

海芋凝集素的纯化及其对4种昆虫细胞的毒杀作用

潘科, 黄炳球, 侯学文*

(1. 华南农业大学资源环境学院, 广东广州510642; 2. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州510642)

摘要 通过离体昆虫细胞培养研究海芋凝集素(*Alocasia macrorrhiza* lectin, AML)的毒杀作用。采用MIT法研究了提取自海芋叶0~30%、叶30%~80%、块茎0~30%、块茎30%~80%盐析段海芋凝集素粗品对4种昆虫细胞[草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda* Smith)细胞(简称Sf-9细胞)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua* Hübner)细胞(简称Se301细胞)、粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni* Hübner)细胞(简称H5细胞)和美洲棉铃虫(*Heliothis zea* Boddie)细胞(简称Hz细胞)]的毒杀作用,结果表明,海芋叶、块茎上述盐析段的粗提物均对4种昆虫细胞有明显的毒杀作用,其中以块茎30%~80%的样品毒杀活力最高:在2%浓度处理24h条件下,上述4种细胞的相对死亡率分别为91.40%、91.62%、97.13%和82.30%。用Q Sepharose Fast Flow柱(2.6 cm×30 cm)对海芋块茎30%~80%的盐析物进行分离纯化,用最大活性峰样品对Sf-9细胞的毒杀作用进行研究,得到处理24h的毒力回归方程,LC₅₀为0.79%。

关键词 海芋凝集素;昆虫细胞培养;MIT法

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05484-02

Purification of a Lectin from *Alocasia macrorrhiza* and its Toxic Effect on Four Cultured Insect Cell Line

PAN Ke et al (College of Natural Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract The toxic effect of *Alocasia macrorrhiza* lectin (AML) on in vitro cultured insect cells was studied in this report. Four types of crude lectin were extracted and their toxic effects were tested with four insect cell lines which were Sf-9 from *Spodoptera frugiperda* Smith, Se301 from *Spodoptera exigua* Hübner, H5 from *Trichoplusia ni* Hübner, and Hz from *Heliothis zea* Boddie, respectively. With MIT method, the obvious toxic effect of AML on four tested insect cell lines was found, with the 30%~80% tuber extracts showed the strongest effect on above cells, and the relative cell death rates were 91.40%, 91.62%, 97.13% and 82.30% respectively, under 2% crude extracts concentration and 24 h treatment. This extract was further purified by Q Sepharose Fast Flow (2.6 cm×30 cm), and the highest activity peak was tested by Sf-9 cell. The toxicity regression equation under 24 h treatment was obtained, with the LC₅₀ value of 0.79%.

Key words *Alocasia macrorrhiza* lectin (AML); Insect cell culture; MIT method

海芋 [*Alocasia macrorrhiza* (L.) Schott] 为天南星科海芋属植物,据《土农药及生物防治》记载,海芋水提取物对防治稻苞虫、粘虫、稻飞虱、稻叶蝉效果良好,这表明海芋中含有有效的杀虫活性成分,但对其中的杀虫活性成分的属性尚未有明确的认识^[1]。侯学文等从海芋块茎中分离出海芋凝集素(*Alocasia macrorrhiza* lectin, AML),并发现海芋凝集素对肺腺癌细胞株P18具有较强的直接杀伤能力^[2]。同时大量资料证明,来源于植物的多种凝集素(GNA、WGA、ConA等)对昆虫均表现出明显的杀虫活性,并已在抗虫转基因植物中应用^[3-5]。海芋凝集素对豆蚜(*Aphis craccivora* Koch)的抗生作用表现为具有明显的忌避作用、蜜露分泌抑制作用、胃毒作用、生殖抑制作用、生长发育抑制作用等^[6]。Zhu等^[7]采用RACE-PCR(Rapid Amplification of cDNA Ends-Polymerase Chain Reaction, cDNA末端快速扩增-聚合酶链式反应)技术从海芋总RNA中克隆到海芋凝集素基因AML,并对它的性质进行了预测,为利用该凝集素基因获得抗虫转基因植物奠定了良好基础。但在应用该基因前,应充分了解它的杀虫谱、杀虫特点以及作用机理等。该研究就是为了探讨海芋凝集素是否对其他昆虫也具有杀虫活性,同时考虑到离体培养的昆虫细胞来源稳定可靠、批间差异小、测试时间较短、用药量少等优点,笔者选用4种鳞翅目昆虫细胞为测试对象,用MIT法测定海芋凝集素对它们的毒力,为今后海芋凝集素的抗虫试验、应用等提供依据。

