

绿僵菌分解昆虫外壳蛋白酶 MAP-21 的纯化与特性^{*}

裴 炎 冀志霞 杨星勇 卢晓风 夏玉先

(西南农业大学生物技术研究中心 重庆 400716)

摘 要 以蝉蜕为底物诱导绿僵菌产生分解昆虫外壳蛋白酶。发酵液经超滤、Ultrogel AcA 54 凝胶层析、制备 IEF 电泳,纯化了一种蛋白酶 MAP-21, SDS-PAGE 电泳后经银染色呈单带。该酶的 Mr 为 27kD 左右, pI 为 7.6。它的特异识别氨基酸为 Arg, 其活性可被 PMSF 和 TLCK 抑制, 表明其活性中心有 Ser 和 His 残基。它还可被胰蛋白酶的典型抑制剂 Leupeptin、Antipain 及 STI 等所抑制, 而胰凝乳蛋白酶抑制剂 TPCK 和胰凝乳弹性蛋白酶抑制剂 TEI 对其活性无影响。专一底物和抑制剂特性试验结果表明 MAP-21 是类胰蛋白酶。此外, 该酶还可被 EDTA 所抑制, 表明金属离子为其活性所必需。另外还研究了 MAP-21 的最适作用温度和 pH, 以及温度耐受性等特性。

关键词 绿僵菌, 蛋白酶, 纯化, 特性

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)03-0306-11

利用昆虫病原真菌防治害虫已引起了国内外的广泛关注。研究昆虫病原真菌的侵染机制, 对于筛选高效杀虫菌株以及认识昆虫-病原微生物相互关系均有重要意义^[1~3]。Charnley 和 Leger^[4~11]等对昆虫病原真菌侵染过程中产生的分解寄主外壳的水解酶进行了大量研究, 发现一些蛋白酶在病原真菌的侵染过程中起重要作用, 并与菌株感染寄主的毒力密切相关。但是, 目前已纯化的昆虫病原真菌降解寄主外壳蛋白酶还不多。而且, 在已报道的此类蛋白酶中, 有关凝乳弹性蛋白酶(Chymoelastase, Pr1)纯化与功能研究相对较多, 而对类胰蛋白酶(Trypsin-like protease, Pr2)报道较少。前人的结果还表明, 虽然所有病原真菌的降解寄主外壳过程中都有蛋白酶产生, 但这些酶类存在种间和种内差异^[10]。我国昆虫病原真菌种类繁多、资源丰富, 有必要对它们产生的此类蛋白酶加以研究, 这对了解昆虫-病原真菌相互关系、寻找提高杀虫微生物效果新途径, 均有重要意义。

1 材料和方法

1.1 菌种

金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)由本实验室分离保存。

1.2 试剂

底物 Suc(Ala)₂-Pro-Phe-NA, Suc-Phe-NA, Suc(Ala)₂-Pro-Leu-NA, Suc(Ala)₂-Val-Ala-NA, Ac(Ala)₂-Pro-Ala-NA, Ac(Ala)₃-NA, Bz-Arg-NA, Bz-Phe-Val-Arg-NA, Bz-Val-

^{*} 国家自然科学基金资助项目(39570022)

作者简介 裴 炎(1948-)男, 四川省成都市人, 西南农业大学生物技术研究中心教授, 博士, 主要从事生物防治与植物基因工程研究

收稿日期: 1999-01-22 修回日期: 1999-06-09

Gly-Arg-NA, Bz-Pro-Phe-Arg-NA; Leupeptin, TLCK (N-P-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone), TPCK (N-P-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone), EDTA, Antipain, STI (Soy-bean trypsin inhibitor), TEI (Turkey egg-white inhibitor); Tris, SDS (Sodium dodecyl sulfate) 均购自 Sigma 公司; Ultrogel AcA54 为 LKB 公司产品; PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), 低分子量标准蛋白和载体两性电解质为 Pharmacia 产品; 牛血清白蛋白购自上海丽珠东风公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

