

从大豆中纯化棉铃虫组织蛋白酶 B 抑制因子 HCB-SoyI

张新昌*, 刘杨*, 王金星, 赵小凡**

(山东大学生命科学学院, 济南 250100)

摘要: 棉铃虫组织蛋白酶 B (*Helicoverpa armigera* cathepsin B, HCB) 在胚胎发育过程中降解卵黄蛋白为氨基酸, 供给胚胎发育必需的养料, 是棉铃虫胚胎正常发育的重要因素。许多植物种子中存在蛋白酶抑制因子, 如大豆和向日葵种子。用棉铃虫组织蛋白酶 B 为酶源, 通过硫酸铵沉淀、排阻层析和离子交换层析等方法, 从大豆中分离纯化到了一种对 HCB 有抑制活性的蛋白酶抑制因子, 命名为 HCB-SoyI。用牛血清白蛋白为底物进一步证明该抑制因子对 HCB 具有抑制作用。该抑制因子的纯化为进一步克隆其基因奠定了基础, 为转基因抗虫作物研究提供了新的候选靶标。

关键词: 棉铃虫; 大豆; 组织蛋白酶 B; 抑制因子; 纯化

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)06-0849-05

Purification of an inhibitor of *Helicoverpa armigera* cathepsin B from soybean seeds

ZHANG Xin-Chang*, LIU Yang*, WANG Jin-Xing, ZHAO Xiao-Fan** (School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Cathepsin B from *Helicoverpa armigera* (HCB) plays important role in the life of the cotton bollworm, which degrades yolk proteins to amino acids as nutrients for embryonic development. Many plant seeds, such as soybean seeds and sunflower seeds, contain proteinase inhibitors. An inhibitor, HCB-SoyI, purified from the soybean seeds by ammonium sulfate precipitation, gel filtration and ion-exchange chromatography, was here reported. The inhibitory activity of the inhibitor was further studied with bovine albumin as a substrate. The purified inhibitor offers an opportunity to further clone its gene and may become a new target for insect resistant transgenic plant research.

Key words: *Helicoverpa armigera*; soybean seeds; cathepsin B; inhibitor; purification

蛋白酶抑制因子 (proteinase inhibitor, PI) 普遍存在于动植物体内, 是对蛋白酶有抑制活性的一类小分子物质, 在植物防御害虫和病原体的侵染中具有十分重要的作用。Kunitz 和 Northrop (1936) 首先从牛胰脏中分离出碱性胰蛋白酶抑制因子 (basic pancreatic trypsin inhibitor, BPTI)。迄今为止, 自然界共发现 4 大类蛋白酶抑制因子: 丝氨酸蛋白酶抑制因子、半胱氨酸蛋白酶抑制因子 (巯基蛋白酶抑制因子)、金属蛋白酶抑制因子和天冬氨酸蛋白酶抑制因子 (酸性蛋白酶抑制因子)。其中, 半胱氨酸蛋白酶抑制因子和丝氨酸蛋白酶抑制因子可以明显抑制取食昆虫的生长和发育 (Bowen *et al.*, 2004)。

已报道的大豆 *Glycine max* 蛋白酶抑制因子分

为 2 类: 一类是丝氨酸蛋白酶抑制因子, 如 Kunitz 胰蛋白酶抑制因子 (Kunitz trypsin inhibitor, KTI) 和 Bowman-Birk 胰蛋白酶抑制因子 (Bowman-Birk inhibitor, BBI), 分子量分别为 21 kD 和 8 kD (Kunitz, 1945); 另一类是半胱氨酸蛋白酶抑制因子, 如 soyacystatin N、L (Koiwa *et al.*, 1998)、P (Botella *et al.*, 1996)、G (Brzin *et al.*, 1990) 和一种分子量为 13 kD 的 soyacystatin (Misaka *et al.*, 1996) 均对半胱氨酸蛋白酶类具有抑制作用, 但它们的作用可能因为还原剂的存在而不可逆地丧失, 所以在检测半胱氨酸蛋白酶的标准条件下往往检测不到 (Zimacheva and Mosolov, 1995)。

组织蛋白酶 B (cathepsin B) 抑制因子属于半胱

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30330070)

作者简介: 张新昌, 男, 1979 年生, 硕士研究生; 刘杨, 男, 1982 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学

* 并列第一作者 Authors who made equal contributions to this paper

** 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: xfzhao@sdu.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-01-31; 接受日期 Accepted: 2005-06-06