1 材料与方

1.1 主要试剂与仪器 MIT{溴化[3-(4,5-二甲基 唑

2,5-二苯基四氮唑]}和SDS(十二烷基磺酸钠),Sigma公司产品;Grace's昆虫细胞培养基粉剂, Gibco BRL公司产品;Q Sepharose Fast Flow, Pharmacia Botech公司产品;3710型生化培养箱, Forma公司产品;倒置显微镜, Kogaku公司产品;3550型自动酶标分析仪, BIO RAD公司产品。

1.2 供试植物及昆虫细胞 海芋 [*Alocasia macrorrhiza* (L.) Schott]:采自华南农业大学昆虫毒理研究室杀虫植物标本园;草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda* Smith)细胞(简称Sf-9细胞)有梭形、圆形等,以圆形为主;甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua* Hübner)细胞(简称Se301细胞)以圆形为主;粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni* Hübner)细胞(简称H5细胞)有梭形、方形、纺锤形等,以圆形为主;美洲棉铃虫(*Heliothis zea* Boddie)细胞(简称Hz细胞)以圆形为主。培养时采用Gibco BRL公司的Grace's昆虫细胞培养基加10%胎牛血清、抗菌素(200万U的链霉素1支,100万U的青霉素2.5支,100万U的卡那霉素1支,使用时100 ml培养基加1 ml三抗母液),调pH值为6.8。

1.3 海芋凝集素的粗提及凝血活性检测方法 参考侯学文等^[2]的方法,采用生理盐水浸提、(NH₄)₂SO₄分段盐析法提取海芋凝集素粗品,并经透析除盐冷冻干燥,得海芋块茎或叶0~30%盐析段凝集素粗品(以下简称为块茎或叶0~30%段粗品)、海芋块茎或叶30%~80%盐析段凝集素粗品(以下简称为块茎或叶30%~80%段粗品),置于-18℃冰箱保存待用。海芋凝集素凝血活性检测采用兔红血球,具体方法见文献^[2]。

1.4 海芋凝集素的离子交换层析纯化 将海芋凝集素30%~80%粗品溶于PBS(pH值7.0, 0.001 ml/L),上样到经起始缓冲液平衡的Q Sepharose Fast Flow柱(2.6 cm×30.0 cm),用起始缓冲液洗脱至流出液在280 nm的OD值小于0.02为止。用0.001 ml/L PBS(0.1 ml/L NaCl)梯度洗脱,用自动收集器分步收集,流速为6滴/min,洗脱至流出液在280 nm的

基金项目 广东省自然科学基金项目(000643)。

作者简介 潘科(1978-),女,湖南桃源人,硕士,助理研究员,从事农业昆虫与害虫防治研究。* 通讯作者,副教授, E-mail: hxw1969@scau.edu.cn。