1.3.1 产孢培养基: 马铃薯 200g, 蔗糖 15g, 蛋白胨 20g, 琼脂 20g, 用水定容至 1L, 用 1mol/L HCl 调 pH 为 5.4。

1.3.2 发酵培养基: 基本盐培养基 100mL, 蝉蛻 ($d < 0.2\text{mm}$) 1g, 初始 pH 为 5.4。

1.3.3 诱导培养基: 诱导底物 2g ($d \leq 0.2\text{mm}$) 装入 250mL 三角瓶中, 加 100mL 基本盐溶液 (NaCl 3g, MgSO_4 3g, KH_2PO_4 3g, 定容至 1L)。

1.4 方法

1.4.1 菌的培养及粗酶液的制备: 将在产孢培养基上生长 5d 的绿僵菌, 用 0.05% Triton X-100 配制成 1×10^8 个/mL 的孢子悬液, 按 1% 接种于发酵培养基中, 在 26°C 、150r/min 振荡培养 3d; 发酵液在 4°C 下, 12 000r/min 离心 15min, 收集上清液, 用超过滤浓缩 (Minitan II 超滤系统, 截留分子量为 1kD) 透析, 即为粗酶液。

1.4.2 蛋白质浓度测定: 按 Bradford^[12] 方法, 以牛血清白蛋白为标准。

1.4.3 酶活力测定: 蛋白酶总活力参照 Lowry^[13] 的方法定义酶的单位, 类胰蛋白酶的活性测定以 Bz-Phe-Val-Arg-NA 为底物, 按 Leger 等^[5] 的方法进行。

1.4.4 凝胶过滤: 用 0.02mol/L (pH 6.6) 乙酸钠缓冲液平衡 Ultrogel AcA54 柱 (1.0cm \times 95cm), 粗酶液上样后用平衡缓冲液洗脱, 收集蛋白酶活性部分, 透析、浓缩后备用。

1.4.5 X 光片显示蛋白酶同工酶: 按 Leger 等^[5] 的方法, 电泳后, 将凝胶铺于 X 光片上, 28°C 保温, X 光片表面的明胶被蛋白酶降解, 在酶的对位位置因明胶降解而呈透明带。

1.4.6 IEF: IEF 参照郭尧君^[14] 的方法进行, 聚丙烯酰胺凝胶浓度 7.5%, 初始恒功 5W, 待电压升至 900V 时, 改为恒压至电流接近为零。聚焦完毕后, 从凝胶上切下一条空白胶, 按正极到负极的顺序分割成 0.5cm^2 的小块, 分别置于离心管内, 用蒸馏水浸泡过夜, 测 pH 梯度。

1.4.7 SDS-PAGE: 按 Laemmli^[15] 方法, 分离胶浓度 15%, 浓缩胶 4%, 电泳完毕, 凝胶按 Ausubel 等^[16] 的方法银染。

1.4.8 温度对酶活力的影响: ①酶的最适作用温度: 于 $450\mu\text{L}$ 0.04mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中, 加入 $25\mu\text{L}$ 蛋白酶液和 $25\mu\text{L}$ 的专一底物 Bz-Phe-Val-Arg-NA, 分别在不同温度下保温 15min 测活力, 以相对活力表示。②酶的温度耐受性: 将蛋白酶分别在 45、50、55、 60°C 水浴中分别处理 5、10、30、60、120min, 用专一底物测蛋白酶的剩余活力。

1.4.9 酶的最适作用 pH: 将蛋白酶分别与不同 pH (3.0~12.0) 的 Britton Robinson 缓冲液^[17] 混合, 再用专一底物 37°C 下测活, 以相对活力表示。

1.4.10 酶的底物特异性: 参照 Leger^[6] 的方法, 于 $30\mu\text{L}$ 0.04mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中, 分别加入 $10\mu\text{L}$ 酶液和等体积生色底物 (0.001mol/L) 充分混合, 25°C 下反应

