

中华稻蝗谷胱甘肽 S-转移酶的分离纯化^{*}

郭艳琼^{1,2} 吴海花¹ 宣涛¹ 张建珍¹ 郭亚平¹ 马恩波^{1**}

(1. 山西大学应用生物研究所 太原 030006; 2. 山西农业大学农学院 太谷 030801)

摘要 采用硫酸铵沉淀法和 GSH-agarose 亲和层析法,对中华稻蝗 *Oxya chinensis*(Thunberg) 5 龄若虫谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)进行了分离纯化。结果表明:经硫酸铵沉淀,饱和度在 60%~80% 下沉淀中 GSTs 比活力较高,饱和度 90% 时比活力达到最高,为 0.3046 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$,纯化倍数为 1.82。进一步经 GSH-agarose 亲和层析纯化后,比活力最高达到 8.5185 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$,纯化倍数为 50.88。经 SDS-PAGE 电泳检测,呈现单一的条带,亚基的分子量约为 25.4 ku。此组分的纯化成功为进一步研究中华稻蝗谷胱甘肽 S-转移酶的酶学性质、结构特点和作用原理提供了基础资料。

关键词 谷胱甘肽硫转移酶,中华稻蝗,纯化,亲和层析

Affinity chromatography for the purification of glutathione S-transferase from *Oxya chinensis*

GUO Yan-Qiong^{1,2} WU Hai-Hua¹ XUAN Tao¹ ZHANG Jian-Zhen¹

GUO Ya-Ping¹ MA En-Bo^{1**}

(1. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. College of Agriculture, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801, China)

Abstract Glutathione S-transferase (GST) in the fifth-instar nymphs of *Oxya chinensis*(Thunberg) was purified by ammonium sulfate and GSH-agarose affinity chromatography. Higher specific activity of GSTs could be detected at 60%~80% purity, and the highest specific activity was found at 90%. The specific activity was 0.3046 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$, and the purification factor was 1.82-fold. Further GSH-agarose affinity chromatography indicated that purification reached 50.88 with specific activity of 8.5185 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$. SDS-PAGE analysis indicated that the purified GSTs preparation had a single band with a relative molecular mass of 25.4 ku. These results provide the basis for further study of the enzymatic properties, structural characteristics and functions of the GSTs of *O. chinensis*.

Key words glutathione S-transferases (GSTs), *Oxya chinensis*, purification, affinity chromatography

谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, 简称 GSTs)是昆虫解毒酶系统中的一类重要的多功能超基因家族酶(Qin *et al.*, 2011),其主要功能是催化机体内某些内源性或外来有害物质的亲电子基团与还原型谷胱甘肽的巯基偶联,增加其疏水性,最终被降解而排出体外,从而保护了机体内重要的亲核物质如蛋白质和核酸等,达到解毒的目的(刘小丽等, 2003; 杨海灵等, 2006)。已有的研究发现谷胱甘肽 S-转移酶活性的提高是昆

虫对杀虫剂产生抗药性的一个重要机制(吕敏, 2003; 张永国和亢晋勇, 2006)。

中华稻蝗 *Oxya chinensis*(Thunberg)属于昆虫纲(Insecta),直翅目(Orthoptera),蝗总科(Acridoidea),斑腿蝗科(Oedipodidae),稻蝗属(*Oxya* Serville),主要取食水稻叶片和其它禾本科植物,是重要的植食性农业害虫(郑哲民, 1993)。目前在中华稻蝗的防治中,利用化学杀虫剂仍为主要手段。长期大量使用化学杀虫剂势必引起害

^{*} 资助项目:国家自然科学基金重大国际合作项目(30810103907)、国家自然科学基金(30870302)、中国博士后科学基金(201003656 和 20090451359)。

