

光增白剂对甜菜夜蛾围食膜结构的作用与影响

朱 蓉, 彭建新*, 洪华珠

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430079)

摘要: 应用环境扫描电镜和生化技术研究了甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 正常围食膜和光增白剂 M2R 处理围食膜的形态、结构和组成。结果表明: 正常的围食膜表面光滑致密、无孔洞和缝隙; 光增白剂处理的围食膜产生了孔缝。正常围食膜所含蛋白质的种类很多, 经 SDS-PAGE 测定至少有 17 条多肽, 分子量多在 97.4 kD 以下, 围食膜蛋白质的含量约为 41.98%, 糖的含量约为 2.05%。光增白剂可以解离大部分围食膜蛋白, 液滴法喂食幼虫蓝色葡聚糖 2000 进一步证实了光增白剂能破坏围食膜的完整性。

关键词: 甜菜夜蛾; 围食膜; 光增白剂; 环境扫描电镜

中图分类号: Q962 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2003) 04-0424-05

Effects of fluorescent brightener on the peritrophic membrane structure of *Spodoptera exigua*

ZHU Rong, PENG Jian-Xin*, HONG Hua-Zhu (Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: Environmental scanning electron microscopy and biochemical techniques were employed to analyze the structure of the normal and fluorescent brightener 28 (M2R) treated peritrophic membrane (PM) of *Spodoptera exigua*. The normal PM surface was smooth and wrinkled without pores or slits while the treated PM surface had pores and slits. There were many types of protein in the PM. SDS-PAGE separation of the PM suggest that there are at least 17 polypeptides, most of them less than 97.4 kD. Proteins formed 41.98% of the total mass of the PM and carbohydrates 2.05%. The PM proteins could be dissociated from the PM *in vitro* by M2R. Droplet feeding fifth instar larvae with M2R greatly increased the permeability of the PM.

Key words: *Spodoptera exigua*; peritrophic membrane; fluorescent brightener; environmental scanning electron microscopy

围食膜 (peritrophic membrane, PM) 是昆虫中肠前部分泌产生的, 位于中肠细胞和肠腔之间, 为无色透明半透膜。围食膜起着保护中肠上皮细胞免遭食物通过时造成的各种伤害以及抵抗微生物入侵的作用, 是昆虫的一种防御性屏障。正常的围食膜表面光滑致密、无孔和缝。破坏围食膜可以促进病毒等病原微生物的感染 (Derksen and Granados, 1988; 邓塔和蔡秀玉, 1992)。近年来, 人们发现了一些生物、化学物质可以通过破坏围食膜而增强杆状病毒的感染。Corsaro (1993) 研究证明颗粒体病毒增强蛋白质能导致昆虫中肠围食膜结构的改变。Shapiro 和 Robertson (1992) 首次报道了光增白

剂能极大地增强杆状病毒的感染性, 并推测光增白剂通过破坏围食膜而达到增效作用。Wang 和 Granados (2000) 研究证实光增白剂可以破坏粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 的围食膜。甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 是一种重要的、具有代表性的农业害虫。研究它的围食膜结构以及光增白剂对其结构的影响, 有助于利用病原病毒对这一重要农业害虫进行有效防治。我们研究了甜菜夜蛾围食膜的形态、结构和组成以及光增白剂处理对围食膜的影响, 以期为进一步研究光增白剂对杆状病毒的增效作用及开发病毒增效辅剂提供证据。

基金项目: 湖北省自然科学基金 (2000J112); 教育部科学技术重点项目 (02192)

作者简介: 朱蓉, 女, 1977 年 12 月生, 硕士研究生, 主要从事昆虫病毒方面的研究, E-mail: zhurongao@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: jianxinpeng@21cn.com

收稿日期 Received: 2002-10-08; 接受日期 Accepted: 2003-04-02

1 材料和方法

1.1 供试昆虫和试剂

甜菜夜蛾虫卵购自湖北省农业科学院研究开发中心养虫室, 28℃ 孵育, 人工饲料喂养 (28℃, 60% ~ 80% RH, 每天光照 14 h); 光增白剂 M2R (fluorescent brightener 28) 和蓝色葡聚糖 2000 (blue-dextran 2000) 均购自 Sigma 公司。蓝色葡聚糖 2000 为常用的着色群, 分子量为 2 000 kD。

1.2 围食膜的制备

取健康的 5 龄甜菜夜蛾幼虫, 解剖取出围食膜, 用去离子水清洗至无色透明, 一部分用去离子水保存于 -20℃, 用以 SDS-PAGE; 一部分冷冻干燥, 4℃ 保存, 用以生化分析。

