

梅慧珍,陈安利,夏定国,等. 黄星天牛中肠中内切葡聚糖酶的鉴定与酶活性测定[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):165-168.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.049

黄星天牛中肠中内切葡聚糖酶的鉴定与酶活性测定

梅慧珍¹, 陈安利³, 夏定国^{1,2}, 赵巧玲^{1,2}, 裘智勇^{1,2}

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏镇江 212018; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018;
3. 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 云南蒙自 661101)

摘要:内切葡聚糖酶(Cx)是纤维素酶系中的主要成分,它包含多种同工酶,能够将可溶性纤维素水解成还原性寡糖。采用 Native-PAGE 技术对黄星天牛中肠中 Cx 进行电泳分离,结合 LC-MS/MS 技术对黄星天牛中肠中 Cx 种类进行鉴定,并对其性质进行研究。结果显示黄星天牛中肠中含有多种 Cx,通过结构域分析,确定为 GHF5 家族蛋白,有共同的保守区(HYETFNPT),Cx 最适反应温度为 50 ℃,最适 pH 值为 6.0,且具有较广的 pH 值稳定范围,低浓度的 Mg^{2+} 与 Co^{2+} 对该酶有激活作用,高浓度的 Mg^{2+} 与 Cu^{2+} 对该酶有抑制作用。这一结果可为黄星天牛降解纤维素机制的研究提供理论基础,为进一步研究天牛中肠组织的生理功能提供基础信息。

关键词:黄星天牛;中肠;内切葡聚糖酶;鉴定;结构域;保守区;降解纤维素

中图分类号: Q556+.2;S433.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0165-04

中肠是昆虫食物消化和营养吸收的主要场所,也是许多外来有害物质如农药、毒素、病原微生物等的作用靶标^[1-6]。研究昆虫中肠蛋白质的组成和功能,不仅有助于阐明昆虫中肠对营养物质消化吸收的分子机理,也能进一步认识外源物质与中肠内蛋白质之间的相互作用。

天牛作为植食性昆虫,植物中的多糖如纤维素、半纤维素的降解是本身的能量来源之一。自 1930 年 Ripper 首次报道天牛自身能分泌纤维素酶后^[7],又有一些学者提出天牛自身具有分泌纤维素酶的生化结构基础^[8]。用加入抗菌素的饲料人工饲养天牛,天牛肠道消化液中仍有很高的纤维素酶活性^[9]。用等电聚焦电泳分离天牛消化道内切葡聚糖酶(Cx),发现不同发育阶段和不同虫态间的 Cx 同工酶差异很大,这标志着天牛体内共生微生物分泌 Cx 和天牛摄入真菌 Cx 的可能性很小^[10]。Cx 是纤维素降解过程中的一种重要水解酶。它作用于纤维素分子内部的非结晶区,随机水解 β -1,4-糖苷键,将长链纤维素分子截短,产生大量带非还原性末端的小分子纤维素。自 Chararas 等首次报道从欧洲绞天牛(*Ergates faber*)中分离纯化出内源性纤维素酶以后^[11],其他昆虫的内源性纤维素酶也相继得到报道^[12-20]。

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)是在不加十二烷基硫酸钠(SDS)疏基乙醇等变性剂条件下,对保持活性的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,常用于同工酶的鉴定和提纯。未加 SDS 的天然聚丙烯酰胺凝胶电泳可以使生物大分子在电泳过程中保持其天然的形状和电荷,它们的分离依据其电泳迁移率的不同和凝胶的分子筛作用,因而可以得到较高的分辨率,尤其是在电泳分离后仍能保持酶等蛋

白质生物大分子的生物活性,对于生物大分子的鉴定有重要意义。

本研究基于 Native-PAGE 技术对黄星天牛中肠中 Cx 进行电泳分离并采用 LC-MS/MS 技术对黄星天牛中肠中的 Cx 进行筛选,同时对黄星天牛中肠中 Cx 的活性进行初步研究,可为探索黄星天牛消化纤维素的机制提供理论基础,为进一步认识与研究天牛中肠组织的功能提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄星天牛成虫收集于中国农业科学院蚕业研究所桑园。