^{**} 通讯作者, E-mail: maenbo2003@sxu.edu.cn

收稿日期: 2011-05-01, 接受日期: 2011-05-06

虫产生抗药性,这不但削弱了化学防治的效果,而且也增加了防治的难度和成本,同时也带来一系列环境和健康问题(吴海花等,2007)。吴海花(2007)通过对谷胱甘肽 S-转移酶在中华稻蝗不同组织中的分布及特性进行研究,发现 GSTs 在中华稻蝗不同组织中均有分布,但各组织对不同底物的结合和催化能力及对抑制剂的敏感性不同,这一结果表明不同组织谷胱甘肽 S-转移酶的同工酶组成形式不同。采用蛋白纯化的方法得到各种同工酶,并对其性质进行研究,找到与抗性或诱导相关的同工酶,对于抗性治理和新农药的开发都具有重要意义。本研究采用硫酸铵沉淀法和 GSH-agrose 亲和层析法,从 5 龄稻蝗整虫中分离纯化出具有生物活性的 GSTs。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试虫 实验中所用的中华稻蝗 *Oxya chinensis* 为从田间挖取的蝗卵经实验室孵化所得。若虫孵化后用新鲜麦苗饲喂于纱笼中,每天更换 1 次新鲜麦苗。待其发育到 5 龄选取蜕皮后 2~3 d 活力良好的若虫 30 头,冻存于 -80℃ 冰箱供试。

1.1.2 主要化学试剂 GSH-agrose (Sigma 公司),还原型谷胱甘肽(GSH,BBI 化学试剂公司),1 氯-2,4-二硝基苯(CDNB,上海生工生物工程有限公司),牛血清白蛋白(BSA,Bio-Rad 公司)。其它化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器 DY89-II 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司),高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),DYZC-24DN 型双垂直电泳仪(北京六一仪器厂),SpectraMAX 190 型酶标仪(美国 Molecular Device 公司)。

1.2 方法

1.2.1 GSTs 酶源的提取 取 -80℃ 冻存的中华稻蝗 5 龄若虫称重,在冰浴条件下,用预冷的 0.1 mol/L、pH7.5 磷酸缓冲液(含 0.3% Triton X-100)按照 1:10 (W/V) 的比例加入放有 5 龄若虫的匀浆器。用玻璃电动匀浆机 500 rpm 匀浆 5 min,匀浆液于 4℃,15 000 g 离心 20 min,上清液即为粗酶提取液。上清液转移到一个新的离心管中,并置于冰上备用。

1.2.2 GSTs 粗酶液的硫酸铵沉淀 将固体硫酸

铵研细后在搅动的条件下缓慢加入粗酶液中,使其饱和度达到 20%,在冰上放置 30 min 使硫酸铵充分溶解,4℃ 静置 10 min,4℃ 12 000 g 离心 30 min 分离沉淀与上清液。上清液中继续加入固体硫酸铵调至 30%~100% 饱和度,每次加入硫酸铵均需充分溶解,4℃ 静置 10 min,4℃,12 000 g 离心 30 min 分离沉淀与上清液。最后弃上清液,加入 0.1 mol/L、pH7.5 磷酸缓冲液(含 0.3% Triton X-100)溶解各阶段沉淀,测定每个饱和度对应的沉淀 GSTs 酶活力与蛋白含量,确定最高比活力的对应饱和度,将比活力最高的饱和度对应的沉淀溶解液作为 GSTs 粗酶工作液,贮存于 4℃ 冰箱备用。

1.2.3 GSTs 的 GSH-agrose 亲和层析 先将经过饱和硫酸铵 60%~90% 沉淀段的 GSTs 粗酶工作液装入透析袋中透析,每 2 h 换 1 次透析液,用奈试剂检测 NH_4^+ 的存在,经透析脱盐后进行 GSH-agrose 亲和层析。

