

杀天牛毒蛋白的分离纯化及其 N-末端 氨基酸序列的测定

李建庆^{1,2}, 张永安³, 杨忠岐³, 袁 锋¹

(1 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100;

2 滨州学院 山东省黄三角洲态环境重点实验室, 山东 滨州 256603;

3 中国林业科学研究院 森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

【摘 要】 【目的】从白僵菌代谢物中分离对天牛有毒性的蛋白,并测定其 N-末端氨基酸序列。【方法】从球孢白僵菌培养滤液中分离蛋白类代谢物,以重要林业害虫松墨天牛幼虫为试虫筛选毒蛋白,对筛选的毒蛋白进行 PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,测定其末端氨基酸序列。【结果】从白僵菌代谢物中共分离出 5 种毒蛋白,其中毒性最强的是 PrBb4 蛋白,其对松墨天牛幼虫的致死率为 56.67%。PrBb4 蛋白 N-末端起始的 5 个氨基酸序列为谷氨酸(Glu)→脯氨酸(Pro)→丝氨酸(Ser)→异亮氨酸(Ile)→缬氨酸(Val)。【结论】白僵菌代谢物中含杀天牛毒蛋白 PrBb4,其 N-末端氨基酸序列为 Glu→Pro→Ser→Ile→Val。

【关键词】 白僵菌;代谢物;毒蛋白;氨基酸序列;松墨天牛

【中图分类号】 S763.38

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)03-0171-05

Isolation and ammonia acid N-terminal sequence of the toxic protein to Longhorn Beetle

LI Jian-qing^{1,2}, ZHANG Yong-an³, YANG Zhong-qi³, YUAN Feng¹

(1 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shanxi 712100, China; 2 The Shandong

Province Key Laboratory on Eco-environments of Yellow River Delta, Binzhou University, Binzhou, Shandong 256603, China;

3 The Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: 【Objective】 The toxic proteins to longhorn beetle were isolated from *Beauveria bassiana* culture filtration, and N-terminal ammonia acid sequence was measured. 【Method】 Toxic proteins were screened by bioassay with forest pest *Monochamus alternatus* larvae as the targets. N-terminal ammonia acids sequence of the protein PrBb4 was measured after PrBb4 was transferred on the PVDF. 【Result】 Five toxic proteins were isolated from *B. bassiana* culture filtration. It shows that the toxicity of PrBb4 is the highest in all proteins, whose mortality of PrBb4 is 56.67%. Five ammonia acids sequence of N-terminal end from the beginning is Glu→Pro→Ser→Ile→Val. 【Conclusion】 There is toxic protein PrBb4 in the *B. bassiana* culture filtration, the first ammonia acid of N-terminal end is Glu.

Key words: *Beauveria bassiana*; secretion; toxic protein; ammonia acid sequence; *monochamus alternatus*

* [收稿日期] 2007-04-03

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(973)项目(G19990160)

[作者简介] 李建庆(1977—),男,山东博兴人,讲师,在读博士,主要从事害虫生物防治研究。E-mail:jqing8@netease.com

[通讯作者] 张永安(1959—),男,陕西西安人,研究员,主要从事昆虫病原微生物研究。

天牛是一类蛀干害虫,危害多种林木、果树和花卉,是我国危害最严重、最难治理的害虫之一。天牛的幼虫隐蔽在树皮下的韧皮部和木质部,不易被发现,其危害在林业上常被称为“无烟的森林火灾”,如松墨天牛(*Monochamus alternatus*),除蛀食松树枝干外,还是松材线虫病(*Bursaphelenchus xylophilus*)的重要传播媒介,每年对林业生产和园林树木均造成重大危害。天牛已成为林业发展的严重障碍,因此探索有效的防治方法已成为当务之急。目前,在天牛的防治研究中,经多年的实践和摸索,生物防治已成共识。白僵菌(*Beauveria bassiana*)因其对鞘翅目害虫的独特寄生效果,一直广泛应用于天牛的生物防治,并取得了较好的防效。张立钦等^[1]从松墨天牛体内分离到了一种致病力很强的白僵菌菌株。Mitsuaki 等^[2]研究表明,白僵菌对伐倒的松树木段中生活的松墨天牛幼虫有良好的防效,平均感染死亡率达 80%。

