

## 褐飞虱类酵母共生菌菌体蛋白质提取方法的比较

张海强<sup>1,2</sup>, 陈建明<sup>2</sup>, 张珏锋<sup>2</sup>

(1. 杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036; 2. 浙江省植物有害生物防控重点实验室 省部共建国家重点实验室培育基地, 浙江省农业科学院 植物保护与微生物研究所, 浙江 杭州 310021)

**摘要:** 为了筛选出适合褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 类酵母共生菌蛋白质提取的细胞破碎方法, 选择超声波破碎法、反复冻融法和液氮研磨法等 3 种细胞破碎方法提取共生菌吡虫啉敏感菌株和抗性菌株蛋白质。结果表明: 菌体显微形态观察发现, 使用超声波破碎法和液氮研磨法处理类酵母共生菌的细胞破碎效果均优于反复冻融法, 处理后菌体分布均匀, 破碎彻底; 72 h 是提取菌体蛋白质的最佳培养时间。定量分析表明: 用超声波破碎法提取蛋白质质量浓度最高, 液氮研磨法次之, 反复冻融法提取蛋白质质量浓度的效果最差, 各方法所提蛋白质质量浓度差异显著 ( $P < 0.05$ )。培养 72 h 后, 超声波破碎法、液氮研磨法和反复冻融法提取的蛋白质质量浓度分别为  $2.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $2.62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (敏感菌株) 及  $2.64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $2.53 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (抗性菌株)。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分析发现: 超声波破碎法获得的蛋白质不仅得率高, 且条带清晰, 丰度好。液氮研磨法虽得率高, 但蛋白质部分降解, 条带不清晰; 而反复冻融法获得的蛋白质得率最低。超声波破碎法更适合于褐飞虱类酵母共生菌的蛋白质提取, 该研究为后续蛋白质的双向电泳实验和分离差异蛋白质提供技术支持。图 4 表 1 参 22

**关键词:** 植物保护学; 褐飞虱; 类酵母共生菌; 菌体蛋白质; 提取方法

中图分类号: S476

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2015)02-0173-08

## Extraction methods for mycoprotein, a yeast-like symbiote isolated from brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in rice

ZHANG Haiqiang<sup>1,2</sup>, CHEN Jianming<sup>2</sup>, ZHANG Juefeng<sup>2</sup>

(1. College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, Zhejiang, China; 2. State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China)

**Abstract:** To select the most suitable cell breaking method for protein extraction of the yeast-like symbiote (YLS) isolated from brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, three cell breaking methods: ultrasonication, repeated freeze-thaw, and liquid nitrogen grinding, were used to extract the mycoprotein of susceptible- and resistant-imidacloprid strains of YLS. Analysis was conducted by Duncan's new multiple range test (DMRT) and sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Results of observation using cell microscopic morphology showed that the breaking effect of the YLS cells treated with ultrasonication and liquid nitrogen grinding were greater than repeated freeze-thaw. After treatment, cells were uniformly distributed and thoroughly broken. Optimum culture time for mycoprotein extraction was 72 h. Protein concentration for the three methods was significantly different ( $f_0=8$ ,  $P < 0.05$ ) with ultrasonication highest, then liquid nitrogen grinding, and lastly repeated freeze-thaw. After being cultured for 72 h, protein concentrations for the susceptible strain were ultrasonication,  $2.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; liquid nitrogen grinding,  $2.62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; and repeated freeze-thaw,  $2.12$

收稿日期: 2014-06-14; 修回日期: 2014-09-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771411, 31272040); 浙江省自然科学基金资助项目(LY13C140008)

作者简介: 张海强, 从事褐飞虱抗药性机制研究。E-mail: zhqyuy112@163.com。通信作者: 陈建明, 研究员, 从事水稻害虫抗药性监测、抗性机制与抗性治理技术研究。E-mail: chenjm63@163.com

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; protein concentrations for the resistant strain were ultrasonication,  $2.64\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; liquid nitrogen grinding,  $2.53\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; and repeated freeze-thaw,  $2.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Electrophoresis showed that proteins extracted by ultrasonication had clear bands, greater abundance, and more protein; by liquid nitrogen grinding had partial protein degradation and unclear bands; and by repeated freeze-thaw had the least protein. Thus, the ultrasonication method was best for mycoprotein extraction of YLS from *N. lugens*, and in the future this will provide technical support for two dimensional electrophoresis protein experiments and separation of differential proteins. [Ch, 4 fig. 1 tab. 22 ref.]