1.3 围食膜的电镜观察

解剖 5 龄甜菜夜蛾幼虫, 取出围食膜, 将包含食物的围食膜置于环境扫描电镜 (XL-30ESEM) 下观察, 摄像。

1.4 围食膜组成成分的测定

SDS-PAGE 分析蛋白质种类: 取出冻存于 -20℃ 的围食膜 10 条, 加入 SDS-PAGE 上样缓冲液, 并加入 4 种蛋白酶抑制剂 (0.5 μg/mL Leupeptin, 1 μg/mL Pepstatin, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF), 4℃ 过夜, 次日取上清, SDS-PAGE 不连续胶电泳, 其中分离胶为 12%, 浓缩胶为 5%, 银染, 拍照。

蛋白质含量的测定: 取 4 mg 冷冻干燥的围食膜, 分别进行酸水解和碱水解, 所有样品中和至 pH 7.0, 用 Biophotometer 测蛋白质的浓度, 设空白对照, 重复 3 次, 换算成蛋白质的含量。

糖含量的测定: 取 4 mg 冷冻干燥的围食膜进行酸水解, 所有样品中和至 pH 7.0, 定容后用硫酸-萘酚法测糖含量; 分光光度计测 620 nm 处 OD 值, 根据标准曲线查出糖浓度, 换算成糖含量。重复 3 次。

1.5 光增白剂处理围食膜的电镜观察

喂以 5 龄幼虫 20 mm³ 食物, 其中加入 5 μL 1% M2R, 分别于 2 h、4 h 剖取围食膜, 置于环境扫描电镜下观察, 摄像。

1.6 光增白剂处理围食膜的蛋白分析

取出冻存于 -20℃ 的围食膜 10 条, 加入 50 μL 1% M2R, 同时加入 4 种蛋白酶抑制剂 (0.5 μg/mL Leupeptin, 1 μg/mL Pepstatin, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF), 4℃ 过夜, 次日取上清, 12% 的 SDS-PAGE, 银染分析。

1.7 光增白剂对围食膜通透性的影响

用液滴法喂以刚蜕皮的 5 龄幼虫 5% 蔗糖溶液, 其中含 5 μL 1% M2R, 参照组仅喂以 5% 蔗糖, 2.5 h 后喂以 5 μL 5% 蔗糖溶液, 其中含 1% 蓝色葡聚糖 2000, 剖取围食膜, 置于显微镜下观察, 摄像。

喂以刚蜕皮 5 龄幼虫 20 mm³ 食物, 其中加入 5 μL 1% M2R, 16 h 后剖取围食膜, 置于一载玻片上, 滴加 PBS 观察, 摄像。

2 结果和分析

2.1 围食膜结构的电镜观察

环境扫描电镜观察到正常的围食膜表面光滑、致密, 除细小的皱褶外, 没有孔和缝 (图 1)。

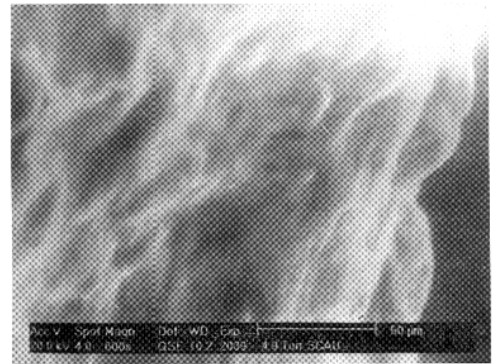


图 1 正常围食膜结构的电镜观察

Fig. 1 ESEM of the peritrophic membrane of *S. exigua*

2.2 围食膜组成成分的分析

SDS-PAGE 显示围食膜的蛋白质种类很多, 至少有 17 条多肽, 分子量多在 97.4 kD 以下, 而且多数比较接近 (图 2)。

围食膜的蛋白质含量: 围食膜蛋白质约占 41.98%, 其中碱溶性蛋白质约占 34.66%, 酸溶性蛋白质约占 7.32% (表 1)。

围食膜的糖含量: 硫酸-萘酚法测定糖的百分含量约为 2.05% (表 2)。

表 1 甜菜夜蛾围食膜的蛋白质含量 (%)

Table 1 The composition of the peritrophic membrane protein (%)

蛋白质 Protein	测定批次 Batch			平均值 ± 标准差 Mean ± SD
	1	2	3	
总蛋白质 total protein	42.26	38.33	45.35	41.98 ± 3.52
酸溶性蛋白质 acid-soluble protein	7.12	6.80	8.05	7.32 ± 0.65
碱溶性蛋白质 alkaline-soluble protein	35.14	31.53	37.30	34.66 ± 2.92

