

WHS₃ 菌株产几丁质酶对棉铃虫 HaSNPV 的增效作用*

徐红革, 彭辉银**, 刘家欣, 白志强, 谢 薇

(中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071)

Enhancement to *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus
by Chitinase of WHS₃ Strain

XU Hong-ge, PENG Hui-yin**, LIU Jia-xin, BAI Zhi-qiang, XIE Wei

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: WHS₃ *Serratia marcescens* is a high yield bacterium of Chitinase. The yield of chitinase in induce medium was 84.4 μg/mL. The chitinase (A₃) can enhance the toxicity of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaSNPV) up to 20% ~ 70%. The LT₅₀ and LT₉₀ were shortened 1.1 and 1.3 days respectively comparing with control.

Key words: WHS₃; Chitinase; *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus(HaSNPV)

摘要: WHS₃ (*Serratia marcescens*) 菌是一株几丁质酶的高产菌株, 在诱导培养基中几丁质酶的产量可达 84.4 μg/mL。通过对中国棉铃虫进行的生物测定表明: WHS₃ 菌所产的几丁质酶 (A₃) 能有效地提高 HaSNPV 的毒力 20% ~ 70%, LT₅₀、LT₉₀ 比对照组缩短天数最高可达 1.1d、1.3d。

关键词: WHS₃ 菌株; 几丁质酶; 棉铃虫核型多角体病毒

中图分类号: S433 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)03-0239-04

几丁质(Chitin)是自然界中除纤维素外储量最大的生物多聚糖^[1], 在自然界几丁质广泛存在于真菌、硅藻、节肢动物和原生动物的生物中, 是绝大部分真菌细胞壁的结构物质, 占细胞壁干重的 40% - 60%。几丁质是以 N-乙酰-D-氨基葡萄糖为单体, 以 β-1, 4 糖苷键连结而成的生物多聚体^[2]。Bennecke(1905)首次分离到能够降解几丁质的微生物之后, 人们相继发现多种微生物和动植物能够降解几丁质, 这是因为这些生物能够产生胞外或胞内几丁质酶(Chitinase)^[3]。

根据作用于底物的方式不同, 微生物几丁质酶可分为两类^[4-6]: 外切几丁质酶(Exochitinase)和内切几丁质酶(Endo-chitinase, EC3.2.1.14)。内切几丁质酶从几丁质链的任一部位随机水解, 产物主要是几丁二糖。外切几丁质酶的作用方式为外作用型, 水解几丁质的产物只有 N-乙酰氨基葡萄糖(N-

acetylglucosamine, NAG)。几丁质是昆虫中肠围食膜的主要结构成分。围食膜是昆虫防止病原细菌或病毒侵染的一道天然屏障。昆虫病原病毒的杀虫机理主要是通过幼虫取食病毒的方式进入中肠, 然后穿透中肠的围食膜进入中肠细胞或体细胞内, 引起寄主昆虫罹病或死亡。因此, 昆虫病原微生物须首先破坏昆虫天然屏障表皮和中肠, 才能达到杀虫效果。能否破坏昆虫天然屏障与昆虫病原微生物的致病力有密切的关系^[7-9], 本文将应用 WHS₃ 菌产的几丁质酶增效 HaSNPV 的毒力的结果报道如下。

1.1 材料和试剂

菌种: WHS₃ (*Serratia marcescens*) 由本室保藏。
诱导培养基: 酵母膏 0.05%、几丁质 1.5%、(NH₄)₂SO₄ 0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.03%、KH₂PO₄ 0.136%、pH 7.0。棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 由武汉病毒研究所提供。棉铃虫核型多角体病毒

收稿日期: 2001-12-30, 修回日期: 2002-02-01

* 基金项目: 院重点项目; 中国科学院九五重点项目资料(990202)

作者简介: 徐红革(1967-), 男, 湖北武汉籍, 助理研究员, 硕士, 主要研究方向为病毒生物学。

** 通讯作者: 彭辉银(1950-), 男, 湖北秭归籍, 研究员, 从事昆虫病毒资源开发及应用。Correspondence author.

(*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus)由武汉病毒研究所提供。

1.2 胶体几丁质制备^[10]

脱矿几丁质(Sigama公司),碾碎,过100目筛,经浓HCl处理,离心后于蒸馏水中沉淀而成。称取2g纯几丁质,加入15mL丙酮溶解后,加入90mL浓盐酸搅拌均匀,用玻璃纤维过滤至冰水中,边过滤边搅拌,加盖放入冰箱过夜,使其沉淀彻底。第二天将几丁质3000r/min离心20min,用蒸馏水洗至中性,沉淀物放入透析袋中,自来水透析一夜后,以蒸馏水透析2h,再3000r/min离心10min,弃去上清液,得90%的胶体几丁质。

