

类产碱假单胞菌杀虫蛋白对蝗虫能量代谢的影响

赵 建 罗 霞 陈东辉 王建东 杨志荣*

(四川大学生命科学学院草原生物防治工程教育部重点实验室 成都 610064)

摘 要:电镜直接观察结果显示,在类产碱假单胞菌杀虫蛋白作用下,蝗虫中肠细胞线粒体病变严重,多数呈现膨胀,有嵴断裂等现象。氧电极技术分析发现病变后蝗虫胃、肠细胞线粒体氧化磷酸化作用减弱,ATP 产生减少,能量代谢被抑制,但 ATPase 活力基本不受影响,即蝗虫体内能量需求仍可维持正常水平,由此导致蝗虫体内能量供应不足而死亡。

关键词:类产碱假单胞菌,杀虫蛋白,线粒体,氧化磷酸化

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)03-0365-04

微生物杀虫剂作为生物防治害虫的主要手段,专一性较强,无害于环境,具有强有力的开发前景^[1,2]。类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)是一种新发现的昆虫病原微生物,其分泌到胞外的一种杀虫蛋白对蝗虫具有较强的致死作用,田间小区的治蝗效果可以达到 80% 以上^[3,4]。这种杀虫蛋白只含一种亚基分子,分子量为 25.1kD,分子表面的疏水-亲水镶嵌结构有利于其与蝗虫胃、肠等处的细胞表面分子受体结合,产生毒性^[5]。该杀虫蛋白可以导致蝗虫的多种组织细胞和细胞器发生病变,尤其表现在对线粒体的病变作用异常明显,对此我们对线粒体超微结构和分子作用机理作了研究,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株:类产碱假单胞菌由本实验室分离、保存。

1.1.2 实验昆虫:黄脊竹蝗(*Ceracris kiansu*)采自四川江安竹海的卵块,28℃ 孵化并饲养至 4 龄备用。

1.2 杀虫蛋白制备

杀虫蛋白提取、纯化按照文献[6]方法进行,Bradford 法定量^[7]。

1.3 杀虫蛋白致蝗虫中肠线粒体病变研究

因类产碱假单胞菌杀虫蛋白最早对蝗虫中肠发生明显作用,所以选中肠为电镜研究对象^[8]。对蝗虫喂饲 5.0μL 1.5g/L 杀虫蛋白溶液,作用 30h 后,用

乙醚麻醉,取蝗虫中肠组织,切成 1.0mm³ 小块,用生理盐水洗去食物残渣,固定于 3.0% 戊二醛(pH7.4),然后再用 1.0% 锇酸于 4℃ 固定。样品经乙醇逐级脱水后,用 Epon812 包埋,切片后用柠檬酸铝和醋酸双氧铀染色,电镜观察^[9]。对照组喂饲等量无菌水。

1.4 蝗虫前胃、中肠、后肠细胞线粒体制备

喂饲 30μL(1.5g/L)杀虫蛋白的蝗虫,分别在 18h、24h、30h、36h 取蝗虫前胃、中肠、后肠并迅速浸入预冷的蔗糖分离液中,用梯度离心法提取蝗虫(每组 100 只)的线粒体,制成 2.5mg 线粒体蛋白/mL 的悬浮液备用^[10]。

1.5 蝗虫前肠、中肠、后肠线粒体肿胀检查

取不同病变期的线粒体悬液(2.5mg 线粒体蛋白/mL),测定 520nm 的 OD 值,检查线粒体是否发生病变肿胀^[11]。

1.6 线粒体氧化磷酸化测定

用 SP-2 溶氧仪测定线粒体氧化磷酸化反应的耗氧量。极化电压 0.6V,记录仪量程 1.0mV,记录纸速度 4.0mm/min。将反应液 1.8mL(含 1.0×10^{-2} mol/L Tris-HCl, 1.0×10^{-3} mol/L EDTA, 2.0×10^{-2} mol/L 葡萄糖, 1.5×10^{-1} mol/L 蔗糖, 2.0×10^{-3} mol/L Na₂HPO₃, 5.0×10^{-3} mol/L MgCl₂, 3.0×10^{-1} g/L 己糖激酶, 2.0×10^{-3} mol/L ATP, pH7.2)置于氧电极反应杯,待电极平衡后加入 0.2mL 2.5g/L 线粒体悬浮液,反应温度 25℃,反应时间 15min,反应结束时加 0.2mL 20% 三氯醋酸(Trichloroacetic acid, TCA)终止

