

杨伟克,唐芬芬,刘增虎,等. 1-脱氧野尻霉素对家蚕中肠 *BmSuc1* 基因表达及其酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):290-292. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.087

# 1-脱氧野尻霉素对家蚕中肠 *BmSuc1* 基因表达及其酶活性的影响

杨伟克,唐芬芬,刘增虎,钟健,董占鹏

(云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所,云南蒙自 661101)

**摘要:**为研究 1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin,简称 DNJ)对家蚕中肠 *BmSuc1* 基因表达及其酶活性的影响,以 5 龄第 3 天家蚕为试验材料,经口添食不同剂量的生物碱 DNJ,采用实时荧光定量 PCR 方法检测中肠 *BmSuc1* 的表达情况,同时测定  $\beta$ -呋喃果糖苷酶的活性。结果表明,添食不同剂量的 DNJ 均能引起 *BmSuc1* 基因在添食 6、9 h 出现上调表达,但相对表达量有一定差异,添食 4  $\mu\text{g}/\text{头}$  的处理组在添食 6、9 h 基因的相对表达量分别是对照组的 1.9、2.9 倍,添食 2  $\mu\text{g}/\text{头}$  的处理组在添食 6、9 h 基因的相对表达量分别仅为对照组的 1.5、1.8 倍。另外,添食 4  $\mu\text{g}/\text{头}$  的处理组  $\beta$ -呋喃果糖苷酶活性在添食 6、9、12 h 显著高于对照组,而添食 2  $\mu\text{g}/\text{头}$  的处理组酶活性仅在添食 6、9 h 显著高于对照组。由结果可知,酶活性变化与基因的转录表达规律基本一致。

**关键词:**家蚕;DNJ;*BmSuc1*;  $\beta$ -呋喃果糖苷酶;实时荧光定量 PCR

**中图分类号:** S881.2; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0290-03

1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin,简称 DNJ)属于吡啶类多羟基生物碱,它能够抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶,具有一定的降血糖功能<sup>[1]</sup>。研究发现,多种植物、微生物中均有 DNJ 及其类似物存在<sup>[2-3]</sup>,其中桑树中生物碱 DNJ 的含量远高于其他植物<sup>[4-5]</sup>。

蔗糖是包括昆虫在内的动物非常喜好的主要糖营养来源,分解蔗糖的水解酶有 2 种:一种是催化葡萄糖侧基的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase),另一种是催化果糖侧基的  $\beta$ -呋喃果糖苷酶( $\beta$ -fructofuranosidase)<sup>[6]</sup>。DNJ 能够抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,而对  $\beta$ -呋喃果糖苷酶没有抑制作用。DNJ 能够通过抑制昆虫肠道  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,阻止其分解和吸收蔗糖营养,使其不能正常生长发育,甚至死亡<sup>[7]</sup>。已有研究表明,生物碱 DNJ 对非食桑昆虫卷心菜蛾、蓖麻蚕具有强烈的毒害作用<sup>[8-9]</sup>。

Daimon 等率先在家蚕基因组中发现了  $\beta$ -呋喃果糖苷酶同源基因 *BmSuc1*,其编码的中肠蛋白酶具有蔗糖水解酶功能,且活性不受 DNJ 的抑制<sup>[10]</sup>。桑树的叶片、枝条和根茎等部位富含 DNJ<sup>[11]</sup>,寡食性昆虫家蚕一生以桑叶为食物来源<sup>[12-13]</sup>,它能够克服生物碱毒性,正常吸收桑叶中的糖营养,主要依赖  $\beta$ -呋喃果糖苷酶充分分解吸收桑叶中的蔗糖营养,从而成功地避开桑叶生物碱 DNJ 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性

的抑制作用<sup>[10]</sup>。

本研究通过添食外源 DNJ,利用实时荧光定量 PCR 对家蚕中肠 *BmSuc1* 基因的表达进行定量检测和分析,同时测定  $\beta$ -呋喃果糖苷酶的变化规律,探讨外源 DNJ 对 *BmSuc1* 基因表达及其酶活性的影响,为深入研究家蚕回避桑叶生物碱 DNJ 毒害作用的适应机制提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

