



鹿儿岛被毛孢分生孢子胞外黏液蛋白提取与鉴定

段林¹ 邹晓¹ 瞿娇娇^{*2}

1 贵州大学生命科学学院真菌资源研究所 贵州 贵阳 550025

2 贵州大学茶学院 贵州 贵阳 550025

摘要:【背景】分生孢子表层黏液在虫生真菌与昆虫的互作中扮演着重要角色。鹿儿岛被毛孢是寄主专一、孢子表面具黏液层的虫生真菌，但其胞外黏液成分尚不清楚。【目的】优化鹿儿岛被毛孢分生孢子黏液蛋白的提取方法，对黏液蛋白组分进行质谱鉴定，探究分生孢子胞外黏液的蛋白成分。

【方法】用低浓度还原剂二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)对胞外黏液进行温和洗脱并优化提取条件，聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)检测蛋白提取浓度，用碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色法检测孢子细胞膜选择通透性，通过肽段酶解、LC-MS/MS 数据采集及蛋白质比对分析鉴定蛋白质。【结果】鹿儿岛被毛孢分生孢子黏液蛋白的最佳提取条件：孢子浓度为 5×10^7 cells/mL，DTT 浓度为 2 mmol/L，4 °C 提取 24 h；黏液蛋白提取后不影响孢子细胞膜通透性。提取的黏液蛋白共鉴定到蛋白质 77 个，蛋白丰度排前 10 的蛋白多为分泌性小分子蛋白，包括未注释的蛋白、几丁质酶、脂酶或是与昆虫体壁降解相关的酶类。【结论】鹿儿岛被毛孢胞外黏液中富含与寄主识别、穿透相关的蛋白质，与被毛孢的黏附、识别功能密切相关。

关键词：鹿儿岛被毛孢，胞外黏液蛋白，温和洗脱法，附着性

Extraction and identification of extracellular mucilage proteins from the conidia of *Hirsutella satumaensis*

DUAN Lin¹ ZOU Xiao¹ QU Jiaojiao^{*2}

1 Institute of Fungal Resources, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

2 College of Tea Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: [Background] The surface mucilage layer of conidia plays an important role in the interaction between insects and fungi. *Hirsutella satumaensis* is a host-specific entomopathogenic fungus, and its conidia are covered with a mucilage layer. However, the composition of the mucilage remains unclear. [Objective] The extraction method of mucilage proteins from the conidia of *H. satumaensis* was optimized, and the extracted proteins were identified by mass spectrometry. [Methods] The extracellular

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31860037, 32060038); Science and Technology Project of Guizhou Province (Qiankehe Foundation [2021]080, Qiankehe Foundation [2020]1Z009, Qiankehe Support [2019]2405); Talent Introduction Fund of Guizhou University ([2019]10)

*Corresponding author: E-mail: jjqu@gzu.edu.cn

Received: 30-03-2021; Accepted: 08-06-2021; Published online: 30-06-2021

基金项目：国家自然科学基金(31860037, 32060038); 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2021]080, 黔科合基础[2020]1Z009, 黔科合支撑[2019]2405号); 贵州大学引进人才基金([2019]10)

*通信作者: E-mail: jjqu@gzu.edu.cn

收稿日期: 2021-03-30; 接受日期: 2021-06-08; 网络首发日期: 2021-06-30

mucilage was eluted with a low concentration of dithiothreitol (DTT) and the extraction conditions were optimized. We used sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to determine the extracted proteins concentrations and propidium iodide (PI) to detect the permeability of conidial membrane. Finally, the proteins from extracellular mucilage were identified by peptide enzymatic hydrolysis, LC-MS/MS, and protein comparative analysis. **[Results]** The optimized extraction condition was as follows: extraction of the conidia at a concentration of 5×10^7 cells/mL with 2 mmol/L DTT at 4 °C for 24 h, and the cell membrane integrity was not affected after extraction. Seventy-seven proteins were identified from the extracellular mucilage of *H. satumaensis* conidia, most of which were small molecular secretory proteins, including unannotated proteins, chitinase, lipase, and other insect cuticle-degrading enzymes. **[Conclusion]** The extracellular mucilage of *H. satumaensis* has rich proteins involved in host recognition and penetration, which is associated with adhesion and recognition of the host insect.