收稿日期 2007-02-09

OD 值小于0.02 为止。通过血凝活性检测收集活性峰,透析除盐,冷冻干燥后得到海芋凝集素的层析纯样品。

1.5 细胞毒力测定方法(MIT 法) 参考Siipanovic 等^[8]、张志祥等^[9]方法,在超净工作台上将96 孔板的第1 行、第1 列、及最后1 行、最后1 列作为保湿行列,将第2 列作为调零列,第3 列为对照列,其他列为处理列,每一处理设6 次重复。将保湿列及调零列的每孔各加100 μ l 细胞培养基,对照列及处理列每孔各加100 μ l 细胞悬浮液;(27 \pm 1) 培养箱中培养12 ~14 h 使细胞贴壁,然后将96 孔板翻转过来,弃去培养液。保湿列、调零列、对照列每孔各加100 μ l 培养基,处理列每孔各加100 μ l 药液在(27 \pm 1) 培养箱中培养24 h。除保湿列外,其余各列每孔均加10 μ l MIT 母液(5 ng/ml, Grace's 培养基配制),在(27 \pm 1) 培养箱中培养4 h 后将96 孔板翻转过来,弃去细胞液及培养基。除保湿列外,每孔加100 μ l 3% SDS 异丙醇溶液,室温下放置30 min,待蓝色晶体formazan 完全溶解。用自动酶标仪测定570 nm 下各孔 OD 值。根据下式计算细胞死亡率和细胞相对死亡率。

$$\text{细胞死亡率}(\%) = 1 - \frac{\text{处理孔处理 OD 值}}{\text{对照孔平均值}} \times 100$$

$$\text{细胞相对死亡率}(\%) = \frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{100 - \text{对照死亡率}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 海芋凝集素粗品的提取结果 对海芋叶、块茎进行海芋凝集素的分段盐析提取,结果发现两种组织中的两个分段提取物均具有凝血活性。凝血活性检测表明,在1 ng/ml 的蛋白浓度下,海芋叶0 ~30%、30% ~80%、块茎0 ~30%、30% ~80% 的盐析物的凝血滴度依次为 2^5 、 2^6 、 2^6 、 2^8 ,这一结果表明海芋凝集素主要分布在海芋块茎30% ~80% 的盐析段中。

2.2 不同部位海芋凝集素粗品对4 种昆虫细胞的毒力 为了确定海芋提取物中对昆虫细胞的毒性成分,用MIT 法测定了2.0% 不同海芋粗提物处理24 h 对草地贪夜蛾Sf-9 细胞、甜菜夜蛾Se301 细胞、粉纹夜蛾H5 细胞、美洲棉铃虫Hz 细胞的毒杀效果,结果见表1。

表1 2.0%不同海芋凝集素粗品对4 种昆虫细胞系的毒杀效果

处理	细胞相对死亡率 %			
	Sf-9 细胞	Se301 细胞	H5 细胞	Hz 细胞
叶0 ~30% 段粗品	70.25 d	44.31 d	58.28 c	52.67 c
叶30% ~80% 段粗品	84.89 b	97.94 a	63.89 b	43.21 d
块茎0 ~30% 段粗品	80.55 b	88.39 c	97.59 a	68.45 b
块茎30% ~80% 段粗品	91.40 a	91.62 b	97.13 a	82.30 a

注:表中数据为5 次重复的平均值。表中同列数据后不同字母表示经DMRT 法检验在0.05 水平差异显著。下表同。

综合海芋不同部位及盐析段提取物粗品对Sf-9 细胞、Se301 细胞、H5 细胞及Hz 细胞毒杀作用的测定结果,可知块茎提取物粗品对4 种昆虫细胞的毒杀作用普遍强于叶提取物粗品,30% ~80% 段粗品对4 种昆虫细胞的毒杀作用强于0 ~30% 段粗品。结合“2.1”的结果,笔者认为海芋凝集素是主要的毒力成分。为了证实这一结论,笔者选用海芋块茎30% ~80% 段粗品进行纯化,得到海芋凝集素层析纯样品后再进行细胞毒力测定。

2.3 海芋凝集素的离子交换层析纯化 海芋块茎30% ~

80% 段粗品经Q Sepharose Fast Flow 柱分离后,经紫外- 可见分光光度计于280 nm 检测其蛋白质含量,得出其蛋白峰;经凝血活性检测得出其凝血活性峰(图1)。3 个大的蛋白峰均有较强的凝血活性,几个小峰无凝血活性。这说明在海芋块茎中凝集素的含量非常丰富,而且海芋凝集素的凝血活性也较强。3 个大峰完全分开,且均表现出较强的凝血活性,这说明在海芋块茎中可能存在着同功凝集素。第3 个蛋白峰的蛋白含量最高,凝血活性最强,滴度达 2^6 。因此,用第3 个蛋白峰对Sf-9 细胞系的毒力进行进一步的测试。