1.3 摇瓶发酵产酶

500mL锥形瓶装产酶培养基50mL,接种量2%,30℃200r/min摇瓶震荡培养7d,收集发酵液。

1.4 几丁质酶测定

1.4.1 平板检测法 0.25%几丁质+0.8%琼脂糖+0.002%NaN₃铺板后将酶液加在平板上,保温后观察有无透明圈^[11]。

1.4.2 酶活测定 吸取酶液0.5mL,加入0.1mL的NaN₃,再加入0.5mL的几丁质悬浮液,37℃保温3h后,加热至100℃5min终止反应。在A_{544nm}下测定光密度。在10,000r/min下离心10min。去除多余的几丁质,取上清再测OD₅₄₄值,得二次测定之差ΔOD₅₄₄值。在OD₅₉₅下测得蛋白质含量,根据下式算出酶的活力^[12]。

$$\text{酶活力} = \frac{\Delta\text{OD}_{544}}{\text{OD}_{595}} \times (\text{nk} \cdot \text{g}^{-1})$$

1.5 几丁质酶(A₃)对病毒的增效试验

根据田间防治情况设定三种浓度10⁶ PIB/mL、10⁷ PIB/mL、10⁸ PIB/mL HaSNPV悬浮液,在上述三种病毒悬液中分别加入2μg/mL、0.4μg/mL、0.08μg/mL几丁质酶(A₃),每头虫接种剂量为50μL,滴加在人工饲料表面,对照组加等量的无菌水,供试昆虫为4d龄棉铃虫,每一处理浓度用棉铃虫幼虫30头,实验重复三次,饲毒温度为25℃~27℃,湿度为70%~90%。

1.6 几丁质酶浓度测定

考马斯亮兰法^[13]。离心几丁质酶发酵液,通过测定OD₅₉₅方法测定发酵过程中几丁质酶的产量。

2 结果与分析

2.1 WHS₃产几丁质酶分析

WHS₃菌株生产的几丁质酶是一种诱导酶,通过测定OD₅₉₅的方法测定其发酵过程中产酶情况(如图1)。结果显示,WHS₃菌株应用诱导选择培养基,在摇瓶发酵条件下第7天几丁质酶产量达到最高值(84.4μg/mL)。

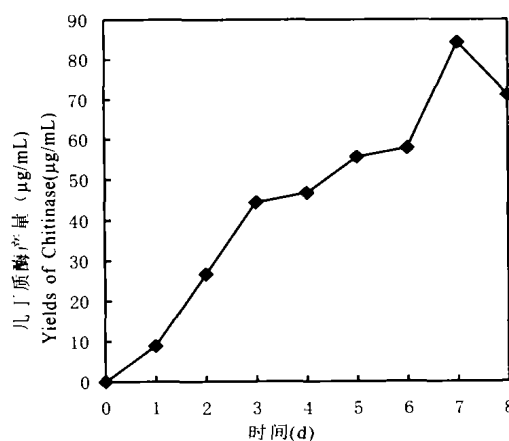


图1 WHS₃菌株产几丁质酶曲线

Fig.1 Curver of The Chitinase's yield of WHS₃

2.2 几丁质酶(A₃)活性测定

将含几丁质酶提取液加到检测平板上,保温观察,可见明显的透明圈,并测定其酶活性。随着几丁质酶的浓度降低,所产生的透明圈将逐渐减小,从应用的角度,选择10⁻³和10⁻⁴稀释倍数比较经济。

2.3 几丁质酶(A₃)对HaSNPV的增效试验

根据田间防治情况选择10⁸ PIB/mL、10⁷ PIB/mL、10⁶ PIB/mL等三种浓度进行HaSNPV增效试验。几丁质酶的浓度分别是(2μg/mL、0.2μg/mL、0.08μg/mL)。重复三次的结果显示几丁质酶(A₃)对棉铃虫核型多角体病毒有明显增效作用(如图2、3、4)。

几丁质酶A₃对棉铃虫NPV病毒的增效效果明显,10⁸ PIB/mL HaSNPV中加入2μg/mL几丁质酶,生测第四天增效40.1%,第五天增效70.8%;10⁸ PIB/mL HaSNPV中加入0.4μg/mL几丁质酶,生测第四天增效37.5%,第五天增效70.8%;10⁸ PIB/mL HaSNPV中加入0.08μg/mL几丁质酶,生测第四天增效18.6%,第五天增效50%(见表1、图2)。10⁷ PIB/mL HaSNPV中加入2μg/mL几丁质酶,生测第四天增效23.7%,第五天增效56.4%;10⁷ PIB/mL HaSNPV中加入0.4μg/mL几丁质酶,在生测第四天增效11.8%,在第五天增效50%(见表1、图3)。10⁶ PIB/mL HaSNPV中加入2μg/mL