**Key words:** plant protection; *Nilaparvata lugens*; yeast-like symbiote; mycoprotein; extraction method

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是中国水稻 *Oryza sativa* 的最重要害虫之一。药剂防治仍是控制该虫的主要手段。由于长期滥用吡虫啉等农药使褐飞虱产生抗药性, 造成褐飞虱再猖獗, 也带来稻谷的农药残留<sup>[1]</sup>。研究褐飞虱抗药性产生机制, 探索褐飞虱抗药性的延缓治理途径是中国水稻生产中亟待解决的重要课题。研究发现: 褐飞虱对吡虫啉的抗性机制与酯酶(羧酸酯酶)、谷胱甘肽-S-转移酶和细胞色素 P450 单加氧酶等解毒酶的解毒作用增强、乙酰胆碱受体敏感性下降等有关<sup>[2-3]</sup>。目前, 褐飞虱对吡虫啉产生抗药性, 特别是其快速产生高水平抗药性的分子机制仍不很清楚。褐飞虱腹部脂肪体内存在着大量的类酵母共生菌(yeast-like symbiotes, 简称 YLS), 这些共生菌在褐飞虱生长发育、繁殖和致害性变异过程中起着重要作用<sup>[4-9]</sup>。褐飞虱类酵母共生菌—解脂假丝酵母 *Candida lipolytica* 体内羧酸酯酶、多功能氧化酶、尿酸酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶等活性的提高与其抗吡虫啉水平有关<sup>[10-11]</sup>, 抗吡虫啉类酵母共生菌对吡虫啉农药有一定降解能力, 敏感种群的共生菌则无降解作用<sup>[12]</sup>。这些结果表明: 褐飞虱体内类酵母共生菌在褐飞虱对吡虫啉抗性发展中可能起重要作用, 但目前尚未分离鉴定到共生菌中与杀虫剂解毒/降解相关的基因, 因此, 共生菌在褐飞虱对吡虫啉产生抗药性中的分子机制尚不清楚。蛋白质组学(proteomics)和生物信息学(bioinformatics)技术的迅速发展为研究类酵母共生菌在褐飞虱抗药性产生中的分子机制提供了契机。蛋白质组学技术为揭示褐飞虱类酵母共生菌中杀虫剂解毒/降解相关的生理变化提供了有效手段。在酵母类真菌蛋白质组学研究中, 获取相关胞内蛋白质是首要问题。酵母类真菌细胞表面厚厚的细胞壁限制了其胞内蛋白质的提取。破碎真菌细胞的方法主要有超声波法、液氮研磨法、玻璃珠法<sup>[13]</sup>、玻璃棒研磨法<sup>[14]</sup>等或者几种方法结合使用的方法。本研究采用超声波破碎、反复冻融和液氮研磨等细胞破碎方法, 比较提取褐飞虱类酵母共生菌不同抗感菌株菌体蛋白质质量浓度与纯度, 选择出适合褐飞虱类酵母共生菌菌体蛋白质的提取方法, 为后续蛋白质的双向电泳实验和分离差异蛋白质提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验菌株 敏感菌株: 褐飞虱类酵母共生菌——解脂假丝酵母来源于浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所从褐飞虱体内分离纯化的菌株。该菌株没有接触过任何农药。抗性菌株: 敏感菌株在含  $2\ 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  吡虫啉培养基中连续培养 20 代获得的菌株。

1.1.2 培养基 采用综合马铃薯葡萄糖琼脂(CPDA)液体培养基。配方组成( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 磷酸氢二钾( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 2 g, 硫酸镁( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.5 g。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株种子液的培养 取活化后的斜面菌株 1 环, 接入 50 mL 液体培养基中,  $28\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  培养 24 h, 备用。

1.2.2 菌株培养和菌体收集 实验设置 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 h 共 8 个时间段, 取相应数量 250 mL 锥形瓶标记好, 加入液体培养基  $100\text{ mL}\cdot\text{锥形瓶}^{-1}$ 。分别取抗性菌株和敏感菌株种子菌液 0.1 mL 接种到对应的液体培养基中, 重复 3 次。 $28\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  黑暗培养, 取相应时间段的培养液,  $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 离心 10 min, 弃上清液, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2~3 次, 用离心管收集菌体,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。