10min ,用 Bio-Rad model550 酶标仪在 410nm 波长下测酶活性 ,酶活以相对活力表示。

1.4.11 抑制剂对酶活力影响 :取 10 μ L 蛋白酶液分别与等体积 PMSF(0.001mol/L) ,Leupeptin(20 μ g/mL) ,TLCK(0.001mol/L) ,TPCK(0.001mol/L) ,EDTA(0.01mol/L) ,Antipain(0.001mol/L) ,STK(20 μ g/mL) ,TEK(20 μ g/mL)混合 ,室温处理 45min ,加专一底物 Bz-Phe-Val-Arg-NA 10 μ L 和 0.04mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液 20 μ L ,测蛋白酶的剩余活力。

2 结果和分析

2.1 不同诱导物对绿僵菌产酶的影响

以蚕蛹壳、虻虫壳、虾壳、胶体几丁质、蝇蛆壳和蝉蜕为诱导物 ,振荡培养 3d 后 ,发酵液经离心去除沉淀 ,测定上清液中蛋白酶活性和比活力(表 1)。在所用的 6 种诱导物中 ,蚕蛹壳的总活性最高 ,但其比活较低 ,胶体几丁质和虾壳的比活最高 ,但其总活性不高 ,不加诱导物的基本盐培养基中 ,没有蛋白酶活性。上述样品在 pH4.0~10.0 之间进行 IEF 后 ,转移到 X 光片上显示蛋白酶同工酶谱带。由于 X 光片表面有一层很薄的明胶 ,能被蛋白酶降解 ,可用来检测蛋白酶同工酶 ,其结果见图 1。不同的诱导物诱导绿僵菌产生的蛋白酶同工酶差别明显。胶体几丁质、虾壳和蝇蛆壳诱导产生的蛋白酶同工酶类型较少 ,主要分布在中性和碱端 ,而蝉蜕和蚕蛹壳产生的蛋白酶同工酶类型较多 ,从酸端到碱端都有分布。但从蛋白酶的总活性、比活的高低和同工酶谱的多少 ,以及诱导物与昆虫体壁的相似性方面考虑 ,最终选择蝉蜕为绿僵菌产生降解昆虫体壁蛋白酶的诱导物。

表 1 绿僵菌发酵液中不同诱导底物的蛋白酶活力

Table 1 Protease activity of *M. anisopliae* induced by different materials added into minnimal medium

	Colloidal Chitin	Shrimp cuticle	Cicada exuviae	Horsefly cuticle	Maggot cuticle	Scs
Activity/(U/mL)	7	6	75	62	68	82
Specific activity/(U/mg)	1240	1031	530	475	367	258

Scs Silkworm chrysalis cuticle

2.2 酶的纯化

粗酶液经 Ultrogel AcA54 凝胶层析 ,收集蛋白酶活性部分 ,样品经超滤浓缩 ,进行等电聚焦电泳(pH3.5~9.0)。聚焦完毕后 ,纵向切下一胶条用于测 pH ,将凝胶铺于 X 光片上显示蛋白酶活性带(图 2)。按照 X 光片所显的活性带位置 ,切下凝胶 ,回收有类胰蛋白酶(Pr2)活性的区带洗脱液。区带的 pH 为 7.6 的样品经 SDS-PAGE 后 ,在银染图谱上呈现一条单带(图 3) ,Mr 约为 27kD ,将该蛋白酶命名为 MAP-21。

2.3 MAP-21 的特性

将 IEF 胶条切割纯化的 MAP-21 回收后 ,作酶学特性研究。

2.3.1 酶的最适反应温度和 pH :MAP-21 的最适反应温度为 50 $^{\circ}$ C ,而酶的最适反应 pH 为 8.0。

2.3.2 酶的温度稳定性 :由图 4 可知 ,酶在 45 $^{\circ}$ C 保温 2h 活力基本不变。50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C 保温 2h ,活力分别下降为 80 %和 32 % ,在 60 $^{\circ}$ C 保温 1h ,活力完全丧失。