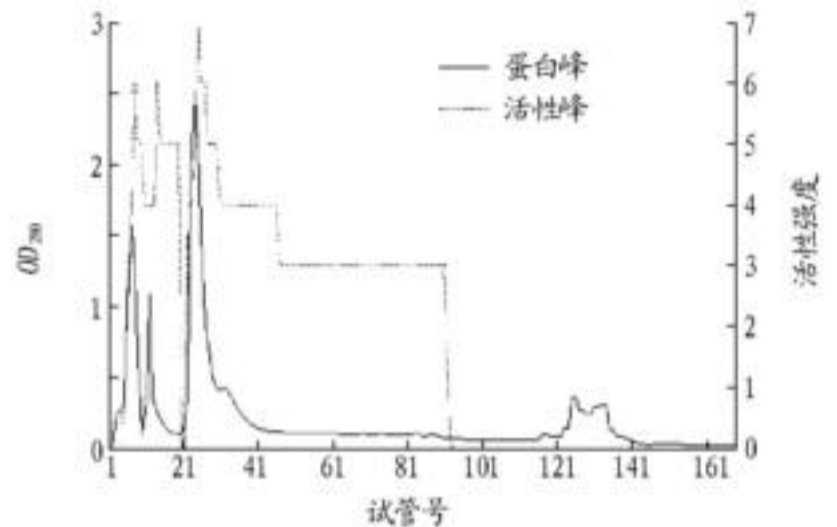


图1 海芋凝集素粗品经Q Sepharose Fast Flow 柱分离的蛋白峰与活性峰

2.4 海芋凝集素层析纯样品对Sf-9 细胞的毒力 用1.0% 海芋凝集素层析纯样品处理后,显微镜下观察Sf-9 细胞,发现细胞变圆,生长减慢,细胞少有增殖分裂;细胞膜边缘有褶皱,表面不光滑,透明度减少;且随着处理时间的延长,视野中细胞越来越少。照片显示(图2),1.0% 海芋凝集素层析纯样品处理24 h,视野中绝大多数细胞已经死亡消失;处理48 h,细胞的相对死亡率达到93.17%。2.0% 海芋层析纯样品处理Sf-9 细胞24 h,细胞的相对死亡率达到100%。