表 2 甜菜夜蛾围食膜的糖含量

Table 2 The carbohydrate content of the peritrophic membrane

测定项目 Sample	测定批次 Batch			平均值 ± 标准差 Mean ± SD
	1	2	3	
糖浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) concentration of carbohydrate	7.7	8.6	8.4	8.2 ± 0.47
糖含量 (%) content of carbohydrate	1.90	2.15	2.10	2.05 ± 0.13

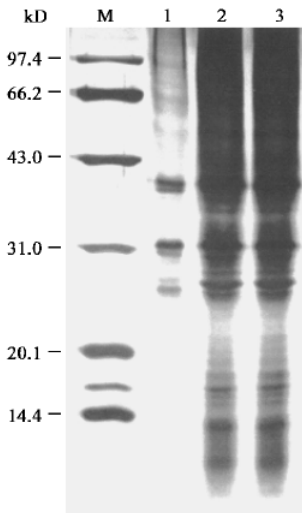


图 2 围食膜蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the peritrophic membrane protein of *S. exigua*

M: 低分子量蛋白质标准 low-molecular-weight proteins marker;
1: 1% M2R 解离的围食膜蛋白质 proteins isolated from the peritrophic membrane with 1% M2R; 2, 3: 围食膜蛋白质 the peritrophic membrane proteins.

2.3 光增白剂处理围食膜的电镜观察

环境扫描电镜观察表明, 经 1% M2R 处理 2 h 后的围食膜表面粗糙, 出现凹沟和小孔 (图 3: A), 随着处理时间的延长围食膜结构损坏程度逐渐加重, 处理 4 h 后的围食膜完全消失 (图 3: B)。

2.4 光增白剂处理围食膜蛋白的 SDS-PAGE

围食膜蛋白质和几丁质结合十分牢固, 用 1% M2R 在离体条件下可以使围食膜蛋白质解离 (图 2)。

2.5 光增白剂对围食膜通透性的影响

喂食 $5 \mu\text{L}$ 1% M2R 可导致围食膜破坏。2.5 h 后, 光学显微镜下观察围食膜已消失, 蓝色葡聚糖 2000 大量溢出至中肠肠腔中 (图 4: A)。而参照组围食膜保持完整, 无蓝色葡聚糖 2000 外溢现象 (图 4: B)。0.5% M2R 不会导致围食膜的完全破坏, 只是出现穿孔, 蓝色葡聚糖 2000 部分溢出 (图 4: C)。

喂食含 1% M2R 的食物 16 h 后, 剖取围食膜, 置于载玻片上, 并滴加 PBS 可观察到食物立即不断渗入 PBS 中 (图 4: D), 而参照组围食膜保持完整 (图 4: E)。

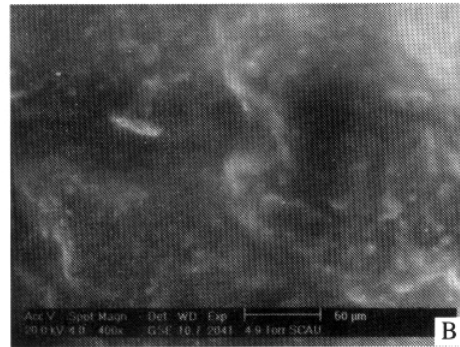
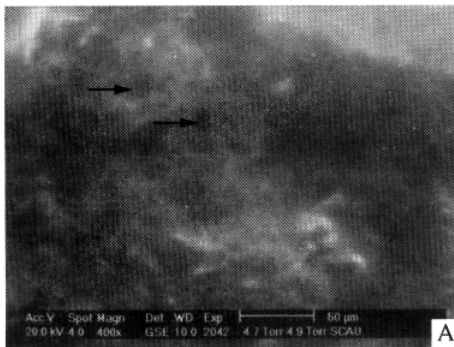


图 3 光增白剂处理围食膜的电镜观察

Fig. 3 ESEM of the peritrophic membrane of larvae fed with M2R

A. 1% M2R 喂食 2 h 后 5 龄幼虫的围食膜 The peritrophic membrane 2 h after fifth instar larvae were fed with 1% M2R;
B. 1% M2R 喂食 4 h 后 5 龄幼虫的围食膜 The peritrophic membrane 4 h after fifth instar larvae were fed with 1% M2R.