1.2 试验方法

1.2.1 中肠总蛋白的提取 将采集的黄星天牛成虫置于 -80 ℃ 冰箱中保存过夜,翌日解剖,取出中肠,用 ddH₂O 反复冲洗,至无明显的内含物,用吸水纸吸干。利用一步法动物组织活性蛋白提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取总蛋白:将组织剪切成小块,用液氮研磨至粉末状,加入预冷的抽提试剂(每 1 mL 抽提试剂加入 1 μ L DTT、10 μ L PMSF、1 μ L 蛋白酶抑制剂),涡旋振荡 10 s,冰上放置 20 min,期间取出振荡 3~5 次,再 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,上清液作为组织总活性蛋白部分,于 -80 ℃ 冰箱中保存备用(具体试验方法参照试剂盒说明书)。

1.2.2 Cx 分析 参考李庆的方法^[10],制备含有 1% CMC、12% 凝胶的非变性胶,进行电泳,电泳在低于 8 ℃ 条件下进行。电泳完毕后,将胶剥离,将 marker 的区域与蛋白样品的区域切割分离,含有 marker 的胶进行考染,含有蛋白样品的胶移至 pH 值为 6.0 的 0.2 mol/L NaH₂PO₄-NaHPO₄ 缓冲液中,37 ℃ 水浴保温 10 min,倒去缓冲液,加入 2.0% KI + 0.2% I₂ 染色液于 25 ℃ 水浴染色 5 min,倒去染色液,用自来水冲洗多余染料,加入 60% 硫酸处理 5~10 min,终止酶活,倒去硫酸,用水冲洗,直至背景胶板上出现透明带(Cx 带)。

1.2.3 Cx 带的胶回收及质谱分析 将 Cx 带的部分切下,用

收稿日期:2015-08-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31372377)。

作者简介:梅慧珍(1990—),女,安徽宣城人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:huizhenmei@126.com。

通信作者:夏定国,副研究员。E-mail:xiadingguo@126.com。

ddH₂O 将胶中蛋白质条带脱色到胶体接近无色,室温、12 000 r/min 条件下离心 5 min,去除上清保留胶体,然后用生工生物工程(上海)股份有限公司的 PAGE 胶蛋白微量回收试剂盒回收胶中的蛋白,所得蛋白溶液委托深圳华大基因科技服务有限公司进行 LC-MS/MS 分析。

1.2.4 Cx 的酶活性测定 采用 DNS 定糖法测定 Cx 的活性^[21]。取 10 μL 适当稀释的粗酶液,加入 200 μL 1% 羧甲基纤维素钠(用 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液配制, pH 值 4.8),50 ℃ 反应 1 h,加入 500 μL DNS 试剂,煮沸 6 min,再加入 500 μL 蒸馏水,在 540 nm 波长下测定吸光度。定义 1 min 产生 1 g 葡萄糖所需酶量为 1 个酶活性单位。

1.2.5 中肠 Cx 活性的研究

1.2.5.1 最适 pH 值的测定 分别用 pH 值为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 的缓冲液配制 1% 羧甲基纤维素钠溶液[醋酸缓冲液(pH 值 2.0),柠檬酸缓冲液(pH 值 4.0、6.0),Tris-HCl 缓冲液(pH 值 8.0),甘氨酸-氢氧化钠(pH 值 10.0)]^[18],作为不同 pH 值条件下的酶作用底物,加入稀释后的粗酶液,于 50 ℃ 保温 1 h,测定酶活性,以酶活性最高者为 100%,确定最适 pH 值。