基金项目:国家“863 计划”(2001AA214061)

* 通讯作者。Tel:86-28-85412485; E-mail: zbjoyang@163.com

作者简介:赵 建(1976-)男,江苏人,在读博士生,研究方向为现代遗传与基因工程。E-mail: zj804@163.com

收稿日期:2003-07-21,修回日期:2003-12-02

反应 ,反应终体积 2.2mL。 计算得出线粒体的反应耗氧量。 空白对照在加入线粒体己糖激酶前即加入 TCA。 反应液于 12000r/min 25℃ 离心 10min ,取上清液对照 Sumner 氏法制作标准定磷曲线 ,测定溶液中无机磷含量^[8]。 磷酸化强度根据反应时间内无机磷消失的量求得。

1.7 线粒体的 ATPase 活力测定

反应液总体积为 1.0mL ,含 6.0×10^{-3} mol/L ATP , 1.0×10^{-2} mol/L Tris-HCl ,0.03mol/L 蔗糖 , 1.0×10^{-3} mol/L EDTA , 4.0×10^{-2} mol/L KCl ,1.0g/L 牛血清白蛋白 ,pH 7.2 ,加入 0.2mL 2.5g/L 线粒体悬浮液 25℃ 保温 20min 后加入 1.0mL 5.0% TCA ,过滤后测定滤液中无机磷的释放量 ,按每毫克线粒体蛋白每 5min 释放出的无机磷量来表示 ATPase 活力。

2 结果和分析

2.1 线粒体超微结构

线粒体数目增多 ,多数线粒体肿胀 ,嵴断裂而模糊不清 ,严重者嵴消失 ,基质变成空泡状(图 1)。

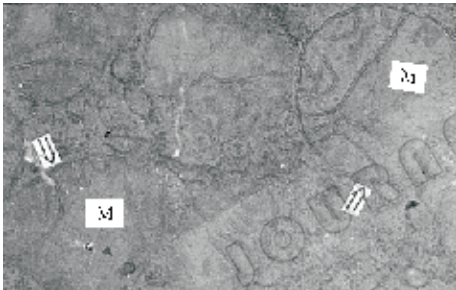


图 1 电镜照片显示中肠细胞出现线粒体膨大和部分嵴断裂等病变(29000×)

Fig.1 Electron micrograph of midgut mitochondria showing they swelled and partial cristae broken(29000×)

M : Corresponds to mitochondrion.

2.2 线粒体肿胀情况

随着时间延长 ,蝗虫前肠、中肠、后肠细胞线粒体悬浮液在 520nm 处的吸光值不断下降 ,提示线粒体发生肿胀 ,且发生肿胀的线粒体数目随病变时间延长而增多(表 1)。

表 1 杀虫蛋白对线粒体肿胀的影响

Table 1 Effect of insecticidal protein on mitochondrion

Time of Ingestion/h	OD ₅₂₀		
	Foregut mitochondria	Midgut mitochondria	Hindgut mitochondria
0 *	0.1105	0.1137	0.1025
18	0.0966	0.1047	0.0954
24	0.0860	0.0685	0.0780
30	0.0504	0.0516	0.0540
36	0.0315	0.0297	0.0325

* Corresponds to the control fed with sterile deionized water.