Keywords: *Hirsutella satumaensis*, extracellular mucilage protein, mild elution, adhesion

虫生真菌可以有效控制农林害虫的种群数量, 已被研发作为具有高效性、高度特异性且对环境友好的生物农药, 在农林生产中起到了很好的害虫防治作用^[1]。被毛孢属(*Hirsutella* Pat., 1892)真菌是一类窄谱、专性和全球性分布的节肢动物和线虫病原真菌^[2], 同时也是线虫草科(*Ophiocordycipitaceae* Sung.)真菌的无性阶段, 然而虫草是亚洲很多国家传统的药食两用真菌, 因此该类真菌资源在控制节肢动物种群、维持生态系统平衡, 以及医药、生物活性物质开发方面有重要价值^[3-5]。被毛孢尽管在生长速率和产孢率等方面与白僵菌等广谱虫生真菌有较大差距, 但该类真菌仍能在自然环境中广泛分布并引起昆虫种群流行病, 其环境适应能力和对寄主的识别及侵染机理可能存在一定的特异性, 在生物防治上也存在独到优势。

被毛孢属的大多数种具有寄主专一性, 孢子较大且产孢量较少, 孢子表面一般附着明显黏液层等特点^[6]。真菌黏液在植物寄生菌中较为常见, 多数与寄主的黏着、吸引过程有关^[7-10], 但目前虫生真菌中有关孢子黏液的研究较少。被毛孢属多数种的分生孢子都具有明显黏液层, Loughheed 等^[11]最早报道了被毛孢的一个种在液体培养基中产生类似多糖的黏性物质, 能有效黏附昆虫, 但对其成分和功能没有做进一步研究。洛斯里被毛孢(*H. rhossiliensis* Minter & Brady)的

分生孢子黏液层具有黏附作用, 当自由活动的线虫经过时, 黏性孢子能黏附于线虫体表, 能有效提高感染效率^[12]。鹿儿岛被毛孢(*H. satumaensis* Aoki)分生孢子的黏液层类似于植物种子的“包衣层”, 有利于孢子应对环境中高温、低温、高渗透压、紫外线照射等不利条件, 具有提高孢子环境适应力的生态学功能^[5]。

虫生真菌细胞表面蛋白(Cell Surface-Associated Protein, CSAP)是细胞壁重要组成成分之一, 易与外界环境和寄主组织发生直接相互作用, 具有重要的生物学功能^[13]。对虫生真菌分生孢子细胞表面相关蛋白的提取和鉴定是对其功能进行解析的重要步骤。真菌细胞表面蛋白可以采用阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)和还原剂二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)进行提取, 而且不影响细胞壁的完整性^[14-15]。细胞表面蛋白之间通过二硫键相连接, 还原剂 DTT 能够破坏这些蛋白之间的二硫键, 从而使蛋白自细胞表面释放^[13]。SDS 的头基可以通过静电吸引与蛋白质的阳离子基团结合, 而烃尾可以通过疏水吸引与蛋白质的疏水斑块结合, 从而促进蛋白质的解折叠和展开^[16-17]。蒋洪岩等^[18]采用 DTT 提取了球孢白僵菌细胞表面蛋白, 优化了细胞表面蛋白的提取条件, 表面蛋白提取后明显改变了细胞表面的碳源表位。Yang 等^[13]为了表征球孢白僵菌细胞表面蛋白的特性, 用 DTT 自活的分生孢子、芽

孢子和菌丝体中释放出蛋白质,并用无标记定量质谱法进行鉴定和定量,功能分析表明其 CSAP 与细胞壁合成、毒力和与寄主互作等过程相关。

前期研究显示,鹿儿岛被毛孢孢子的胞外黏液在维持孢子表面疏水性、增强孢子黏附力、孢子对极端环境的耐受性,以及对寄主的致病性等方面发挥积极作用^[5],对其成分与功能的进一步解析将有助于对鹿儿岛被毛孢致病机理的理解及后期在虫害防治方面的应用。因此本文以鹿儿岛被毛孢的孢子胞外黏液为研究对象,对黏液蛋白进行提取、检测和鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