白僵菌寄生昆虫后,在寄主体内进行营养生长的同时,还分泌一些毒素类代谢物质,这些物质本身具有一定的毒性,可以直接杀死寄主或加快寄主的死亡^[3]。目前,对白僵菌代谢产物的研究较多,并发现了一些毒素。这些毒素基本可分为低相对分子质量毒素和高相对分子质量蛋白毒素^[4],低相对分子质量毒素多为小分子环缩肽类,高相对分子质量蛋白毒素多为一些可降解体壁的酶^[5-7],但目前尚未发现这些毒素对天牛有毒性。其他蛋白毒素仅见 Mollier 等^[8-9]曾从白僵菌 *Beauveria sulfurescens* 中纯化了一种对大蜡螟(*Galleria mellonella*)有高毒性的蛋白。为了探索天牛生物防治的新途径,本研究对白僵菌代谢物中杀天牛毒蛋白进行了分离纯化,并对纯化出的毒蛋白 N-末端序列进行了测定,以期为天牛的生物防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种 球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill),由中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所生物防治实验室提供。

1.1.2 试 虫 松墨天牛(*Monochamus alternatus* Hope)幼虫,采自浙江宁波和杭州。其人工饲料由中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所生物防治实验室提供。

1.1.3 试剂与材料 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵、考马斯亮

蓝 R-250、 α -巯基乙醇、溴酚蓝、甘氨酸等均购自 Sigma 公司;磷酸、氢氧化钠、盐酸和甲醇等均为常规分析纯。聚偏氟乙烯膜(PVDF)购自 Millipore 公司。

1.2 白僵菌代谢物中蛋白的分离

将白僵菌分生孢子制成浓度为 4×10^8 mL⁻¹ 的接种母液,接种于发酵培养基上,25℃、130 r/min 振荡培养 6 d。将发酵液 4 000 r/min 离心取上清,冰浴条件下,用硫酸铵盐析法浓缩蛋白,将浓缩后的白僵菌蛋白代谢溶液用截留相对分子量为 8~10 ku 的透析袋透析,以除去代谢物中白僵菌素等小分子毒素,即得白僵菌代谢物蛋白粗提液。通过洗脱凝胶法^[10]从粗提液中分离蛋白,用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)法^[10]检测分离所得蛋白的纯度。

1.3 白僵菌代谢物杀天牛毒蛋白生物活性的测定

将从白僵菌代谢物中分离出的蛋白样品用 0.22 μ m 的 Millipore 滤器过滤除菌然后,用 1 mL 注射器从第 4 腹节处注入松墨天牛体腔,注射量为 15 μ L/头,以注射相同剂量 0.04 mol/L pH 6.6 磷酸缓冲液(PB)的松墨天牛为对照,每处理 6 头试虫,每天观察记录松墨天牛的死亡情况,连续观察 9 d。试虫死亡率高者,蛋白毒性强。试虫饲喂人工饲料,温度为(25 $\pm$ 1)℃,24 h 黑暗。

1.4 白僵菌代谢物中杀天牛毒蛋白的 N-末端氨基酸序列分析

1.4.1 毒性蛋白的 PAGE 电泳 将生物活性测定试验筛选的杀天牛毒蛋白在 4℃,恒压 150 V 条件下进行非变性不连续垂直凝胶电泳,分离胶 80 g/L,浓缩胶 50 g/L,电泳缓冲液为 Tris-Gly 缓冲液。

1.4.2 蛋白转膜 电泳完成后不染色,按文献^[11]的方法直接进行转膜。

1.4.3 N-末端氨基酸序列测定 将载有目的蛋白的 PVDF 膜,送北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室测序。

2 结果与分析

2.1 白僵菌代谢物中蛋白的分离结果

从白僵菌代谢物粗提液中分离出 5 种蛋白,分别记作 PrBb1、PrBb2、PrBb3、PrBb4、PrBb5(图 1)。

2.2 白僵菌代谢物中杀天牛毒蛋白的筛选

由表 1 可见,从白僵菌代谢物中分离出的蛋白 PrBb3、PrBb4,在 9 d 内可致 4 头松墨天牛死亡,毒性较其他 3 种蛋白强。为进一步区分蛋白 PrBb3、

