

根癌农杆菌介导的 *Pr1* 基因在贵阳腐霉的组成性表达

刘萍^{1*} 郑慧玲² 赵竟男³ 吴建伟⁴ 苏晓庆¹

- (1. 贵阳医学院生物学教研室 贵州 贵阳 550004)
- (2. 贵阳市妇幼保健院优生遗传科 贵州 贵阳 550004)
- (3. 艾迪康临床检验所有限公司 江西 南昌 330096)
- (4. 贵阳医学院寄生虫学教研室 贵州 贵阳 550004)

摘要: 【目的】构建组成性表达贵阳腐霉 *Pr1* 基因的载体 pCambia-hph-*Pr1*, 转化贵阳腐霉, 以获得高毒力的基因工程转化菌株。【方法】以二元载体 pCambia-Pnos-PNN-hph 为基本骨架, 将 *Pr1* 基因置于组成型启动子 PgpdA 和终止子 TtrpC 之间, 获得含 *Pr1* 基因的表达元件。以贵阳腐霉菌丝体为受体材料, 利用根癌农杆菌介导的遗传转化法转化贵阳腐霉, 观察转化株的生物学特征和灭蚊毒力。【结果】转化株的菌丝生长速度和游动孢子产量与野生株无显著性差异。生物测定表明转化株对蚊幼虫平均致死率达到 32.9%, 比野生株提高了约一倍, 并且使受试蚊幼虫生长速度明显减缓。【结论】利用根癌农杆菌介导的遗传转化获得了遗传稳定的高毒力菌株。

关键词: 生物防治, 组成性表达, 灭蚊毒力

Improvement of *Pythium guiyangense* by constructive expression of *Pr1* gene

LIU Ping^{1*} ZHENG Hui-Ling² ZHAO Jing-Nan³ WU Jian-Wei⁴

SU Xiao-Qing¹

(1. Department of Biology, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(No. 黔科合 J 字[2008]2084 号)

*通讯作者: Tel: 86-851-6908638; 信箱: gymcliu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-09-22; 接受日期: 2011-12-27

(2. *Eugenics Heredic Department, Maternal and Child Health Hospital, Guiyang, Guizhou 550003, China*)

(3. *ADICON Clinical Laboratories, Inc., Nanchang, Jiangxi 330096, China*)

(4. *Department of Parasitology, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China*)

Abstract: [Objective] To construct a constructive expression vector p*Cambia-hph-Pr1* containing a Pr1 ORF of *Pythium guiyangense* for transformation of the fungus to get a genetic recombinant strain with enhanced virulence against mosquito larvae. **[Methods]** The Pr1 gene expression vector was constructed using a binary vector as basic frame, and Pr1 gene was placed between promoter PgpdA and terminator TtrpC. The recombinant strains were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation system, with *P. guiyangense* mycelia as acceptor, using vector p*Cambia-hph-Pr1* containing hygromycin B resistance gene as marker. The biological characteristics and virulence to *Culex* larvae of the transformant were observed. **[Results]** No distinct difference was found between wild-type stain and transformant in terms of growth rate and zoospore yield. A transformed strain of the fungus with significantly improved virulence was achieved. It caused an average larval death rate of 32.9% which was approximately double that of wild-type stain. Besides, the larvae exposed to transformant grew obviously slower. **[Conclusion]** A genetically stable strain with higher virulence was obtained by constitutive expression of Pr1 protease through *Agrobacterium*-mediated transformation.

Keywords: Biocontrol, Constructive expression, Virulence against *Culex* larvae

贵阳腐霉 *Pythium guiyangense* 是贵阳医学院于 1994 年分离得到的一株灭蚊真菌^[1]。经课题组实验研究证实它具有灭蚊能力强、繁殖速度快、易于人工培养^[2]、可移植性强以及对非靶生物相对安全等诸多优点^[3-4]。然而,和其它昆虫病原真菌一样,贵阳腐霉也具有毒力不稳定、击倒害虫所需时间较长、对环境依赖性强以及长期人工传代菌株退化等缺点,要将其开发成生物防治剂,真正用于蚊虫生物防治,目前还有许多工作要做。在基因工程技术广泛应用于生物遗传改造的今天,采用基因转化技术培育新菌株是可行的。