将预处理的 GSH-agrose 按说明书要求装入 1:10 的凝胶柱。用 0.1 mol/L、pH7.5 磷酸缓冲液(含 1.5 mol/L NaCl)平衡层析柱,流速为 1 mL/min。然后将透析并过滤后的粗酶工作液上样过柱,用 10 mmol/L、pH7.4 的磷酸缓冲液(含 0.1% Triton X-100)洗脱杂蛋白,随后用 50 mmol/L、pH9.0 的 Tris-HCl(含 8 mmol/L 的 GSH)洗脱液洗脱 GSTs 蛋白,并分部收集洗脱组分。测定每管的 GSTs 酶活性,确定酶比活力最高的管,收集纯酶,置于 4℃ 冰箱保存。

1.2.4 GSTs 酶活力测定 参照 Zhu 和 He (2000) 的方法,以 CDNB 和 GSH 为底物稍做修改进行测定。取 10 μL 适当稀释的酶液与 190 μL 200 mmol/L GSH 和 10.35 mmol/L 的 CDNB 混合液(GSH:CDNB=188:2)混合,用酶标仪在 340 nm 处每隔 10 s 计数 1 min,记录 OD 值。每个样品设 3 个重复。对照组用 10 μL 提取缓冲液代替酶液。CDNB 的摩尔消光系数为 $9.6 \text{ m} \cdot (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

1.2.5 蛋白含量的测定 根据 Smith 等(1985)的方法,用牛血清白蛋白作标准,Bio-Rad Protein Assay 法测定蛋白质浓度(李海燕等 2008)。

1.2.6 GSTs 纯度鉴定及酶相对分子质量测定 GSTs 纯度鉴定和蛋白质分子量分析采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法。分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 4%,电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色,再

用脱色液脱色,直至出现清晰的条带(王霞等,2011)。

2 结果与分析

2.1 中华稻蝗 GSTs 粗酶液的硫酸铵沉淀

中华稻蝗 GSTs 在 60% ~ 90% 饱和度下沉淀出来(图 1)。由图 1 可以看出,当硫酸铵饱和度为 90% 时目的蛋白的比活力最大,为 0.3046 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$,粗酶液的比活力为 0.1674 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$,纯化倍数为 1.82 倍。

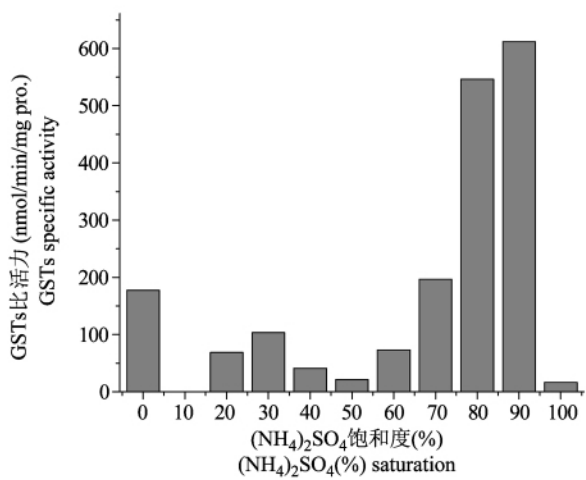


图 1 不同饱和度的硫酸铵沉淀中中华稻蝗 GSTs 比活力的变化

Fig. 1 Specific activity of GSTs in different (NH₄)₂SO₄ saturation

2.2 经硫酸铵沉淀后的 GSTs 的亲和层析

根据硫酸铵粗沉淀中华稻蝗 GSTs 结果(图 1),选择 GSTs 比活力较高的 60% ~ 90% 沉淀段,粗酶液经透析脱盐后进行 GSH-agarose 亲和层析。用洗脱液洗脱进行分步收集,共收集到 15 管收集份。目的蛋白洗脱后蛋白含量及 GSTs 比活力变化如图 2,GSTs 比活力在第 3 管收集份中出现 1 个峰,蛋白含量在第 5、6、8 管比较高。GSTs 经硫酸铵沉淀和 GSH-agarose 亲和层析的每步纯化结果详见表 1。