2.3 杀虫蛋白对蝗虫组织细胞线粒体氧化磷酸化作用的影响

蝗虫在喂饲杀虫蛋白后 ,随着时间延长 ,前肠、中肠、后肠细胞线粒体呼吸耗氧量不断降低 ,磷酸化反应也减弱 ,表明线粒体的氧化磷酸化作用逐渐被抑制 ,36h 后被抑制 30% ~ 35%(表 2) 。 反应中 P/O 值无明显改变 ,提示线粒体中有氧呼吸的电子传递链从某处被隔断 ,蝗虫体内能量代谢被抑制 ,ATP 产生减少 ,机体活动由此受到影响。

2.4 病变蝗虫组织细胞线粒体 ATPase 活力测定

依据标准定磷曲线 ,计算出每毫克线粒体蛋白每 5min 释放的无机磷量 ,ATPase 活力由分解 ATP 释放无机磷的量表示。 从表 3 可知 ,喂饲了杀虫蛋白的蝗虫与正常蝗虫的 ATPase 活力无明显差异 ,说明杀虫蛋白不破坏 ATPase 的功能 ,从而不影响蝗虫在生命活动中对 ATP 的分解与利用。

表 2 杀虫蛋白作用蝗虫不同时间后的线粒体氧化磷酸化反应

Table 2 Reaction of the mitochondrial oxidative phosphorylation in different stages of disease progression

Time of ingestion/h	Foregut mitochondria			Midgut mitochondria			Hindgut mitochondria		
	Aerobic respi-ration *	Oxidative phosphorylation **	P/O	Aerobic respi-ration *	Oxidative phosphorylation **	P/O	Aerobic respiration *	Oxidative phosphorylation **	P/O
0 * * *	8.30	24.92	3.0	9.14	27.41	3.0	6.04	19.92	3.0
18	7.07	21.02	2.9	8.94	24.17	2.7	6.00	18.00	3.0
24	6.54	19.44	2.9	7.65	20.27	2.6	5.95	15.47	2.6
30	6.00	18.03	3.0	7.00	19.60	2.8	5.08	15.24	3.0
36	5.40	17.48	3.2	6.12	18.64	3.0	4.52	12.95	2.9

* Corresponds to microgram oxygen atom/(milligram mitochondrial protein × 15min). ** Corresponds to microgram phosphor molecule /(milligram mitochondrial protein × 15min). * * * Corresponds to the control fed with sterile deionized water.

表 3 杀虫蛋白作用蝗虫不同时间后 ATPase 活力变化

Table 3 Variation of ATPase activity in different stages of disease progression

Time of ingestion /h	ΔP (microgram phosphor molecule /milligram mitochondrial protein \times 15min)		
	Foregut mitochondria	Midgut mitochondria	Hindgut mitochondria
0*	0.402	0.510	0.411
18	0.405	0.510	0.408
24	0.403	0.509	0.412
30	0.404	0.508	0.409
36	0.401	0.511	0.410

* Corresponds to the control fed with sterile deionized water.

3 讨论

生物体的生物合成、呼吸、分泌及机械运动等全部生命活动所需要的能量,都是由线粒体提供的。氧化磷酸化是细胞获得能量的主要途径,线粒体通过十分复杂而又相互关联的一系列综合反应和电子传递,利用糖和脂肪酸氧化过程中释放的自由能,将 ADP 和无机磷转化成细胞进行生命活动的直接能源 ATP,再提供细胞进行各种生命活动所需的能量。