供试家蚕品种为菁松  $\times$  皓月,来自云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所。主要试剂:MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 和 M-MLV 反转录试剂盒(TOYOBIO 公司),FastStart Universal SYBR Green Master(Roche 公司),生物碱 DNJ(Sigma 公司),蛋白定量测试盒和蔗糖水解酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 添食处理及样品采集** 选取发育良好、体质量和大小相当的家蚕 5 龄第 3 天幼虫,采用经口喂食的方法进行生物碱 DNJ 添食,其中 A 组喂食剂量为 2  $\mu\text{g}/\text{头}$ ,B 组喂食剂量为 4  $\mu\text{g}/\text{头}$ ,以添食灭菌水的家蚕为对照,添食后在同等条件下饲喂。

取添食后 3、6、9、12、24 h 家蚕的中肠组织,对照组同时取材,每次取样均分成 2 份,1 份用于抽提 RNA,另外 1 份用于制备酶液,每次取样均设 3 次重复,每个重复取 5 头蚕,样品收集后置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.2 总 RNA 的提取及反转录** 按照 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 操作说明提取中肠组织 RNA。在核酸蛋白分析仪上测定  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值,计算 RNA 样品浓度,根据 M-MLV 反转录酶使用说明书将抽提的 RNA 反转录成 cDNA。另外取  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值在 1.80~2.00 之间

收稿日期:2015-10-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360586);云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所青年创新基金(编号:QC2015002)。

作者简介:杨伟克(1985—),男,河南许昌人,硕士,助理研究员,主要从事野蚕资源的搜集与利用工作。E-mail:WKSUN1985@163.com。

通信作者:董占鹏,博士,研究员,主要从事家蚕种质资源收集、素材创新、改良利用和品种选育工作。E-mail:scsdong@163.com。

的样品,用于实时荧光定量 PCR 试验。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 利用 Primer Premier 5.0 软件,按照 Real-Time PCR 要求对选取的家蚕内参基因 *Actin3* 及目标基因 *BmSud1* 进行引物设计。*Actin3* 引物序列为 F: 5' - CGGGAAATCGTTCGTGAT - 3', R: 5' - ACGAGGGTTGGAAGAGG - 3'; *BmSud1* 引物序列为 F: 5' - AATCCAGTCCTCTCCTACGTGC - 3', R: 5' - TCCGGTCTGATACGTGTCT - TG - 3'。

荧光定量 PCR 方法参照 FastStart Universal SYBR Green Master 试剂盒操作说明进行。反应体系 20  $\mu$ L, 反应参数: 95  $^{\circ}$ C 1 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。用 ABI 公司 StepOne 荧光定量 PCR 扩增仪记录试验结果, 每个样品设 3 次重复。根据公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算基因的相对表达量<sup>[14]</sup>, 其中  $\Delta\Delta C_t = (C_{T_{BmSud1}} - C_{T_{Actin3}})_{处理} - (C_{T_{BmSud1}} - C_{T_{Actin3}})_{对照}$ 。式中:  $C_{T_{BmSud1}}$ 、 $C_{T_{Actin3}}$  分别代表靶标基因 *BmSud1*、内参基因 *Actin3* 在实时荧光定量 PCR 反应过程中扩增的  $C_t$  值。

1.2.4  $\beta$ -呋喃果糖苷酶活性测定 酶液的制备: 取家蚕中肠样品, 加入 4  $^{\circ}$ C 预冷的 1.0 mL 磷酸钾缓冲液 (0.1 mol/L, pH 值 7.0), 在冰上匀浆, 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 5~8 min, 收集上清。

蛋白质含量测定按照蛋白定量试剂盒操作进行。测定原理是蛋白质分子具有一  $\text{NH}_3^+$  基团, 当棕红色的考马斯亮兰显色剂加入蛋白标准液或样品中时, 考马斯亮兰染料上的阴离子与蛋白一  $\text{NH}_3^+$  结合, 使溶液变为蓝色, 通过测定 595 nm 处吸光度可计算出蛋白含量。计算公式: 待测样品蛋白浓度 (g/L) =  $[(D_{595 \text{ nm}})_{试验} - (D_{595 \text{ nm}})_{对照}] / [(D_{595 \text{ nm}})_{标准} - (D_{595 \text{ nm}})_{空白}] \times$  标准品浓度 (0.563 g/L)。每个样品重复 3 次, 取其平均值, 下同。