氨酸蛋白酶抑制因子,可以抑制组织蛋白酶 B 活性,引起害虫体内某些必需氨基酸的缺乏,扰乱其正常代谢甚至导致死亡。目前,利用基因工程技术已经克隆到水稻、小麦和玉米等多种不同来源的抑制因子的 cDNA,并通过基因枪或农杆菌介导等转化途径导入不同植物中,获得了对害虫具有明显抗性的转基因植株(John *et al.*, 2002),部分地解决了因大量使用化学农药控制害虫而造成的环境污染问题。因此,研究组织蛋白酶 B 抑制因子的性质,可以为杀虫剂的研发提供一定的理论基础。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae,具有很高的繁殖力,危害多种农作物的生产。棉铃虫组织蛋白酶 B(*Helicoverpa* cathepsin B, HCB)是其胚胎发育过程中水解卵黄蛋白供给胚胎发育养料所必需的一种半胱氨酸蛋白酶。另外,HCB 在成虫脂肪体中活性也很高,可能与棉铃虫的卵巢发育和成虫脂肪体解体有关(Zhao *et al.*, 2002, 2005)。由于化学农药防治导致害虫抗药性迅速发展和环境污染,各种转基因抗虫作物的研究已经成为害虫防治的新途径,一些利用蛋白酶抑制因子基因获得的转基因植物已经进入田间试验阶段(Telang *et al.*, 2003)。目前应用于转基因抗虫作物研究的靶标基因除 Bt 毒蛋白基因外,主要是针对幼虫消化道丝氨酸类蛋白酶的各种抑制因子,而针对胚胎发育中的半胱氨酸类蛋白酶的抑制因子国内外均未见报道。本文作者从大豆中纯化了大豆组织蛋白酶 B 抑制因子(HCB-SoyI)。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大豆购自济南市场。Sephadex G-75 为上海长征富民药业有限公司产品;DEAE-Toyopearl 为日本 TOSOH 产品;牛血红蛋白(Hb)为上海东风试剂公司产品;牛血清白蛋白(BSA)为日本 ToKaRa 公司产品,标准蛋白质为美国 Amersham 公司产品。HCB 由本实验室纯化,方法参照 Zhao 等(1998)。其余化学试剂为分析纯产品。

1.2 HCB-SoyI 纯化(全部操作在 4℃ 下进行)

取 100 g 大豆研磨成粉,用乙醚脱脂后,溶入 400 mL 缓冲液 A(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 2 mmol/L 巯基乙醇和 1 mmol/L EDTA)中,4℃ 下搅拌过夜。匀浆液经 12 000 × g 离心 10 min,取上清液,50% 硫酸铵沉淀,沉淀溶解在 20 mL 缓冲液 A 中,

于 10 倍体积缓冲液 A 中透析过夜。透析后的溶液经 12 000 × g 离心 10 min,将上清液缓慢加到用缓冲液 A 平衡过的 Sephadex G-75 柱上(2.5 cm × 100 cm),用缓冲液 A 洗脱并分部收集其中有抑制活性的部分。然后将收集液缓慢加到用缓冲液 A 平衡过的 DEAE-Toyopearl 柱上(1 cm × 30 cm),用 200 mL 缓冲液 A 洗涤柱子以去除未结合的蛋白质,再用 100 mL 缓冲液 A 对 100 mL 0.5 mol/L NaCl 溶液作梯度洗脱,分部收集其中有抑制活性的部分。

1.3 蛋白质浓度测定

根据 Lowry 等(1951)方法测定蛋白质含量。

1.4 抑制活性分析

取 50 μL 待测抑制因子样品,加入 25 μL HCB(0.3 mg/mL)和 25 μL 0.1 mol/L 乙酸缓冲液(pH 3.6)混合后,37℃ 温育 15 min,再加入 200 μL 1% 牛血红蛋白(Hb)作底物,37℃ 温育 1 h,用 0.5 mL 5% TCA 终止反应,12 000 × g 离心 10 min,取 200 μL 上清液加入 250 μL 1 mol/L NaOH,经 Lowry 等(1951)方法发色,用 HCB 与 Hb 温育后的吸光值调零,在 750 nm 处检测各收集管中的吸光值。相对抑制活性(%) = 每管吸光度/最低吸光度 × 100%。

对照同样处理,用 50 μL 缓冲液 A 替代抑制因子。

1.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

参照 Laemmli(1970)方法,胶浓度为 15%,Tris-Gly 缓冲液,恒压 100 V。

1.6 HCB-SoyI 对 HCB 水解牛血清白蛋白(BSA)的抑制作用

用 40 μL、80 μL 和 120 μL HCB-SoyI(0.2 mg/mL)分别与 40 μL HCB(0.3 mg/mL)和 40 μL 乙酸缓冲液(pH 3.6, 0.1 mol/L)混合 15 min,再与 40 μL 牛血清白蛋白(0.1%)反应。用缓冲液 A 补足体积至 240 μL。对照同样处理,用缓冲液 A 代替抑制因子,然后用 SDS-PAGE 法检测 BSA 的水解情况。

