

虫生真菌分子生物学研究进展*

王成树 李增智

(安徽农业大学经济昆虫菌物研究所 合肥 230036)

摘要: 虫生真菌分子生物学的研究自开展以来, 有 20 多种与杀虫毒力相关的蛋白酶得到纯化, 而与之相对应的基因也分别得到克隆、测序。陆续的基因克隆表明, 虫生真菌中的重要毒力基因以基因簇的形式存在, 在精确的表达调控下以适应不同的寄主种类和不同的环境条件。基因工程研究表明, 以增加毒力基因拷贝的方式可显著提高虫生真菌的杀虫速率, 带有外源基因标记的菌株也是环境释放示踪研究的良好材料及方法。

关键词: 虫生真菌, 蛋白酶, 基因克隆, 表达调控, 基因工程

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 03-0088-05

近年来, 由于虫生真菌在害虫持续控制及维护物种多样性方面的特殊优势, 其应用及基础研究发展迅速。商品化方面曾经有 40 余种产品登记注册^[1], 其中研究及应用比较成熟的主要为球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*)、金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*)、蜡蚧轮枝孢 (*Verticillium lecanii*)、玫烟色拟青霉 (*Paecilomyces fumosoroseus*) 及汤普生被毛孢 (*Hirsutella thompsonii*) 等。随着分子生物学技术及水平的迅速发展, 虫生真菌的分子生物学研究方面也不甘落后, 目前已经纯化的蛋白酶类约 20 余种, 其相应基因种类也相继得到克隆测序 (表 1), 主要是与毒力相关的因子, 其中研究比较成熟的是金龟子绿僵菌类枯草杆菌蛋白酶类及其相关基因^[2], 现在马里兰大学 St Leger 研究组正在进行金龟子绿僵菌的基因组测序, 随着对 cDNA 序列功能分析的不断进行, 将有大量的基因被陆续报道。这些研究的目的是为了解决虫生真菌杀虫速率缓慢的弱点, 以期从分子生物学水平上提高菌株的杀虫毒力, 在最大程度及范围上发挥虫生真菌在害虫控制上的优势及潜力。

1 蛋白酶纯化

目前所分离、纯化的酶类主要是虫生真菌入侵昆虫体壁过程中所产生的蛋白酶类, 因而在不同程度上表现与菌株毒力相关。St Leger 由巨大蜚蠊 (*Blattella germanica*) 体壁离体诱导试验表明, 金龟子绿僵菌孢子萌发过程至少有 42 种蛋白产生, 其中主要为酸性蛋白酶类 (pI 4.2~5.6), 这些酶类一般均由结构不同的同工酶组成为一个酶系, 如金龟子绿僵菌 PR1A 及 PR1B 理化特性相近, 但氨基酸序列只有 53% 的同源性; PR2 已知的 2 个同工酶的同源性为 56%^[3,4]。另外就酶活性而言, PR2、PR4、TRY1 也可认为

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39870013)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39870013)

收稿日期: 2000-03-08, 修回日期: 2001-01-20

属于同一类同工酶系。几丁质酶系又可分为几丁质内切酶系(分子量为33kD、42kD、28.6kD)和外切酶系(66kD)两大类, Kang等分离的60kD几丁质酶兼具内切酶活性又具外切酶活性, 金龟子绿僵菌中至少存在10种不同的几丁质同工酶^[5]。显而易见的是由于氨基酸序列不同, 编码这些酶的基因也不尽相同, *pr1A*及*pr1B*还位于不同的染色体上^[4]。新近克隆的金龟子绿僵菌胰凝乳蛋白酶只表现出与放线菌灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)类蛋白55%的同源性^[6]。