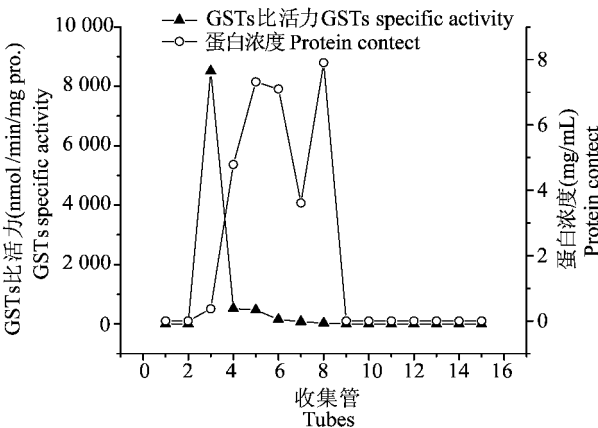


图 2 GSH-agarose 亲和层析纯化 GSTs
Fig. 2 GSH-agarose affinity chromatography of the GSTs from *Oxya chinensis*

表 1 中华稻蝗 GSTs 经硫酸铵沉淀和 GSH-agarose 亲和层析的纯化结果
Table 1 Purification results of the GSTs from *Oxya chinensis* with ammonium sulfate and GSH-agarose affinity chromatography

步骤 Purification step	总蛋白 Total protein (mg)	GSTs 总活力 Total enzyme activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	GSTs 比活力 GSTs specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	纯化倍数 Purification fold	回收率 Yield (%)
粗酶液 Crude extract	446.6195	74.7731	0.1674	1	100
60% ~ 90% 的硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate with saturation 60% —90%	58.1683	17.7201	0.3046	1.82	23.70
GSH-agarose 亲和层析 GSH-agarose affinity chromatography	0.7497	6.3866	8.5185	50.88	8.54

由表 1 可见,粗酶液中 GSTs 的比活力为 $0.1674 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$,经过 60% ~ 90% 的硫酸铵分段盐析沉淀后, GSTs 比活力为 $0.3046 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$,纯化倍数为 1.82,回收率为 23.70%;再经 GSH-agarose 亲和层析纯化后, GSTs 的比活力为 $8.5185 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$,纯化倍数为 50.88,回收率为 8.54%。

2.3 GSTs 纯度鉴定及酶相对分子质量测定

将经过 GSH-agarose 亲和层析分离纯化后收集的酶活力最高的第 3 管组分,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,检测其纯度和分子量,结果如图 3 所示。

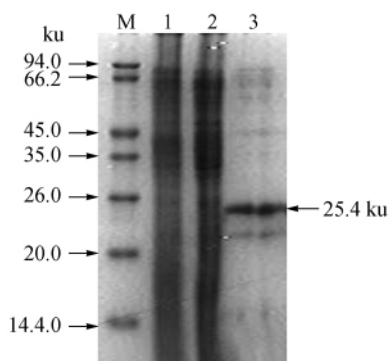


图 3 中华稻蝗 GSTs 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoretogram of tube 3 with GSH-agarose affinity chromatograph

M: Protein markers; 2: Crude GSTs;
3: Dialysate; 4: Purified GSTs.

由图 3 可知 GSH-agarose 亲和层析第 3 管组分经 SDS-PAGE 电泳,在分子量 20.0 ~ 26.0 ku 之间有一条明显的蛋白带。将经过 SDS-PAGE 电泳后的分子量标准蛋白质的迁移率对分子量对数作图得到一条标准曲线,样品蛋白质在相同条件下进行电泳,根据它的迁移率即可在标准曲线上求得,分子量位于 20.0 ~ 26.0 ku 之间的明显蛋白带的分子量约为 25.4 ku (图 3)。