PrBb4 的毒性强弱,将处理试虫数增加到 30 头,进行第 2 次生物活性检测,结果表明,PrBb4 在 9 d 内可致 17 头试虫死亡,死亡率为 56.67%;PrBb3 可致 14 头试虫死亡,死亡率为 46.67%。由此可知,PrBb4 的毒性最强。

2.3 白僵菌代谢物中 PrBb4 蛋白的 N-末端氨基酸序列分析

PrBb4 蛋白 N-末端氨基酸的测序结果见图 2。由图 2 可知,蛋白 PrBb4 N-末端起始的 5 个氨基酸序列为:谷氨酸(Glu)→脯氨酸(Pro)→丝氨酸(Ser)→异亮氨酸(Ile)→缬氨酸(Val)。

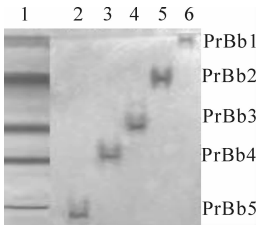


图 1 白僵菌代谢物中 5 种蛋白的 PAGE 结果
1. 代谢物粗提液;2~6. 分别为 PrBb5~PrBb1 蛋白
Fig.1 PAGE of five proteins from Beauveria bassiana culture filtrate

1. The lane is the PAGE of extraction from culture filtrate;
2—6. The lane is the protein isolated from the extraction,
PrBb5, PrBb4, PrBb3, PrBb2, PrBb1

表 1 白僵菌蛋白代谢物对松墨天牛的生物活性

Table 1 Number of death after *M. alternatus* larvae were treated with extracted proteins from *Beauveria bassiana* culture filtrate

样品 Sample	试虫数 Number of tested larvae	死亡试虫数 Number of death			死亡率/%Mortality
		3 d	6 d	9 d	
PB(CK)	6	0	0	0	
PrBb1	6	0	0	0	0
PrBb2	6	0	0	0	0
PrBb3	6	1	3	4	66.7
PrBb4	6	2	3	4	66.7
PrBb5	6	0	2	2	33.3

3 讨 论

白僵菌具有安全有效,易于大量培养等优点,在生物防治中应用较为广泛。目前,用白僵菌防治天牛的方法主要有虫孔堵塞法、虫孔注射法、滴注法、粘膏涂孔法、菌液喷干法等^[12]。这些方法虽然取得了一定的效果,但天牛幼虫终生营隐蔽生活,危害高度从树干到树梢,上述方法操作起来费工、费时、费力,大面积推广应用也存在一定难度。因此,探讨新的利用白僵菌代谢物进行生物防治的途径是非常有必要的。

关于白僵菌对寄主昆虫的致死原因,目前尚存在有不同的观点。传统的观点认为,白僵菌菌丝侵入虫体后,在其体内迅速增殖,大量消耗吸收寄主的营养,最终使寄主死亡;但也有很多学者认为,白僵菌在侵入寄主的过程中,先分泌一些毒素物质将寄主杀死,然后才开始大量繁殖菌丝,使虫体僵化,这些在代谢过程中产生的毒素,对白僵菌的成功入侵和致死寄主起着非常关键的作用^[13]。因此,应用白僵菌代谢产生的毒素,进行生物方防治有一定的应用前景,有必要在这方面进行研究和探索。

白僵菌代谢物中含有大量的毒素,已发现的毒素多为环缩肽类、色素类和有机酸类,如白僵菌素(bauverin)、白僵菌交酯(bassianolide)、卵孢素(oosporein)、纤细素(tenellin)、球孢素(bassianin)、类草酸晶体(oxalic acid-like crystals)等^[4],这些毒素均为小分子物质。本研究在蛋白提取过程中,经透析已除去了 8~10 ku 的小分子毒素,而目前大分子毒蛋白仅见 Mollier 等^[8-9]从白僵菌 *B. sulfurescens* 中分离出一种对大蜡螟表现高毒性的蛋白,其相对分子质量在 100~290 ku。由此可推断,本研究从球孢白僵菌 *B. bassiana* 代谢物中分离的毒蛋白是一新的毒素。