1.2.3 菌体蛋白质提取 ①超声波破碎法。在装有 0.5 g 湿菌体的离心管中加入 5 mL 提取液[主要成分: 0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH 7.5 三羟甲基氨基甲烷(Tris-Cl), 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 氯化钠, 0.005 mol·L<sup>-1</sup> 二硫苏糖醇(DTT), 体积分数 20%的甘油, 5 mmol·L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸(EDTA), 1 mmol·L<sup>-1</sup> 苯甲基磺酰氟(PMSF)], 混匀菌体, 充分振荡后于冰上静置 2~3 min, 400 W, 15 min 超声波破碎菌体, 破碎要在冰上进行, 使菌体保持 4 ℃以下的低温, 重复破碎 1 次。然后 4 ℃, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 40 min, 吸出上清液, 转移到新的离心管中。向离心管中加入 5 倍体积的沉淀液(醋酸铵甲醇溶液)沉淀蛋白。将沉淀下来的蛋白团块 4 ℃, 6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 去上清; 加入 5 mL 甲醇溶液反复吹打洗涤蛋白, 6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 去上清; 重复操作 1 次。再加入 5 mL 丙酮溶液反复吹打洗涤蛋白, 6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 去上清; 重复操作 1 次。将洗干净的蛋白质分装成 5 管, 晾干后-80 ℃保存备用。②反复冻融法。在装有 0.5 g 湿菌体的离心管中加入 5 mL 提取液, 混匀菌体, 充分振荡后于冰上静置 2~3 min, 将离心管置于-70 ℃冰箱冻存 30 min 后取出置于 20 ℃水浴锅溶解 5~10 min(至溶解), 重复操作 3 次。然后 4 ℃, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 40 min, 吸出上清液, 转移到新的离心管中。向离心管中加入 5 倍体积的沉淀液(醋酸铵甲醇溶液)沉淀蛋白。再按照①超声波破碎提取法中的沉淀蛋白的去上清、洗涤等步骤重复 3 次, 最后将洗干净的蛋白质分装成 5 管, 晾干后-80 ℃保存备用。③液氮研磨法。将收集到的 0.5 g 湿菌体移入灭菌的研钵中, 加入液氮研磨, 直至菌体成均匀粉末状后, 加入 5 mL 提取液, 充分振荡混匀后于冰上静置 2~3 min, 重复操作 3 次。然后 4 ℃, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 40 min, 吸出上清液, 转移到新的离心管中。向离心管中加入 5 倍体积的沉淀液(醋酸铵甲醇溶液)沉淀蛋白。再按照①超声波破碎提取法中的沉淀蛋白的去上清、洗涤等步骤重复 3 次, 最后将洗干净的蛋白质分装成 5 管, 晾干后在-80 ℃冰箱中保存备用。

1.2.4 不同破碎方法处理后菌体形态观察 取 1 片洁净载玻片, 用接种环沾无菌水于载玻片上, 蘸取少许不同方法处理的类酵母共生菌液于载玻片的水滴上, 涂片, 热固定后, 加 1 滴结晶紫溶液, 并用盖玻片覆盖, 1~2 min 后水洗(水不得直接冲洗涂菌处), 用吸水纸吸干, 待制片干燥后, 于显微镜下观察并拍照。

1.2.5 蛋白质质量浓度测定 利用 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 染色法测定。取上述提取的上清液 0.2 mL, 加考马斯亮蓝溶液 1 mL, 静置 2 min 后, 在 595 nm 下测吸光度  $D(595)$  值。从蛋白质标准曲线(图 1)上查出样品对应的蛋白质质量浓度。

1.2.6 蛋白质纯度比较 利用 SDS-PAGE 电泳分离培养 72 h 后的共生菌蛋白质样品。制备 150.00 g·L<sup>-1</sup> 的浓缩胶和 40.00 g·L<sup>-1</sup> 的分离胶, 加入蛋白质样品进行电泳。电泳过程保持在稳流的条件下, 浓缩胶时电压为 80 V, 分离胶时为 120 V, 待溴酚蓝到达凝胶底部边缘时结束试验。电泳结束后, 使用考马斯亮蓝染液 37 ℃摇床染色 2 h。对凝胶图像进行扫描, 利用凝胶成像系统的蛋白质分析软件, 观察不同提取方法获得蛋白质的条带差异。

### 1.3 数据分析

采用 Excel 软件进行数据统计并作图, 利用数据处理系统 SPSS 17.0 软件对相关数据进行统计和方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同破碎方法处理后褐飞虱类酵母共生菌显微形态比较

图 2 和图 3 中显示的是培养 72 h 后 3 种细胞破碎方法对褐飞虱类酵母共生菌的处理效果。可以看到: 无论敏感菌株还是抗性菌株, 未经处理的褐飞虱类酵母共生菌呈链状排列。超声波破碎法处理过的菌体呈分散状态, 破碎很彻底; 液氮研磨法处理过的菌体破碎均匀, 其破碎程度与超声波处理无明显差