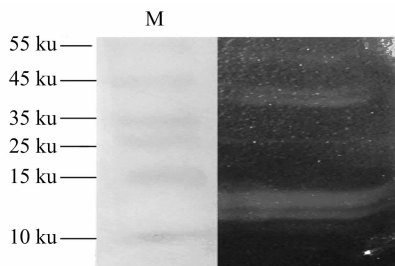
1.2.5.2 最适温度的测定 用 pH 值 6.0 的柠檬酸缓冲液配制 1% 羧甲基纤维素钠溶液,作为底物,加入稀释后的粗酶液,于不同温度(30~70 ℃)水浴保温 1 h,测定酶活性,以最大酶活性为 100%,确定最适反应温度。

1.2.4.3 金属离子对酶活性的影响 分别配制含有浓度为 5、100 mmol/L 的 CoCl₂、MgCl₂、CuCl₂、CaCl₂ 的 1% 羧甲基纤维素钠溶液,在最适温度与 pH 值下保温 1 h,测定酶活性。以不加任何无机盐的 1% 羧甲基纤维素钠溶液作为底物所测出来的值为 100%。

2 结果与分析

2.1 Cx 检测结果

Native-PAGE 电泳共发现 5 条透明度大小不同的 Cx 带(图 1),酶带透明度越大,说明酶活性越大(酶活性由 Cx 与羧甲基纤维素钠反应的强度有关)^[10]。结果表明,黄星天牛中肠中可能存在多种 Cx。Cx 的分子大小范围分布很广,一般分子量介于 23~146 ku 之间,当然也有例外,如纤维黏菌内切酶分子量小至 6.3 ku^[22]。电泳结果显示,黄星天牛 Cx 带的分子量主要分布在 35~55 ku 与 10~15 ku 这 2 个范围内。



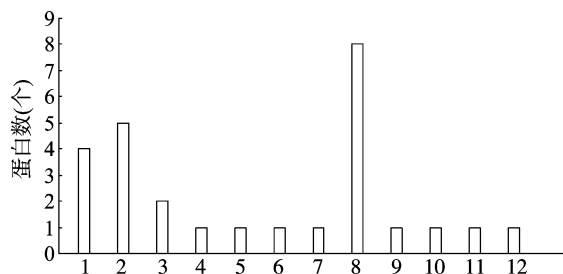
marker (Themro 6616) 与目的蛋白染色方式不同,导致染色后胶体大小不一致,本图是将二者进行等比例拉伸后的合成图

图1 黄星天牛中肠中 Cx 的同工酶谱

2.2 LC-MS/MS 结果分析

本研究委托深圳华大基因科技服务有限公司,利用 Tri-

ple TOF 5600 质谱仪对 Native-PAGE 电泳所获得的蛋白样品进行 LC-MS/MS(液相-质谱联用鉴定蛋白质混合物的技术)分析。通过与 NCBI 天牛科(Cerambycidae)蛋白质数据库进行比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid41088>),共得到 265 个蛋白分子(包括重复蛋白质)。其中,与 Native-PAGE 电泳胶面 Cx 分子量分布一致的有 66 个非重复蛋白,分子量分布在 35~55 ku 之间的蛋白有 54 个,分子量分布在 10~15 ku 之间的蛋白有 12 个,对所得的蛋白进行 COG 分类发现,66 个蛋白中有 27 个蛋白具有 COG 的功能性分类(图 2),其中 11 个蛋白与代谢有关,如氨基酸(amino acid transport and metabolism)、能源代谢(energy production and conversion)、碳水化合物(Carbohydrate transport and metabolism)、脂质(lipid transport and metabolism)的运输和新陈代谢。



1—细胞骨架;2—预测功能蛋白;3—翻译后修饰,蛋白代谢,分子伴侣;4—细胞壁/膜的生物合成;5—能量产生和转化;6—细胞周期控制、细胞分裂、染色体分离;7—氨基酸运输与代谢;8—碳水化合物运输与代谢;9—翻译、核糖体的结构和生物发生;10—转录;11—脂质运输与代谢;12—未知功能