酶活测定原理是  $\beta$ -呋喃果糖苷酶能水解相应的底物产生单糖, 该单糖在相应氧化酶的作用下产生过氧化氢, 过氧化氢同显色剂结合产生红色络合物, 用分光光度计在 505 nm 处测定吸光度, 根据以下公式计算酶性: 酶活性 (U/mg) =  $[(D_{505 \text{ nm}})_{试验} - (D_{505 \text{ nm}})_{对照}] / [(D_{505 \text{ nm}})_{标准} - (D_{505 \text{ nm}})_{空白}] \times$  标准品浓度 (5.55 mmol/L)  $\div$  反应时间 (20 min)  $\div$  待测样品蛋白浓度  $\times$  1 000。具体操作参照蔗糖水解酶活性测定试剂盒说明书。酶活力定义: 在 37  $^{\circ}$ C、pH 值为 7.0 的条件下, 1 mg 蛋白组织 1 min 内水解 1 nmol 蔗糖定义为 1 个酶活力单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 添食 DNJ 对家蚕中肠 *BmSud1* 基因表达的影响

利用实时荧光定量 PCR 的方法, 对添食不同剂量生物碱 DNJ 后家蚕中肠 *BmSud1* 基因的表达进行定量检测和分析。试验中采取的是相对定量计算方法, 将对照组 *BmSud1* 基因的相对表达量设定为 1.0, 当添食组 *BmSud1* 基因的相对表达量大于 1.0 时即为上调表达, 若小于 1.0 时即为下调表达。从图 1 可以看出, 添食不同剂量 (2、4  $\mu$ g/头) 的生物碱 DNJ 均能引起家蚕中肠 *BmSud1* 表达量在 6、9 h 出现明显上调趋势, 其中处理 6 h 相对表达量最高, 而处理 3、12、24 h 基因相对表达量变化不明显, 均接近对照组 *BmSud1* 基因的相对表达量 1.0。

对比 A、B 2 个处理组可知, 添食剂量越高基因表达量上

调幅度越大, 其中添食量 4  $\mu$ g/头的 B 组, *BmSud1* 相对表达量在 6、9 h 分别是对照组的 1.84、2.97 倍, 而添食量 2  $\mu$ g/头的 A 组, 在 6、9 h *BmSud1* 的相对表达量分别是对照组的 1.58、2.19 倍 (图 1)。

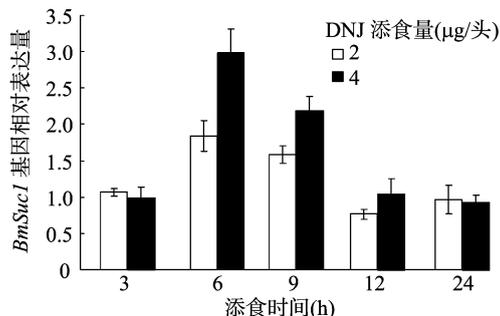
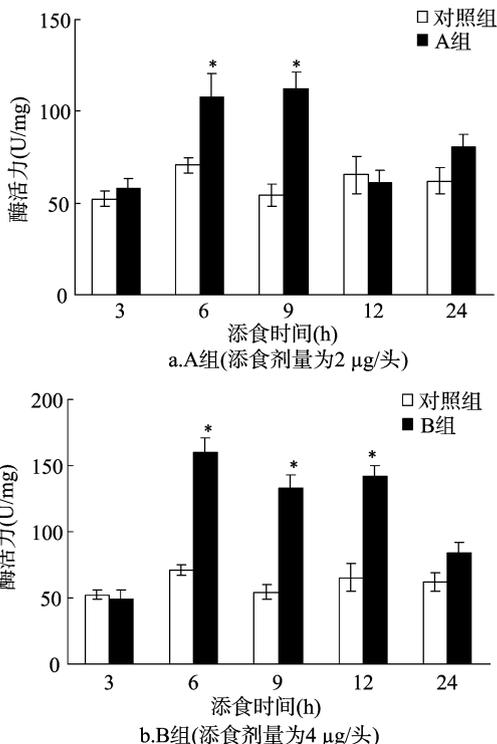