作者曾对虫生真菌毒蛋白进行了一些相关研究^[14-16]。本文从白僵菌代谢物中分离的毒蛋白 PrBb4,对松墨天牛表现出注射毒性,有着较为重要的应用前景。对 PrBb4 N-末端氨基酸序列的测定,是 PrBb4 蛋白基因克隆的前期研究,而该毒蛋白基因的克隆则又是抗天牛苗木选育的基础。当然,本研究仅是对杀天牛毒蛋白的初步探讨,有关抗天牛基因的克隆需进一步深入研究。

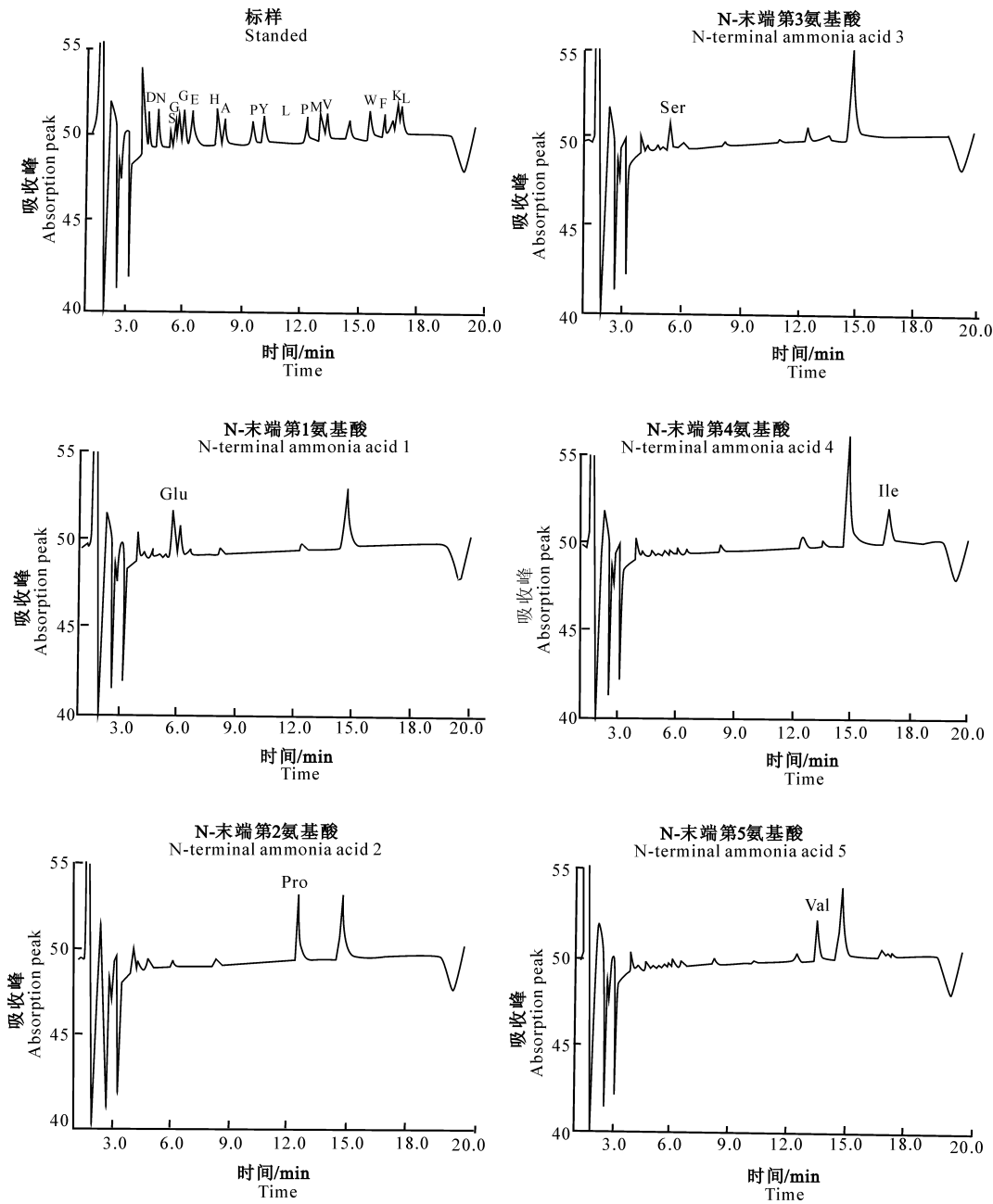


图 2 白僵菌代谢物中蛋白 PrBb4 的 N-末端氨基酸序列分析结果
Fig.2 Chromatography graph of N-terminal ammonia acid sequence of the PrBb4 from Beauveria bassiana culture filtrate