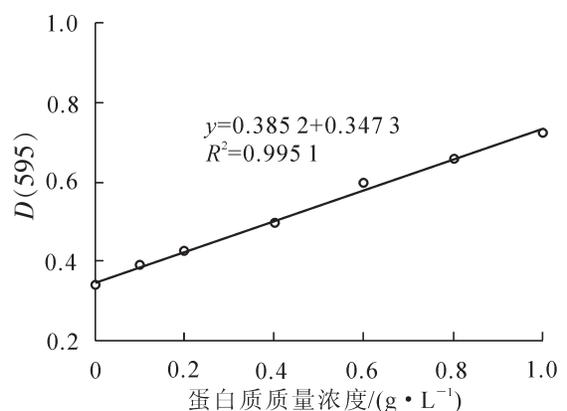
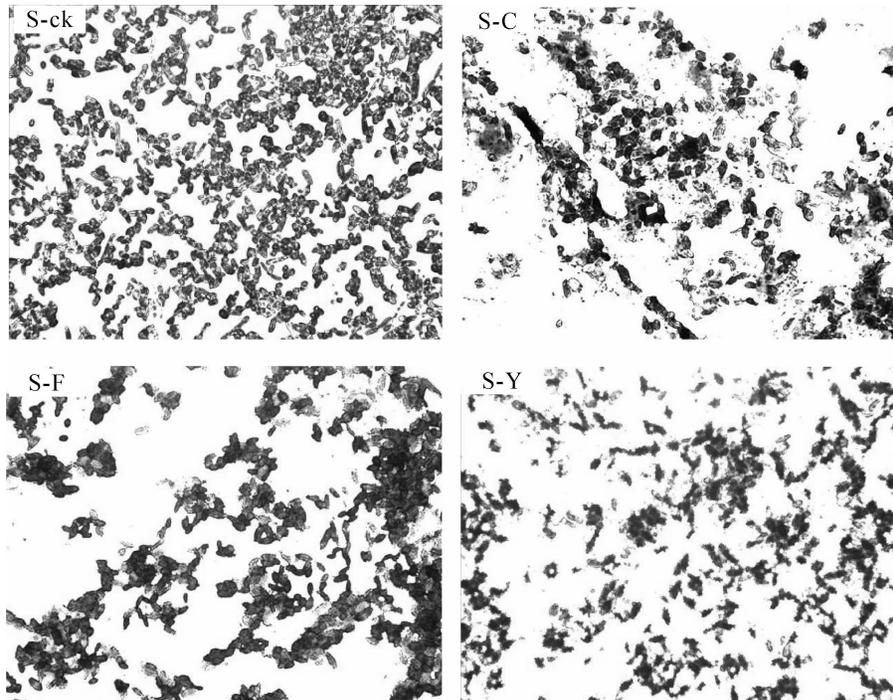


图 1 蛋白质标准曲线

Figure 1 Standard curve of protein

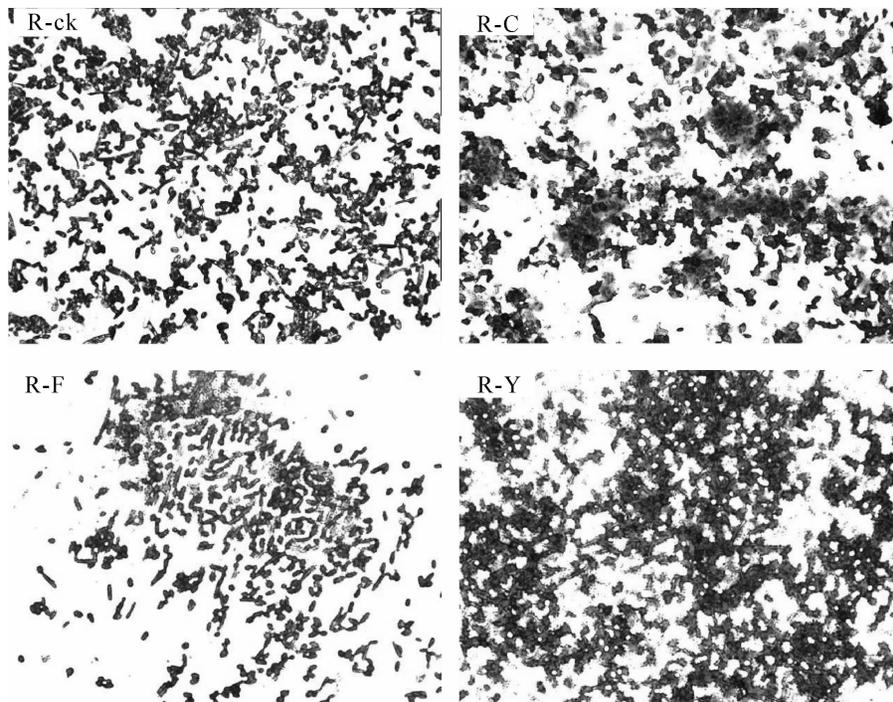
异；而反复冻融法处理后，可以明显看到有大部分菌体未破碎，其破碎程度明显低于前2种方法。该结果说明：超声波破碎法与液氮研磨法处理后共生菌菌体呈分散状，破碎程度明显高于反复冻融法。



S-ck: 未处理敏感菌株; S-C: 超声波破碎处理的敏感菌株;  
S-F: 反复冻融处理的敏感菌株; S-Y: 液氮研磨处理的敏感菌株。

图2 不同方法处理褐飞虱类酵母共生菌敏感菌株的显微形态比较(光镜40×)

Figure 2 Microscopic morphology of susceptible strain of yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* treated by different extraction methods (light microscopy 40 ×)



R-ck: 未处理抗性菌株; R-C: 超声波破碎处理的抗性菌株;  
R-F: 反复冻融处理的抗性菌株; R-Y: 液氮研磨处理的抗性菌株。

图3 不同细胞破碎方法处理褐飞虱类酵母共生菌抗性菌株的显微形态比较(光镜40×)

Figure 3 Microscopic morphology of resistant strain of yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* treated by different extraction methods (light microscopy 40 ×)