图1 DNJ 对家蚕 *BmSud1* 基因表达的影响

### 2.2 添食 DNJ 对家蚕中肠 $\beta$ -呋喃果糖苷酶活性的影响

添食不同剂量生物碱 DNJ 后, 由图 2 可见, 不同剂量生物碱 DNJ 处理家蚕, 均能引起  $\beta$ -呋喃果糖苷酶活性出现先增强后减弱的趋势。添食量 4  $\mu$ g/头的处理组 (B 组), 在 6、9、12 h 时酶活性与对照组相比, 差异均达到显著水平, 其中在处理 6 h 时, 酶活性最高。而添食量 2  $\mu$ g/头的处理组 (A 组), 在处理 9 h 时酶活性最高, 并且仅在 6、9 h 时酶活性与对照组的差异达到显著水平。



“\*”表示添食组与对照组存在显著差异 ( $t$  检验,  $P < 0.05$ )

图2 DNJ 对家蚕  $\beta$ -呋喃果糖苷酶活性的影响

由图 2 还可以看出, 添食量 4  $\mu$ g/头的处理组 (B 组), 酶活性上升速度较快, 而下降速度较慢, 在处理 6 h 就达到最高值, 随后在 9、12 h 继续维持一个相对较高的水平, 在 24 h 酶活性仍高于对照组, 但差异未达到显著水平。添食量 2  $\mu$ g/头的处理组 (A 组) 酶活性上升速度较慢, 而下降速度

较快,在添食9 h 酶活性升至最高值,随后急剧降低,在12 h 已低于对照组,虽然在24 h 的酶活性高于对照组,但差异并不显著。

### 3 讨论与结论

桑叶的乳液中含有大量的DNJ、1,4-二脱氧-1,4-亚氨基-D-阿拉伯糖醇(简称D-AB1)等糖类似物生物碱<sup>[11]</sup>,其中DNJ是一种强效的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,而动物体内的蔗糖消化吸收主要依赖于 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的水解作用<sup>[15]</sup>。研究表明,添食DNJ能导致一些昆虫丧失吸收和利用蔗糖的能力,从而对其产生一定的毒害作用<sup>[8-9]</sup>。 $\beta$ -呋喃果糖苷酶属于另一类蔗糖水解酶,广泛存在于真菌、细菌、酵母菌和植物中<sup>[6]</sup>,它也能催化蔗糖水解产生葡萄糖、果糖,并且其活性不受DNJ抑制<sup>[11]</sup>。家蚕*BmSuc1*是第1个被分子克隆和功能鉴定的动物 $\beta$ -呋喃果糖苷酶基因<sup>[10]</sup>。

家蚕主要依赖 $\beta$ -呋喃果糖苷酶充分分解吸收桑叶中的蔗糖营养,所以桑叶中高浓度的DNJ对家蚕没有毒害作用,也不影响家蚕的生长发育<sup>[10]</sup>。另外家蚕自身具有一定富集DNJ的能力,其富集部位主要集中在血淋巴、消化管和体壁<sup>[16-18]</sup>。但蚕体DNJ的富集、代谢机制目前还不明确,笔者推测DNJ进入蚕体后,一部分被蚕体吸收利用,另一部分随自身代谢产物排出体外。

家蚕无论是富集吸收DNJ,还是代谢利用DNJ,均需要能量。*BmSuc1*编码的 $\beta$ -呋喃果糖苷酶主要是水解家蚕体内的蔗糖,为机体提供糖源和能量,因此添食外源DNJ后,*BmSuc1*基因在一定时间范围内被上调表达,同时 $\beta$ -呋喃果糖苷酶活性显著高于对照组。随着时间的推移,进入蚕体的DNJ逐渐被富集及代谢利用,其含量也相应减少,机体不需要消耗过多能量去应对,*BmSuc1*基因表达量及 $\beta$ -呋喃果糖苷酶活性恢复至接近对照组水平,维持机体正常的生命活动。

