

技术与方法

一种烟粉虱成虫唾液酶鉴定与活性分析的方法^{*}

彭 露^{1 2 **} 严 盈² 万方浩^{2 ***} 王进军¹

(1. 西南大学植物保护学院重庆市昆虫学及害虫控制工程重点实验室 重庆 400716;

2. 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100081)

A method to identify and analyze salivary enzymes of *Bemisia tabaci* adults. PENG Lu^{1 2 **}, YAN Yin², WAN Fang-Hao^{2 ***}, WANG Jin-Jun¹ (1. Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China, 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract A method to identify and analyze the salivary enzymes of small piercing-sucking insects, including artificial feeding, saliva collection, enzyme identification and analysis of salivary polyphenol oxidase and peroxidase, was developed using *Bemisia tabaci* (Gennadius) B-biotype adults. The result show that PPO and POD activity in the watery saliva of *B. tabaci* B-biotype feeding on cabbage were respectively 1.54 and 1.65 fold higher than those feeding on tomato. This new method provides a simple intuitive and sensitive way of identifying and measuring the activity of enzymes in insect saliva. This method can also be applied to other small piercing-sucking insects, such as aphids and psyllids.

Key words piercing-sucking insect, *Bemisia tabaci*, saliva collection, identification and analysis

摘 要 以 B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 成虫为材料,介绍了一种微型刺吸式昆虫唾液酶鉴定和分析的方法,主要包括人工饲养、唾液收集、唾液多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)的鉴定与活性分析。结果显示, B 型烟粉虱在特异性嗜好寄主甘蓝上分泌的多酚氧化酶与过氧化物酶的比活力分别为嗜好寄主番茄上的 1.54 和 1.65 倍。该方法操作简捷,鉴定结果直观清晰,酶活测定灵敏,适合于其他微型刺吸式昆虫如蚜虫、木虱等的唾液酶研究。

关键词 刺吸式昆虫,烟粉虱,唾液酶,鉴定与分析

近年来,在植食者与植物互作的两级关系中,人们开始越来越多地关注植食者唾液组分所起的作用,例如消化植物、传播病毒、干扰植物伤信号、降解植物防御物质、引起植物坏疽等^[1,2]。刺吸式昆虫取食时一般会分泌两种唾液:胶状唾液会在取食早期分泌,形成唾液鞘来围绕并保护口针;水状唾液会在刺穿植物组织时分泌,用以传导果胶酶、纤维素酶、多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、碱性磷酸酯酶、蔗糖酶等组分^[3]。其中,多酚氧化酶和过氧化物酶是刺吸式昆虫唾液中最为常见又重要的酶。多酚氧化酶可以干扰植物体内正常氧化还

原反应的平衡,从而调控食物来源向更有利于昆虫的方向发展^[4],同时还能氧化食物中刺吸式昆虫无法接受的酚类单体,形成可以接受的酚低聚体^[5];而过氧化物酶除了与多酚氧化酶具有很多共同的目标酚类物质外,还有一部分特有的目标物质,如丁布(DIMBOA)、芦竹碱、苯乙烯酸等^[6]。因此,多酚氧化酶与过氧化物

^{*} 资助项目:国家重点基础研究发展计划(2009CB119200)、“十一五”国家科技支撑计划课题(2006BAD08A17)。

^{**} E-mail: pl526520@163.com

^{***} 通讯作者, E-mail: wanfh@mail.caas.net.cn

收稿日期:2009-12-30,修回日期:2010-03-24

酶的解毒作用对于刺吸式昆虫克服特定寄主中的酚类物质无疑具有重要的意义。B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) B-biotype 作为一类典型的刺吸式害虫,其唾液组分能够帮助传播双生病毒^[7],降解植物有毒次生物质和引起植物生理异常,包括西葫芦的银叶反应^[8]、莴苣叶的黄化、青椒叶上的白色条斑、甘蓝茎干的白化^[9]和番茄的不规则成熟^[10]等。作者主要研究了 B 型烟粉虱唾液中多酚氧化酶 [E. C. 1.10.3.1] 与过氧化物酶 [E. C. 1.11.1.7] 对植物酚类物质的代谢解毒作用。但由于 B 型烟粉虱个体较小,唾液提取较为困难,限制了其唾液组分的相关研究。本文参照 Cherqui (2000)^[11]设计了一种适合烟粉虱唾液 PPO 和 POD 鉴定和分析的方法,同时也可应用于其他微型刺吸式昆虫如蚜虫、木虱等唾液酶的研究。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