2 基因克隆

利用不断改进的克隆技术, 各类生物模式种的遗传密码正逐步得到诠释, 虫生真菌中约有20余种基因被克隆测序(表1)。研究表明虫生真菌中的毒力基因多以基因簇(gene cluster)的形式存在, 如金龟子绿僵菌的类枯草杆菌蛋白酶基因(*pr1*)已经克隆的有*pr1A*、*pr1B*...*pr1I*^[2,4](GenBank注册号AJ251925, AJ289823, AJ400706, AJ251967, AJ251964, AJ251965, AJ251972, AJ293220); 金龟子绿僵菌几丁质酶基因(*chit*)至少存在10种不同类型^[5]; 已克隆的球孢白僵菌*pr1*与*bsn1*也同属于类枯草杆菌蛋白酶基因^[7,8]。这些基因族可以位于不同的染色体上, 如金龟子绿僵菌的*pr1A*、*pr1B*^[4]。丝状真菌染色体或其片段具有丢失的现象, 球孢白僵菌的染色体也表现出长度和数量上的多样性, 虫生真菌这种进化上的适应避免了因重要基因丢失而死亡的可能。

金龟子绿僵菌*pr1A*经克隆测序的cDNA序列与其在基因组中的序列相比较发现存在3个内含子, 分别为68、56及72bp^[2]。序列比较发现球孢白僵菌*pr1*中也有3个内含子, 大小分别为72、61及68^[8]。两者*pr1*中所有内含子5'-GTA(C)AG, 3'-TAG为相同的保守序列。这一保守序列在金龟子绿僵菌几丁质酶基因*chit1*的3个内含子(101、68及80bp)中也存在^[9]。

表1 虫生真菌中已经克隆的基因

虫生真菌名称	基因符号	基因产物及名称	结构基因长度 bp
金龟子绿僵菌 ^[2]	<i>pr1A</i>	类枯草杆菌蛋白酶基因	1164
金龟子绿僵菌 ^[4]	<i>pr1B</i>	类枯草杆菌蛋白酶基因	1158
金龟子绿僵菌 ^[6]	<i>chy1</i>	胰凝乳蛋白酶基因	1200
球孢白僵菌 ^[7]	<i>pr1</i>	体壁降解蛋白丝氨酸内切酶基因	1080
球孢白僵菌 ^[8]	<i>bsn1</i>	碱性丝氨酸蛋白酶基因	1137
金龟子绿僵菌 ^[9]	<i>chit1</i>	几丁质酶编码基因	1521
金龟子绿僵菌 ^[10]	<i>sugA</i>	饥饿显示基因	288
金龟子绿僵菌 ^[11]	<i>pr2</i>	类胰蛋白酶丝氨酸内切酶基因	929
金龟子绿僵菌 ^[12]	<i>pes</i>	肽合成酶基因	3401
金龟子绿僵菌 ^[13]	<i>crr1</i>	碳反应调节因子	1233

序表

虫生真菌名称	基因符号	基因产物及名称	结构基因长度 bp
球孢白僵菌 ^[14]	<i>nia</i>	硝酸盐降解酶基因	~ 3900
球孢白僵菌 ^[14]	<i>hupfer</i>	<i>Nia</i> 中的插入序列 (转座子)	3336
金龟子绿僵菌 ^[15]	<i>nrr1</i>	氮反应调节因子	2835
汤普森被毛孢 ^[16]	<i>htA</i>	被毛孢素 A 基因	492
金龟子绿僵菌 ^[17]	<i>chitinase</i>	几丁质酶编码基因	1902
金龟子绿僵菌 ^[18]	<i>MaCHS</i>	几丁质酶合成基因	~ 550
金龟子绿僵菌 ^[19]	<i>MeCPA</i>	羧肽酶基因	1254