本研究表明,生物碱DNJ能诱导家蚕*BmSuc1*基因的表达,同时增强 $\beta$ -呋喃果糖苷酶的活性,并且基因的表达规律与酶活性变化趋势一致。本试验中2种添食处理组,基因上调表达的时间点是一致的,都是在添食后6、9 h,但表达量却有所差异,添食DNJ的剂量越大,基因表达量越高。 $\beta$ -呋喃果糖苷酶活性也是在添食6、9 h显著高于对照组;另外,添食量4  $\mu\text{g}/\text{头}$ 的处理组(B组),12 h的酶活性也显著高于对照组,这表明DNJ剂量越大,对酶活性的影响时间越长。DNJ对家蚕中肠*BmSuc1*基因表达及其酶活性的影响是否与DNJ剂量有一定的相关性,有待进一步研究。

### 参考文献:

[1] Hughes A B, Rudge A J. Deoxyojirimycin: synthesis and biological activity[J]. *Natural Product Reports*, 1994, 11(2): 135-162.  
 [2] Asano N, Nishida M, Miyauchi M, et al. Polyhydroxylated pyrrolidine and piperidine alkaloids from *Adenophora triphylla* var. *japonica* (Campanulaceae) [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(3): 379-382.  
 [3] Kim H S, Kim Y H, Hong Y S, et al. Alpha-glucosidase inhibitors from *Commelina communis* [J]. *Planta Medica*, 1999, 65(5): 437-439.

[4] Kimura T, Nakagawa K, Kubota H, et al. Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxyojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(14): 5869-5874.  
 [5] Yatsunami K, Ichida M, Onodera S. The relationship between 1-deoxyojirimycin content and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity in leaves of 276 mulberry cultivars (*Morus* spp.) in Kyoto, Japan [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2008, 62(1): 63-66.  
 [6] Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, et al. The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(18): 18903-18910.  
 [7] Kite G C, Scofield A M, Lees D C, et al. Alkaloidal glycosidase inhibitors and digestive glycosidase inhibition in specialist and generalist herbivores of *Omphalea diandra* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1997, 23(1): 119-135.  
 [8] Konno K, Ono H, Nakamura M, et al. Mulberry latex rich in antidiabetic sugar-mimic alkaloids forces dieting on caterpillars [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(5): 1337-1341.  
 [9] Hirayama C, Konno K, Wasano N, et al. Differential effects of sugar-mimic alkaloids in mulberry latex on sugar metabolism and disaccharidases of *Eri* and domesticated silkworms; enzymatic adaptation of *Bombyx mori* to mulberry defense [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37(12): 1348-1358.  
 [10] Daimon T, Taguchi T, Meng Y, et al. Beta-fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori* - insights into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(22): 15271-15279.  
 [11] Asano N, Yamashita T, Yasuda K, et al. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(9): 4208-4213.  
 [12] 杨继芬, 吴克军, 朱红涛, 等. 8个云南栽培桑品种对家蚕原种繁育的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(2): 244-248.  
 [13] 秦凤, 石凉, 董晓琪, 等. 家蚕春用品种681×682原蚕的繁育、应用 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(3): 192-193.  
 [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.  
 [15] Krasikov V V, Karelou D V, Firsov L M.  $\alpha$ -Glucosidases [J]. *Biochemistry - Moscow*, 2001, 66(3): 267-281.  
 [16] 沈以红, 朱见, 代方银, 等. 野桑蚕和不同家蚕品系幼虫体内1-脱氧野尻霉素含量测定 [J]. *蚕业科学*, 2007, 33(4): 674-677.  
 [17] 施新琴, 崔为正, 孙波, 等. 家蚕体内DNJ富集规律的研究 [C]//中国蚕学会第七届二次理事会暨学术年会论文集. 南宁, 2005: 272-273.  
 [18] Yin H, Shi X Q, Sun B, et al. Accumulation of 1-deoxyojirimycin in silkworm, *Bombyx mori* L [J]. *Journal of Zhejiang University - Science B*, 2010, 11(4): 286-291.