菇栽培菌株的遗传多样性分析[J]. 食品科学,2009,30(5):158-161.
- [8] 杨立红,黄清荣,辛晓林,等. 食用菌菌种选育中酯酶同工酶的应用研究[J]. 食用菌,2005,27(6):12-14.
- [9] 何燕,曾晓丽,汪思迪,等. 黑木耳菌株酯酶同工酶酶谱多样性研究[J]. 生物技术,2009,19(6):8-10.
- [10] 郑林用. 不同灵芝的遗传特异性和药效差异的比较研究[D]. 成都:四川大学,2007.
- [11] 赵赣,钱芳,曹永长,等. 酯酶同工酶的一种新染色法的初步研究[J]. 江西农业大学学报(自然科学版),2002,24(3):380-382.
- [12] 杨立红,黄清荣,刘新海,等. 食用菌菌种纯度的酯酶同工酶电泳测定[J]. 西南农业大学学报,2005,27(1):128-135.

Influences of Different Culture Times on Zymogram of Esterase Isozyme of *Pleurotus eryngii*

LI Shou-mian, LI Ming, TIAN Jing-hua

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001)

Abstract: Taking ‘*Pleurotus* No. 1’ and ‘*Pleurotus* No. 2’ as test strains, test strains were cultured 5, 7, 9, 11, 13, 15 days at 24℃, changes of esterase isozyme bands was analyzed according to the results of esterase isozymes. The results showed that the enzyme bands of ‘*Pleurotus* No. 1’ and ‘*Pleurotus* No. 2’ were the most clear and up to when cultured for 13 days. 13 days was the best cultivation time for *Pleurotus eryngii* esterase isozymes.

Key words: *Pleurotus eryngii*; incubation time; esterase isozyme; electrophoresis; zymography