

小菜蛾幼虫血淋巴中 β -1,3-葡聚糖结合蛋白的分离及其对根虫瘟霉感染的免疫活性*

刘青娥^{1,2)} 徐均焕¹⁾** 冯明光¹⁾

(¹⁾浙江大学微生物研究所, 杭州 310029; ²⁾丽水师范专科学校生物系, 丽水 323000)

摘要 用亲和沉淀法从小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 幼虫血淋巴中分离获得 2 种 β -1,3-葡聚糖结合蛋白, 分子质量分别为 75.9 ku 和 83.2 ku, 主要存在于幼虫血浆中, 但血细胞中未检出。研究表明, β -1,3-葡聚糖结合蛋白能特异性地识别 β -1,3-葡聚糖, 并显著激活幼虫血淋巴中的酚氧化酶原 (ProPO), 与昆布多糖共存时所激活的酚氧化酶 (PO) 活性显著高于两者单独存在时的 PO 活性。与 4 株根虫瘟霉 (*Zoophthora radicans*) 菌丝裂解液共存时, β -1,3-葡聚糖结合蛋白能激活幼虫血淋巴中的 ProPO, 使 PO 活力显著高于该菌原生质体裂解液所激活的 PO 活性。显然, β -1,3-葡聚糖结合蛋白只有特异性地识别根虫瘟霉细胞壁中的 β -1,3-葡聚糖后才能激活幼虫血淋巴中的 ProPO, 表明虫霉原生质体可逃避寄主免疫反应。此外, β -1,3-葡聚糖结合蛋白对不同菌株所激活的 PO 活性存在差异, 各菌株所激活的 PO 活性由高到低依次为: ARSEF1342 > ARSEF2699 > F99101 > ARSEF1100, 这与各菌株对小菜蛾的毒力强弱相一致, 即菌株逃避寄主免疫识别的能力与其毒力相关。

关键词 小菜蛾, β -1,3-葡聚糖结合蛋白, 根虫瘟霉, 菌丝, 原生质体, 昆虫免疫, 虫霉

学科分类号 Q965.9

昆虫病原菌在入侵寄主的过程中, 常会遇到寄主昆虫的免疫防御, 一般通过寄主昆虫对病原菌细胞壁成分的识别来实现, 如细菌胞壁成分脂多糖、肽聚糖及真菌胞壁成分 β -1,3-葡聚糖等^[1, 2]。一些相关的免疫识别蛋白已在一些个体较大的昆虫血淋巴中被分离报道, 如烟草天蛾 (*Manduca sexta*)^[3]、飞蝗 (*Locusta migratoria*)^[4] 和大头折翅蠊 (*Blaberus craniifer*)^[5] 血淋巴中的 β -1,3-葡聚糖结合蛋白, 家蚕 (*Bombyx mori*) 血淋巴中的 β -1,3-葡聚糖结合蛋白^[6] 和肽聚糖结合蛋白^[7], 美洲蜚蠊 (*Periplaneta americana*) 血淋巴中的脂多糖结合蛋白^[8] 等。当入侵病原菌被寄主血淋巴中的结合蛋白所识别时, 便可激活寄主血淋巴的免疫防御系统而引发一系列免疫响应。

虫霉是一类重要的昆虫病原真菌, 其细胞壁的主要组成为 β -1,3-葡聚糖和几丁质^[9, 10], 但许多虫霉入侵寄主后常以原生质体的形式在寄主血腔内大量繁殖, 由于原生质体缺乏细胞壁成分而可逃避寄主的免疫识别^[11]。由于不同菌种 (株) 的细胞壁成分及入侵寄主后的存在形式有所不同, 它们逃避寄主免疫识别的机制也可能存在差异。最近, 我们在研究不同寄主来源的根虫瘟霉 (*Zoophthora radicans*) 菌株感染小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 幼虫时, 发现它们对寄主的毒力差异很大, 源自小菜蛾的菌株对小菜蛾毒力强, 而源自其他寄主的菌株

对小菜蛾毒力较低或很弱^[12]。菌株毒力的强弱是否与其逃避寄主的免疫识别机制相关, 目前还不清楚。本研究以小型鳞翅目昆虫小菜蛾与根虫瘟霉作为免疫互作模型, 通过对幼虫血淋巴中的 β -1,3-葡聚糖结合蛋白分离纯化, 明确其存在部位及免疫特性。同时, 通过根虫瘟霉不同菌株和菌体状态 (菌丝体或原生质体) 在 β -1,3-葡聚糖结合蛋白存在下激活 ProPO 差异的比较, 以揭示虫霉逃避寄主免疫识别的奥秘。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试虫源: 供试小菜蛾幼虫饲养于人工气候室 (23 ~ 25℃, 12L: 12D) 的盆栽甘蓝植株上。将蛹置于 30 cm × 30 cm × 50 cm 的养虫笼内, 羽化后让其产卵于戳有小孔、内置新鲜菜叶的保鲜袋上, 每天取出收集的小菜蛾卵。为维持小菜蛾产卵, 供其 10% 蜂蜜液作为成虫补充营养。卵袋收集后置于卷心菜植株上, 幼虫孵化后任其在叶片上取食。