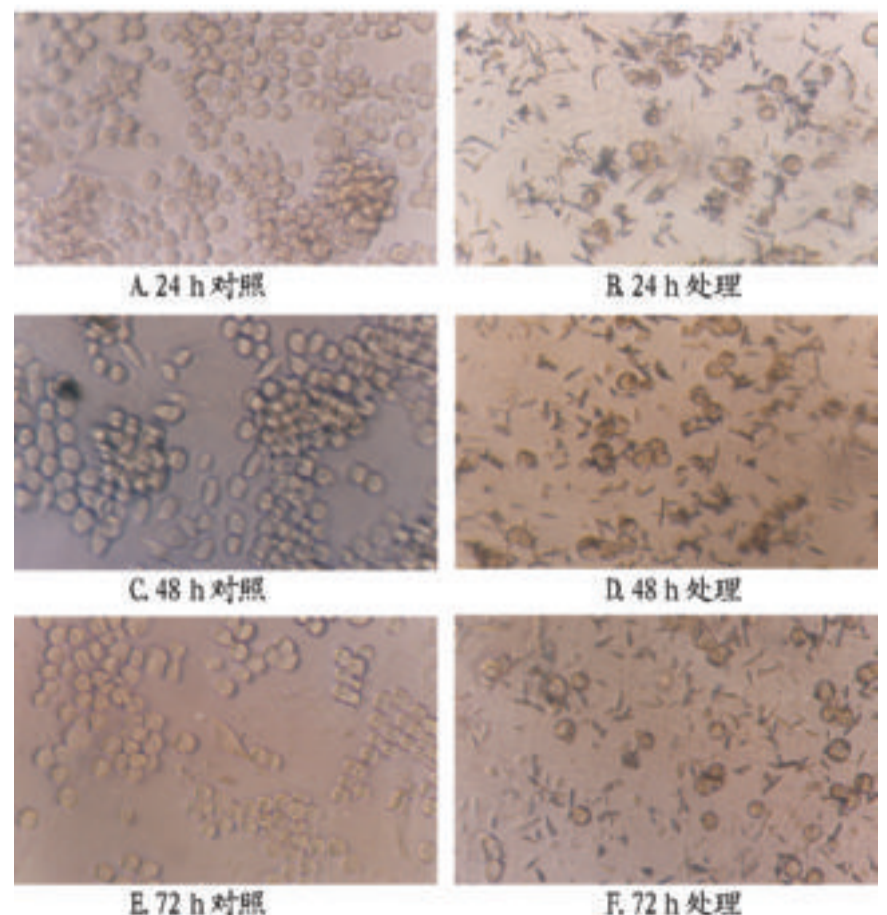


图2 1.0%海芋凝集素层析纯样品处理不同时间(24、48、72 h)对Sf-9 细胞的毒杀效果

5 种不同浓度的海芋凝集素层析纯样品24 h 对Sf-9 细

(下转第5495 页)

(上接第5485页)

胞系处理的试验结果见表2。根据试验结果,计算出海芋凝集素层析纯样品对Sf-9细胞的毒力回归方程为 $y = 2.5488 + 3.1128x$, 相关系数 r 为0.9673, 对草地贪夜蛾Sf-9细胞系的 LC_{50} 为0.79%。

表2 海芋凝集素层析纯样品对Sf-9细胞的毒杀作用(24 h)

处理	OD 值($\bar{x} \pm s$)	处理 OD 值- 本底 OD 值	细胞相对 死亡率 %
本底	0.074 0 \pm 0.003 0 d	-	-
对照 CK	0.348 8 \pm 0.012 0 a	0.274 8	-
2.0% AML	0.075 0 \pm 0.004 0 d	0.001 0	99.64 a
1.0% AML	0.148 0 \pm 0.008 0 c	0.074 0	73.07 b
0.4% AML	0.303 5 \pm 0.012 0 b	0.229 5	16.47 c
0.2% AML	0.305 4 \pm 0.014 0 b	0.231 4	15.78 c
0.1% AML	0.346 0 \pm 0.006 0 a	0.272 0	1.02 d

3 讨论与结论

昆虫细胞离体培养技术在1960年由Wyatt等建立,此后无论在昆虫细胞培养的理论与技术、昆虫培养细胞系的建立、培养昆虫细胞的利用等方面均取得了长足进展^[10]。杀虫活性物质的活体生物测定周期长,而且昆虫对药剂的敏感性受季节、温度、昆虫品系、测试条件等因素的影响,其测定结果往往会因时、因地、因人而异,使测定结果的直接比较具有一定的困难。昆虫细胞系传代稳定,测试操作可标准化,而且昆虫细胞培养周期短,一般5~7 d可传代一次,而且试验在96孔微量细胞培养板上进行,每孔体积在100~200 μ l,药剂消耗量极少。因此利用昆虫离体细胞进行杀虫活性物质的筛选相对于昆虫活体生测有一定的优势。已有一些学者报道,利用离体昆虫细胞培养进行有机磷、氨基甲酸酯类农药、天然活性物质如棉酚^[8]、茛菪素类似物^[9]等的毒力测试,取得了一些有意义的研究结果。在该研究中,笔者就用少量AML样品,进行了多次重复试验,获得了比较接近的试验结果(表1、2)。

但同时也有一些研究指出^[11],药物对离体昆虫细胞的作用主要表现为直接的毒杀作用,如果药物的作用机制是直接影响细胞的代谢能力的毒杀型的药剂类型,其生测结果就与细胞测定结果有比较高的吻合度;如果药物作用机制是通过神经、昆虫生长调节等非直接毒杀的作用方式,则选取有相应受体的细胞来进行测定,并用相应的指标来表示其结果,否则细胞测定结果就会与生物测定结果产生较大偏离。据以前的研究结果,海芋凝集素对肺腺癌细胞株P18具有较强的直接杀伤能力,表现为细胞破裂消失^[2],