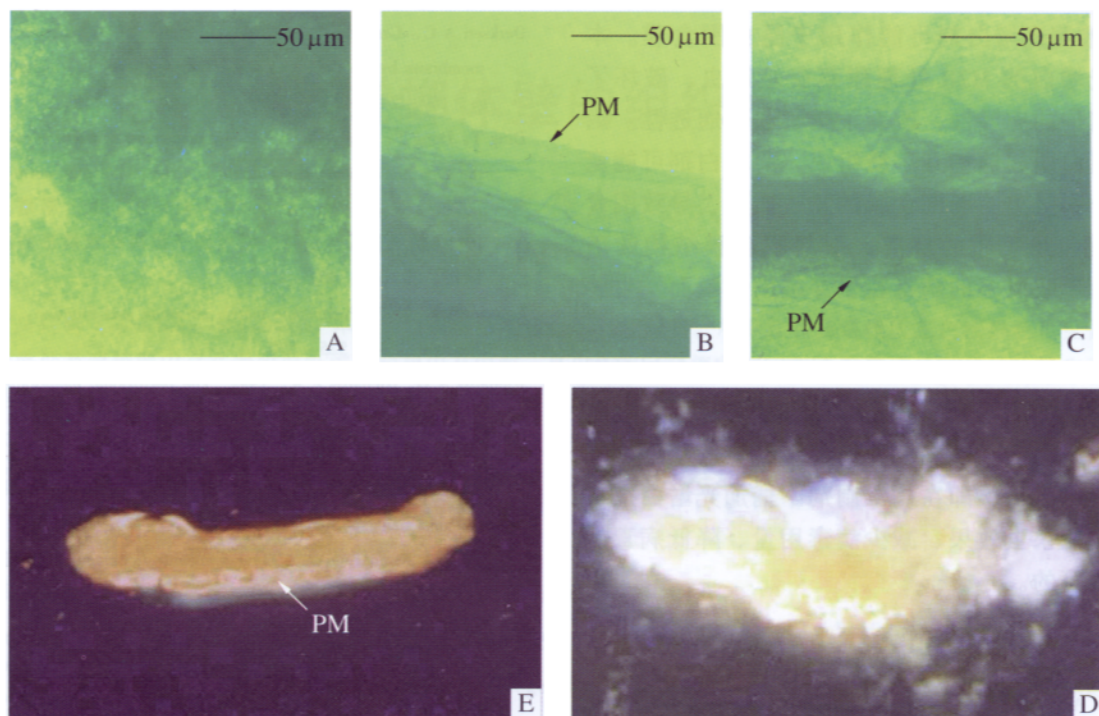


图 4 光增白剂对围食膜通透性的影响

Fig. 4 Effect of M2R on the permeability of the peritrophic membrane

A. 液滴法喂食 5 龄幼虫 1% M2R, 2.5 h 后的围食膜 The peritrophic membrane 2.5 h after fifth instar larvae were droplet fed with 1% M2R; B. 液滴法喂食的参照组围食膜 The peritrophic membrane of non-M2R treated control larvae; C. 液滴法喂食 5 龄幼虫 0.5% M2R, 2.5 h 后的围食膜 The peritrophic membrane 2.5 h after fifth instar larvae were droplet fed with 0.5% M2R; D. 喂以含 1% M2R 的食物 16 h 后 5 龄幼虫的围食膜 (于 PBS 中) Isolated peritrophic membrane (with food contents) from fifth instar larvae fed on 1% M2R for 16 h, in PBS solution; E. 参照组围食膜 (于 PBS 中) The peritrophic membrane of non-M2R treated control larvae in PBS solution.

3 讨论

本实验以甜菜夜蛾围食膜为材料, 分析和研究了围食膜的结构及其蛋白组成。SDS-PAGE 分离出 17 种主要蛋白质, 分子量大多在 97.4 kD 以下。围食膜的蛋白质含量为 41.98%, 糖含量为 2.05%。Lehane (1997) 报道过昆虫围食膜的结构, 指出围食膜蛋白质含量为 20% ~ 55%, SDS-PAGE 分离出 12 种主要蛋白质, 大小在 15 ~ 220 kD 之间, 其中大部分小于 100 kD。国内有人分析过棉铃虫围食膜的结构和组成, SDS-PAGE 显示有 16 条主要蛋白质带, 分子量一般在 97.4 kD 以下, 蛋白质含量为 34.74%, 糖含量为 7.61% (张严峻等, 2000)。本试验结果与上述报道略有差异, 这种差异可能与昆虫种类、虫龄以及测定方法不同有关。Richards 和 Richards (1977) 研究显示大多数昆虫围食膜表面光滑致密、无孔和缝、少数种类有孔径小于 30 nm 的小孔。我们首次采用先进的环境扫描电镜观察了甜菜夜蛾幼虫的围食膜, 结果显示围食膜表面均匀、光滑, 无孔洞与缝隙, 与文献报道的结果一致