类产碱假单胞菌杀虫蛋白分子表面的疏水-亲水镶嵌结构有利于同脂质双层膜上蛋白分子受体相结合,从而利于作用于有膜的靶器,诸如线粒体、细胞核等。电镜超微结构显示线粒体受类产碱假单胞菌杀虫蛋白作用后病变严重,多数呈现膨胀,有峭断裂现象。文献报道,线粒体膨胀或其它细胞器的损伤将使细胞生死开关的线粒体通透性转变孔(Mitochondrion permeability transition pore, MPTP)长期开放,将细胞色素 c、凋亡诱导因子(Apoptosis inducing factor, AIF)、Ca²⁺以及膜间隙中的胱冬肽酶原等凋亡因子释放至细胞质中^[12]。细胞色素 c 通过 Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1)以级联方式激活胱冬肽酶,使细胞进入凋亡程序;AIF 则独立作用于核内染色质,将 DNA 裂解为片段,并通过自身放回路来影响线粒体膜的通透性,释放出更多的 AIF,进而作用于其他线粒体,而 Ca²⁺则可激活 Ca²⁺依赖性酶、核酸酶、磷酸化酶等,从而使整个细胞的结构破坏、功能紊乱,最终引起细胞凋亡。在对蝗虫喂饲杀虫蛋白后,蝗虫肠细胞线粒体的氧化磷酸化作用呈下降趋势,36h 后下降 30%~35%左右,ATP 产生减少,但检测发现,线粒体的 ATPase 活力无明显影响。所以总的来看,杀虫蛋白作用于蝗虫后,破坏了线粒体的正常结构,致使各类凋亡因子的释放,破坏

了进行氧化磷酸化的正常功能,阻碍了能源物质 ATP 的生成,而机体对能量的需求仍维持正常水平,导致了蝗虫体内能量代谢供需不平衡,不能维持细胞的正常生命活动,从而影响整个细胞的基础代谢,致使各细胞器病变,最终导致机体死亡。

参 考 文 献

[1] 杨志荣,张 文,刘世贵,等.复合细菌灭蝗剂对脊椎动物致病性研究.中国生物防治,1996,12(3):114-116.

[2] 张 文,杨志荣,候若彤,等.细菌灭蝗剂对原核生物致突变性研究.四川大学学报,1997,34(5):683-687.

[3] 刘世贵,朱 文,杨志荣,等.一株蝗虫病原菌的分离和鉴定.微生物学报,1995,35(2):86-90.

[4] 葛绍荣,罗春勇,刘世贵,等.竹蝗的生物防治研究.四川林业科技,1999,20(3):12-14.

[5] 罗 霞,杨志荣,朱 文,等.类产碱假单胞菌杀虫蛋白的激光拉曼光谱研究.生物化学与生物物理进展,2000,27(1):68-71.

[6] 张 文,杨志荣,朱 文,等.类产碱假单胞菌杀虫物质的分离纯化和鉴定.微生物学报,1998,38(1):57-62.

[7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976,72:248-254.

[8] Zhao J, Zhu J Q, Luo X, et al. Studies on the locusts' pathogenesis and energy metabolic inhibition induced by the insecticidal protein purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. High Technology Letters, 2002,8(4):13-17.

[9] Culling C E A. Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques. London: Butterworth, 1974:323-339.

[10] Piquet M A, Nogueira V, Devin A, et al. Chronic ethanol ingestion increases efficiency of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. FEBS Letters, 2000,468:239-242.

[11] 王亚军,王晓飞,吴秀珍.细胞生物学实验指导.成都:四川大学出版社,1997:27-32.

[12] 樊廷俊,夏 兰,韩贻仁.线粒体与细胞凋亡.生物化学与生物物理学报,2001,33(1):7-12.

Study on The Locusts Energy Metabolizability Inhibited by The Insecticidal Protein Purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

ZHAO Jian LUO Xia CHEN Dong-Hui WANG Jian-Dong YANG Zhi-Rong*

(The Key Laboratory for Grassland Biocontrol Engineering of Ministry of Education ,Sichuan University , Chengdu 610064 ,China)

Abstract : Under the electron microscope , it could be observed that many mitochondria expanded after the ingestion of the insecticidal protein purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* . Partial cristae broke and blurred . Detection of oxygen electrode showed the efficiency of oxidative phosphorylation and ATP quantity decreased in the midgut cells , whereas the activity of mitochondrial ATPase was almost not affected . That means the energy utilization of locusts was in gear , but the shortage of the supplying of energy resulted in their death .

Key words : *Pseudomonas pseudoalcaligenes* , Insecticidal protein , Mitochondrion , Oxidative phosphorylation

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA214061)

* Corresponding author. Tel 86-28-85412485 ; E-mail : bioyang@163.com

Received date 07-21-2003