* 国家自然科学基金资助项目 (30070025), 浙江省自然科学基金资助项目 (302016) 和国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G2000016208-04)。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-86434359, E-mail: xujh@zju.edu.cn

收稿日期: 2003-11-21, 接受日期: 2003-12-29

1.1.2 菌种及来源: 4 株根虫瘟霉供试. 菌株 F99101 自云南高山茶园的假眼小绿叶蝉 (*Empoasca vitis*) 虫尸上分离纯化而得, 菌株 ARSEF1100、ARSEF2699 和 ARSEF1342 由美国农业部昆虫病原真菌收藏中心提供, 其原始寄主分别为小菜蛾 (马来西亚)、小绿叶蝉 (*Empoasca flavescens*, 前南斯拉夫) 和大菜粉蝶 (*Pieris brassicae*, 波兰)^[12]. 上述菌株接种于牛奶蛋黄培养基 SEMA (12% 蛋黄、8% 牛奶、0.8% 蛋白胨、0.8% 酵母粉、3.2% 葡萄糖、1.5% 琼脂) 平板上, 在 21℃ 和 12L:12D 的培养箱中每隔 15 天转接一次继代培养保存.

1.1.3 仪器及试剂: 实验设备包括 12LS 型冷冻干燥系统 (美国 VirTis 公司), Universal 32R 型离心机 (德国 Hettich 公司), Spectronic® Genesys™ 紫外可见分光光度计 (美国 Spectronic Instruments 公司), Hoefer® miniVE 型电泳仪 (瑞士 Pharmacia 公司). 试剂包括 Novozym 234 和 β -1,3-葡聚糖 (Sigma 公司), 标准蛋白为 200 ku 肌球蛋白重链、130 ku 钙调素结合蛋白、97 ku 兔磷酸化酶 B、66.2 ku 牛血清蛋白、43 ku 兔肌动蛋白 (上海实生细胞生物技术有限公司).

1.2 方法

1.2.1 血浆和血细胞的分离: 挑取小菜蛾末龄幼虫约 2 000 头, 用解剖刀切开幼虫体壁, 使血迅速溶入抗凝固缓冲液 (62 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA, 30 mmol/L 柠檬酸三钠, 26 mmol/L 柠檬酸, pH 4.6) 中, 800 g 离心 3 min, 取上清液, 然后 12 000 g 离心 1 min, 取上清液作为血浆, 于 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲溶液中透析 12~16 h. 血细胞沉淀用 0.01 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液 (内含 150 mmol/L CaCl_2 , 0.25 mol/L 蔗糖, pH 7.0) 冲洗 2 次, 再用 0.01 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液 (内含 100 mmol/L CaCl_2 , pH 7.0) 洗一次, 并在同一缓冲液中用玻璃活塞匀浆器搅拌均匀, 所得匀浆液在 12 000 g 下离心 10 min, 上清即为血细胞裂解液. 以上所有步骤均在 4℃ 下进行.

1.2.2 β -1,3-葡聚糖结合蛋白的分离: 采用亲和沉淀法, 用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 50 mmol/L NaCl, 4 mmol/L CaCl_2 , 4 mmol/L MgCl_2 , pH 8.0) 稀释血浆和血细胞裂解液, 终浓度为 0.8 g/L. 然后用昆布多糖 (终浓度为 2.5 g/L) 于室温下孵育 4 h. 孵育液于 4℃ 下

12 000 g 离心 15 min, 去上清. 沉淀物用孵育缓冲液洗 2 次, 并用不含钙和镁的相同缓冲液冲洗 1 次. 最后, 沉淀物溶解在 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0, 含 150 mmol/L NaCl) 中.

1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析: 按 Laemmli 方法^[13] 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析. 所用浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 7.5%. 以上提取所得的样品在还原和非还原条件下进行电泳. 凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色.