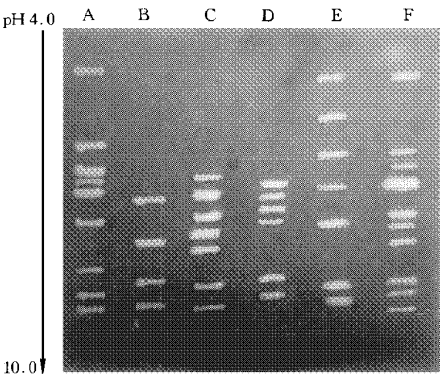


图1 IEF后印迹 X-光片显示不同诱导物诱导白僵菌产生的蛋白酶同工酶谱

Fig.1 Autography of *M. anisopliae* proteases induced by different inducers on X-ray film blotting after IEF
A :Cicada exuviae ; B :Colloidal chitin ;
C :Shrimp cuticle ; D :Maggot cuticle ;
E :Horsefly cuticle ; F :Silkworm chrysalis cuticle.

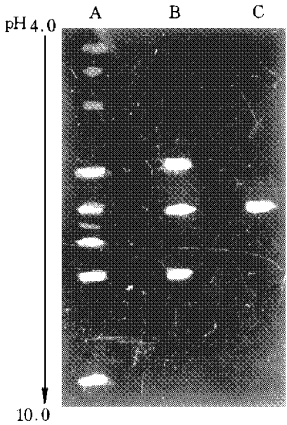


图2 MAP-21 纯化各步的同工酶谱

Fig.2 IEF and Autography of *M. anisopliae* proteases on X-ray film blotting
A :Raw preparation ;
B :After Ultrogel AcA54 column ;
C :Purified sample through preparation IEF.

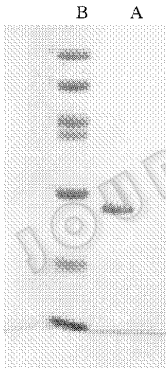


图3 SDS-PAGE 测 MAP-2 的分子量

Fig.3 SDS-PAGE of MAP-21

A : MAP-21 ; B :Protein markers :Phosphorylase B 94000 , Albumin 67000 , Ovalbumin 43000 , Carbonic anhydrase 30000 , Trypsin inhibitor 20100 , Lactalbumin 14400.

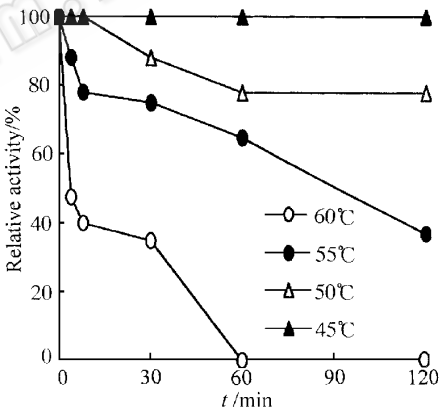


图4 酶的温度稳定性

Fig.4 Thermostability of MAP-21

2.3.3 酶的底物特异性 :MAP-21 能够特异性地识别 Arg 残基。在所选用的底物中它对胰凝乳蛋白酶的专一底物无作用 ,只对胰蛋白酶的专一底物(表 2 ,7~ 10)起作用 ,表明 MAP-21 是类胰蛋白酶。在类胰蛋白酶专一底物中 ,MAP-21 对 Bz-Val-Gly-Arg-NA 的作用最强 ,对 Bz-Arg-NA 的作用明显弱于其它几种(表 2)。