(Richards and Richards, 1977; Brandt *et al.*, 1978; Ryerse *et al.*, 1992; Spence and Kawata, 1993)。

围食膜是昆虫保护中肠上皮细胞的一道重要的天然屏障。Wang 和 Granados (2000) 研究发现光增白剂可破坏粉纹夜蛾和美洲棉铃虫等的围食膜, 本研究进一步直观地证实了光增白剂对甜菜夜蛾围食膜的破坏作用。由此可见, 光增白剂对昆虫围食膜的损伤作用具有普遍性。

Shapiro 和 Robertson (1992) 及 Shapiro 和 Vaughn (1995) 已证实光增白剂对美洲棉铃虫 NPV (*Heliothis zea* nuclear polyhedrosis virus, HzNPV)、棉铃虫 NPV (*Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus, HaNPV)、大蜡螟 NPV (*Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus, GmNPV)、苜蓿银纹夜蛾 NPV (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) 和舞毒蛾 NPV (*Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus, LdNPV) 等都具有增效作用。本实验室研究发现光增白剂对甜菜夜蛾 NPV (*Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus, SeNPV) 和芹菜夜蛾 NPV (*Syngraph falcifera* nuclear polyhedrosis virus, SfaNPV) 也具有增效作用。Shapiro 和 Robertson

(1992) 推测光增白剂可能作用于昆虫围食膜。本实验用光增白剂 M2R 处理甜菜夜蛾幼虫, 破坏了围食膜结构的完整性, 改变了围食膜的通透性。围食膜由蛋白质、糖和几丁质组成, 光增白剂可能竞争性结合到昆虫中肠围食膜的几丁质上, 导致围食膜蛋白质和几丁质的解离, 引起围食膜结构的破坏, 从而导致更多的病毒粒子穿越围食膜而发生感染。

我们希望进一步从分子水平研究光增白剂对围食膜的破坏作用以及光增白剂对杆状病毒的增效机理。从光增白剂破坏围食膜而促进病毒的感染这一点可以得到启示, 即在病毒制剂中辅加光增白剂可以达到提高杀虫效果、减少病毒用量、降低病毒生产成本的目的。

参 考 文 献 (References)

- Brandt C R, Adang M J, Spence K D, 1978. The peritrophic membrane: Ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 32: 12 - 24.
- Corsaro B G, 1993. Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis. *Parasites and Pathogens of Insect*, 2: 127 - 145.
- Deng T, Tsai X Y, 1992. Pathological changes of peritrophic membrane of *Heliothis assulta* after infection with nuclear polyhedrosis virus. *Acta Entomologica Sinica*, 35 (1): 123 - 124. [邓塔, 蔡秀玉, 1992. 烟青虫感染核型多角体病毒后围食膜的病变. 昆虫学报, 35 (1): 123 - 124]
- Derksen A C, Granados R R, 1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*, 167: 242 - 252.
- Ding T, Deng T, Tsai X Y, 1995. Enhancement of baculovirus infection by the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm. *Acta Entomologica Sinica*, 38 (4): 407 - 413. [丁翠, 邓塔, 蔡秀玉, 1995. 粘虫颗粒体病毒的增效因子提高杆状病毒的感染. 昆虫学报, 38 (4): 407 - 413]
- Lehane M J, 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 525 - 550.
- Richards A G, Richards P A, 1997. The peritrophic membrane of insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 22: 219 - 240.
- Ryerse J S, Purcell J P, Sammons R D, Lavrik P B, 1992. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue and Cell*, 24 (5): 751 - 771.
- Spence K D, Kawata M Y, 1993. Permeability characteristics of the peritrophic membrane of *Manduca sexta* larvae. *J. Insect Physiol.*, 39 (9): 785 - 790.
- Shapiro M, Robertson J L, 1992. Enhancement of gypsy moth baculovirus activity by optical brighteners. *J. Econ. Entomol.*, 85 (4): 1 120 - 1 124.
- Shapiro M, Vaughn J L, 1995. Enhancement in activity of homologous baculovirus infectious to cotton bollworm by an optical brightener. *Biological and Microbial Control*, 88 (1): 265 - 269.
- Wang P, Granados R R, 2000. Calcofluor disrupt the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 135 - 143.
- Zhang Y J, Tan J, Lin Y Q, 2000. The structure and constitution of peritrophic membrane of *Helicoverpa armigera*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 12: 140 - 143. [张严峻, 谭军, 林玉清, 2000. 棉铃虫围食膜的结构和组成. 浙江农业学报, 12: 140 - 143]