



家蝇蛹中多酚氧化酶的分离合纯化及抑菌活性的研究

孙 洋, 王春玲, 曹小红

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 采用缓冲液浸提、超滤、亲和层析和高效液相色谱 4 种方法, 从家蝇蛹中分离纯化一种D-半乳糖专一性的多酚氧化酶 (PO), 并对其抑菌活性进行了研究. 在SDS-PAGE中呈现出两个条带, 其中表观分子质量为 78 ku的条带为目的蛋白; 经过高效液相色谱分析, 呈现出了分别和SDS-PAGE结果中相对应的两个峰, 其中第一个峰为要纯化的目的蛋白; 目的蛋白经过肽指纹图谱检测为PO, 精确分子质量为 79 ku. 1mL纯化的PO在 1 g/L的质量浓度下对 1 mL稀释后的大肠埃希菌、枯草芽胞杆菌和伤寒沙门菌 (10^6 mL^{-1})的抑制率分别为 43.2%、38.7%和 50.1%.

关键词: 家蝇蛹; 多酚氧化酶; 抑菌

中图分类号: Q969.42

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 03-0013-03

Isolation and Purification of Phenoloxidase from *Musca Domestica* and Its Activity of Inhibiting Proliferation of Bacteria

SUN Yang, WANG Chun-ling, CAO Xiao-hong

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A D-galactose specific phenoloxidase (PO) was purified from *Musca domestica* pupae and its antibacterial activity was studied. The purification procedures included: crude extract in buffer, ultra-filtration, affinity-chromatography and HPLC. By SDS-PAGE, with or without reduction, purified PO yields two bands with a molecular weight of 78 ku. By HPLC, purified PO shows two peaks. In MALDI-TOF-MS, the precise molecular weight is identified as 79 ku. Purified PO shows significant antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC9372, *Salmonella typhimurium* CCTCC94010 with the inhibiting activity of 43.2%, 38.7%, 50.1%, respectively.

Keywords: pupae of *Musca domestica*; phenoloxidase; antibacteria

昆虫是很多病原体如细菌、病毒和寄生虫等的重要传播媒介, 尽管它们缺少脊椎动物的抗原抗体特性, 但却有一个完整的免疫系统, 通过其结构和生理屏障及多种功能的血细胞、体液因子的协同作用, 对侵入体内的病原体具有明显的免疫防御反应^[1]. 其中由多酚氧化酶 (PO) 参与的昆虫表皮的硬化反应所形成的坚固的几丁质表皮是其结构和生理屏障, 从而在阻止、抵抗已入侵的病原体中可能发挥重要的作用. 而且PO也是昆虫最重要的免疫因子之一, 在昆虫体内是以无活性酶原 (PPO) 形式存在的, 当病原体入侵时通过PPO级联被活化, PPO级联是昆虫分子识

别防御系统的一个重要部分, PPO活化是昆虫对入侵病原体的一种防御反应^[2]. 本文研究了家蝇蛹多酚氧化酶的分离合纯化过程, 并在对其结构作了初步鉴定后进行了抑菌活性的研究, 为其抗菌机理的进一步研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 家蝇

蝇种 (*Musca domestica*) 采自天津市卫生防疫站, 天津科技大学食品安全与卫生实验室养殖.

收稿日期: 2008-03-17; 修回日期: 2008-04-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20676103); 天津市自然科学基金资助项目 (07JCZDJC02900)

作者简介: 孙 洋 (1983—), 男, 天津人, 硕士研究生; 通讯作者: 王春玲, 讲师, wangchunling@tust.edu.cn.

1.2 菌株与培养基

大肠埃希菌 ATCC29522、伤寒沙门菌 CCTCC 94010、枯草芽胞杆菌 ATCC9372, 均为天津科技大学食品安全与卫生实验室保藏.

细菌培养采用牛肉膏蛋白胨培养基.

1.3 试剂与仪器

琼脂糖凝胶 Sepharose4B, Sigma 公司; 标准分子质量蛋白, 上海生化所; 其余试剂均为分析纯.

垂直电泳系统 (Bio-rad), 自动部分收集器, 上海沪西仪器厂; 紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器厂.

1.4 蝇蛆的养殖

参照文献[3]的方法养殖.

1.5 家蝇蛹多酚氧化酶的分离纯化

1.5.1 家蝇蛹血淋巴制备

取针刺诱导后的蛹 50 g, 研磨粉碎. 用昆虫生理盐水 BIS (0.85% NaCl, pH 7.9) 浸提, 在 4 °C 静置 24 h, 然后离心取上清液.