昆虫病原真菌入侵靶标昆虫过程中分泌一系列蛋白质酶、几丁质酶和脂酶等体壁降解酶降解昆虫体壁,与菌丝产生的机械压力协同作用,穿透昆虫体壁并在虫体内寄生,耗竭昆虫营养,甚至产生次生代谢产物,从而导致靶标昆虫的死亡。在此过程中,类枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin-like protease, Pr1)是降解昆虫体壁的重要参与者^[5]。

St. Leger 将构巢曲霉组成性启动子控制下的多拷贝金龟子绿僵菌 *Pr1* 基因转入绿僵菌基因组,在烟草天蛾血淋巴中实现高效表达,增强了绿僵菌的毒力,使杀虫时间缩短了 25%,并使虫体取食能力大大降低^[6]。该结果表明, *Pr1* 蛋白酶基因在绿僵菌中的超表达可以明显提高该菌的毒力。本课题组前期克隆得到 1 519 bp 的贵阳腐霉 *Pr1* 蛋白酶基因序列,其中包含一个 969 bp 的完整的开放阅读框^[7]。在此基础上,我们希望利用基因工程技术将贵阳腐霉的 *Pr1* 蛋白酶基因转入贵阳腐霉中超量表达,以期获得高毒力的工程菌。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种与质粒: 贵阳腐霉来源于贵阳医学院蚊虫生物防治实验室;根癌农杆菌 LBA4404 和质粒 pUC18 由贵州大学赵德刚教授惠赠; pSK-hph 由西南大学生物技术研究中心张永军教授惠赠;

pAN7-1 由黄隽老师惠赠; pCambia-Pnos-PNN-hph 由本实验室构建^[8]; 引物合成与测序由上海英骏 (Invitrogen) 公司完成。

1.1.2 蚊虫: 实验所用蚊幼虫为本实验室驯化后传代饲养的致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 贵阳株。

1.1.3 常用培养基: KPYG₂ 培养基(g/L): 蛋白胨 1.50, 酵母浸出粉 1.50, 葡萄糖 3.00, 胆固醇 0.025, 氯化钙 0.11, 玉米油 1.00。基本盐培养基(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.3, KH₂PO₄ 0.3, NaCl 0.3, 葡萄糖 5.0。诱导培养基(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.3, KH₂PO₄ 0.3, NaCl 0.3, 几丁质 2.0, 蝉蜕 2.0, pH 6.0。YEP 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 10.0, 氯化钠 5.0, pH 7.2。IM 培养基(g/L): KH₂PO₄ 1.45, K₂HPO₄ 2.05, NaCl 0.15, MgSO₄·7H₂O 0.50, (NH₄)₂SO₄ 0.50, CaCl₂ 0.07, FeSO₄·7H₂O 0.003, C₆H₁₂O₆·H₂O 1.80, 甘油 5 mL, 蒸馏水定容至 940 mL, 1×10⁵ Pa 高压灭菌 20 min, 冷却后加入滤过除菌的 40 mL 1 mol/L MES 和 20 mL 10 mmol/L 乙酰丁香酮(AS)。