鹿儿岛被毛孢(*H. satumaensis*)野生菌株 Hir201012JC,由贵州大学真菌资源研究所采集、分离、鉴定并保存。

1/4 SDY 液体培养基参照文献[19]配制;PDA 培养基参照文献[20]配制。

1.2 主要试剂和仪器

十二烷基硫酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT),生工生物工程(上海)股份有限公司;PI 染料, Sigma 公司;BCA 试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司。

高速冷冻离心机, Beckman Coulter 公司;激光共聚焦显微镜, Olympus 公司;蛋白 PowerPac Universal 电泳仪、垂直电泳槽, Bio-Rad 公司;Imagemaster UDSCL 型凝胶成像仪, Pharmacia 公司。

1.3 鹿儿岛被毛孢分生孢子的制备

接种鹿儿岛被毛孢分生孢子悬液(1×10^6 cells/mL)至 1/4 SDY 液体培养基中, 26 °C、200 r/min 培养 5 d 至细密的菌丝球长出。将菌丝球接种于表面被覆玻璃纸的 PDA 培养基,于 22 °C、光照 12 h/黑暗 12 h 条件下培养 7 d。将玻璃纸上的菌丝放置于 PDA 培养基上诱导培养 5 d 后收集气生菌丝,加入 0.05%吐温-80 溶液,充分涡旋后用 4 层擦镜纸过滤收集分生孢子,用血球计数板对其进行

计数(1×10^7 cells/mL),用于各组分生孢子黏液蛋白的提取。

1.4 分生孢子黏液蛋白提取

参考蒋洪岩等^[18]的提取方法,略有改动。3种提取剂分别为 DTT、SDS 和混合组(DTT+SDS)。用磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS)调节已制备的分生孢子的浓度(5×10^7 cells/mL),调节体积至 10 mL,加入还原剂 DTT 至浓度为 2 mmol/L、0.5%表面活性剂 SDS 及混合组(2 mmol/L DTT+0.5% SDS),于 4 °C、100 r/min 培养不同时间(6、12、18、24、30、36 h)。

用脱氧胆酸钠和丙酮沉淀蛋白质,收集蛋白提取混合物,4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液于新离心管中,加入 20 mg/mL 脱氧胆酸钠至终浓度为 300 μ g/mL,混匀后于冰上放置 30–60 min,按 1:1 (体积比)加入预冷的丙酮,混匀后冰上沉淀过夜。然后于 4 °C、10 000 r/min 下离心 10 min。于通风橱中挥发丙酮,–80 °C 保存备用。

1.5 SDS-PAGE 检测提取蛋白

用 BCA 试剂盒测定粗提蛋白浓度后,参照高艳利等^[21]的方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)检测。

1.6 细胞膜选择通透性测定

为筛选合适的胞外蛋白提取时间,对不同提取时间后的分生孢子进行细胞膜选择通透性测定。同时为排除提取方法对分生孢子造成细胞损伤破坏,导致胞内蛋白对结果造成干扰,参照 Insenser 等^[22]方法,用碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色检测孢子的细胞膜通透性。阳性对照为 75%的酒精杀死的孢子,具体操作为:使用含有 75%的酒精-磷酸盐缓冲液(Ethanol-PBS, 0.1 mol/L pH 8.0)对孢子进行重悬,于 4 °C 下固定处理 5 min。取各条件下黏液提取后的孢子,4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 弃上清,用冰预冷的 PBS 溶液洗涤 3 次,最后重悬于 500 μ L PBS 中,加入 PI 染液 5 μ L,26 °C 避光处理 30 min,

PBS 工作液清洗 3 遍, 用 200 μL PBS 重悬分生孢子, 制片于荧光共聚焦显微镜下镜检。

1.7 蛋白条带的质谱鉴定

提取出的黏液蛋白凝胶条带由上海中科新生命生物科技有限公司采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 进行测定。通过肽段酶解、LC-MS/MS 数据采集及蛋白质比对分析鉴定。

2 结果与分析

2.1 分生孢子黏液蛋白提取方法的筛选

2.1.1 不同提取剂对黏液蛋白提取的效果

蛋白浓度测定表明, 3 种不同提取剂的蛋白提取效果一致, 最高浓度均可达到 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 混合提取组的蛋白含量与 SDS 或 DTT 单一处理没有明显差异(表 1)。由于 3 种提取剂的蛋白提取效果一致, 而且孢子提取均在低温(4 $^{\circ}\text{C}$)条件下进行, 而 SDS 在此条件下不溶于水, 析出的固体颗粒极大地影响孢子重悬效果, 也影响对孢子的观察, 因此选用还原剂 DTT 进行提取。

