

# 长足大竹象雄性附腺提取物抑菌作用研究

梁梓, 杜超豪, 杨瑶君\*, 农向, 廖鸿, 颜珊

(乐山师范学院生命科学院, 四川乐山 614004)

**摘要:**以3种细菌(大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Bacillus subtilis*、枯草芽孢杆菌 *Staphylococcus aureus*)为供试菌,测定了长足大竹象 *Cyrtotrachelus buqueti* 雄性附腺提取物的抑菌活性。结果表明:长足大竹象雄性附腺提取物对革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定的抑菌活性。不同浓度的粗提取物对枯草芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌抑菌影响差异均具有高度统计学意义( $P < 0.01$ ),抑菌活性随着粗提取物浓度的增加而增强。粗提取物对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度分别为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。不同处理温度对长足大竹象雄性附腺粗提取物的抑菌作用有一定影响。

**关键词:** 长足大竹象; 雄性附腺; 抑菌作用

**中图分类号:** Q965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7083(2016)01-0066-04

## Study on Antibacterial Activity of Male Accessory-gland Extracts from *Cyrtotrachelus buqueti*

LIANG Zi, DU Chao hao, YANG Yaojun\*, NONG Xiang, LIAO Hong, YAN Shan

(College of Life Science, Leshan Normal University, Leshan, Sichuan Province 614004, China)

**Abstract:** The antibacterial activities of male accessory-gland extracts from *Cyrtotrachelus buqueti* were determined using three species of bacteria (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*). The results showed that male accessory-gland extracts from *C. buqueti* had a certain antibacterial activity on the Gram-positive bacteria such as *B. subtilis* and *S. aureus*, and the antibacterial activities were significantly differed among different concentrations of male accessory-gland extracts. The antibacterial activity would increase with increasing concentrations of the extracts. The minimum inhibitory concentration of male accessory-gland extracts against *B. subtilis* and *S. aureus* were  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. Temperature also had a certain influence on the antibacterial effects of male accessory-gland extracts from *C. buqueti*.

**Key words:** *Cyrtotrachelus buqueti*; male accessory glands; antibacterial activity

长足大竹象 *Cyrtotrachelus buqueti* 又名竹横锥大象,属昆虫纲 Insecta 鞘翅目 Coleoptera 象甲科 Curculionidae,国内主要分布于重庆、广东、广西等地。长足大竹象是竹林主要害虫,国家林业局将它列为我国林业危险性有害生物之一(王维德等,2002)。

由于昆虫的生殖道直接与体内环境相连,是潜在的微生物通道,有时可能会消极地影响繁殖成功率。据文献报道,为了防止有害细菌或真菌的入侵,许多昆虫的生殖系统能产生抗菌肽,包括雄性附腺。将黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 未交配的雌虫与刚交配的雌虫生殖道作对比,发现后者增加了3种抗菌蛋白,其中一种蛋白(28 kDa)是雄性附腺的产物(Lung & Wolfner, 1999);这些蛋白在交配过程中比精子先转入到雌虫体内,使得交配后的雌虫生殖

道和卵都能抵抗细菌的侵染;在精子进入后,在雌虫生殖道内的这些蛋白可以保护精子免受细菌的侵害(Lung & Wolfner, 2001)。目前有关昆虫雄性附腺抑菌的研究已经有了一些报道,研究对象主要集中在作为生物学模式物种的黑腹果蝇(Wolfner, 2002; Ram & Wolfner, 2007)。本研究首次对长足大竹象雄性附腺抑菌作用进行研究,为下一步长足大竹象雄性附腺生理功能研究提供有价值的资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

2014年8月初,在乐山师范学院实验竹林罩网,采集捕捉竹笋上刚出土的长足大竹象成虫,根据虫的外形特征判断雌雄。随机采集体型中等大小的

收稿日期:2015-05-01 接受日期:2015-10-29 基金项目:四川省教育厅项目(13ZB0112)