3 讨论

分离纯化是进行蛋白质结构和功能研究的基础。粗酶液中除目的酶蛋白外,还混有其它种类众多的蛋白质、脂类等物质,尤其是各种水解酶类对目的酶活性的结果影响较大。作为昆虫体内一

类重要的解毒酶系, GSTs 参与许多分子的解毒机制,并可转运一些重要的亲脂性化合物 (Qin *et al.*, 2011)。GSTs 在保护组织以抵御氧化侵害及氧化压力中起重要作用, GSTs 是昆虫及螨类对有机磷类杀虫剂产生抗性的重要因素 (宣涛等, 2009)。采用蛋白纯化的方法分离参与抗药性的同工酶,明确其生物化学特性及其与抗药性的关系,对于害虫的抗药性治理具有重要意义。

目前对于昆虫的谷胱甘肽 S-转移酶纯化方法主要有沉淀法、亲和层析法及电泳法等 (汤方和高希武, 2007)。GSTs 纯化的最初研究大多采用硫酸铵粗级沉淀法。该方法可用于从大量的粗酶制剂中浓缩和部分纯化酶蛋白,且不改变酶的性质。但经该方法纯化后的酶蛋白,虽能除去大量的杂蛋白,但纯化倍数较低,往往只能达到几倍的纯化效果。如 Chien 和 Dauterman (1991) 用硫酸铵分段沉淀的方法从美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 中初步纯化的 GSTs 仅获得 4.3 的纯化倍数; Yawetz 和 Koren (1984) 用硫酸铵沉淀纯化地中海蜡实蝇 *Ceratitis capitata* GSTs, 纯化倍数为 6.3。本文通过实验确定了中华稻蝗提取液硫酸铵分级沉淀的范围,达到了浓缩与初步纯化 GSTs 的目的,为该酶进一步纯化打下了基础。

GSH-agarose 亲和层析是利用谷胱甘肽与谷胱甘肽硫转移酶之间具有特异的作用力,将一种配体 (即谷胱甘肽) 共价结合到固体介质 (琼脂糖凝胶) 上,使 GSTs 与配体结合,就可将与配体没有亲和性的杂质洗脱下来,然后利用谷胱甘肽或其它能与配体竞争的分子把 GSTs 洗脱下来,从而获得纯化的 GSTs 酶的纯品 (陈勇等, 2001)。Kunanz 和 Nanen (2004) 采用 GSH-agarose 亲和柱对二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 3 个品系, Rauch 和 Nanen (2004) 对烟粉虱 *Bemisia tabaci* 8 个品系进行了纯化。

本实验室宣涛等 (2009) 采用硫酸铵分级沉淀和 GSH-agarose 亲和层析相结合的方法,从东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 体内成功分离纯化了谷胱甘肽 S-转移酶。本文采用已建立的方法对中华稻蝗的谷胱甘肽 S-转移酶进行分离纯化,经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测所得的谷胱甘肽 S-转移酶样品为单一组分。东亚飞蝗与中华稻蝗同属蝗总科,其中东亚飞蝗为斑翅蝗科,而中华稻蝗为斑腿蝗科,通过对 2 种昆虫谷胱甘肽 S-转移酶纯

化结果进行比较分析,发现先后经硫酸铵沉淀和 GSH-agarose 亲和层析纯化后,2 种蝗虫 GSTs 获得的纯化倍数相似,分别为 61.25 和 50.88 倍。但由于物种的差异造成其体内的蛋白和脂肪含量有所差异,分离纯化结果略有不同,如硫酸铵分级沉淀时 GSTs 比活力达到最大时的硫酸铵饱和度不同,东亚飞蝗 GSTs 比活力在硫酸铵饱和度为 85% 时最高,而中华稻蝗 GSTs 比活力在硫酸铵饱和度为 90% 时最高;其次纯化获得的产物分子量也稍有差异,东亚飞蝗 GSTs 分子量为 24 ku,中华稻蝗 GSTs 分子量为 25.4 ku,分子量大小均与文献中已报道昆虫 GSTs 的分子量(24.9 ± 3.1) ku 范围相一致(豆威 2009)。