2.1.2 DTT 浓度对黏液蛋白提取的影响

对还原剂 DTT 的提取浓度进行优化。分生孢子在不同 DTT 浓度下提取的黏液蛋白量检测结果如图 1 所示。结果表明 DTT 浓度为 2 mmol/L 和 4 mmol/L 时提取的分生孢子黏液蛋白量差异不显著, 但明显高于用 1 mmol/L DTT 提取的蛋白量 ($P < 0.05$)。因此, 选用 2 mmol/L DTT 为适宜的提取剂浓度。

2.1.3 DTT 提取时间对黏液蛋白提取的影响

对提取时间进行优化, 提取时间设为 6、12、18、24、30、36 h。鹿儿岛被毛孢分生孢子在 DTT 不同浓度和提取时间下提取的黏液蛋白量检

表 1 不同提取剂对孢子黏液蛋白的提取浓度

Table 1 The concentration of conidia mucilage protein with different extraction agents

提取剂	蛋白浓度
Extraction agent	Protein concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
2 mmol/L DTT	37.157 9
0.5% SDS	34.239 6
2 mmol/L DDT+0.5% SDS	38.777 8

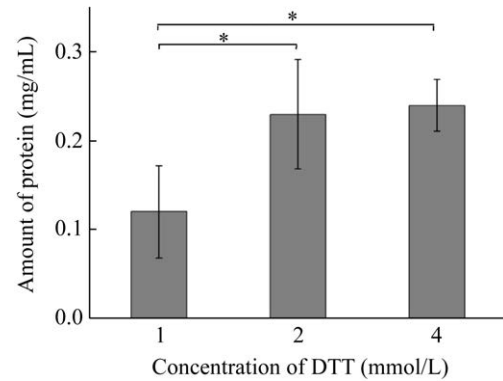


图 1 不同浓度 DTT 提取胞外黏液的蛋白量

Figure 1 The amount of mucilage proteins from *Hirsutella satumaensis* conidia released by different concentration of DTT

Note: *: $P < 0.05$

测结果如图 2A 所示。结果表明, 提取时间大于 18 h 时提取的黏液蛋白量明显高于 6 h 和 12 h; 24 h 后随提取时间的增加黏液蛋白量并没有明显的增加。其中 DTT 浓度 2 mmol/L 和 4 mmol/L 在提取时间为 24 h 时蛋白总量一致且提取量趋于稳定。另外, 为检测提取蛋白的种类多样性, 将孢悬液的提取体积增加至 100 mL, 并对提取不同时间后的黏液蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。电泳结果表明, 黏液提取蛋白均为小分子蛋白 (<40 kD), 提取时间会影响部分蛋白的丰度, 如 12 h 和 24 h 所提取的黏液蛋白种类均多于 6 h (图 2B)。综合黏液蛋白定量结果, 设定 DTT 提取时间为 24 h, 浓度为 2 mmol/L。

2.2 黏液蛋白提取后分生孢子细胞膜通透性检测

由于还原剂及提取时产生的机械力会对分生孢子的细胞产生损害, 因此黏液蛋白提取时间过长可能会破坏细胞膜通透性导致胞内蛋白的释放, 从而对实验结果产生干扰, 因此应对孢子黏液蛋白提取前后孢子的细胞膜通透性进行测定, 以确定最佳的蛋白提取时间。PI 染色主要可对去极化的或已渗透化的细胞染色, 从而在激发光下发红色荧光, 而细胞完整性较好、细胞膜通透性未发生改变的细胞则不被染色或仅发出很弱的荧光。如图 3 所示, PI 染色测定孢子细胞膜通透性