1.1.4 主要试剂: Taq 酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、各限制性内切酶、CIAP、DNA marker 等购自 TaKaRa 公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、潮霉素 B 等抗生素购自 Solarbio 公司。底物 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA、左旋多巴(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) 等购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 贵阳腐霉 Pr1 基因的克隆: 根据贵阳腐霉 Pr1 蛋白酶基因序列(序列分析无内含子)自行设计引物 pr1-F: 5'-CGCGGATCCGACCCATTCGG AAAGTCCAAG-3', 5'端引入 BamH I 酶切位点; pr1-R: 5'-GGAAGATCTTACAACCGTCCTCCTAACAC-3', 5'端引入 Bgl II 酶切位点。尿素法提取贵阳腐霉菌基因组 DNA^[9], 以其为模板, 扩增 Pr1 基因片段。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.2 组成性表达载体 pCambia-hph-Pr1 的构建: 用限制性内切酶 Hind III 和 BamH I 酶切质粒 pSK-hph, 回收 TtrpC 片段(770 bp), 与用相同酶切的质粒 pUC18 连接转化, 重组载体命名为 pUC18-TtrpC。以贵阳腐霉菌基因组 DNA 为模板扩增 Pr1 片段, 切胶回收, 以限制性内切酶 BamH I 和 Bgl II 双酶切, 得到 Pr1 片段(1 100 bp), 与相同酶切的载体 pUC18-TtrpC 连接转化, 重组载体命名为 pUC18-TtrpC-Pr1。以质粒 pAN7-1 为模板, 扩增 Pgpda 片段(约 2.1 kb), 回收该片段, 用 Kpn I 和 BamH I 酶切, 与相同酶切的载体 pUC18-TtrpC-Pr1 连接, 命名为 pUC18-Pgpda-pr1-TtrpC。用 Hind III 单酶切 pUC18-Pgpda-pr1-TtrpC, 回收约 4.0 kb 片段, 与相同酶切的 pCambia-Pnos-PNN-hph 连接转化。获得组成性表达 Pr1 的载体 pCambia-hph-Pr1, 冻融法转入根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 中^[10], -70 °C 保存。

1.2.3 根癌农杆菌介导的 Pr1 基因在贵阳腐霉的遗传转化: 按龙朝钦等^[11]方法稍改动。取含质粒 pCambia-hph-Pr1 的 LBA4404 过夜培养物, 用含 200 μmol/L AS 的 YEP 液体培养基 28 °C 振荡培养 6 h 后, 与贵阳腐霉菌丝混合, 26 °C 培养 24 h。弃上清, 加入含 200 μmol/L AS 的 IM 培养基, 26 °C 培养 48 h。悬浮沉淀, 将该混合物涂布到 KPYG₂ 平板上(含 200 mg/L 潮霉素 B 和 200 mg/L 头孢霉素), 26 °C 培养直至抗性菌丝长出。

1.2.4 潮霉素抗性基因 hph 的 PCR 检测: 引物 hphR: 5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3'; hphF: 5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3'。分别以贵阳腐霉菌野生株和转化株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.5 Pr1 蛋白酶活性测定: 野生株和转化株

分别在诱导培养基和基本盐培养基中振荡培养 24 h。取培养液 4 °C、13 000 r/min 离心, 上清液即为粗酶液。利用专一性短肽底物 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 进行 Pr1 蛋白酶活性测定^[12]。酶活单位定义为在 pH 8.0、28 °C 条件下, 每分钟每毫克总蛋白的 A₄₁₀ 增加 0.1 所需的酶量。考马斯亮蓝法测定蛋白含量, 计算比酶活。

1.2.6 游动孢子的诱发与计数: 接种贵阳腐霉于 KPYG₂ 培养基上培养 7 d 后, 30 mL 灭菌蒸馏水中放入直径 15 mm 的 2 个菌丝块, 25 °C 静置 24 h, 轻摇烧瓶, 取 50 μL 液体并加入 10 μL 棉蓝染液, 混匀, 放置 10–15 min。显微镜下计数游动孢子^[2]。

1.2.7 生物测定—灭蚊实验: 贵阳腐霉接种于 KPYG₂ 培养 7 d 后。取塑料杯, 盛入 100 mL 水, 加入 25 只二龄致倦库蚊幼虫和直径为 15 mm 的 2 块菌丝块, 加入 6 滴 4% 兔肝粉悬液。设空白对照。每天观察一次, 取出死亡幼虫镜检, 体内有菌丝者即为感染幼虫; 无菌丝者保湿培养 24 h 再镜检, 如有菌丝亦为感染。连续观察 10 d^[2]。