[参考文献]

[1] 张立钦,刘 军,吴 鸿. 松墨天牛优良白僵菌菌株筛选 [J]. 南京林业大学学报,2000,24(2):33-37.
Zhang L Q,Liu J,Wu H. The screening virulent strain of Beauveria bassiana to Monochamus alternatus [J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2000,24(2):33-37. (in Chinese)

[2] Mitsuaki S,Daiji T H S. Microbial control of Momochamus alternatus Hope by application of nonwoven fabric strios with Beauveria bassiana on infested tree trunks [J]. Appl Entomol Zool Japan,1995,30(1):207-221.

[3] Dresner E. The toxic effects of Beauveria bassiana (Bals.) Vuill on insects [J]. J N Y Entomol Soc,1950,58:269-278.

[4] 李建庆,张永安,张星耀,等. 昆虫病原真菌毒素的研究进展 [J]. 林业科学研究,2003,16(2):233-239.
Li J Q,Zhang Y A,Zhang X Y,et al. Progress in studies on toxin of entomopathogenic fungi [J]. Forest Research,2003,16(2):233-239. (in Chinese)

[5] Kodaira T. Studies on the new toxic substance to insects, de-

- struxin A and B, produced by *Oospora destructor*. I. Isolation and purification of destruxin A and B [J]. *Agr Biol Chem*, 1961, 26: 36-42.
- [6] Urtz B E, Rice W C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana* [J]. *Mycology Research*, 2000, 104(2): 180-186.
- [7] Vining L C, Kelleher W J, Schwartim A E. Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *America muscaria* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, 8: 931-933.
- [8] Mollier P, Lagnel J, Fournet B. A glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, 64: 200-207.
- [9] Mollier P, Lagnel J, Quiot J M. Cytotoxic activity in culture filtrates from the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, 64: 208-213.
- [10] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- Wang J Z, Fan M. *An Manual in Proteins Technology* [M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [11] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 布伦特 R, 等. 精编分子生物学指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- Ausubel F, Kingston R E, Brent R, et al. *Short protocols in molecular biology* [M]. Yan Z Y, Wang H L, Translated, Beijing, Science Press, 1998.
- [12] 周秋菊, 潘贤丽. 应用生物防治技术控制天牛为害 [J]. *植物保护*, 2004, 30(1): 12-16.
- Zhou Q J, Pan X L. Advances in biological control of *Cerambycidae* beetles (Coleoptera) [J]. *Plant Protection*, 2004, 30(1): 12-16. (in Chinese)
- [13] 蒲蜚龙, 李增智. 昆虫真菌学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.
- Pu Z L, Li Z Z. *Insect Mycology* [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing House, 1996. (in Chinese)
- [14] 李建庆, 张永安, 王玉珠, 等. 从白僵菌中筛选杀天牛蛋白的初步研究 [J]. *中国森林病虫*, 2003, 22(2): 8-10.
- Li J Q, Zhang Y A, Wang Y Z, et al. Primary study on screening toxic protein to longhorn beetle from *beauveria bassiana* [J]. *Forest pest and disease*, 2003, 22(2): 8-10. (in Chinese)
- [15] 李建庆, 张永安, 张星耀, 等. 虫生真菌中对松墨天牛高毒性蛋白的筛选及性质测定 [J]. *昆虫学报*, 2005, 48(5): 1-6.
- Li J Q, Zhang Y A, Zhang X Y, et al. Screening and characterization of proteins from entomogenous fungi toxic to *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2005, 48(5): 1-6. (in Chinese)
- [16] 李建庆, 张永安, 梅增霞, 等. 白僵菌和绿僵菌蛋白对松墨天牛致病性研究 [J]. *福建林学院学报*, 2006, 26(2): 165-168.
- Li J Q, Zhang Y A, Mei Z X, et al. Pathogenicity of entomogenous fungi proteins to *Monochamus alternatus* [J]. *Journal of Fujian College of forestry*, 2006, 26(2): 165-168. (in Chinese)