作者简介:梁梓(1980—),女,高级实验师,研究方向:生物化学, E-mail:120564533@qq.com

\*通信作者 Corresponding author, 博士,教授,研究方向:林竹生态, E-mail:290316289@qq.com

雌、雄虫各 50 头,在温度 25 ℃、相对湿度 75%、光周期 16L:8D 环境下以盆栽竹笋喂食在室内饲养,每 2 d 更换 1 次竹笋,让其自由交配;用红外摄像系统实时监测其交配情况,交配一旦结束,随即采雄虫附腺或将雄虫转移至新饲养室继续饲养。实验分别采集刚出土,出土 24 h,交配后 0 h、2 h、12 h、24 h、48 h 的雄虫附腺进行内容物蛋白含量测定。

## 1.2 主要仪器

高压蒸汽灭菌锅 (YX-18LM)、冷冻干燥箱 (HDR-100HP)、恒温水浴锅、电子天平 (BSS224S)、游标卡尺、841 型远红外电子专用干燥箱、移液枪、冷冻高速离心机 (TGL-20MB/TGL-20M)、紫外可见分光光度计 (K1901)。

大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 以及其他分析纯等均由乐山师范学院生命科学学院实验室提供。

## 1.3 试验方法

**1.3.1 雄性附腺内容物样品制备** 按照实验设计要求,选取各采样节点雄虫 7 头,在 4 ℃ 昆虫生理盐水 (NaCl 6.8 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g, KCl 0.2 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.2 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.15 g, 葡萄糖 7.7 g, ddH<sub>2</sub>O 1000 mL) 中解剖雄虫,取出完整的雄性附腺,放入 500 μL 磷酸盐缓冲液 (PBS) (pH6.86) 中冰浴匀浆。10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,沉淀用少量缓冲液清洗,离心后,收集上清液,合并相同上清液为一管,定容至 1 mL, -20 ℃ 保存备用,用于抑菌活性测定。

**1.3.2 雄性附腺内容物蛋白含量测定** 利用 Bradford 法 (Bradford, 1976),建立牛血清白蛋白标准曲线,分别用移液枪加入不同时期适量样品各自定容到 1 mL,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 蛋白质试剂,充分混合,放置 2 min 后以空白为对照,测定其 595 nm 处吸光值,并通过标准曲线查得各待测样品中蛋白质的含量。最终确定雄虫附腺内容物蛋白含量较高的时期。

**1.3.3 雄性附腺蛋白干粉的制备** 选择蛋白含量较高时期的雄虫,将其雄性附腺内容物样品进行冷冻干燥,制成蛋白干粉, -70 ℃ 贮存。

**1.3.4 培养基及无菌平板的制备** 固体培养基及无菌平板的制作参照沈萍等 (1999) 的方法。

**1.3.5 菌种的活化及菌悬液制备** 取 3 支已灭菌的试管,每支试管倒入一定量 (不超过试管的 1/5) 的培养基,制成斜面 (斜面不超过试管的 1/2),取供试菌种 1 环划线培养,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 37 ℃ 培养 24 h,空白对照用无菌蒸馏

水配制,采用血细胞计数板法计数,使菌悬液浓度为  $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$  个/mL,备用。

**1.3.6 含菌平板的制备** 将上述各培养基灭菌后倒于培养皿内,每个培养皿约 20 mL。待培养基凝固后,用灭菌移液枪准确吸取上述各种菌悬液 0.2 mL 注入培养皿内,再用灭菌的涂布棒迅速将菌液涂抹均匀,制成指示含菌平板。

**1.3.7 抑菌性的测定** 将雄性附腺蛋白含量最高时样品制备的蛋白干粉溶解于预冷的无菌生理盐水,分别配成  $3.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  样品溶液,将灭菌的 6 mm 圆形滤纸片分别置于这 2 种浓度的雄性附腺内容物溶液中浸泡 1 h,用已灭菌的镊子取浸泡过的滤纸片,放置于含菌平板中,每个浓度 3 个重复板,空白对照为无菌蒸馏水。金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 37 ℃ 培养 24 h,取出,观察是否有抑菌圈,若有,则用游标卡尺测量抑菌圈直径 (包括滤纸片直径)。