进一步从敏感菌株和抗性菌株的不同破碎处理后菌体显微形态中看出：敏感菌株用上述 3 种方法处理的破碎程度分别高于抗性菌株的结果。

## 2.2 不同培养时间提取的蛋白质质量浓度变化

表 1 数据显示：随着培养时间的增加，3 种方法提取的蛋白质质量浓度也增加。培养 72 h 后 3 种方法处理抗性菌株和敏感菌株所得蛋白质质量浓度均达到最高，而后趋于平稳，说明 72 h 是提取菌体蛋白质的最佳培养时间。对敏感菌株的提取方法中，超声波破碎法提取的蛋白质质量浓度显著 ( $P < 0.05$ ) 大于液氮研磨法和极显著 ( $P < 0.01$ ) 大于反复冻融法，液氮研磨法也显著 ( $P < 0.05$ ) 高于反复冻融法；培养 72 h 后，超声波破碎法、液氮研磨法和反复冻融法提取的蛋白质质量浓度分别为  $2.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对抗性菌株的提取方法中，同样是超声波破碎法提取的蛋白质质量浓度显著 ( $P < 0.05$ ) 大于液氮研磨法和极显著 ( $P < 0.01$ ) 大于反复冻融法，液氮研磨法又显著 ( $P < 0.05$ ) 高于反复冻融法；培养 72 h 后，超声波破碎法、液氮研磨法和反复冻融法提取的蛋白质质量浓度分别为  $2.64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.53 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这说明无论抗性菌株还是敏感菌株用超声破碎法提取的蛋白质质量浓度较高。

进一步比较敏感菌株和抗性菌株的蛋白质质量浓度差异时发现，敏感菌株的 3 种提取方法提取的蛋白质质量浓度分别高于抗性菌株的结果。

表 1 不同培养时间下抗感菌株蛋白质质量浓度的方差分析结果

Table 1 Results of variance analysis of mycoprotein concentrations of different strains of yeast-like symbiote from *Nilaparvata lugens* at different culture times

t/h	蛋白质质量浓度/( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )					
	敏感菌株			抗性菌株		
	超声波破碎法	反复冻融法	液氮研磨法	超声波破碎法	反复冻融法	液氮研磨法
12	$1.79 \pm 0.04 \text{ aA}$	$0.39 \pm 0.01 \text{ bB}$	$1.75 \pm 0.10 \text{ aA}$	$2.01 \pm 0.02 \text{ aA}$	$0.52 \pm 0.14 \text{ cB}$	$1.88 \pm 0.02 \text{ bA}$
24	$2.11 \pm 0.04 \text{ aA}$	$1.16 \pm 0.03 \text{ cB}$	$2.02 \pm 0.00 \text{ bA}$	$2.27 \pm 0.08 \text{ aA}$	$1.08 \pm 0.02 \text{ cB}$	$2.02 \pm 0.02 \text{ bA}$
36	$2.39 \pm 0.05 \text{ aA}$	$1.45 \pm 0.01 \text{ cB}$	$2.25 \pm 0.04 \text{ bA}$	$2.34 \pm 0.06 \text{ aA}$	$1.42 \pm 0.01 \text{ cB}$	$2.03 \pm 0.01 \text{ bA}$
48	$2.41 \pm 0.02 \text{ aA}$	$1.96 \pm 0.01 \text{ bB}$	$2.32 \pm 0.01 \text{ aA}$	$2.41 \pm 0.05 \text{ aA}$	$1.73 \pm 0.03 \text{ cB}$	$2.09 \pm 0.02 \text{ bA}$
60	$2.51 \pm 0.05 \text{ aA}$	$1.95 \pm 0.03 \text{ cB}$	$2.34 \pm 0.03 \text{ bA}$	$2.48 \pm 0.08 \text{ aA}$	$1.76 \pm 0.02 \text{ cB}$	$2.16 \pm 0.05 \text{ bA}$
72	$2.82 \pm 0.02 \text{ aA}$	$2.12 \pm 0.03 \text{ cB}$	$2.62 \pm 0.03 \text{ bA}$	$2.64 \pm 0.03 \text{ aA}$	$2.05 \pm 0.03 \text{ cB}$	$2.53 \pm 0.01 \text{ bA}$
96	$2.75 \pm 0.02 \text{ aA}$	$2.10 \pm 0.04 \text{ cB}$	$2.66 \pm 0.04 \text{ bA}$	$2.61 \pm 0.01 \text{ aA}$	$2.08 \pm 0.01 \text{ cB}$	$2.48 \pm 0.06 \text{ bA}$
120	$2.73 \pm 0.01 \text{ aA}$	$2.04 \pm 0.03 \text{ cB}$	$2.62 \pm 0.06 \text{ bA}$	$2.60 \pm 0.00 \text{ aA}$	$2.08 \pm 0.01 \text{ cB}$	$2.48 \pm 0.01 \text{ bA}$

说明：数据(平均值 $\pm$ 标准差)后不同小写字母表示同一菌株相同培养时间下不同提取方法之间差异显著 ( $P < 0.05$ )；不同大写字母表示同一菌株相同培养时间下不同提取方法之间差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