几丁质酶,生测第四天增效 1.3%,第五天增效 48.6%(见表 1、图 4)。

10⁶PIB/mL HaSNPV 加入 0.08μg/mL 几丁质酶的 LT₅₀、LT₉₀分别比对照缩短 0.6d 和 0.9d 病毒死亡率提高。病毒中加入的几丁质酶浓度愈高,其

增效效果愈好。10⁸PIB/mL + 2μg/mL 几丁质酶实验组,LT₅₀、LT₉₀比对照组缩短分别为 1.1d、0.8d,10⁶PIB/mL + 2μg/mL 几丁质酶实验组,LT₅₀、LT₉₀比对照组缩短分别为 1.0d、1.3d(见表 2)。

表 1 病毒加几丁质酶后的增效结果(%)

Table 1 The enhancement of HaSNPV with chitinase A3

+ ChiA ₃ (μg/mL)	10 ⁸ PIB/mL HaSNPV			10 ⁷ PIB/mL HaSNPV			10 ⁶ PIB/mL HaSNPV		
	2	0.4	0.08	2	0.4	0.08	2	0.4	0.08
第四天的增效结果 Forth day's enhancement	40.1	37.5	18.6	23.7	11.8	4.7	1.3	11.1	6.6
第五天的增效结果 Fifth day's enhancement	70.8	70.8	50	56.4	50	20.8	48.6	40.1	20

表 2 病毒加几丁质酶后生测效果(LT₅₀、LT₉₀)

Table.2 Bioactivity of HaSNPV after plus chitinase

	LT ₅₀ (d)	缩短的天数 shortened day	LT ₉₀ (d)	LT ₉₀ 缩短的天数 shortened day
10 ⁸ PIB/mL	4.5±0.4		6.3±0.3	
+ 2μg/mL ChiA ₃	3.4±0.3	1.1	5.5±0.1	0.8
+ 0.4μg/mL ChiA ₃	3.9±0.3	0.6	5.5±0.3	0.8
+ 0.08 μg/mL Chi A ₃	4.2±0.2	0.3	5.7±0.7	0.6
10 ⁷ PIB/mL	4.7±0.1		6.4±0.1	
+ 2μg/mL ChiA ₃	4.0±0.3	0.7	5.8±0.1	0.6
+ 0.4μg/mL ChiA ₃	4.4±0.1	0.3	5.9±0.2	0.5
+ 0.08 μg/mL Chi A ₃	4.6±0.2	0.1	6.1±0.1	0.3
10 ⁶ PIB/mL	5.5±0.1		7.4±0.1	
+ 2μg/mL ChiA ₃	4.5±0.2	1.0	6.1±0.1	1.3
+ 0.4 μg/mL ChiA ₃	4.7±0.1	0.8	6.3±0.1	1.1
+ 0.08 μg/ml. ChiA ₃	4.9±0.3	0.6	6.5±0.3	0.9