2.3.4 酶的抑制剂 :由表 3 可以看出 ,MAP-21 可被 PMSF 抑制 ,剩余活力为 53 % ,表明其活性中心有 Ser 残基 ,同时它也可被 TLCK 抑制 ,推知在其活性中心还有 His 残基。因此 MAP-21 属于丝氨酸蛋白酶类。此外 ,MAP-21 可被胰蛋白酶的典型抑制剂 Leupeptin、Antipain 及 STI 强烈抑制 ,剩余活力分别为 20%、27% 和 13% ,表明该酶为类

胰蛋白酶。而胰凝乳蛋白酶抑制剂 TPCK 和胰凝乳弹性蛋白酶抑制剂 TEI 对它无影响 , 这与其不具有这两类酶活性的结果一致。同时 , 引人注意的是 , MAP-21 可被 EDTA 抑制 67 % 的活性 , 表明金属离子是其活性所必需的。

表 2 MAP-21 的底物专一性

Table 2 Substrate specificity of MAP-21

Substrates	Relative activities/%
1. Suc(Ala) ₂ -Pro-Phe-NA	0
2. Suc-Phe-NA	0
3. Suc(Ala) ₂ -Pro-Leu-NA	0
4. Suc(Ala) ₂ -Val-Ala-NA	0
5. Ac(Ala) ₂ -Pro-Ala-NA	0
6. Ac(Ala) ₂ -NA	0
7. Bz-Arg-NA	34.2
8. Bz-Phe-Val-Arg-NA	90.5
9. Bz-Pro-Phe-Arg-NA	97.4
10. Bz-Val-Gly-Arg-NA	100

Note : The maximum absorbance is 0.190 at 410nm.

表 3 抑制剂对 MAP-21 的影响

Table 3 Effect of protease inhibitors on MAP-21

Inhibitors	MAP Residual activity/%
PMSH(1m mol/L)	53
Leupeptin(20μg/mL)	20
TLCK(1m mol/L)	53
TPCK(1m mol/L)	100
EDTA(10m mol/L)	33
Antipain(1m mol/L)	27
STK(20μg/mL)	13
TEK(20μg/mL)	100
Control	100

Note : The maximum absorbance is 0.175 at 410nm.

3 讨论

Charnley 和 St. Leger 等对病原真菌侵染寄主过程中产生的凝乳弹性蛋白酶(Pr1)和类胰蛋白酶(Pr2)进行了大量的研究。结果表明 , Pr1 的活力与病原菌感染寄主的毒力密切相关^[7] , Pr1 对昆虫的外壳有很强的降解能力 , 能够促进真菌的入侵 , Pr1 还能够激活昆虫的酚氧化酶系 , 使大量酚类物质被氧化为醌类物质 , 导致昆虫因醌类物质积累过多而自毒死亡^[10]。St. Leger 等^[11]将 Pr1 基因导入绿僵菌中超量表达 , 菌株的侵染力明显提高 , 进一步证实了 Pr1 在病原真菌致病力中的作用。Pr2 在功能上与 Pr1 有所不同。Pr2 主要降解表皮中的可溶性蛋白 , 在诱导启动时间上 , Pr2 明显早于 Pr1^[18]。St. Leger 等^[8,9]推测 Pr2 的降解产物诱导 Pr1 的产生 , 并控制 Pr1 产生的速度和数量 , 认为 Pr2 虽然不直接降解寄主表皮 , 但它可能对寄主表皮的降解有调控作用。因此 , Pr2 在真菌降解昆虫表皮过程中也有重要作用^[6,8,10]。目前所报道的 Pr2 多为丝氨酸类蛋白酶。从底物专一性、抑制剂特性看 , 本文所纯化的蛋白酶 MAP-21 属丝氨酸类的类胰蛋白酶 , 按 Charnley 等的命名 , 为 Pr2 类蛋白酶 , MAP-21 与 St. Leger 等所报道的 Pr2 相比 , 分子量相差不大 , 但在其它性质方面 , 却有明显不同 : MAP-21 的等电点中性偏碱(pI 7.6) , 而后者偏酸(pI 4.0~5.0) ; MAP-21 温度稳定性较好 , 45℃ 保温 2h 活性不变 , 而 Pr2 在 35℃ 保温 2h , 活性就有所丧失 , 值得注意的是 , MAP-21 还能被金属离子螯合剂 EDTA 抑制 , 这表明在它的活性中心可能不仅有 Ser 和 His 残基 , 而且还有金属离子。

参 考 文 献

[1] Charnley A K , St leger R J. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York :Plenum Press ,1991. 267~286.