**1.3.8 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定** 用倍比稀释,将雄性附腺蛋白含量最高时的内容物溶液稀释成  $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  5 个浓度。每支试管中加入 0.2 mL 对数期生长菌悬液,并用 PBS 作阴性对照,将不同浓度的内容物稀释液加入到菌悬液试管中,吸取 0.3 mL 混合液涂布培养基平板上,置于 37 ℃ 下培养 24 h,观察平板内有无细菌生长,以无菌生长的最低粗提取浓度作为最小抑菌浓度 (温旺荣等, 1994)。每个浓度重复 3 次。

**1.3.9 温度对长足大竹象雄性附腺抑菌的影响** 分别取 200 μL 附腺蛋白含量最高时的内容物溶液放入不同的灭菌试管中,将试管分别置于 3 ℃、16 ℃、18 ℃、22 ℃、24 ℃、28 ℃、30 ℃ 下处理 30 min,根据 1.3.7 测定结果选择适当的雄性附腺内容物抑菌浓度,重复 1.3.7 的步骤比较不同温度对长足大竹象雄性附腺提取物抑菌活性的影响。每个处理重复 3 次。

## 1.4 数据处理

所有数据的整理和分析均使用 Excel 2000 及 SPSS 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 长足大竹象雄性附腺不同发育时期蛋白含量

不同发育时期长足大竹象雄性附腺蛋白含量如表 1 所示,刚出土的长足大竹象雄性附腺中蛋白含

量为每只  $568.75 \mu\text{g} \pm 13.12 \mu\text{g}$ , 在出土 12 h 内蛋白增长十分迅速, 增加了 10.85%, 蛋白含量达到每只  $630.43 \mu\text{g} \pm 12.45 \mu\text{g}$ 。而后蛋白含量的增长趋于缓和, 至出土 24 h, 达到每只  $640.57 \mu\text{g} \pm 36.79 \mu\text{g}$ , 蛋白含量最高。交配后 2 h 内蛋白含量迅速下降, 较追尾时下降 9.29%; 交配后的 2 ~ 12 h 蛋白含量下降趋于稳定。交配 12 h 后蛋白含量又急剧增加,

达到每只  $608.36 \mu\text{g} \pm 14.56 \mu\text{g}$ 。到交配后的 48 h 基本上恢复到出土 24 h 水平。通过两两差异显著性检验, 除出土 12 h、出土 24 h 和预交配 0 h 3 个时间段外, 其他各个时期蛋白含量的变化差异具有高度统计学意义 ( $P < 0.01$ )。出土 24 h 长足大竹象雄性附腺蛋白含量基本上达到最高, 最终选择出土 24 h 长足大竹象雄性附腺蛋白样品进行抑菌活性测定。

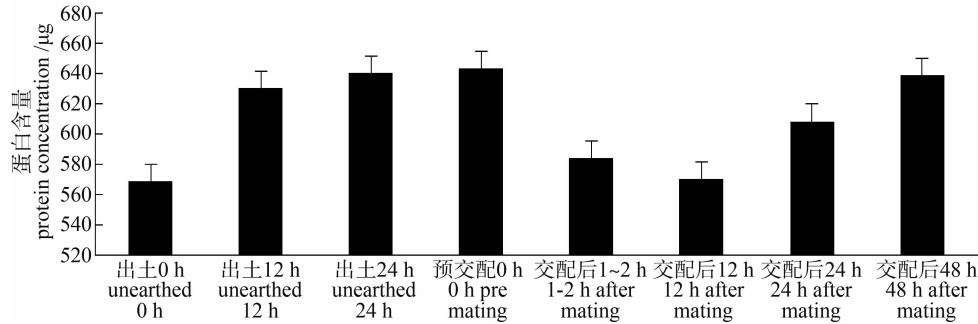


图1 不同发育时期长足大竹象雄性附腺提取物蛋白含量

Fig. 1 The protein concentration of male accessory-gland extracts from *Cyrtotrachelus buqueti* in different development stages