B 型烟粉虱采自作者实验室温室长期饲养种群,寄主植物为番茄和甘蓝,无用药史;饲养温度为 $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$,自然光照。

1.2 主要试剂及仪器

试剂:牛血清白蛋白 (BSA)、蔗糖、琼脂糖购自于 Amresco 公司;2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES)、二氨基联苯胺 (DAB) 购自于 Sigma 公司;多巴 (dopa) 购自于 Fluka 公司。仪器:高速冷冻离心机 (Sigma, 美国),赛多利斯聚醚砜膜超滤离心管 (Sartorius, 美国)。

1.3 人工饲养

人工饲养需在超净工作台上进行,选取两端通透的玻璃管(直径 3 cm,高 8 cm)作为饲养室,玻璃管朝上端用双层 Parafilm 膜覆盖,底膜须尽可能拉薄,确保粉虱能够顺利穿刺取食。Parafilm 膜在使用前需用无菌水浸泡一周,消除 UV 吸收的可溶性物种,然后在 30°C 无菌条件下晾干备用。膜间加入人工饲料(见 1.4 和 1.5),然后在上层膜上覆盖第 3 层膜,防止破裂。从不同寄主上收集粉虱成虫 400 头左右,冻晕后置饲养室内,迅速用透气纱布覆盖玻璃

管下端并用橡皮筋固定(图 1:A)。将处理好的饲养室放入光照培养箱(温度 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$,光周期 L:D = 14:10, RH = 60%)中,粉虱苏醒后会立即飞附在底层 Parafilm 膜上取食(图 1:B)。

1.4 唾液 PPO 和 POD 的鉴定

向琼脂糖胶状饲料中加入酶的特异底物,粉虱唾液酶会催化该底物使胶状饲料着色,通过着色现象即可进行相关酶的鉴定,本方法根据这一原理来鉴定 PPO 与 POD。

PPO:在 1 mL 饲养液加入 0.0125 g 琼脂糖,与 1 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 混合,然后加入 0.1% 多巴底物,备用。待粉虱取食 48 h 后,移走粉虱,揭去上层膜,观察食料上表面的颜色变化。如果出现黑色的鞘状物,则说明粉虱胶状唾液中含有多酚氧化酶;如果出现黑色的晕圈,则证明粉虱水状唾液中含有多酚氧化酶。

POD:在 1 mL 饲养液中加入 0.0125 g 琼脂糖,与 1 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0) 混合,然后加入 0.1% DAB 底物与 $20\ \mu\text{L}\ \text{H}_2\text{O}_2$,备用。待粉虱取食 48 h 后,移走粉虱,揭去上层膜,观察食料上表面的颜色变化。如果出现红色的鞘状物,则说明粉虱胶状唾液中含有过氧化物酶;如果出现红色的晕圈,则证明粉虱水状唾液中含有过氧化物酶。

1.5 唾液 PPO 和 POD 的活性分析

1.5.1 粉虱唾液的提取 (1) 采用液体饲料:向蒸馏水中加入蔗糖与 MES,使其浓度分别为 10% 和 100 mmol/L,再用 KOH 将饲养液的 pH 值调至 6.5,在 120°C 下,灭菌 15 min, MES 用于稳定饲养液的 pH 值。待粉虱取食 48 h 后,使用一次性注射器回收含有粉虱唾液的液体饲料,随后加入 100 μL 的超纯水润洗底膜后再次回收,吸取过程需谨慎防底膜破裂。(2) 将 3 个饲养室回收的饲养液合置于 1 个 2 mL 的赛多利斯聚醚砜膜超滤离心管中, PPO 与 POD 测定时使用的超滤离心管膜,截留分子量分别为 30 ku MW 和 5 ku MW。(3) 向离心管中添加 BSA (终浓度为 0.25 mg/mL),以稳定蛋白,消除酶

原与滤膜的非特异性结合。(4)最后在6 000 r/min,4℃下浓缩离心至约200 μL。

1.5.2 粉虱唾液成分活性的测定 以浓缩后的液体饲料作为酶液,建立酶活测定体系:

PPO: 反应体系为 210 μLNa₂HPO₄-

NaH₂PO₄ 缓冲液(0.2 mol/L,pH 7.4) +40 μL 邻苯二酚(500 mmol/L) +150 μL 酶液,37℃水浴 10 min,立即转入酶标仪,在 415 nm 处测定吸光度。