1.5.2 超滤浓缩

将上清液置于超滤杯中, 于截留分子质量 3 ku 的超滤膜上浓缩至 10 mL.

1.5.3 亲和层析

将家蝇蛹血淋巴粗提液 10 mL 与 Sepharose-4B 等体积于室温混合 3 h, 将混合物装于 1.1 cm × 30 cm 的层析柱中, 待静置完全, 用 BIS 以流速 1 mL/min 冲洗至杂蛋白组分, 在 280 nm 的吸光度值低于 0.02 后, 再换用 0.2 mol/L D-半乳糖-BIS 溶液洗脱, 将其在 280 nm 吸收峰的组分收集.

1.5.4 超滤分离

将收集到的组分以截留分子质量 50 ku 的超滤膜上进行脱盐, 同时除去分子质量 50 ku 以下蛋白, 浓缩至 1 mL 后进行冷冻干燥.

1.5.5 高效液相色谱

TSKgel Super SW3000 色谱柱预先用 BIS (pH 6.7) 平衡, 将冻干粉配成 2 g/L 溶液, 上样 5 μL, 以流速 0.1 mL/min 洗脱.

1.5.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照 Laemmli^[4]的方法, 应用包含 1% SDS 和 2.5% β-巯基乙醇的 12% 分离胶进行检测.

1.5.7 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)

将聚丙烯酰胺凝胶电泳目的条带切下, 用胰蛋白酶水解蛋白样品. 取 0.75 μL 水解液并与基质[新鲜配制的 10 g/L 的 α-氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)] 等体积混合, 点于靶上, 自然干燥. 将靶装入质谱仪进行

分析, 相应的参数为反射模式、氮激光 (337 nm, 0.5 ns 脉冲宽度值, 20 Hz 重复率), 离子延迟提取 100 ns, 70% 激光束电压, 真空度为 4×10^{-8} , 质谱信号的单次扫描累加 150 次, 正离子谱测定.

1.5.8 抑菌实验

受试菌株 (大肠埃希菌、伤寒沙门菌、枯草芽胞杆菌) 用牛肉膏蛋白胨液体培养基 37 °C 培养过夜, 取稀释后的 1 mL 菌悬液 (10^6 mL⁻¹) 和 1 mL 多酚氧化酶 (1 g/L), 在 37 °C 孵育 24 h. 对照组和实验组分别进行平板菌落计数.

抑菌活性 = (对照组的菌落数 - 实验组的菌落数) / 对照组的菌落数 × 100%

2 结果与讨论

2.1 家蝇多酚氧化酶的纯化结果

在亲和层析过程中, 经 0.2 mol/L D-半乳糖洗脱后, 于 280 nm 下检测, 出现明显的蛋白峰 (图 1). 将此峰物质超滤后用 HPLC 进一步分离, 出现两个峰, 分子质量分别为 78 ku 和 66 ku (图 2).

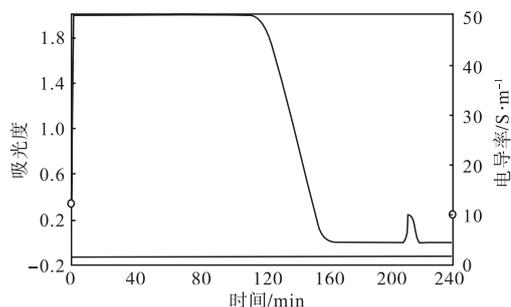


图 1 家蝇血淋巴亲和层析色谱图

Fig. 1 Affinity chromatography of the hymph from *Musca domestica*

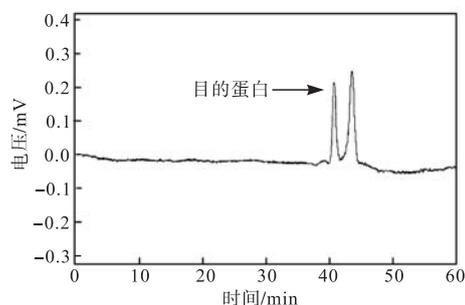


图 2 亲和层析后蛋白组分纯化高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC of proteins after affinity chromatography

在 SDS-PAGE 中, 经过超滤, 亲和层析之后的组分也在分子质量 78 ku 和 66 ku 的两个位置出现了明显的两个条带 (图 3).