[2] Hajek A E , St. Leger R J. *Annu Rev Entomol* ,1994 ,**39** :293~322.

[3] Feng M G. Johnson J B. *Environ Entomol* ,1990 ,**19** :785~790.

[4] Clarkson J M , Charnley K. *Trends in Microbiology* ,1996 ,**4** (5) :197~203.

© 1996 微生物学报编辑部 联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [5] St. Leger R J , Charnley A K , Cooper R M. *Arch Biochemi biophys* ,1987b ,**253** 221~231.
- [6] St. Leger R J , Cooper R M , Charnley A K. *Deuteromycetes Arch Biochemi Biophys* ,1987c ,**258** 212~131.
- [7] St. Leger R J , Durands P K , Charnley A K , *et al.* *Intertebr Pathol* ,1988 ,**52** 459~471.
- [8] St. Leger R J , Bidochka M J , Roberts D W. *Arch Biochemi Biophys* ,1994 ,**313**(1) :1~7.
- [9] St. Leger R J , Joshi L , Bidochka M J , *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* ,1996 ,1257~1264.
- [10] St. Leger R J , Josin L , Bidochka M J , Roberts D W. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 ,**93** 6349~6354.
- [11] St. Leger R J , Roberts D W. *Trend in Biotechnology* ,1997 ,**15** 83~85.
- [12] Bradford M M. *Anal Biochem* ,1976 ,**72** 248~254.
- [13] Lowry O H , Rosbrough N J , Farr A L , *et al.* *Biol Chem* ,1951 ,**193** 265~275.
- [14] 郭尧君. 生物化学与生物物理进展 ,1983 ,**51** 50~55.
- [15] Laemmli U K. *Nature* ,1970 ,**227** 680~685.
- [16] Ausubel F M , Brent R , Kingston R E , *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons , Inc , 1995 ,10~39.
- [17] Mckenzie h A. Data for biochemical research 2nd ed. London Oxford Univ. Press ,1969. 485.
- [18] Gillespie J P , Bateman R , Charnley A K. *Journal of Invertebrate Pathology* ,1998 ,**71** 128~137.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CUTICLE-DEGRADING PROTEASE FROM ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS , *METARHIZIUM ANISOPLIAE* *

Pei Yan Ji Zhixia Yang Xingyong Lu Xiaofeng Xia Yuxian

(*Biotechnology Research Center , Southwest Agricultural University , Chongqing 400716*)

Abstract : The cuticle-degrading proteases from entomopathogenesis fungus , *Melarhizium anisopliae* , were induced by adding cicada exuviae , colloidal chitin , shrimp cuticle , maggot cuticle , horsefly cuticle and silkworm chrysalis cuticle into minimal medium. After ultrafiltration , Ultrogel AcA 54 column and IEF , a protease designated as MAP-21 with Mr 27 kD , and pI 7.6 were purified. It was shown that the recognition site of MAP-21 was Arg , PMSF and TLCK could inhibited the activity of this protease , indicating that there were Ser and His residues in the active center. The inhibitors to trypsin , leupeptin antipain and STI also repressed the activity of MAP-21 , while chymostatin , TPCK and elastatinal TEI were shown no inhibition to its activity , demonstrating that , MAP-21 was a trypsin-like protease. Other properties of MAP-21 were also reported.

Key words : *Metarhizium anisopliae* , Protease , Purification , Characterization