## 2.3 不同破碎方法提取的蛋白质的 SDS-PAGE 电泳结果

培养 72 h 后，用 3 种方法提取菌体蛋白质，再取等量所提取的蛋白质样品进一步通过 SDS-PAGE 电泳(图 4)进行分析。可以看出：无论抗性菌株还是敏感菌株，相同质量的蛋白质中反复冻融法的得率最少，而且提取的蛋白质丰度很低，与超声破碎法和液氮研磨法的差异明显；超声破碎法与液氮研磨法提取的蛋白质质量浓度较高，但是液氮研磨法提取的蛋白质存在一定程度的降解，蛋白质条带不够清晰。还发现，超声波破碎法和反复冻融法提取的敏感菌株的菌体蛋白质条带数、条带颜色明显多(深)于抗性菌株，说明敏感菌株用这 2 种方法提取的菌体蛋白质种类较多、蛋白质质量浓度较大。但液氮研磨法由于部分蛋白质降解，抗性菌株和敏感菌株之间的蛋白质条带颜色深，差异不明显。上述结果说明，对敏感菌株还是抗性菌株，超声破碎法提取的蛋白质质量浓度高，丰富性好，而且条带分布均匀，可以作为后续双向电泳的样品提取方法。

## 3 讨论

褐飞虱类酵母共生菌与其他真菌类微生物类似，其细胞表面也存在有一层包被，即细胞壁。酵母菌的细胞壁主要有酵母纤维素组成，分为 3 层：外层是甘露聚糖，中间夹有一层蛋白质分子，内层是葡聚糖。酵母细胞壁有一定的韧性，因此提取酵母细胞蛋白质时破壁就成为瓶颈问题。目前，已报道破碎真

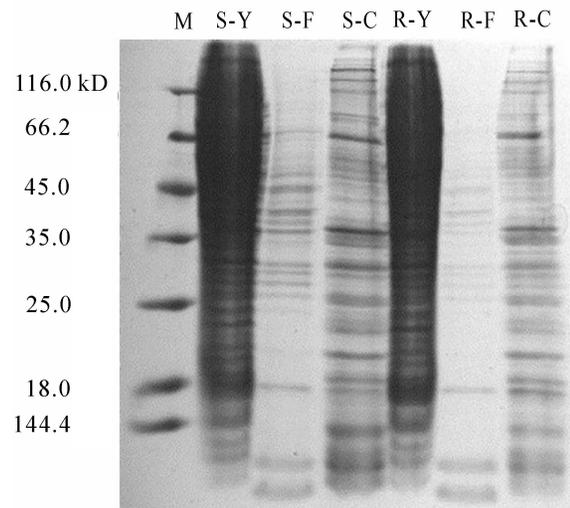
菌细胞的方法主要有超声波破碎法、液氮研磨法、玻璃珠法<sup>[13]</sup>、玻璃棒研磨法<sup>[14]</sup>或者几种方法结合使用的方法等。超声波破碎法操作简单,但是工作时会产生热量,时间掌握不好易引起蛋白降解<sup>[15]</sup>;液氮冷冻研磨因液氮挥发极快,操作非常困难;玻璃珠破碎壁是一种比较经典的方法,通常单纯用涡旋振荡,但提取的蛋白质质量浓度偏低,加用玻璃棒研磨后蛋白质质量浓度明显提高<sup>[14]</sup>。

采用不同方法提取蛋白质的效果不同<sup>[16-17]</sup>,酵母菌需裂解以释放胞内蛋白质,裂解比例越大,释放的蛋白质越多。许多学者对酵母类真菌微生物蛋白质组学研究中蛋白质的提取方法进行了研究,提出了一些适用于酵母类真菌的蛋白质提取方法。王爽等<sup>[18]</sup>报道超声波法与玻璃珠研磨法结合是提取白假丝酵母 *Candida albicans* 和茄病镰刀菌 *Fusarium solani* 胞内蛋白质的最佳方法。焦立新等<sup>[14]</sup>为了有效破碎热带念珠菌 *Monilia guilliermondi*, 季也蒙念珠菌 *Candida tropicalis* 和光滑念珠菌 *Candida glabrata* 菌体的细胞壁,利用玻璃珠涡旋震荡加玻璃棒研磨法,获得理想结果。胡彬彬等<sup>[19]</sup>也认为玻璃珠涡旋、振荡结合玻璃棒研磨法提取真菌蛋白质效果好,是一种潜在的适合提取大部分真菌总蛋白质的提取方法。于影等<sup>[20]</sup>认为:超声波-硫酸铵沉淀法提取东方伊萨酵母 *Issatchenkia orientalis* 蛋白质质量浓度明显高于比单纯超声波和超声波-丙酮/三羧酸循环(TCA)沉淀法,并获得分辨率高和重复性好的双向电泳图谱。研究发现,超声波破碎细胞的机制可能与超声波作用于溶液时气泡产生、长大和破碎的空气现象有关,空气现象引起的冲击波和剪切力使细胞裂解<sup>[21]</sup>。