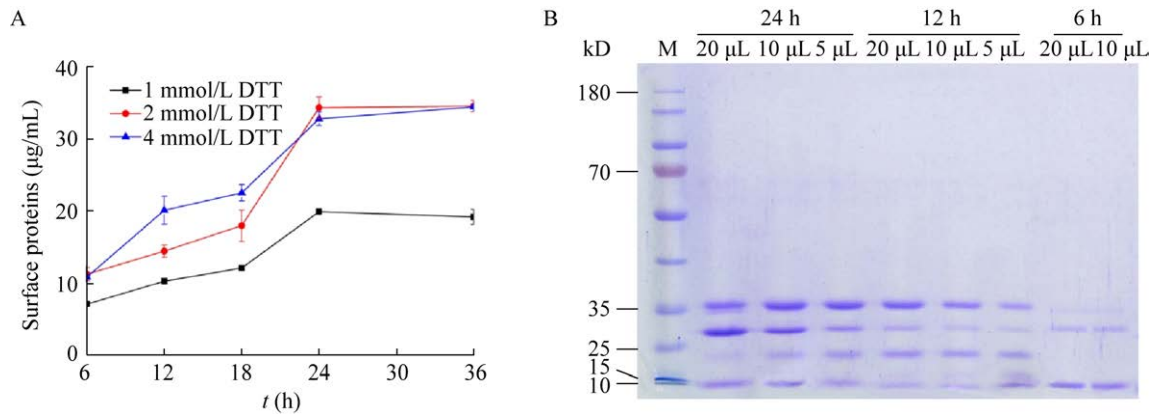


图 2 提取时间对胞外黏液蛋白提取效果的影响

Figure 2 Detection of mucilage proteins from *Hirsutella satumaensis* at different extraction time

注: A: 不同 DTT 浓度和不同提取时间对分生孢子黏液的蛋白总量提取的影响; B: SDS-PAGE 电泳检测 DTT 提取不同时间后分生孢子黏液蛋白质量, 各体积为蛋白不同的上样量。M: Prestained protein ladder 26616

Note: A: Effects of different DTT concentration and extraction time on total protein extraction of conidia mucus; B: Determination of extracted conidia mucilage protein by SDS-PAGE. Each electrophoresis lane is showed with different volumes of protein. M: Prestained protein ladder 26616

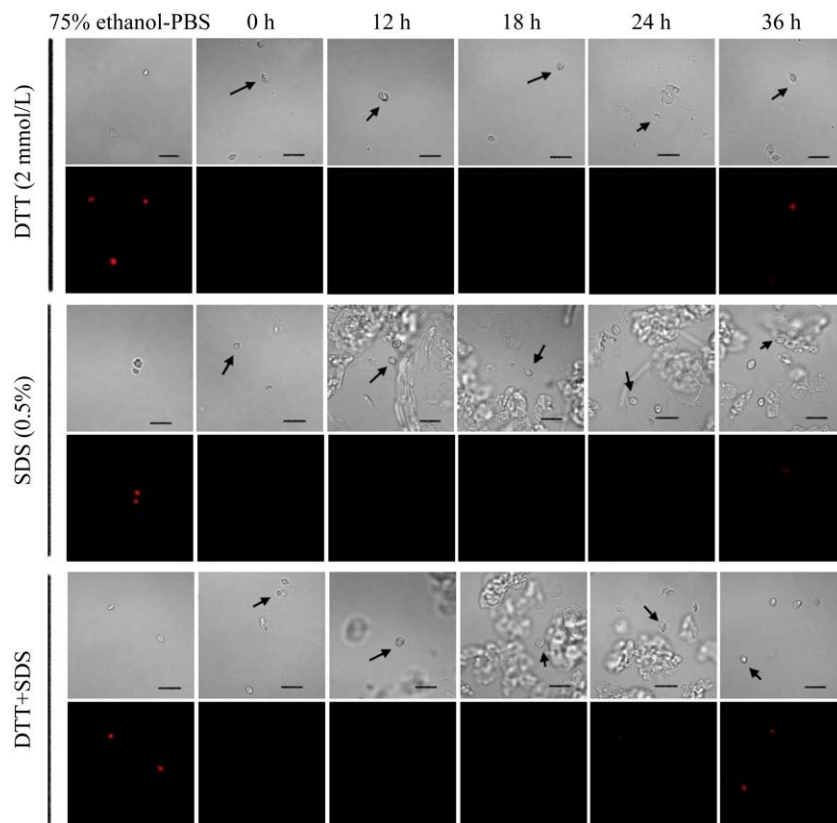


图 3 激光共聚焦显微镜观察 PI 染色的鹿儿岛被毛孢分生孢子

Figure 3 DIC and fluorescence images of PI staining profiles of *Hirsutella satumaensis* conidia