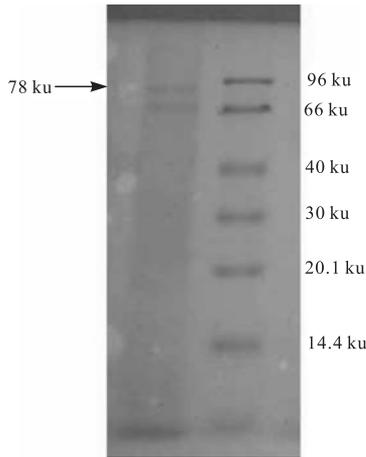


图3 50 ku以上蛋白组聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.3 SDS-PAGE of proteins with MW above 50 ku

目的蛋白被酶切位点专一的蛋白酶水解后得到肽片段质量图谱(图4)。由于每种蛋白质的氨基酸序列都不同,蛋白质被酶水解后,产生的肽片段序列也各不相同,其肽混合物质量数亦具特征性,所以称为指纹谱,可用于蛋白质的鉴定^[5]。将实验测得的蛋白质酶解肽段质量数在蛋白质数据库中检索,得知与目的蛋白匹配度极高的蛋白为家蝇多酚氧化酶。

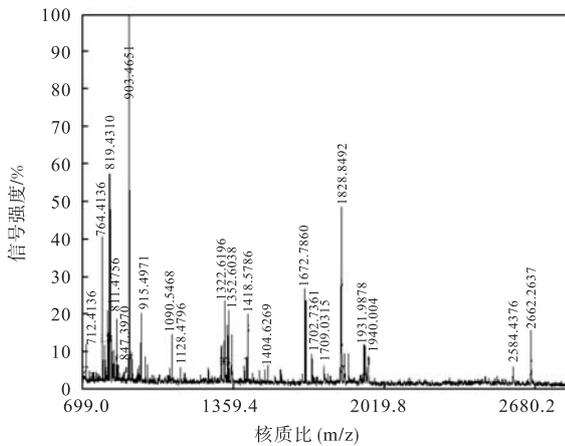


图4 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

Fig.4 MALDI-TOF-MS

2.2 抑菌实验结果

多酚氧化酶的抑菌活性见表1。

表1 家蝇多酚氧化酶对3种菌株的抑菌活性

Tab.1 Inhibition of 3 kind of strains of phenoloxidase from *Musca domestica*

受试菌株	抑制率/%
大肠埃希菌 ATCC29522	43.2
枯草芽胞杆菌 ATCC9372	38.7
伤寒沙门菌 CCTCC94010	50.1

由表1可见,在1 g/L的质量浓度下,对大肠埃希菌、枯草芽胞杆菌和伤寒沙门菌显示不同程度的抑菌活性,分别为43.2%、38.7%和50.1%。

3 结 语

许多昆虫的血淋巴都具有抑菌活性,通常认为是抗菌蛋白和抗菌肽起作用。家蝇具有较强的免疫系统,其体液免疫因子包括抗菌蛋白、多酚氧化酶(PO)、溶菌酶、褪黑素、凝集素等^[6]。其中多酚氧化酶以无活性的酶原形式—多酚氧化酶原(PPO)存在于昆虫血淋巴中,当病原生物入侵时,通过特异性丝氨酸蛋白酶的级联反应(PPO级联)被活化,参与机体的免疫防御反应^[7]。本研究表明,经分离纯化后的家蝇多酚氧化酶对大肠埃希菌、枯草芽胞杆菌和伤寒沙门菌的生长均有抑制作用,推测多酚氧化酶或相关级联反应是家蝇血淋巴抑菌途径中很重要的一部分。

参 考 文 献:

- [1] Spray F J, Christensen B M. Aedes aegypti: characterization of hemocyte polypeptide synthesis during wound healing and immune response to inoculated microfilariae [J]. *Exp Parasitol*, 1991, 73: 481—488.
- [2] Duvic B, Soderhall K. Purification and characterization of a beta-1, 3-glucan binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265: 9327—9332.
- [3] 安瑞军, 邢昌龄, 王振宇, 等. 家蝇饲养技术 [J]. 哲里木畜牧学院学报, 1999, 9 (2): 49—52.
- [4] Laemmli, M Favre. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1970, 80: 575—599.
- [5] Kris G, Joel V. Protein identification methods in proteomics [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1145—1154.
- [6] Van der Knaap WP, Boerrigter-Barendsen LH, Van den Hoeven DS, et al. Immunocytochemical demonstration of a humoral defense factor in blood cells (Amoebocytes) of the pond snail *Lymnaea stagnalis* [J]. *Celm Tissue Res*, 1981, 219 (5): 291—296.
- [7] Gillespie J P, Kanost M R, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity [J]. *Annu R ev Entomol*, 1997, 42: 611—643.