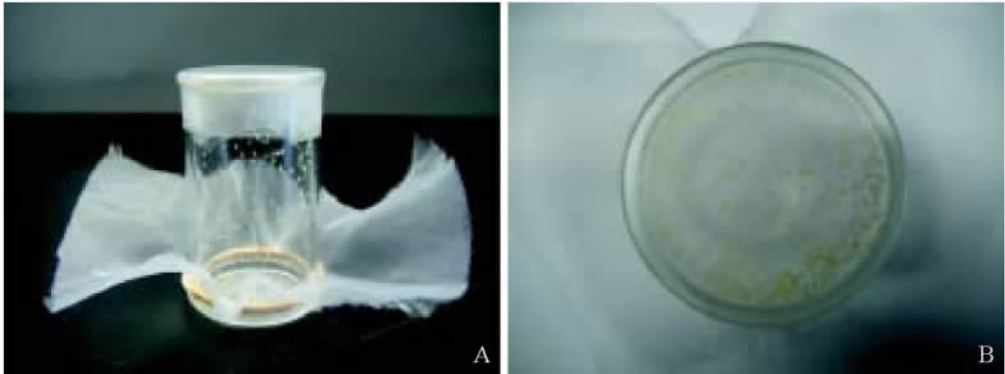


图1 粉虱人工饲养
A:饲养室;B:粉虱取食

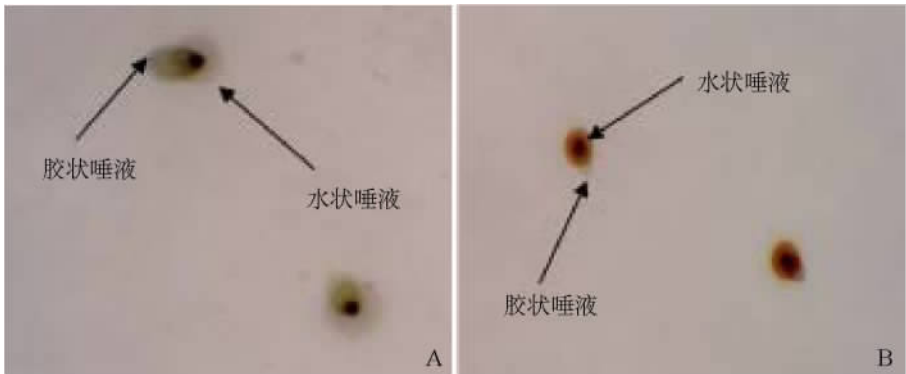


图2 B型烟粉虱 PPO 与 POD 的鉴定
A:黑色的晕圈与鞘代表水状唾液与胶状唾液中均存在 PPO
B:红色的晕圈与鞘代表水产生状唾液与胶状唾液中均存在 POD

POD: 反应体系为 200 μL Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液(0.2 mol/L,pH 7.0) +20 μL 1% H₂O₂ +30 μL 4% 愈创木酚 +150 μL 酶液,然后在 30℃水浴 40 min,立即转入酶标仪,在 470 nm 处测定吸光度。

两种酶均以每毫升酶液每分钟催化底物 OD 值改变 0.01 定义为一个酶活力单位(u)。各处理重复 5 次,每次重复制备酶液。

1.5.3 蛋白质含量测定 以牛血清白蛋白(BSA,Sigma)作为标准蛋白,制作标准曲线,

采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定。取浓缩饲养液(方法见 1.5.1)200 μL 加入酶标生测板(Costar,美国),再加入 100 μL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,用 680-型酶标仪(美国)于 595 nm 下处读取 OD 值,通过标准曲线查得待测样品提取液中蛋白质的含量。

1.5.4 比活力的计算 根据标准曲线和酶原蛋白的测定结果,将 OD 值转换成比活力,比活力计算公式为:比活力(OD/min·mg)=酶活力(OD/min·mL)/蛋白质含量(mg/mL)。