注: 分生孢子分别用 DTT、SDS 和 DTT+SDS 分别处理 0、12、18、24、36 h; 阳性对照使用 75% Ethanol-PBS 处理, Bars=10 µm

Note: Cells were released by DTT, SDS and DTT+SDS extraction for 0, 12, 18, 24 and 36 h, respectively. 75% ethanol-PBS treated conidia was as a control for dead cells, bars=10 µm

试验结果表明, 提取时间在 24 h 之内时, 99.9% 以上孢子的细胞膜选择通透性并未改变, 而 36 h 后的分生孢子有 30% 能被 PI 染色。由此表明, 提取时间在 24 h 前未涉及胞内蛋白的干扰; 而 36 h 后则有部分细胞膜通透性改变, 因此蛋白提取时间最好控制在 24 h 以内。

2.3 黏液蛋白的质谱鉴定

利用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)对提取获得的黏液蛋白进行鉴定, 共鉴定出蛋白质 77 个, 大多数蛋白质为小分子蛋白, 相对分子质量在 0–40 kD 之间。由于公共数据库中无鹿儿岛被毛孢基因组数据, 因此黏液蛋白的注释主要参考明尼苏达被毛孢 (*Hirsutella minnesotensis* 3608) 基因组。注释结果表明, 黏液提取蛋白丰度排前 10 位的多为分泌性小分子蛋白(表 2), 包括几丁质酶、脂酶等与昆虫体壁降解相关的酶, 还有一些未注释的蛋白。这说明黏液中多是与寄主识别、穿透相关的蛋白质, 与被毛孢分生孢子的黏附、识别功能相关。

3 讨论与结论

鹿儿岛被毛孢分生孢子的表面黏液与其环境适应能力及对寄主的黏附、识别关系密切。为了进一步研究黏液的成分与功能, 本文采用温和洗脱的方

法提取鹿儿岛被毛孢分生孢子胞外黏液并优化了提取条件, 结果表明鹿儿岛被毛孢分生孢子黏液蛋白的最优提取条件为: 孢子浓度为 5×10^7 cells/mL, 2 mmol/L 的 DTT, 4 °C 提取 24 h, 该提取效果与对白僵菌孢子表面蛋白提取的研究相似^[18], 也证明了这种对细胞表面蛋白提取方法的有效性。有研究表明, DTT 会破坏真菌细胞壁二硫键、导致甘露糖蛋白丢失而增加细胞壁的孔隙度^[14], 这可能是提取时间超过 36 h 后影响了细胞膜通透性的原因。

本文利用 LC-MS/MS 对黏液提取到的 4 个条带进行蛋白质谱鉴定, 结果显示为一些与降解昆虫体壁相关的功能性小分子蛋白, 可能在侵染寄主过程中起到黏附和穿透作用, 这进一步印证了被毛孢黏液这一特异形态结构在其致病过程中发挥着重要作用。黏液与白僵菌等广谱虫生真菌 CSAP 的组成及功能具有一定的相似性, 与真菌发育、黏附及与宿主组织的相互作用过程相关^[13]。在广谱类真菌绿僵菌的表面蛋白中包括大量降解酶^[23], 说明虫生真菌表面蛋白在穿透寄主体壁时起关键作用。另外, 与被毛孢属不同的是, 白僵菌、绿僵菌等会产生毒素迅速杀死宿主, 并在身体中腐生生长, 这种侵染机制可能是广谱类真菌

表 2 黏液提取蛋白条带的质谱鉴定结果

Table 2 Identification of protein bands extracted from mucilage by mass spectrometry

