

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 β -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 β -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*; β -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)属于哌啶类多羟基生物碱,它能够抑制 α -葡萄糖苷酶,具有一定的降血糖功能^[1]。研究发现,多种植物、微生物中均有 DNJ 及其类似物存在^[2-3],其中桑树中生物碱 DNJ 的含量远高于其他植物^[4-5]。

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 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase),另一种是催化果糖侧基的 β -呋喃果糖苷酶(β -fructofuranosidase)^[6]。DNJ 能够抑制 α -葡萄糖苷酶活性,而对 β -呋喃果糖苷酶没有抑制作用。DNJ 能够通过抑制昆虫肠道 α -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^[7]。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^[8-9]。

Daimon 等率先在家蚕基因组中发现了 β -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^[10]。桑树的叶片、枝条和根茎等部位富含 DNJ^[11],寡食性昆虫家蚕一生以桑叶为食物来源^[12-13],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 β -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 α -葡萄糖苷酶活性

的抑制作用^[10]。

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 β -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(TOYOBO 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'-ACGAGGGTTG-GAAGAGGG-3'; *BmSud1* 引物序列为 F: 5'-AATCCAGTC-CTCTCCTACGTGC-3', R: 5'-TCCGGTCTGATACGTGTTCT-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 μ 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^[14],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 β -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 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 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) = $[(D_{595 \text{ nm}} \text{ 试验} - D_{595 \text{ nm}} \text{ 对照}) / (D_{595 \text{ nm}} \text{ 标准} - D_{595 \text{ nm}} \text{ 空白})] \times \text{标准品浓度}(0.563 \text{ g/L})$ 。每个样品重复 3 次,取其平均值,下同。

酶活测定原理是 β -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) = $[(D_{505 \text{ nm}} \text{ 试验} - D_{505 \text{ nm}} \text{ 对照}) / (D_{505 \text{ nm}} \text{ 标准} - D_{505 \text{ nm}} \text{ 空白})] \times \text{标准品浓度}(5.55 \text{ mmol/L}) \div \text{反应时间}(20 \text{ min}) \div \text{待测样品蛋白浓度} \times 1000$ 。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 μ 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 μ 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 μ 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)。

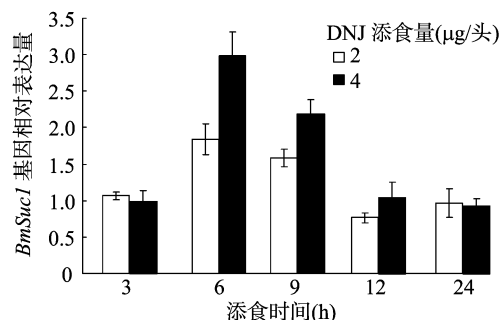
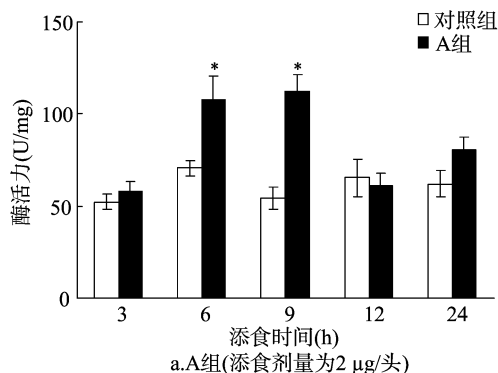


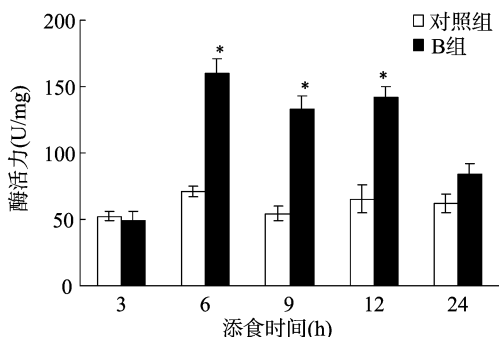
图1 DNJ 对家蚕 *BmSud1* 基因表达的影响

2.2 添食 DNJ 对家蚕中肠 β -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 β -呋喃果糖苷酶活性出现先增强后减弱的趋势。添食量 4 μ 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 μ 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。



a.A组(添食剂量为2 μ g/头)



b.B组(添食剂量为4 μ g/头)

“*”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 β -呋喃果糖苷酶活性的影响

由图 2 还可以看出,添食量 4 μ 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 μ 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^[11],其中 DNJ 是一种强效的 α - 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 α - 葡萄糖苷酶的水解作用^[15]。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^[8-9]。 β - 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^[6],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^[11]。家蚕 *BmSuc1* 是第 1 个被分子克隆和功能鉴定的动物 β - 呋喃果糖苷酶基因^[10]。

家蚕主要依赖 β - 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^[10]。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^[16-18]。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 β - 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 β - 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 β - 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 β - 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。 β - 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. Deoxynojirimycin: 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 - deoxynojirimycin 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 - deoxynojirimycin content and α - 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 \times 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, Karelov D V, Firsov L M. α - 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 - deoxynojirimycin in silkworm, *Bombyx mori* L. [J]. Journal of Zhejiang University - Science B, 2010, 11(4): 286 - 291.