1.2.8 感染蚊虫酚氧化酶的测定: 取贵阳腐霉转化株和野生株处理 5 d 的蚊幼虫各 20 只, 加入 pH 6.0 的磷酸盐缓冲液 1 mL, 冰上研磨。4 °C、12 000 r/min 多次离心, 最终所得澄清液即为蚊虫粗酶液。酚氧化酶活性测定: 取粗提液 100 μL, 再加入 0.01 mol/L 反应底物 L-DOPA 100 μL。一个酶活单位定义为室温下每分钟每毫克总蛋白的 A₄₉₀ 改变 0.001 所需的酶量。考马斯亮蓝法测定蛋白含量, 计算比酶活^[13]。

1.3 统计学处理

实验数据经 SPSS 11.5 电脑统计软件分析处理。

2 结果

2.1 Pr1 组成性表达载体 pCambia-hph-Pr1 的构建与酶切验证

按方法 1.2.1 扩增贵阳腐霉 Pr1 基因片段, 获

得大小约 1 100 bp 的片段, 与预期片段大小一致。测序结果经 BLAST 比对与贵阳腐霉 Pr1 已知序列相同。按方法 1.2.2 构建了以潮霉素抗性基因 hph 为筛选标记, 将目的基因 Pr1 置于真菌组成性启动子 Pgpda 之下, 构建了表达载体 pCambia-hph-Pr1 (图 1)。用 BamH I 酶切 pCambia-hph-Pr1 进行验证, 切下大小分别约为 16.3 kb 和 2.8 kb 的条带(图 2), 与载体酶切位点和预期片段大小相符。将该载体导入根癌农杆菌 LBA4404 菌株中, 用于贵阳腐霉的遗传转化。

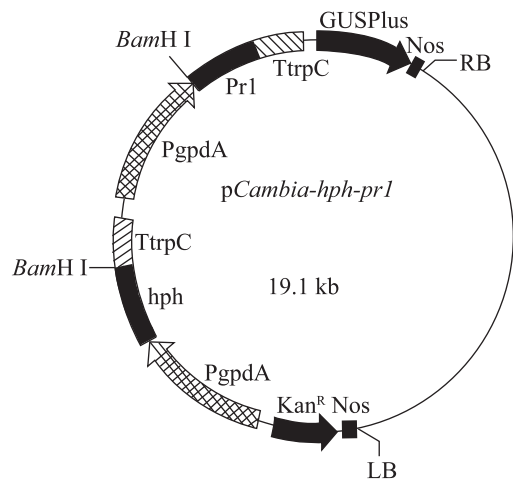


图 1 pCambia-hph-Pr1 载体结构示意图

Fig. 1 Diagram of the pCambia-hph-Pr1 vector

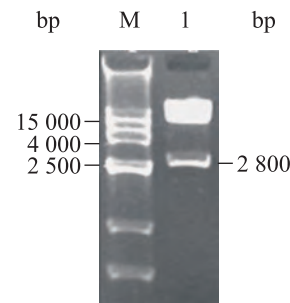


图 2 酶切重组质粒 pCambia-hph-pr1

Fig. 2 The restriction map of the vector pCambia-hph-pr1 digested by BamH I

注: M: DNA 分子量标准; 1: BamH I 酶切 pCambia-hph-pr1 酶切产物。

Note: M: Marker wind rang marker 500–15 000; 1: The product of pCambia-hph-pr1 digested by BamH I .

2.2 贵阳腐霉转化株的获得及鉴定

按 1.2.3 方法,在选择培养基上培养 2-3 d,可见贵阳腐霉菌丝生长。随机挑取这些潮霉素抗性菌丝转接至新的含有 200 mg/L 潮霉素 B 的选择培养基上时,正常生长的菌丝体初步确定为转化子。提取抗性菌株基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,潮霉素抗性基因设计的引物进行 PCR 检测,电泳如图 3 显示,贵阳腐霉野生型菌株没有扩增到特异性条带,而抗性菌株均扩增到约 780 bp 的目的条带。