3 表达调控

虫生真菌不同蛋白酶的结构基因被克隆、测序后,人们最感兴趣的还是其精确表达调控的机理,从而争取得到人为设计和调控的目的。金龟子绿僵菌 PR1 的产生可在多种情况下被诱导,人工合成培养基上 *pr1A*、*pr1B* 可低水平表达;纤维表、木聚糖、弹性蛋白、胶原蛋白对 *pr1*、*pr2* 的表达均具有去抑制的功能,而昆虫体壁诱导 PR1 的产量是弹性蛋白的 5~9 倍^[2,11]。氢氧化钾去蛋白的沙漠蝗 (*Schistocerca gregaria*) 体壁残留物不能诱导 PR1 产生,氟仿、二乙醚处理的去碳氢化合物、甘油脂、甾醇类的体壁残留物能够诱导 PR1 产生,所以体壁中包含的氨基酸、多肽类及降解的短肽类在 *pr1* 诱导中起重要作用。明胶和 1% (W/V) 以上浓度的牛血清白蛋白能够快速、完全地抑制 *pr1* 表达,鸡蛋清蛋白及 PR1 IgG 抗体对 *pr1* 的抑制表现在显著延迟穿透时间上,但对菌丝生长及附着胞形成没有影响^[2]。

Western 和 Northern 杂交表明,PR1 及其它蛋白酶的产生是伴随侵染结构附着胞形成同时进行的^[2],这说明 PR1 完全受体壁降解物诱导是不可能的,金龟子绿僵菌在加有丙氨酸(易利用物)的寄主体壁上只会形成徒长菌丝,此时,PR1 合成及侵染结构形成受抑制,说明当环境中易用物充分时,绿僵菌细胞不会浪费能量去合成暂不需要的酶类^[5]。所以真正涉及侵染过程中蛋白质合成及形态发生的信号是胞外及胞内营养物的匮乏,这种情况下细胞产生饥饿显示因子^[10],并作为信号蛋白诱导产生一系列酶合成反应。这种精细调控还表现在翻译后调节上,在营养匮乏的 45min 内 *pr1* 基因转录起始,翻译产物是无活性的 40.3kD 前体蛋白,28.6kD 活性成份的剪切及分泌到胞外只需要 7min 时间,这种快速调节方式是适应致病过程中不断变化着的代谢途径的结果^[2]。

目前为止,*pr1* 操纵子的结构及其调控机制还不十分清楚,在其启动子的-136 位有类似 TATA 盒的 TATAAAA 序列,-648~-620 区域为 TC 丰富区,-555 位点左右为 cAMP 反应元件,启动子区域内还存在 7 个类似于粗糙脉胞菌 (*Neurospora crassa*) 和构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的 N-调节蛋白识别位点 GATA,其中有 6 个位于-351~-561 之间^[2]。

4 基因工程

涉及虫生真菌基因工程研究的报道目前主要体现在三个方面：一是将虫生真菌作为宿主细胞接受外源基因的试验，并进而研究外源基因的稳定性；二是将虫生真菌的毒力因子（如 *pr1* 基因）导入杀虫真菌受体菌，构建永久型表达的菌株，以提高真菌的杀虫效率；第三是使用带有外源基因的稳定转化子进行释放试验，以验证工程菌株的环境稳定性及与当地菌株的基因交流情况。

构巢曲霉的苯菌灵抗性基因 *benA3* 通过 pBENA3 质粒导入金龟子绿僵菌，从筛选出的转化子中得到既对烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 具浸染活力，又对杀真菌剂具有抗性的工程菌株^[20]。Pfeifer 和 Khachatourians^[21] 将 *benA3* 基因导入球孢白僵菌，每微克 DNA 得到 1~3 个转化子。Bogo 等^[22] 通过 PEG、电穿孔及粒子轰击法，将带有苯菌灵抗性质粒 pBT6 导入金龟子绿僵菌，三者的转化率分别为 0.8~6.9, 1.3~1.8 及 32~201 转化子/微克 DNA；转化子有丝分裂稳定性分别为 46%, 67% 及 90%，均以粒子轰击法转化率及稳定性最高。带有苯菌灵抗性基因 *benA3* 质粒 pBENA3 与带有 *pr1* 基因的质粒 pMAPR-1 于金龟子绿僵菌 1080 菌株进行共转化试验，经抗性及富营养筛选，得到能够在烟草天蛾血腔中组成型过量表达 *pr1* 的工程菌株，与野生菌株相比，工程菌株感染虫体的取食量下降 40%、死亡时间缩短 20%^[23]。