蛋白编号 Protein No.	登录号 Accession No.	蛋白得分 Protein score	蛋白质量 Protein mass	蛋白丰度 emPAI	蛋白描述 Protein description
1	gi 799246882	56	11 349	0.70	Hypothetical protein HIM_04811 (secretory pathway protein)
2	gi 799251155	27	27 877	0.50	Hypothetical protein HIM_00486
3	gi 799249948	22	13 838	0.48	Hypothetical protein HIM_02010
4	gi 799240436	52	46 520	0.45	Chitinase 1
5	gi 799245656	33	15 440	0.23	Esterases and lipases
6	gi 799246399	119	57 202	0.18	Hypothetical protein HIM_05392
7	gi 799247653	87	40 141	0.17	Cuticle-degrading protease
8	gi 799243972	77	40 095	0.17	3-isopropylmalate dehydrogenase
9	gi 799247114	41	19 460	0.17	ATP synthase subunit
10	gi 799249992	121	63 791	0.16	Hypothetical protein HIM_02054

Note: HIM: *Hirsutella minnesotensis* 3608

寄主范围较广的原因^[24]。研究还表明,球孢白僵菌表面含有疏水蛋白,这些蛋白质可能有利于分生孢子附着和对寄主的感染^[25]。细胞表面蛋白的黏附作用在细菌中也有体现,在提取牙鲈肠道乳杆菌、动物肠道嗜酸杆菌黏附蛋白后,可分别导致其菌体的分布离散和细菌表面变得粗糙^[26],表明黏附蛋白在细菌发育过程中也有重要作用。

本研究发现鹿儿岛被毛孢胞外黏液成分中含有多种黏附蛋白,说明黏液直接参与对寄主的初始黏附过程,黏液会影响孢子的黏附能力。但這些黏附蛋白参与黏附过程的机制还有待明确,如这些蛋白是孢子形成过程中分泌到孢子表面的,还是受寄主识别诱导产生的?黏液中包含有多种与寄主昆虫体壁降解相关的脂酶、几丁质酶,表明黏液可能参与对寄主体壁降解的穿透过程。黏液中还包含大量的未注释蛋白,这些蛋白的种类与功能有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Li ZZ. History, progress and current status of the application of fungi against pest insects in China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(5): 699-711 (in Chinese)
李增智. 我国利用真菌防治害虫的历史、进展及现状[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 699-711
- [2] Evans HC. Natural control of arthropods, with special reference to ants (*Formicidae*), by fungi in the tropical high forest of Ghana[J]. Journal of Applied Ecology, 1974, 11(1): 37-49
- [3] Simmons DR, Kepler RM, Rehner SA, Groden E. Phylogeny of *Hirsutella* species (*Ophiocordycipitaceae*) from the USA: remedying the paucity of *Hirsutella* sequence data[J]. IMA Fungus, 2015, 6(2): 345-356
- [4] Zou X, Liu AY, Liang ZQ, Han YF, Yang MF. *Hirsutella liboensis*, a new entomopathogenic species affecting *Cossidae* (*Lepidoptera*) in China[J]. Mycotaxon, 2010, 111(1): 39-44
- [5] Qu JJ, Zou X, Yu JP, Zhou YM. The conidial mucilage, natural film coatings, is involved in environmental adaptability and pathogenicity of *Hirsutella satumaensis* Aoki[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 1301
- [6] Ciancio A, Colagiero M, Rosso LC, Murga Gutierrez SN, Grasso G. Phylogeny and morphology of *Hirsutella tunicata* sp. nov. (*Ophiocordycipitaceae*), a novel mite parasite from Peru[J]. Mycoscience, 2013, 54(5): 378-386
- [7] Asiegbu FO. Adhesion and development of the root rot fungus (*Heterobasidion annosum*) on conifer tissues: effects of spore and host surface constituents[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 33(2): 101-110
- [8] Kershaw MJ, Basiewicz M, Soanes DM, Yan X, Ryder LS, Csukai M, Osés-Ruiz M, Valent B, Talbot NJ. Conidial morphogenesis and septin-mediated plant infection require Smo1, a ras GTPase-activating protein in *Magnaporthe oryzae*[J]. Genetics, 2019, 211(1): 151-167
- [9] Thürich J, Meichsner D, Furch ACU, Pfalz J, Krüger T, Kniemeyer O, Brakhage A, Oelmüller R. *Arabidopsis thaliana* responds to colonisation of *Piriformospora indica* by secretion of symbiosis-specific proteins[J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0209658
- [10] Wang CS, St Leger RJ. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants[J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(5): 808-816
- [11] Loughheed TC, MacLeod DM. Extracellular metabolic products of a *Hirsutella* species[J]. Nature, 1958, 182(4628): 114-115
- [12] Jaffee BA, Zehr EI. Parasitism of the Nematode *Criconebella xenoplax* by the fungus *Hirsutella rhossiliensis*[J]. Phytopathology, 1982, 72(10): 1378-1381
- [13] Yang Z, Jiang HY, Zhao X, Lu ZY, Luo ZB, Li XB, Zhao J, Zhang YJ. Correlation of cell surface proteins of distinct *Beauveria bassiana* cell types and adaption to varied environment and interaction with the host insect[J]. Fungal Genetics and Biology, 2017, 99: 13-25
- [14] Cappellaro C, Mrsa V, Tanner W. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(19): 5030-5037
- [15] De Nobel JG, Dijkers C, Hooijberg E, Klis FM. Increased cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA[J]. Microbiology, 1989, 135(7): 2077-2084
- [16] Mortensen HG, Otzen DE, Pedersen JS. Ubiquitin forms conventional decorated micelle structures with sodium dodecyl sulfate at saturation[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2021, 596: 233-244
- [17] Kelley D, McClements DJ. Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions[J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17(1): 73-85
- [18] Jiang HY, Song YL, Huang SS, He ZJ, Zhang YJ. Extraction of cell surface proteins from *Beauveria bassiana* and the effects on spore surface characteristics and virulence[A]//Proceedings of the 4th National Symposium on Microbial Resources and Operation Service of National Microbial Resources Platform[C]. Chengdu: Chinese Society for Microbiology, 2012:121-122 (in Chinese)
蒋洪岩, 宋雨林, 黄帅帅, 何张江, 张永军. 球孢白僵菌