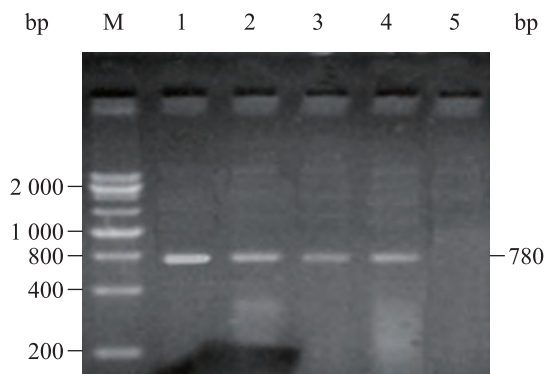


图 3 PCR 扩增潮霉素抗性基因 *hph* 验证转化子
Fig. 3 PCR analysis by amplifying *hph* gene of transformant

注: M: DNA 分子量标准; 1: 质粒 p*Cambia-hph-Pr1*; 2、3、4: 转化株; 5: 野生株。

Note: M: 200 bp DNA ladder; 1: Plasmid p*Cambia-hph-Pr1*; 2, 3, 4: Transformants; 5: Wild-type strain.

2.3 贵阳腐霉转化株的稳定性检测

将转化子在不含潮霉素 B 的 KPYG₂ 培养基上培养,连续转接 10 代,然后再接种到含有不同浓度潮霉素的培养基上培养,测量 72 h 后菌落直径^[14]。贵阳腐霉野生株生长随着潮霉素 B 浓度的增高受到抑制,当潮霉素 B 浓度达到 150 mg/L 时,生长完全受到抑制。贵阳腐霉转化株的生长情况与潮霉素 B 浓度无相关性,与野生株在非选择培养基上的生长状况无明显差别(表 1),表明转化子是可以稳定遗传的。

表 1 贵阳腐霉野生株与转化株对不同浓度潮霉素 B 处理下菌落生长直径
Table 1 Colony diameters of wild-type stain and transformant on agar plates with different concentrations of hygromycin B

潮霉素 B 浓度 Concentration of hygromycin B (mg/L)	菌丝圈直径 Colony diameters (cm)	
	野生株 Wild-type stain	转化株 Transformant
	0	6.98±0.15a
50	4.82±0.09b	6.98±0.10
100	1.82±0.22c	6.95±0.04
150	0c	7.04±0.06
200	0c	6.94±0.07
300	0c	6.95±0.07

注: 同一列中带有不同字母的数据间的差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

Note: There is significant difference between data followed by different letters in the same array, $P < 0.05$.

2.4 转化株 Pr1 蛋白酶分析

在含蝉蜕的诱导培养基中,转化株的 Pr1 蛋白酶活性水平略高于野生株,但统计学分析无显著性差异。在含葡萄糖的基本盐培养基(非诱导培养基)中转化株产生的 Pr1 蛋白酶水平显著高于野生型菌株(表 2)。

表 2 诱导培养基中和基本盐培养基中贵阳腐霉野生株和转化株的 Pr1 蛋白酶活性
Table 2 Pr1 activity of wild-type stain and transformant in induction medium of cicada cuticle and in basic salt medium supplemented with 0.5% glucose

菌株 Strain	Pr1 蛋白酶比酶活 Pr1 activity [U/(mg·min)]	
	诱导培养基 Medium of cicada cuticle	基本盐培养基 Basic salt medium
	野生株 Wild-type stain	109.39±21.40
转化株 Transformant	141.95±12.31	104.58±13.07b

注: 同一列中带有不同字母的数据间的差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

Note: There is significant difference between data followed by different letters in the same array, $P < 0.05$.

2.5 贵阳腐霉转化株菌丝游动孢子产量

统计学分析表明野生株与转化株的游动孢子产量没有显著性差异(表 3)。

表 3 贵阳腐霉野生株与转化株的游动孢子产量
Table 3 Zoospore production of wild-type strain and transformant

菌株 Strain	游动孢子产量 Zoospore production ($\times 10^3/\text{mL}$)
野生株 Wild-type stain	2.43 \pm 0.25
转化株 Transformant	2.27 \pm 0.73