1.7 HCB-SoyI 氨基酸序列测定

将纯化的 HCB-SoyI 转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用蛋白质测序仪(Applied Biosystems Model 491)测定 N-端氨基酸序列。

2 结果与分析

2.1 HCB-SoyI 纯化

50% 硫酸铵沉淀并透析后的上清液经过 Sephadex G-75 柱层析,大部分杂蛋白首先被分离,形

成 1 个蛋白质主峰,虽然其中也有部分蛋白酶抑制活性,但由于杂蛋白太多,难以纯化,因此合并收集第 2 个峰进行下一步纯化。图 1 是 Sephadex G-75 收集液经 DEAE-Toyopearl 层析后蛋白质含量及抑制活性的变化曲线。经过该层析柱后,蛋白质进一步分

离成两部分,经 SDS-PAGE 检测,第 1 个峰有目的蛋白,但还有其他较多的杂蛋白,而第 2 个峰已经纯化并有蛋白酶抑制活性,为目的蛋白。依据蛋白含量及抑制活性曲线,收集第 38~56 管进行纯度检测。

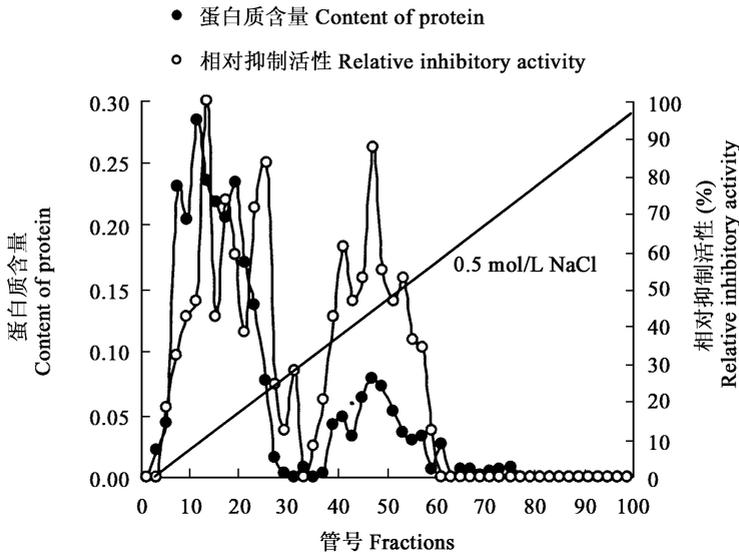


图 1 DEAE-Toyopearl 层析(1 cm × 30 cm, 每管 2 mL, 流速 0.1 mL/min)

Fig. 1 DEAE-Toyopearl (1 cm × 30 cm, each fraction is 2 mL, and the flow rate is 0.1 mL/min)

2.2 HCB-SoyI 纯度检测

经过 Sephadex G-75 和 DEAE-Toyopearl 层析柱后得到的 HCB-SoyI 经 15% SDS-PAGE 检测,结果显示大豆蛋白质匀浆液中含有多种蛋白质, Sephadex G-75 层析去除了大部分杂蛋白, DEAE-Toyopearl 层析进一步纯化获得目的产物,在 SDS-PAGE 上显示为 1 条带,表明其已经纯化, SDS-PAGE 测定分子量约为 8 kD (图 2), 基质辅助激光解析离子飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 测定分子量为 7 872.1 D (图省略)。

2.3 HCB-SoyI 纯化得率计算

由表 1 可以看出,随着硫酸铵沉淀和柱层析,大量杂蛋白被分离,目的蛋白逐渐变少,其纯度越来越高,比活也越来越大。

2.4 HCB-SoyI 对 HCB 水解牛血清白蛋白(BSA)的抑制作用

酸性条件下(0.1 mol/L 乙酸缓冲液, pH 3.6), HCB 对 BSA 有很好的水解作用,但是加入抑制因子后,水解变少,并且随着抑制因子量的增加,水解变得越来越少,证明 HCB-SoyI 对 HCB 有比较明显的抑制作用(图 3)。

2.5 HCB-SoyI 的 N-末端氨基酸序列分析

将纯化得到的 HCB-SoyI 电转 PVDF 膜进行蛋白

质测序,其 N-末端的 10 个氨基酸序列为 DDESSLPXXD。从 www.ncbi.nlm.nih.gov 进行比较得知, GenBank 中没有与该段序列相同的大豆蛋白酶抑制因子的报道。