- 细胞表面蛋白提取及其对孢子表面特性和毒力的影响[A]//第四届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会论文集[C]. 成都: 中国微生物学会, 2012: 121-122
- [19] Li WH, Wang ZK, Yin YP, Xia YX, Peng GX. Effect of physical and chemical factors on appressorium formation of *Beauveria bassiana*[J]. Journal of Chongqing University: Natural Science Edition, 2004, 27(2): 102-106 (in Chinese)
李文华, 王中康, 殷幼平, 夏玉先, 彭国雄. 理化因子对白僵菌附着胞形成的影响[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2004, 27(2): 102-106
- [20] Zou X, Zhou JX, Liang ZQ, Han YF. *Hirsutella shennongjiaensis*, a new entomopathogenic species infecting Earwig (*Dermaptera*)[J]. Mycosystema, 2016, 35(9): 1070-1079 (in Chinese)
邹晓, 周家喜, 梁宗琦, 韩燕峰. 寄生革翅目蠪螋的被毛孢一新种[J]. 菌物学报, 2016, 35(9): 1070-1079
- [21] Gao YL, Yang SW, Fan KQ, Chen J, Wang J. Development of SDS-PAGE in protein[J]. Liaoning Chemical Industry, 2007, 36(7): 460-463 (in Chinese)
高艳利, 杨思文, 樊凯奇, 陈静, 王娟. SDS-PAGE 电泳技术分析蛋白质的研究[J]. 辽宁化工, 2007, 36(7): 460-463
- [22] Insenser MR, Hernandez ML, Nombela C, Molina M, Molero G, Gil C. Gel and gel-free proteomics to identify *Saccharomyces cerevisiae* cell surface proteins[J]. Journal of Proteomics, 2010, 73(6): 1183-1195
- [23] Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang YJ, Xiao GH, Shang YF, Duan ZB, Hu X, Xie XQ, Zhou G, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*[J]. PLoS Genetics, 2011, 7(1): e1001264
- [24] Lovett B, St RL. The insect pathogens[J]. Microbiology Spectrum, 2017, 5(2): FUNK-0001-2016
- [25] Ying SH, Feng MG. A conidial protein (CP15) of *Beauveria bassiana* contributes to the conidial tolerance of the entomopathogenic fungus to thermal and oxidative stresses[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(5): 1711-1720
- [26] Wang L. The study of the surface adhesive proteins of the *Lactobacillus* sp. isolated from the intestine of *Paralichthys olivaceus*[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Normal University, 2005 (in Chinese)
王蕾. 牙鲆肠道乳杆菌新种(*Lactobacillus* sp.)表面黏附蛋白的研究[D]. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, 2005