2 结果与分析

2.1 唾液 PPO 与 POD 的鉴定

粉虱取食时, 胶状唾液围绕口针分泌, 与饲料中底物反应形成清晰的着色口针鞘, 而水状唾液则从口针末端注入饲料后在胶体中扩散, 形成以口针尖为中心的着色晕圈, 口针尖由于酶浓度大, 出现颜色最深的点。鉴定结果表明, B 型烟粉虱水状唾液与胶状唾液中均存在 PPO (图 2:A) 与 POD (图 2:B)。由于不同的个体取食时间与分泌唾液的能力不同, 因此在饲养过程中, 着色的鞘与晕圈也不一致, 一般在粉虱取食 24 h 后开始出现, 并随着时间的延长, 着色点的个数逐渐增加, 着色深度也逐渐增强。因此唾液鞘和晕圈颜色的深浅在一定程度上反映了相关酶活力的大小, 同时认为这一唾液酶的鉴定原理也适用于其他唾液酶, 如蛋白酶、果胶酶等。

2.2 唾液 PPO 与 POD 的活性分析

利用浓缩后的液体饲料进行酶活性测定, 结果显示 B 型烟粉虱在不同寄主植物上唾液 PPO 与 POD 活性存在差异 (图 3), 表明了液体饲料提取浓缩的方法不仅能够检测出唾液酶的活性, 还能够灵敏地分析不同寄主上粉虱唾液

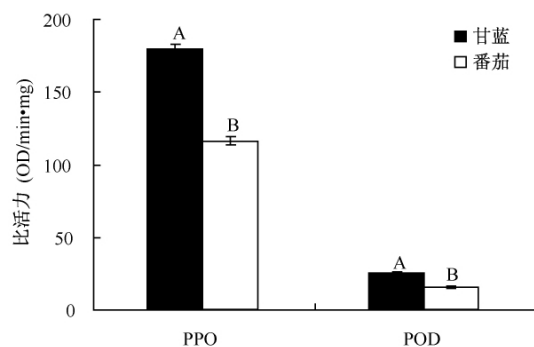


图 3 不同寄主植物上 B 型烟粉虱唾液 PPO 与 POD 的活性

注: 不同大写字母表示两种植物上的

B 型烟粉虱差异显著, $P < 0.05$ 。

酶的比活力差异, 从而有利于进一步的功能分析。该分析方法同样适用于其他唾液酶, 但需注意, 应根据目标酶的种类与分子量来选择超滤离心管膜的类型与截留分子量, 且在酶液浓缩时, 离心的时间与转速由滤膜的类型与截留分子量的大小决定。

参 考 文 献

- 1 严盈, 刘万学, 万方浩. 唾液成分在刺吸式昆虫与植物关系中的作用. 昆虫学报, 2008, **51**(1): 537 ~ 544.
- 2 陈明顺, 仵均祥, 张国辉. 植物诱导性直接防御. 昆虫知识, 2009, **46**(2): 175 ~ 186.
- 3 Miles P. W. Aphid saliva. *Biol. Rev.*, 1999, **74**: 41 ~ 85.
- 4 Miles P. W., Oertli J. J. The significance of antioxidants in the aphid-plant interaction: the redox hypothesis. *Entomol. Exp. Appl.*, 1993, **67**(3): 273 ~ 285.
- 5 Peng Z., Miles P. W. Acceptability of catechin and its oxidative condensation products to the rose aphid, *Macrosiphum rosae*. *Entomol. Exp. Appl.*, 1988, **47**(3): 255 ~ 265.
- 6 Madhusudhan V. V. Interaction of the Spotted Alfalfa Aphid and Its Food Plant. PhD Thesis, University of Adelaide, South Australia, 1994. 81.
- 7 Oliveira M. R. V., Henneberry T. J., Anderson P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 2001, **20**(9): 709 ~ 723.
- 8 Jiménez D. R., Yokomi R. K., Mayer R. T., et al. Cytology and physiology of silverleaf whitefly - induced squash silverleaf. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1995, **46**(3): 227 ~ 242.
- 9 Hoelmer K. A., Osborne L. S., Yokomi R. K. Foliage disorders in Florida associated with feeding by the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *The Florida Entomologist*, 1991, **74**(1): 162 ~ 166.
- 10 Schuster D. J., Stansly P. A., Polston J. E. Expressions of plant damage by *Bemisia*. In: Gerling D., Mayer R. T. (eds.). *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage Control and Management*, Intercept Ltd., Andover, Hants, UK, 1996. 153 ~ 165.
- 11 Cherqui A., Jjallingli W. F. Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immunolocalisation. *J. Insect Physiol.* 2000, **46**: 1 177 ~ 1 186.