图2 COG 蛋白功能分类

2.3 黄星天牛中肠中 Cx 种类的鉴定与分析

通过 LC-MS/MS 技术对黄星天牛中肠中 Cx 的鉴定,结果显示,黄星天牛有 4 种非重复的 Cx(表 1),其蛋白理论分子量分布在 36~38 ku 之间,等电点在 4.3 左右。

利用 Prosite 生物在线软件(<http://prosite.expasy.org/prosite.html>)对 Cx 的结构域进行分析,结果显示,这 4 种 Cx 均属于 GHF 5 家族(图 3),存在共同的保守区(HYETFNEPT)。

2.4 Cx 的最适 pH 值与温度

从图 4-A 可以看出,Cx 在 pH 值 4~8 时,该酶活性在最大酶活性的 50% 以上,可见 Cx 具有较广的 pH 值稳定性,在 pH 值为 6.0 时的酶活性最高。这可能是由于 pH 值改变了酶分子的带电状态,特别是改变了酶活性中心上有关基团的电离状态,导致该酶与底物不能很好地结合,从而影响底物被酶水解,最终使酶催化活性有不同程度的下降。图 4-B 表明,温度在 30~50 ℃ 之间时,Cx 的酶活性随着温度的升高而升高,在 50 ℃ 时达到最大,随着温度继续上升,酶活性逐渐下降。

2.5 金属离子对 Cx 的影响

用 5、100 mmol/L Co²⁺ 及 5 mmol/L Mg²⁺ 对 Cx 进行处理,酶活性最高分别能够提高 31.37%、95.17%、25.24%;Ca²⁺ 对酶活性基本无影响;而 5、100 mmol/L Cu²⁺ 及 100 mmol/L Mg²⁺ 对酶有抑制作用(图 5)。

3 结论与讨论

以木质纤维素为食的昆虫(如白蚁、甲虫、蠹虫、木食性

表 1 黄星天牛中肠 Cx 的鉴定结果

蛋白 ID	蛋白名称	分子质量 (u)	等电点 (pI)	覆盖率 (%)	蛋白得分
gi 19773501	纤维素酶(黄星天牛)	36 191.75	4.12	24.92	341.53
gi 578359008	糖苷水解酶家族 5 亚科 2(日本光肩天牛)	36 141.78	4.20	5.59	70.99
gi 550267826	部分内切葡聚酶(光肩星天牛)	38 085.93	4.58	2.65	36.27
gi 550267819	内切葡聚酶(光肩星天牛)	36 778.08	4.59	4.66	55.44

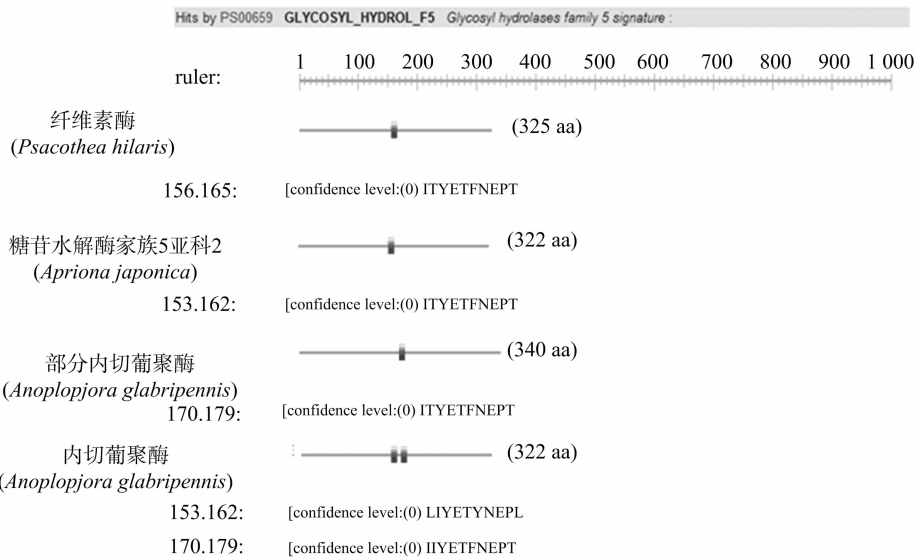
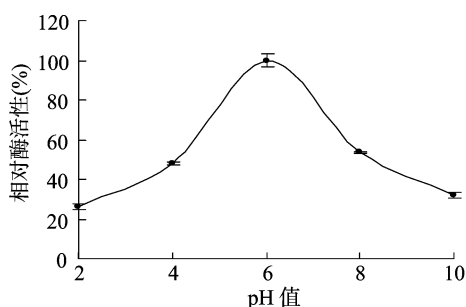
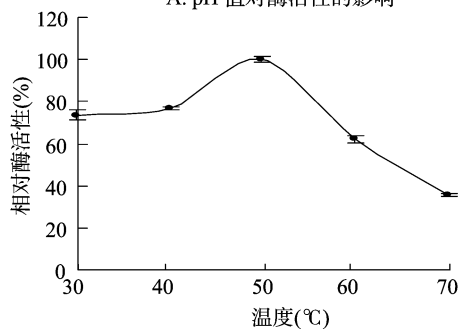