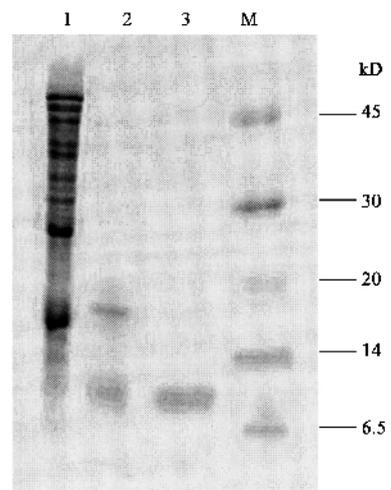


图 2 SDS-PAGE 检测 HCB-SoyI 纯度(胶浓度为 15%)

Fig. 2 SDS-PAGE showing the purity of HCB-SoyI (15% gel) 1: 硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation; 2: Sephadex G-75 层析产物 Product after Sephadex G-75 chromatography; 3: DEAE-Toyopearl 层析产物 Final product after DEAE-Toyopearl column; M: 蛋白质分子量标准 Protein standard.

表 1 HCB-SoyI 纯化得率

Table 1 Purification of the HCB-SoyI from soybean seeds

步骤 Steps	总蛋白 Total proteins (mg)	抑制活性 Inhibitory activity (U)	比活 Specific activity (U/mg)	产率 Yield (%)
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitates	176	54	0.31	100
Sephadex G-75	45	22	0.49	41
DEAE-Toyopearl	3	4	1.33	7

注 Notes: 1 个抑制活力单位 U 定义为每分钟 A_{750} 变化 0.001。One unit of inhibitory activity is defined as 0.001 decrease in absorbance at 750 nm per minute when HCB degrades Hb.

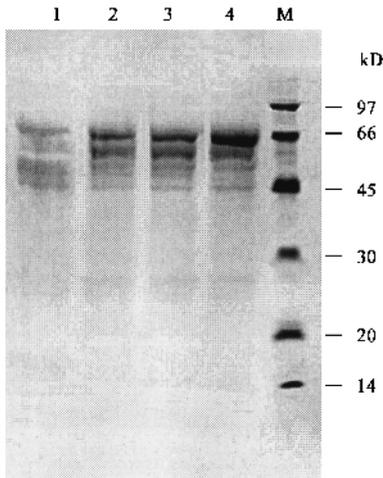


图 3 SDS-PAGE 检测 HCB-SoyI 对 HCB 水解 BSA 的抑制作用(胶浓度为 12.5%)

Fig. 3 SDS-PAGE showing the effect of HCB-SoyI to HCB (12.5% gel)

1: BSA + HCB; 2: BSA + HCB + 40 μ L HCB-SoyI; 3: BSA + HCB + 80 μ L HCB-SoyI; 4: BSA + HCB + 120 μ L HCB-SoyI; M: 蛋白质分子量标准 Protein standard. 上样量 30 μ L; BSA, HCB 和 HCB-SoyI 浓度分别为 0.1%, 0.3 mg/mL 和 0.2 mg/mL。30 μ L per lane. The concentrations of BSA, HCB and HCB-SoyI are 0.1%, 0.3 mg/mL and 0.2 mg/mL.

3 讨论

大豆中已有多种蛋白酶抑制因子被纯化和测序,本实验从大豆中纯化的 HCB-SoyI 分子量经 SDS-PAGE 测定为 8 kD,从 www.ncbi.nlm.nih.gov 比较得知,其 N-末端的 10 个氨基酸序列 DDESSLPXXD 不同于已报道的大豆丝氨酸蛋白酶抑制因子 KTK (gi|256429|gb|AAB23464.1|bbm|243572|bbs|114634|256429) 和 BBK (gi|124037|sp|P12940|IBB_HORVU|124037),也不同于已报道的大豆半胱氨酸蛋白酶抑制因子 soyacystatin N (gi|1277166|gb|AAA97906.1|1277166)、soyacystatin I (gi|1277164|gb|AAA97905.1|1277164)、soyacystatin R ([\[AAA97907.1|1277168\]\(http://gi|1277168\)\)、soyacystatin G \(\[gi|99896|pir|S10588|99896\]\(http://gi|99896|pir|S10588|99896\)\) 和另一种分子量为 13 kD 的 soyacystatin \(\[gi|7488657|pir|T07139|7488657\]\(http://gi|7488657|pir|T07139|7488657\)\),因此, HCB-SoyI 是一种新的组织蛋白酶 B 抑制因子。](http://gi|1277168|gb|</p>
</div>
<div data-bbox=)