5 展望

虫生真菌在真菌的 5 个亚门中均有分布，这种种类上的广泛多样性，使得仅将某一个种类作为“模式”物种进行虫生真菌的分子生物学等研究是不具普遍代表性的，但就所有种类均必须突破昆虫体壁这一屏障而言，虫生真菌入侵过程中所涉及的酶系又具有相似性，所以利用某一种研究比较成熟的虫生真菌（如金龟子绿僵菌或球孢白僵菌）作对象，继续进行相关致病基因的分离克隆，以阐明它们的遗传机理、调控机制、结构功能关系、演化及协同作用等仍是相当长一段时间内的研究内容；其二，大量研究已经证实虫生真菌的毒力是多基因决定的，不同降解酶类及毒素基因的陆续分离克隆，人们必须最终确定毒力主效基因，以解决菌株毒力效价问题，为标准化提供依据；第三，通过位点特异性突变，人工改变毒力相关酶类的释放时间，加速侵染致病速率；第四，研究病原体与寄主之间的分子识别及分子防御等；第五，分离寄主专化性基因，构建寄主专一性菌株，以更大程度上提高虫生真菌的环境安全性；第六，将毒力相关基因（主毒力因子）导入其它真菌、细菌甚至病毒粒子中进行放大、表达，探讨将其蛋白产物作为辅助因子进行剂型加工的可能性。

参考文献

- [1] 王成树. 安徽农业大学学报, 1996, 23: 375~380.
- [2] St Leger R J, Frank D C, Roberts D W, et al. Eur J Biochem, 1992, 204: 991~1001.
- [3] St Leger R J, Charney A K, Cooper R M. Arch Biochem Biophys, 1987, 253: 221~232.
- [4] Joshi L, St Leger R J, Roberts D W. Gene, 1997, 197: 1~8.
- [5] Kang S C, Park S, Lee D G. J Invertebr Pathol, 1999, 73: 276~81.
- [6] Screen S E, St Leger R J. J Biol Chem, 2000, 275: 6689~6694.

- [7] Joshi L, St Leger R J, Bidochka M J. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **125**: 211 ~ 218.
- [8] Kim H-K, Hoe H-S, Suh D S, *et al.* *Biotechnol Lett*, 1999, **21**: 777 ~ 783.
- [9] Bogo M R, Rota C A, Pinto H, *et al.* *Curr Microbiol*, 1998, **37**: 221 ~ 225.
- [10] St Leger R J, Staples R C, Roberts D W. *Gene*, 1992, **120**: 119 ~ 124.
- [11] Smithson S L, Paterson I C, Bailey A M, *et al.* *Gene*, 1995, **166**: 161 ~ 165.
- [12] Bailey M, Kershaw M J, Hunt B A, *et al.* *Gene*, 1996, **173**: 195 ~ 197.
- [13] Screen S, Bailey A, Charnley K, *et al.* *Curr Genet*, 1997, **31**: 511 ~ 518.
- [14] Maurer P, Couteaudier Y, Girard P *et al.* *Mycol Res*, 1997, **101**: 159 ~ 164.
- [15] Screen S, Bailey A, Charnley K, *et al.* *Gene*, 1998, **221**: 17 ~ 24.
- [16] Boucias D G, Farmerie W G, Pendland J C. *J Invertebr Pathol*, 1998, **72**: 258 ~ 261.
- [17] Kang S C, Park S, Lee D G, *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **165**: 267 ~ 271.
- [18] Nam J-S, Lee D-H, Lee K H, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **159**: 77 ~ 84.
- [19] Joshi L, St Leger R J. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 9803 ~ 9811.
- [20] Goettel M S, St Leger R J, Bhairi S, *et al.* *Curr Genet*, 1989, **17**: 129 ~ 132.
- [21] Pfeifer T A, Khachatourians G. G. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **38**: 376 ~ 381.
- [22] Bogo M R, Vainstein M H, Aragao F J L, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **142**: 123 ~ 127.
- [23] St Leger R J, Joshi L, Bidochka M J, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 6349 ~ 6354.