## 2.2 抑菌活性的测定

长足大竹象雄性附腺内容物粗提物的抑菌试验结果如表 1, 其内容物的粗提物对属于革兰氏阴性菌的大肠杆菌没有抑菌作用, 但对革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定的抑菌作用。与空白对照相比, 不同浓度的粗提物对枯草芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌抑菌活性影响差异均具有高度统计

学意义 ( $P < 0.01$ ), 抑菌活性随着粗提物浓度的增加而增强。当长足大竹象雄性附腺粗提物浓度为  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌生长平板上的抑菌圈直径分别为 11.16 mm、10.62 mm。低于头孢霉素在  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度时对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌生长平板上的抑菌圈直径 (15.78 mm、17.22 mm) (向玉勇等, 2013)。

表 1 长足大竹象雄性附腺粗提物的抑菌圈直径 (单位: mm)

Table 1 The diameter of inhibition zone of male accessory-gland extracts from *Cyrtotrachelus buqueti* (unit: mm)

菌种 Bacterial species	空白对照 Control	不同浓度下抑菌圈直径 Inhibition zone diameter in different concentrations/mm	
		$0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$3.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	6	6.00	6.00
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	6	11.16	12.94
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	6	10.62	11.63

## 2.3 最小抑菌浓度的测定

长足大竹象雄性附腺粗提物最小抑菌浓度的结果如表 2 所示, 可以看出粗提物对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均有一定的抑菌作用, 最小抑菌浓度分别为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 2.4 温度对长足大竹象雄性附腺抑菌影响

不同温度对长足大竹象雄性附腺粗提物的抑菌作用有一定影响, 依据乐山地区全年平均最低温度和最高温度, 设置  $3 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  为边界温度, 从表 3 可以看出边界温度下的抑菌圈非常小, 抑菌活性较低。随着对长足大竹象雄性附腺粗提物处理温度的升高, 其抑菌作用明显呈先上升后下降的趋势。通过两两差异显著性检验,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  下粗提物对金黄色葡

萄球菌及枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径与其他温度下的差异具有高度统计学意义 ( $P < 0.01$ )。显著性分析显示: 不同温度下长足大竹象雄性附腺粗提物对金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌抑制效果均在  $\alpha = 0.05$  水平上有显著影响 ( $t_{0.05} < t_{\alpha_{\text{金}}} = 3.53 < t_{0.01}$ ,  $t_{0.05} < t_{\alpha_{\text{枯草}}} = 2.79 < t_{0.01}$ )。

## 3 结论与讨论

从 20 世纪 50 年代开始, 有关双翅目、鳞翅目、直翅目、鞘翅目等多个目昆虫雄性附腺的研究已经有了一些报道 (Chapman & Davies, 2004; 高洁等, 2008)。但迄今为止对于雄性附腺抗菌性的研究, 在鞘翅目昆虫中尚未见报道。在本研究中, 我们用滤

表2 长足大竹象雄性附腺粗提物对供试菌种的最小抑菌浓度  
Table 2 The minimum inhibitory concentration of male accessory-gland extracts from *Cyrtotrachelus buqueti* on the tested strains

粗提物浓度 Concentration of extracts /(mg · mL <sup>-1</sup> )	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
3.2	-	-
1.6	-	-
0.8	-	-
0.4	-	-
0.2	-	+
0.1	+	+

注: - 没有长菌, + 长菌; 没有长菌判断: 粗提物与菌悬液培养涂布培养基平板, 观察整个平板没有菌落生成。

Notes: - no bacterial growth, + bacterial growth; Judging criteria of no bacterial growth completely: crude extracts were mixed with bacterial suspension, they were cultured in medium plate, there was no colony in the whole medium plate.