综上所述,本研究所采用的硫酸铵分级沉淀和 GSH-agarose 亲和层析的方法对中华稻蝗 GSTs 进行了成功纯化,这一结果为进一步研究中华稻蝗谷胱甘肽 S-转移酶的酶学性质、结构特点、作用原理以及分子生物学相关资料提供了基础资料,并为进一步寻找在抗性中起重要作用的谷胱甘肽 S-转移酶,筛选和研制抑制其酶活性的化合物作为杀虫剂或增效剂提供了理论和实验依据。

参考文献 (References)

- 陈勇,徐焱,应汉杰 2001. 亲和层析研究进展. 离子交换与吸附, 17(3): 276—280.
- Chien C, Dauterman WC, 1991. Studies on glutathione S-transferase in *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *zea*. *Insect Biochemistry*, 21(8): 857—864.
- 豆威 2009. 书虱谷胱甘肽 S-转移酶的纯化及生化毒理学特性研究. 博士学位论文. 重庆: 西南大学.
- Kunanz S, Nauen R, 2004. Purification and partial characterization of a glutathione S-transferase from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pestic. Biochem. Phys.*, 79(2): 49—57.
- 李海燕, 靳艳, 张卫 2008. 龙须菜中溴过氧化物酶的分离纯化及酶学性质分析. 生物工程学报, 24(4): 662—666.
- 刘小丽, 廖祥儒, 赵立梅 2003. GST 酶的提取纯化及特性分析. 河北大学学报(自然科学版) 23(2): 170—174.
- 吕敏 2003. 谷胱甘肽 S-转移酶与昆虫抗药性的关系. 昆虫知识 40(3): 204—207 转 228.
- Qin GH, Jia M, Liu T, Xuan T, Zhu KY, Guo YP, Ma EB, Zhang JZ, 2011. Identification and characterization of ten glutathione S-transferase genes from oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pest Manag. Sci.*, (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.
- Rauch N, Nauen R, 2004. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase from the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 321—329.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1): 76—85.
- 汤方, 高希武 2007. 昆虫谷胱甘肽 S-转移酶蛋白纯化技术研究. 昆虫知识 44(3): 810—814.
- 王霞, 刘铭钧, 高俊娥 2011. 太阳鱼脑乙酰胆碱酯酶的分离纯化. 应用与环境生物学报, 17(1): 135—137.
- 吴海花 2007. 中华稻蝗对马拉硫磷的敏感性及其生化机理研究. 博士学位论文. 山西: 山西大学.
- 吴海花, 杨美玲, 郭亚平 2007. 不同中华稻蝗种群对马拉硫磷的敏感性及其乙酰胆碱酯酶特性的比较. 农业环境科学学报 26(1): 179—183.
- 宣涛, 吴海花, 郭亚平 2009. 东亚飞蝗谷胱甘肽 S-转移酶分离纯化. 昆虫知识 46(3): 480—484.
- 杨海灵, 聂力嘉, 朱圣庚 2006. 谷胱甘肽硫转移酶结构与功能研究进展. 成都大学学报(自然科学版) 25(1): 9—24.
- Yawetz A, Koren B, 1984. Purification and properties of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* W. glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry*, 14(6): 663—670.
- 张永国, 亢晋勇 2006. 谷胱甘肽硫转移酶的生理功能述评. 忻州师范学院学报 22(3): 124—128.
- 郑哲民 1993. 蝗虫分类学. 西安: 陕西师范大学出版社. 76—80.
- Zhu KY, He FQ, 2000. Elevated esterases exhibiting arylesterase-like characteristics in an organophosphate-resistant clone of the greenbug, *Schizaphis graminum*. *Pestic. Biochem. Phys.*, 67(3): 155—167.