2.6 贵阳腐霉转化株灭蚊毒力检测

转化株的平均灭蚊效果比野生株灭蚊效果增强了近一倍, 达到约 33%, 其中最高能达到约 54.7%, 两者比较差异有显著性意义。对蚊幼虫化蛹率的统计分析表明, 转化株处理的幼虫化蛹率显著低于野生株和空白对照处理的幼虫(表 4)。死亡蚊幼虫镜检观察, 对照组死亡蚊幼虫尸体肿胀发白, 表面无菌丝生长。野生株处理组死亡蚊幼虫尸体弯曲, 94% 尸体表面有菌丝体生长。转化株处理组死亡蚊幼虫尸体明显黑化, 仅 5.4% 尸体表面可见菌丝体生长。

表 4 贵阳腐霉野生株与转化株杀虫活性和化蛹率
Table 4 Insecticidal activity and pupation rates of wild-type stain and transformant to *Culex quinquefasciatus* larvae

菌株 Strain	蚊幼虫死亡率 Mortality of mosquito larvae (%)	化蛹率 Pupation rates (%)
空白对照 Blank control	0.7 \pm 1.2a	98.52 \pm 1.22a
野生株 Wild-type stain	16.7 \pm 13.0b	94.82 \pm 0.95a
转化株 Transformant	32.9 \pm 19.2c	36.12 \pm 1.47b

注: 同一列中带有不同字母的数据间的差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

Note: There is significant difference between data followed by different letters in the same array, $P < 0.05$.

2.7 贵阳腐霉转化株对蚊幼虫体酚氧化酶活性的影响

贵阳腐霉野生株和转化株处理的蚊幼虫, 其酚氧化酶活性显著高于空白对照组, 而转化株处理的蚊幼虫酚氧化酶活性数据高于野生株, 但差异不显著(表 5)。

表 5 贵阳腐霉野生株和转化株处理蚊幼虫酚氧化酶活力
Table 5 Phenoloxidase activity of *Culex* larvae after being exposed to wild-type strain and transformant

菌株 Strain	酚氧化酶比酶活 Phenoloxidase activity [U/(mg·min)]
空白对照 Blank control	4.63 \pm 0.12a
野生株 Wild-type stain	8.90 \pm 0.15b
转化株 Transformant	10.48 \pm 0.46b

注: 带有不同字母的数据间的差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

Note: There is significant difference between data followed by different letters, $P < 0.05$.

3 讨论

本实验中获得了遗传稳定的贵阳腐霉转化株, 在非诱导培养基中产生 Pr1 蛋白酶活性显著高于野生株, 说明转入的 Pr1 蛋白酶基因在非诱导的条件下能够组成性的表达。而在蝉蜕诱导培养基中, 转化株的 Pr1 蛋白酶活性虽然在数据上要高于野生株, 但统计学分析表明这种差异不显著。这与方卫国研究球孢白僵菌组成性表达类枯草杆菌蛋白酶基因 *CDEP-1* 及几丁质酶基因 *Bbchit-1* 工程菌株的结果相似^[15]。这有待于采用实时荧光定量 PCR 或者 Western-Blotting 等方法进一步验证, 以检测在基本盐和诱导培养基的条件下, 贵阳腐霉野生型菌株和转化株 Pr1 基因转录 mRNA 或表达 Pr1 蛋白酶水平的差异。游动孢子是贵阳腐霉产生的侵染蚊幼虫的单细胞结构, 结果显示转入的 Pr1 基因并未影响贵阳腐霉的产