说明海芋凝集素具有较强的细胞毒力。为研究海芋凝集素是否对昆虫细胞也具有毒杀效果,笔者选用4种昆虫细胞进行研究,试验结果表明,海芋凝集素对4种昆虫细胞也具有较强的毒力,处理24 h就使大部分的昆虫细胞破坏消失,说明海芋凝集素是一个比较有效的活性物质,值得进行多方面的深入研究,使其成为一个新的抗虫基因来源。

对分离的凝集素的抗虫活性研究,主要采用人工营养液或人工饲料夹毒的方式,如Powell^[12]、Sauvion等^[13]、毛雪等^[14]、黄大窠等^[15]均采用这种活体生测的方法研究了多种凝集素对数种昆虫的抗虫活性。但未见有报道利用昆虫细胞培养来研究植物凝集素的抗虫活性,因此该工作对今后的同类研究具有一定的借鉴意义。

参考文献

- [1] 全国供销合作总社农业生产资料局. 土农药及生物防治[M]. 北京: 化学工业出版社, 1979.
- [2] 侯学文, 吴伯良, 曾仲奎, 等. 海芋凝集素的理化性质鉴定[J]. 暨南大学学报, 1998, 19(3): 89-93.
- [3] NAGADHARA D, RAMESHS, PASALUI C, et al. Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (gna) exhibit high level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(7): 1399-1405.
- [4] GATEHOUSE A MR, DAMSON G M, STEWART J N, et al. Corranavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia cloracea*) and peach potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants [J]. Molecular Breeding, 1999, 5(2): 153-165.
- [5] KANRARS, VENKATESWARI J, KRISHNAN P B, et al. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) with resistance to the mustard aphid (*Lipaphis erysi* ni K<.) [J]. Hort Cell Reports, 2002, 20(10): 976-981.
- [6] 潘科, 侯学文, 黄炳球. 海芋凝集素对豆蚜的抗生作用研究[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(3): 51-54.
- [7] ZHU Y R, WANG J, HUANG B Q, et al. Molecular cloning of a lectin cDNA from *Alcoxia macrorhiza* and prediction of its characteristics [J]. J Hort Physiol & Mol Biol, 2006, 32(6): 634-642.
- [8] SII PANOM C R D, ELISSALDE M H, ALTMAN D W, et al. Cell culture bioassay to evaluate allelochemical toxicity to *Hibithis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 1990, 83(3): 737-741.
- [9] 张志祥, 徐汉虹, 程东美, 等. 利用MIT法以茛菪素类似物对昆虫细胞毒力筛选及测定[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(3): 29-32.
- [10] 宋德伟, 马艳, 冯颖, 等. 昆虫细胞工程研究进展[J]. 林业科学研究, 2004, 17(1): 116-124.
- [11] 郑丙莲, 杨红, 洪华珠, 等. 八种昆虫离体细胞系对灭多威农药的敏感性研究[J]. 生物技术通报, 2000(5): 30-32.
- [12] POWELL K S. Antinutritional effects of plant lectins towards nymphal stages of the planthoppers *Tarophagus proserpina* and *Nilaparvata lugens* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2001, 99(1): 71-77.
- [13] SAUMON N, RAHBÉ Y, PEUMANS W J, et al. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach potato aphid *Myzus persicae* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1996, 79(3): 285-293.
- [14] 毛雪, 高丽峰, 李彩霞, 等. 植物凝集素对蚜虫的抗生效应[J]. 山西农业大学学报, 1999, 19(2): 122-124.
- [15] 黄大窠, 潘映红, 张淑香, 等. 从掌叶半夏和半夏中发现对几种蚜虫有致死活性的蛋白[J]. 中国农业科学, 1997, 30(2): 94-96.