超声波不同超声时间提取蛋白质的效果也不同。田晓蓓等<sup>[22]</sup>报道了超声时间对革兰阳性兼性厌氧球菌——变异链球菌蛋白质提取的影响,发现随着超声时间的延长,提取的蛋白质质量浓度也相应增加,在超声处理 96 圈时(总时间 16 min),提取的蛋白质质量浓度达到最大;超声时间继续延长,蛋白质质量浓度反而下降,说明超声时间过短蛋白质提取不充分,超声时间过长会引起蛋白质降解。我们在预备试验中发现超声时间 15 min,提取的类酵母共生菌菌体蛋白质最多。

有学者认为,同一种提取方法对不同菌株蛋白质的提取效果相似,如焦立新等<sup>[14]</sup>用玻璃珠涡旋震荡结合玻璃棒研磨法提取热带、季也蒙和光滑 3 种念珠菌的临床分离株,获得的蛋白质质量浓度基本相同。也有学者认为,同一种方法对不同真菌蛋白质的提取效果不一样,如王爽等<sup>[18]</sup>报道,在相同超声波功率和作用时间下对白假丝酵母和茄病镰刀菌胞内蛋白质的组分和质量浓度有差异,并认为这可能是由于这 2 种真菌的细胞壁成分存在差异所致。本研究发现:同一种提取方法对吡虫啉敏感菌株和抗性菌株蛋白质的提取效果也有差异,敏感菌株用超声波震荡、液氮冷冻或反复冻融法提取的菌体蛋白质组分、蛋白质质量浓度均多(高)于抗性菌株结果,其原因可能是由于在吡虫啉的长期胁迫下抗性菌株胞内相关酶种类减少或酶活性失活造成。

研究表明:无论是敏感菌株还是抗性菌株,超声波法破碎的类酵母细胞壁彻底,提取的菌体蛋白质质量浓度高、丰富性好、蛋白条带均匀清晰;液氮研磨法的破碎程度与超声波无明显差异,但其提取的蛋白质有一定降解,蛋白条带也不够清晰;反复冻融法的破碎程度明显低于超声波和液氮法,且提取的蛋白质丰度很低。因此,适用于褐飞虱类酵母共生菌菌体蛋白质提取的最佳方法为超声波法。该方法操作简便、破碎时间短、蛋白质性状稳定、变性少,可以作为后续蛋白质双向电泳的样品提取方法。



M: 标记; S-Y: 敏感菌株液氮研磨法提取蛋白; S-F: 敏感菌株反复冻融法提取蛋白; S-C: 敏感菌株超声波破碎法提取蛋白; R-Y: 抗性菌株液氮研磨法提取蛋白; R-F: 抗性菌株反复冻融法提取蛋白; R-C: 抗性菌株超声波破碎法提取蛋白。

图 4 用 3 种方法提取的不同抗性菌株菌体蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 4 SDS-PAGE pattern of mycoprotein of different resistant yeast-like symbiote strains from *Nilaparvata lugens* extracted with three methods