孢能力和生长能力。

2007年贵阳腐霉野生型菌株对致倦库蚊幼虫的生物测定显示,其感染率为 $23.7\% \pm 13.0\%$ ^[2],与最初分离时比较有显著降低。而目前,贵阳腐霉野生型菌株对致倦库蚊幼虫的感染率仅为 $16.7\% \pm 13.0\%$ 。在长期实验室人工传代培养的过程中,菌株毒力退化明显。因此我们期望采用菌株复壮、细胞工程和基因工程技术等技术以提高菌株的毒力。利用根癌农杆菌介导的Pr1基因在贵阳腐霉的遗传转化方法,获得的转化株处理的蚊幼虫死亡率明显提高。我们推测了以下几个原因:(1)在贵阳腐霉的野生型菌株,Pr1蛋白酶基因需要在昆虫体壁的诱导下才能表达,因此只有在游动孢子附着在昆虫体壁上时,分泌Pr1蛋白酶作用昆虫体壁局部。而转化株可组成性表达Pr1蛋白酶,在游动孢子附着前可能已表达Pr1蛋白酶,而游动孢子附着后也诱导Pr1蛋白酶的产生,使其更快速入侵并萌发生长,耗竭昆虫营养。(2)入侵后的转化株在昆虫血腔内仍然组成性表达Pr1蛋白酶,可能破坏寄主的正常生理活动,降低其免疫力。(3)St. Leger提出在感染昆虫晚期,当酚氧化酶水平明显降低的时候才在血淋巴中产生Pr1,显示出酚氧化酶具有抵抗Pr1的蛋白水解作用^[6]。在转化株处理蚊幼虫过程中,产生了更多的酚氧化酶,以抑制超表达的Pr1蛋白酶的水解作用,同时,酚氧化酶水平升高也导致了其氧化后醌水平的升高,引起蚊幼虫醌中毒。染病的蚊幼虫,取食量下降,生长速度明显减缓,最终死亡。转化株处理的蚊幼虫的酚氧化酶活性数值虽然高于野生株处理组,但是差异不显著,这与St. Leger的结果不一致。可能是由于St. Leger采用直接注射Pr1蛋白酶,且烟草天蛾幼虫体积大,易于获取足量的血淋巴用于检测,而蚊幼虫(孑孓)体积小,难以获得足够测试数量的血淋巴。因而我们采用孑孓的整体研磨液,得到的

粗酶液里包含了血浆、血细胞、表皮和组织中的PO,因此检测的是总PO活性。这也可能是导致贵阳腐霉无论野生型抑或转化菌株对蚊幼虫的杀灭效率偏低的原因。

参 考 文 献

- [1] Su XQ. A new species of *Pythium* isolated from mosquito larvae and its ITS region of rDNA[J]. *Mycosystema*, 2006, 25(4): 523-528.
- [2] Huang SW, Su XQ. Biological studies on *Pythium guiyangense*, a fungal pathogen of mosquito larvae[J]. *Mycosystema*, 2007, 26(3): 380-388.
- [3] 刘萍, 苏晓庆. 灭蚊真菌贵阳腐霉 *Pythium guiyangense* 对大鼠的长期安全性测试[J]. 菌物学报, 2007, 26(3): 440-447.
- [4] 刘萍, 苏晓庆. 灭蚊真菌贵阳腐霉对几种动物的急性安全性测试[J]. 贵阳医学院学报, 2007, 32(4): 331-336.
- [5] St Leger RJ. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1995, 73(Suppl 1): 1119-1125.
- [6] St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(13): 6349-6354.
- [7] 杨平, 李敏惠, 苏晓庆. *Pythium* sp. GY1938 菌株类枯草菌素蛋白酶Pr1基因的克隆与序列分析[J]. 成都医学院学报, 2006, 1(1): 5-8.
- [8] Zhao JN, Su XQ. The genetic transformation of *Pythium guiyangense* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Mycosystema*, 2008, 27(4): 594-600.
- [9] 刘少华, 陆金萍, 朱瑞良, 等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组DNA提取方法[J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 362-365.
- [10] 张边江, 陈全战. 质粒导入不同种农杆菌冻融法的探讨[J]. 湖北农业科学, 2007, 46(3): 329-331.
- [11] 龙朝钦, 邓军, 郝飞, 等. 根癌农杆菌介导的烟

- 曲霉转化条件的优化[J]. 西部医学, 2008, 20(2): 261-264.
- [12] St Leger R J, Bidochka MJ, Roberts DW. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1994, 313(1): 1-7.
- [13] 王建国, 陆宏达. 酚氧化酶活力测定方法中关于测定时间的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(6): 765-770.
- [14] 高兴喜, 杨谦. 根癌农杆菌介导的 Cry I A(b)基因在哈茨木霉菌中的转化[J]. 科学通报, 2004, 49(21): 2193-2197.
- [15] Fang WG, Feng J, Fan YH, et al. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(2): 155-159.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2012-00-00; 接受日期: 2012-00-00

(下转 p.780)