表3 温度对长足大竹象雄性附腺粗提物抑菌活性的影响  
Table 3 Effect of temperature on the antibacterial activity of male accessory-gland extracts from *Cyrtotrachelus buqueti*

温度 Temperature/°C	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
3	6.16	6.23
16	7.34	7.89
18	8.69	8.98
22	10.04	10.98
24	10.43	11.64
28	11.12	12.36
30	6.11	6.19

纸片法首次证明长足大竹象雄性附腺中存在抗菌蛋白,并且对革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定的抑菌活性。对大肠杆菌的抑制效果不明显,可能是因为大肠杆菌普遍存在,也为长足大竹象体内的天然共生菌,因此未检测到抑菌效果。这与其他学者对棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina* 雄性附腺抑菌的研究结果相同,并且其抑菌活性明显高于棕尾别麻蝇雄性附腺对该枯草芽孢杆菌的抑菌活性(高熹等,2007)。在浓度为 0.8 mg · mL<sup>-1</sup> 时本实验长足大竹象雄性附腺粗提物对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径(10.62 mm)低于家蝇 *Musca domestica* 血淋巴粗提物对该菌的抑菌圈直径(12.22 mm)(向玉勇等,2013)。这可能是因为昆虫抗菌肽一般是在血淋巴及消化道中产生的一类抗菌肽,专职于免疫功能的淋巴液中含有更多、更强的抑菌物质(孙恩涛,秦志辉,2006)。

本研究用滤纸片法测定的长足大竹象雄性附腺提取物最小抑菌浓度均已超出常规的敏感判定,一方面可能与抗菌肽是一类小分子,在组织内含量低,另一方面可能与使用的是长足大竹象雄性附腺粗提

物,而不是分离纯化出的纯抗菌蛋白有关。究竟是何种抗菌肽,是一种或是几种抗菌蛋白综合起作用需要进一步研究。

本研究通过不同温度处理,发现温度是影响长足大竹象雄性附腺粗提物抑菌活性的因素,在 28 °C 下的粗提物抑菌效果最好。根据本文的结果,在长足大竹象出土高峰期,可以通过观测竹林区温度并结合其他气候指标,对长足大竹象进行及时防治。本研究结果可为制定经济合理的防治方案提供一定的参考依据。

本研究用的是长足大竹象雄性附腺粗提物,为深入探讨其活性物质的抑菌机理,及进一步揭示雄性附腺在生殖生理中的特殊功能,需要对粗提物进行分离纯化,从而为开展更为深入的研究以及从生殖的角度找到一条切实可行的防治对策建立基础。

## 参考文献:

- 高洁, 嵇保中, 刘曙雯, 等. 2008. 桑天牛雄性附腺内容物组分分析[J]. 四川林业科技, 29(6): 58-62.
- 高熹, 吴国星, 叶恭银, 等. 2007. 棕尾别麻蝇雄性附腺分泌物的生理功能[J]. 昆虫知识, 44(6): 821-825.
- 向玉勇, 周书芹, 程凯, 等. 2013. 家蝇幼虫血淋巴粗提物抑菌活性初步研究[J]. 四川动物, 32(3): 419-422.
- 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 1999. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社: 215.
- 孙恩涛, 秦志辉. 2006. 昆虫抗菌肽研究进展[J]. 热带病与寄生虫学, 4(1): 47-50.
- 王维德, 王雄清, 陈封政. 2002. 沐川县竹林主要害虫大竹象的调查[J]. 乐山师范学院学报, 19(4): 49-50.
- 温旺荣, 戴庚孙, 王德春. 1994. 常用消毒剂对念珠菌最小杀菌浓度的测定[J]. 中国消毒学杂志, 11(2): 85-87.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Chapman T, Davies SJ. 2004. Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies[J]. Peptides, 25(9): 147-190.
- Lung O, Wolfner MF. 1999. *Drosophila* seminal fluid proteins enter the circulatory system through the walls of the posterior vagina[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29: 1043-1052.
- Lung O, Wolfner MF. 2001. Identification and characterization of the major *Drosophila melanogaster* mating plug protein[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 31: 543-551.
- Ram KR, Wolfner MF. 2007. Sustained post-mating response in *Drosophila melanogaster* requires multiple seminal fluid proteins[J]. PLoS Genetics, 3(12): 238.
- Wolfner MD. 2002. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*[J]. Heredity, 88(2): 85-93.