图3 黄星天牛中肠中 Cx 的保守结构域



A. pH 值对酶活性的影响



B. 温度对酶活性的影响

图4 pH 值、温度对 Cx 活性的影响

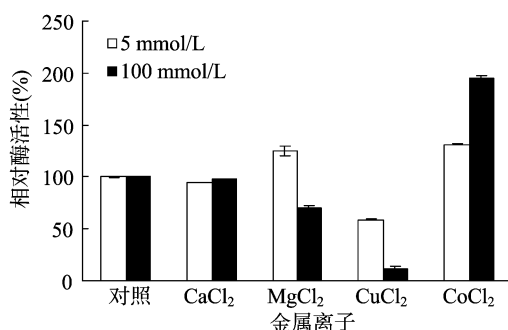


图5 金属离子对酶活的影响

35 ~ 50 ku 的 GHF5 蛋白中,且他们发现雄性成虫中只有 4 种属于 GHF5 的蛋白中,而雌性成虫中没有 GHF5 家族的蛋白^[17]。本试验在黄星天牛中肠中鉴定出 4 种 Cx,均属于 GHF5,这一结果与 Pauchet 等的结果^[17]一致。GHF45 作为 Cx 家族的另一成员,已在很多种类的天牛中发现,如云斑天牛、桑天牛^[16-20]。本试验在黄星天牛中未鉴定出 GHF5 家族,这可能与蛋白表达丰度有关^[20]。此外,本研究发现 2 条分子量低于 15 ku 的内切酶条带,迄今为止还未见报道。

对黄星天牛中肠中 Cx 活性研究表明,无论是最适作用温度还是最适作用 pH 值,Cx 均显示出广泛的适应性。Cx 作为纤维素的主要消化酶,广泛的 pH 值适应范围使其能适应食物的不同 pH 值条件及肠道各部分的内环境,直接作用于天牛摄入的纤维类物质,并随食物在肠道内向后移动时持续发挥作用^[24]。金属离子对 Cx 的活性有一定的影响,Co²⁺ 及低

蟑螂以及木蜂等)能非常有效地将食物中的纤维素、半纤维素物质转化为糖类,并从中获取自身生长发育所需的能量^[23],Cx 是纤维素降解途径中的一种重要的酶系。2014 年,Pauchet 等在日本光肩天牛的中肠中证实了 6 个分子量皆在

浓度的 Mg^{2+} 对 Cx 都有较强的激活作用, Cu^{2+} 及高浓度的 Mg^{2+} 对酶都有抑制作用。高浓度的 Cu^{2+} 相比低浓度的 Mg^{2+} 而言, 其抑制作用更强。 Cu^{2+} 是一些杀虫剂的重要成分, 施用 Cu^{2+} 试剂如波尔多液等, 既可防疾病, 又可抑制天牛的消化酶, 从而起到控制天牛为害的作用。