## 4 参考文献

- [1] 程家安, 祝增荣. 2005 年长江流域稻区褐飞虱暴发成灾原因分析[J]. 植物保护, 2006, **32**(4): 1 - 4.  
CHEN Jiaan, ZHU Zengrong. Analysis on the key factors causing the outbreak of brown planthopper in Yangtze Area, China in 2005 [J]. *Plant Prot*, 2006, **32**(4): 1 - 4.
- [2] 刘泽文, 张懿熙, 姚香梅, 等. 褐飞虱对吡虫啉的抗性机理和靶标分子毒理学[J]. 昆虫学报, 2010, **53**(6): 683 - 688.  
LIU Zewen, ZHANG Yixi, YAO Xiangmei, *et al.* Imidacloprid resistance mechanisms in *Nilaparvata lugens* and pharmacological properties of its nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Acta Entomol Sin*, 2010, **53**(6): 683 - 688.
- [3] WEN Yucong, LIU Zewen, BAO Haibo, *et al.* Imidacloprid resistance and its mechanisms in field populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål in China [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2009, **94**(1): 36 - 42.
- [4] 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 共生菌对褐飞虱生长发育和生殖的影响[J]. 植物保护学报, 2001, **28**(3): 193 - 197.  
LÜ Zhongxian, YU Xiaoping, CHEN Jianming, *et al.* The effect of endosymbiote on the development and reproduction of brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål [J]. *Acta Phytophylacica Sin*, 2001, **28**(3): 193 - 197.
- [5] 孙佳音, 傅强, 赖凤香, 等. 不同褐飞虱寄主种群类酵母共生菌形态和数量的比较[J]. 中国水稻科学, 2009, **23**(5): 546 - 550.  
SUN Jiayin, FU Qiang, LAI Fengxiang, *et al.* Comparison morphology and number of yeast-like symbionts in different host-associated populations of *Nilaparvata lugens* [J]. *Chin J Rice Sci*, 2009, **23**(5): 546 - 550.
- [6] LU Zhongxian, YU Xiaoping, CHEN Jianming, *et al.* Dynamics of yeast-like symbiote and its relationship with the virulence of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, to resistant rice varieties [J]. *J Asia-Pac Entomol*, 2004, **7**(3): 317 - 323.
- [7] GIBSON C M, HINTER M S. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects [J]. *Ecol Lett*, 2010, **13**(2): 223 - 234.
- [8] CHEN Xiaona, WEI Hui, XIAO Nengwen, *et al.* Effects of elevated CO<sub>2</sub> and transgenic Bt rice on yeast-like endosymbiote and its host brown planthopper [J]. *J Appl Entomol*, 2011, **135**(5): 333 - 342.
- [9] YUKUHIRO F, MIYOSHI T, NODA H. Actin-mediated transovarial transmission of a yeastlike symbiont in the brown planthopper [J]. *J Insect Physiol*, 2014, **60**(1): 111 - 117.
- [10] 李娜, 陈建明, 张珏锋, 等. 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株解毒酶活性的比较[J]. 浙江农业学报, 2010, **22**(5): 653 - 659.  
LI Na, CHEN Jianming, ZHANG Juefeng, *et al.* Comparison for activities of detoxifying enzymes in resistant-and susceptible-imidacloprid endosymbiotic strains of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2010, **22**(5): 653 - 659.
- [11] 李娜, 陈建明, 张珏锋, 等. 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株体内抗氧化酶活性比较[J]. 植物保护学报, 2011, **38**(3): 258 - 264.  
LI Na, CHEN Jianming, ZHANG Juefeng, *et al.* Comparison for activities of antioxidant enzymes in imidacloprid resistant-and susceptible symbiotic strains in rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) [J]. *Acta Phytophylacica Sin*, 2011, **38**(3): 258 - 264.
- [12] 李娜. 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株的筛选、抗性机理和降解作用[D]. 杭州: 杭州师范大学, 2010.  
LI Na. *The Screening, Resistant Mechanism and Degradation of Imidacloprid-resistant Strain of the Symbiote in Rice Brown Planthopper, Nilaparvata lugens* (Stål) [D]. Hangzhou: Hangzhou Normal University, 2010.
- [13] KNIEMEYER O, LESSING F, SCHEIBNER O, *et al.* Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the humanpathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. *Curr Gen*, 2006, **49**(3): 178 - 189.
- [14] 焦立新, 张云峰, 贺丹, 等. 一种念珠菌蛋白质的提取方法[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, **11**(8): 1540 - 1541.  
JIAO Lixin, ZHANG Yunfeng, HE Dan, *et al.* A method to extract protein of *Candida* [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2007, **11**(8): 1540 - 1541.
- [15] CANAS B, PINEIRO C, CALVO E, *et al.* Trends in sample preparation for classical and second generation pro-

- teomics [J]. *J Chromatogr*, 2007, **1153**(1/2): 235 – 258.
- [16] GORG A, WEISS W, DUNN M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. *Proteomics*, 2004, **4**(12): 3665 – 3685.
- [17] LOPEZ J L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2007, **849**(1/2): 190 – 202.
- [18] 王爽, 姜兰香, 张宇, 等. 真菌胞内蛋白质提取方法的建立[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2012, **38**(5): 590 – 594.  
WANG Shuang, JIANG Lanxiang, ZHANG Yu, *et al.* Establishment of intracellular protein extraction methods from fungus [J]. *J Jilin Univ Med Ed*, 2012, **38**(5): 590 – 594.
- [19] 胡彬彬, 林连兵, 魏云林, 等. 一种高效的真菌总蛋白质提取方法[J]. 中国生物工程杂志, 2013, **33**(9): 53 – 58.  
HU Binbin, LIN Lianbing, WEI Yunlin, *et al.* An efficient fungal protein extraction method [J]. *China Biotechnol*, 2013, **33**(9): 53 – 58.
- [20] 于影, 余志晟, 白志辉, 等. 东方伊萨酵母降解染料蛋白质组的双向电泳条件优化[J]. 环境科学, 2011, **32**(2): 548 – 553.  
YU Ying, YU Zhicheng, BAI Zihui, *et al.* Optimization of two-dimensional electrophoresis conditions for proteomics of *Issatchenkia orientalis* in degrading dyes [J]. *Environ Sci*, 2011, **32**(2): 548 – 553.
- [21] 王家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 82 – 86.
- [22] 田晓蓓, 韩建国. 超声时间对提取变异链球菌蛋白质的实验研究[J]. 徐州医学院学报, 2010, **30**(8): 527 – 529.  
TIAN Xiaobei, HAN Jianguo. Experimental study of ultrasonic time on protein extraction of *Streptococcus mutans* [J]. *Acta Acad Med Xuzhou*, 2010, **30**(8): 527 – 529.