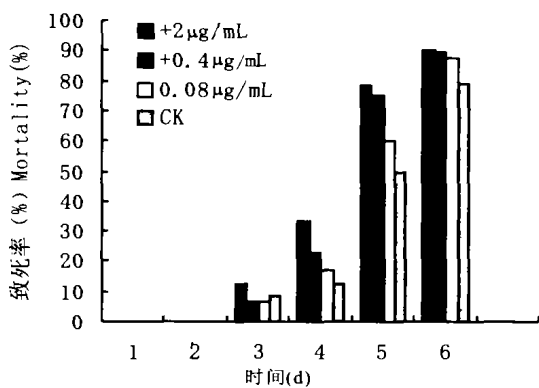


图 2 几丁质酶 A₃ 对 10⁸PIB/mL 棉铃虫病毒增效作用

Fig.2 Bioactivity effectiveness of 10⁸PIB/ml. HaSNPV plus chitinase A₃

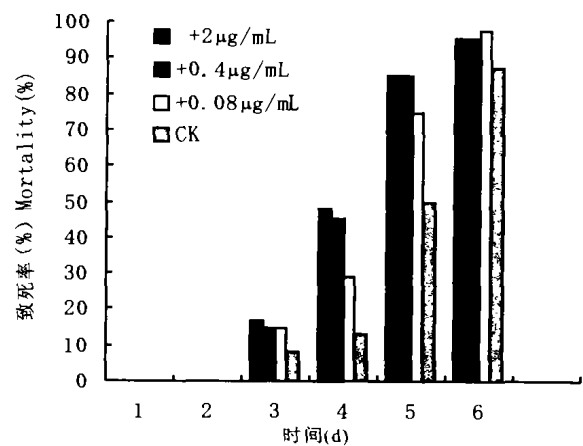


图 3 几丁质酶 A₃ 对 10⁷PIB/mL 棉铃虫病毒增效作用

Fig.3 Bioactivity effectiveness of 10⁷PIB/mL HaSNPV plus chitinase A₃

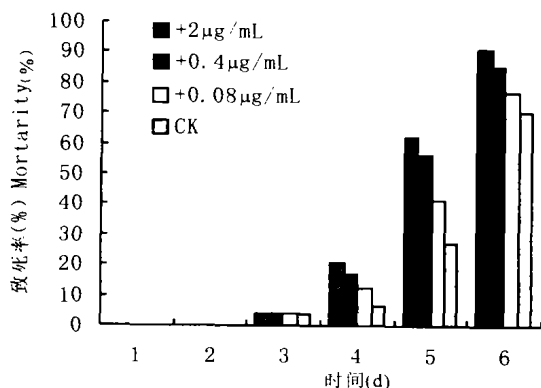


图4 几丁质酶 A3 对 10⁶PIB/mL 棉铃虫病毒增效作用

Fig.4 Bioactivity effectiveness of 10⁶PIB/mL HaSNPV plus chitinase A3

3 讨论

在诱导培养基中几丁质酶的产量可达 84.4 μg/mL。如果对诱导培养基做进一步的筛选,可望进一步提高几丁质酶的产量。棉铃虫核型多角体病毒加入几丁质酶后都可不同程度地提高病毒的杀虫效果。病毒制剂中加入的几丁质酶的浓度愈高,其增效的效果愈好。病毒制剂中加入 2 μg/mL 的几丁质酶的杀虫效果比加入 0.4 μg/mL 的几丁质酶的杀虫效果要好,加入 0.4 μg/mL 的几丁质酶的杀虫效果比加入 0.08 μg/mL 的几丁质酶的杀虫效果要好。几丁质酶的增效作用具有广阔的应用前景。由于化学农药的大量使用,昆虫产生了抗药性,愈用化学农药虫灾愈泛滥,愈泛滥愈用药,如此恶性循环。“小虫子,大灾害”是目前和今后严重威胁农业生产和迫切需要解决的全球性难题。因此,西方已有许多国家不再使用化学农药,改用生物防治和生物农药来取代化学农药。随着我国经济实力的增强和人民健康意识及环保意识的增强,公众对绿色食品的要求也与日俱增。为了减少化学农药对环境的污染,走一条可持续发展的农业、林业路,生物农药产

业将得到迅速的发展。生物增效剂的研究具有重要的意义。

参考文献

- [1] 郑志成,周美英,姚炳新.蜂房芽孢杆菌 B-91 几丁质酶的合成条件[J].厦门大学学报(自然科学版),1995,34:447-451.
- [2] 程明哲,苏拔贤,宋英良,等.虾头几丁质酶的研究[J].热带海洋,1996,15:68-73.
- [3] Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K, et al. Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and class III plant chitinases [J]. J. Bacteriol, 1992, 174: 408-414.
- [4] 彭辉银,李星,张双民,等.中国棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因的定位与克隆[J].中国病毒学,1998,2:139-143.
- [5] 邱立友.菜豆内切几丁质酶对立枯丝核菌的抗菌作用[J].微生物学杂志,1994,14:66-70.
- [6] 邱立友.微生物几丁质酶与害虫防治[J].河南农业大学学报,1995,29:185-190.
- [7] Kramer K J, Muthukrishnan S. Insect Chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides[J]. Insect biochem Molec Biol, 1998,27:887-900.
- [8] 赵小东,周建华,丁清泉.蜀柏毒蛾核型多角体病毒基因文库的构建及几丁质酶基因的定位[J].中国病毒学,2001,3:286-288.
- [9] 胡国栋,庞义,杨凯,李充璧.斜纹夜蛾核型多角体病毒几丁质酶基因上游 4.0Kb 的序列分析[J].中国病毒学,2001,16:161-165.
- [10] 谢湘玉.紫外诱变球孢白僵菌选育几丁质酶高产菌株方法的研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),1996,24:75-77.
- [11] 陈三凤,李季伦.黄干菌几丁质酶的纯化和性质[J].微生物学报,1994,34:14-19.
- [12] 王海波,陶芸,金沙.蚕豆叶片几丁质酶活性的蚜虫诱导——植物生理应激反应的趋同性[J].应用生态学报,1994,5:68-71.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.