Liu 等 (2004) 研究发现,大豆半胱氨酸蛋白酶抑制因子 soyacystatin N 可以增加鞘翅目昆虫黄瓜十一星叶甲 *Diabrotica undecimpunctata howardi* 幼虫死亡率和降低其生长率。但 HCB 的作用环境为酸性,在棉铃虫幼虫中肠中没有检测到该蛋白酶活性 (Zhao *et al.*, 2002),因此, HCB-SoyI 用于控制棉铃虫的可能途径是通过雌成虫取食进入虫体,抑制棉铃虫成虫体内 HCB 活性,影响卵巢发育和胚胎发育,从而达到杀虫的效果。关于 HCB-SoyI 对棉铃虫生长发育的影响,还需要进一步研究。

目前,转基因抗虫作物的抗虫基因主要是 Bt 毒蛋白基因,它可以通过破坏害虫的中肠细胞壁控制害虫 (Cetin *et al.*, 2004),由于害虫产生适应性,已经出现抗性。另外还有豇豆胰蛋白酶抑制因子基因,通过抑制幼虫消化道蛋白酶控制害虫,但幼虫消化道蛋白酶可以代偿性调节蛋白酶种类和表达量 (Ahn *et al.*, 2004),使杀虫效果降低。因此,发现新的害虫控制基因是制约转基因抗虫作物研究的瓶颈。棉铃虫组织蛋白酶 B 在成虫期表达,参与成虫脂肪体的解体,为卵母细胞发育提供养料,在胚胎发育中水解卵黄蛋白,供给胚胎发育必需的氨基酸, HCB-SoyI 的发现可以为转基因抗虫作物的研究提供新的思路。

参考文献 (References)

- Ahn JE, Salzman RA, Braunagel SC, Koiwa H, Zhu-Salzman K, 2004. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. *Insect Mol. Biol.*, 13: 649–657.
- Botella MA, Xu Y, Prabha TN, Zhao Y, Narasimhan ML, Wilson KA, Nielsen SS, Bressan RA, Hasegawa PM, 1996. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, 112:

- 1 201 - 1 210.
- Bowna DP, Wilkinson HS, Jongsma MA, Gatehouse JA, 2004. Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 305 - 320.
- Brzin J, Ritonja A, Popovic T, Turk V, 1990. Low molecular mass protein inhibitor of cysteine proteinases from soybean. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler. Suppl.*, 371: 167 - 170.
- Cetin S, Ford HR, Sysko LR, Agarwal C, Wang J, Neal MD, Baty C, Apodaca G, Hackam DJ, 2004. Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and increased focal adhesions. *J. Biol. Chem.*, 279(23): 24 592 - 24 600.
- John T, Elisabeth PJ, Valentina M, Heather S, Colleen M, Louise A, 2002. The expression of a mammalian proteinase inhibitor, bovine spleen trypsin inhibitor in tobacco and its effects on *Helicoverpa armigera* larvae. *Transgen. Res.*, 11: 161 - 173.
- Koiwa H, Shade RE, Zhu-Salzman K, Subramanian L, Murdock LL, Nielsen SS, Bressan RA, Hasegawa PM, 1998. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *Plant J.*, 14(3): 371 - 379.
- Kunitz M, 1945. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 101: 668 - 669.
- Kunitz M, Northrop JH, 1936. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, trypsin inhibitor and an inhibitor-trypsin compound. *J. Gen. Physiol.*, 19: 991 - 1 007.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680 - 685.
- Liu Y, Salzman RA, Pankiw T, Zhu-Salzman K, 2004. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 1 069 - 1 177.
- Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randal RJ, 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265 - 275.
- Misaka T, Kuroda M, Iwabuchi K, Abe K, Arai S, 1996. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. *Eur. J. Biochem.*, 240: 609 - 614.
- Telang M, Srinivasan A, Patankar A, Harsulkar A, Joshi V, 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry*, 63(4): 643 - 652.
- Zhao XF, An XM, Wang JX, Du XJ, Dong DJ, Sueda S, Kondo H, 2005. Recombinant expression of *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase in *E. coli* and detection of the enzyme in embryonic development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 58: 39 - 46.
- Zhao XF, Wang JX, Wang YC, 1998. Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 259 - 264.
- Zhao XF, Wang JX, Xu XL, Schmid R, Wiczorek H, 2002. Molecular cloning and characterization of the cathepsin B-like proteinase from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol. Biol.*, 11: 567 - 575.
- Zimacheva AV, Mosolov VV, 1995. Cysteine proteinase inhibitors from soybean seeds. *Biokhimiia*, 60(1): 118 - 123.

(责任编辑:黄玲巧)