本试验通过对黄星天牛中肠内切酶的研究, 不仅可以为黄星天牛降解纤维素机制的研究提供理论基础, 也为以后天牛中肠蛋白质研究提供了重要的数据资料。

参考文献:

- [1] Wang J, McCommas S, Syvanen M. Molecular cloning of a glucan-lione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly (*Musca domestica*) [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1991, 227(2): 260–266.
- [2] Fournier D, Bride J M, Poirie M, et al. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(3): 1840–1845.
- [3] Ranson H, Rossiter L, Ortell F, et al. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae* [J]. Biochemical Journal, 2001, 359(2): 295–304.
- [4] Vontas J G, Small G J, Hemingway J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens* [J]. Biochemical Journal, 2001, 357(1): 65.
- [5] Scott J G. Cytochromes P450 and insecticide resistance [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 29(9): 757–777.
- [6] Feyereisen R. Insect cytochrome P450 [J]. Comprehensive Molecular Insect Science, 2005, 4: 1–77.
- [7] Ripper W. Zur frage des celluloseabbaus bei der holzverdanung xylophager insektenlarven [J]. Zeitschrift für Vergleichende Physiologie, 1930, 13(2): 313–333.
- [8] Terra W R, Ferreira C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1994, 109(1): 1–62.
- [9] Scrivener A M, Slaytor M, Rose H A. Symbiont-independent digestion of cellulose and starch in *Panesthia cribrata* Saussure, an Australian wood-eating cockroach [J]. Journal of insect Physiology, 1989, 35(12): 935–941.
- [10] 李庆. 天牛消化纤维素的机制研究 [J]. 林业科学, 1991, 27(4): 418–423.
- [11] Chararas C, Eberhard K, Courtois J E, et al. Purification of three cellulases from the xylophagous larvae of ergates faber (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. Insect Biochemistry, 1983, 13(2): 213–218.
- [12] Scivener A M, Slaytor M. Properties of the endogenous cellulase from *Panesthia cribrata* Saussure and purification of major endo- β -1, 4-glucanase components [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1994, 24(3): 223–231.
- [13] Tokuda G, Watanabe H, Matsumoto T, et al. Cellulose digestion in the wood-eating higher termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo- β -1, 4-glucanase [J]. Zoological Science, 1997, 14(1): 83–93.
- [14] Watanabe H, Nakamura M, Tokuda G, et al. Site of secretion and properties of endogenous endo- β -1, 4-glucanase components from *Reticulitermes speratus* (Kolbe), a Japanese subterranean termite [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 27(4): 305–313.
- [15] Lee S J, Kim S R, Yoon H J, et al. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 139(1): 107–116.
- [16] Lee S J, Lee K S, Kim S R, et al. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: gene structure, expression, and enzymatic activity [J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 140(4): 551–560.
- [17] Pauchet Y, Kirsch R, Giraud S, et al. Identification and characterization of plant cell wall degrading enzymes from three glycoside hydrolase families in the cerambycid beetle *Apriona japonica* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 49(1): 1–13.
- [18] Wei Y D, Lee K S, Gui Z Z, et al. Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 145(2): 220–229.
- [19] Xia D G, Wei Y D, Zhang G Z, et al. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the beetle *Batocera horsfieldi* [J]. Gene, 2013, 514(1): 62–68.
- [20] Sugimura M, Watanabe H, Lo N, et al. Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* [J]. European journal of biochemistry, 2003, 270(16): 3455–3460.
- [21] Miller G L. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426–428.
- [22] 路梅. 嗜热毛壳菌纤维素酶液体发酵条件和内切 β -葡聚糖酶的分离纯化 [D]. 济南: 山东大学, 2002: 1–53.
- [23] 黄胜威. 暗黑鳃鳉鱼幼虫肠道微生物分子多态性及纤维素降解菌多样性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [24] 殷幼平. 天牛消化纤维素的机制及天牛纤维素酶的研究 [D]. 重庆: 西南农业大学, 1996.