1.2.4 根虫瘟霉菌丝及原生质体裂解液制备: 将在 SEMA 平板上培养 10 天的新鲜菌块挑碎后, 移入内含 20 ml 萨氏培养液 SDY (1% 蛋白胨、1% 酵母粉, 4% 葡萄糖和 0.5% 芝麻油) 的 50 ml 锥形瓶中, 21℃ 下振荡 (120 r/min) 培养 1~4 天, 转入 40 ml 培养液中再振荡培养 4~5 天. 所获菌丝液 3 000 g 离心 10 min, 取菌丝沉淀用双蒸水洗 2 次后, 再用渗透压稳定剂 (0.2 mol/L 磷酸缓冲液, 含 0.6 mol/L KCl, pH 6.0) 洗 1 次, 将菌丝悬浮于 5 mg/L 的 Novozym 234 酶的渗透压稳定液中 (浓度为 50 g/L 菌丝湿重), 室温下反应 2 h 后用无菌脱脂棉滤去未酶解的菌丝, 过滤液 12 000 g 离心 10 min. 沉淀的原生质体用渗透压稳定剂冲洗 2 次, 再悬浮于渗透压稳定剂中, 光学显微镜下检测原生质纯度. 所获菌丝和原生质体用超声波破碎后即为相应的裂解液.

1.2.5 酚氧化酶活性测定: 小菜蛾幼虫血细胞裂解液 (内含高浓度的 ProPO) 与等量的 β -1,3-葡聚糖结合蛋白溶液室温反应 10 min, 再加入等量菌丝 (或原生质体) 裂解液, 在 30℃ 下混合反应 1 h, 加入 3 g/L 多巴溶液 (1:3), 紫外分光光度 490 nm 下测定样品 A 值, 并以多巴溶液作对照, 每处理重复 3 次. 一个酶活单位 (U) 定义为每分钟每毫克蛋白质的 A_{490} 值. 采用 Bradford 检测法^[14] 测定各样品的蛋白质浓度, 即以考马斯亮蓝 G250 染色, 在紫外分光光度计下测定样品 A_{595} 值, 并以结晶牛血清白蛋白为标准蛋白, 制定标准曲线.

2 结 果

2.1 β -1,3-葡聚糖结合蛋白的分离纯化及存在部位

用昆布多糖亲和沉淀法处理小菜蛾幼虫血浆和血细胞裂解液, 离心后取其沉淀, 在还原及非还原条件下进行 SDS-PAGE 分析. 结果显示, 血细胞裂解液的沉淀物中不含任何蛋白质, 而在血浆的沉淀物中可见到两条蛋白质条带 (图 1), 其分子量分

别为 83.2 ku 和 79.5 ku。这表明 β -1,3-葡聚糖结合蛋白主要存在于小菜蛾幼虫血浆中, 而不存在于血细胞中。

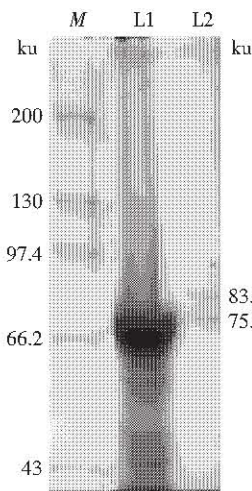


Fig.1 SDS-PAGE of β -1,3-glucan binding proteins
M: Protein molecular mass marker; L1: Plasma; L2: β -1, 3-glucan binding proteins.

2.2 β -1,3-葡聚糖结合蛋白对 ProPO 的免疫激活作用

图 2 所示, β -1,3-葡聚糖结合蛋白的存在可直接影响昆布多糖对小菜蛾幼虫 ProPO 的免疫激活作

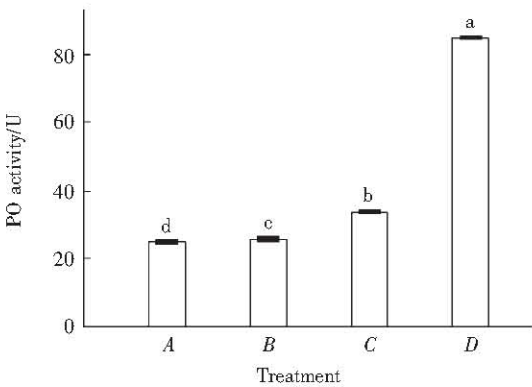


Fig.2 The effect of β -1,3-glucan binding proteins on the PO activity
A: CK; B: β -1,3-glucan binding proteins; C: Laminarin; D: β -1,3-glucan binding proteins plus laminarin. The bars with different lowercase letters were significantly different in height ($P < 0.05$).

用。方差分析表明, β -1,3-葡聚糖结合蛋白的不同处理间存在极显著差异 ($F_{3,8} = 34\ 905, P < 0.01$)。其中, β -1,3-葡聚糖结合蛋白和昆布多糖共同存在

时, 对小菜蛾幼虫血细胞裂解液中 ProPO 的免疫激活作用最强, 显著高于其他各处理。此外, 昆布多糖单独存在时也能激活小菜蛾幼虫血细胞裂解液中 ProPO, 其 PO 活性显著高于 β -1,3-葡聚糖结合蛋白所激活的 PO 活性。而后者与对照无显著差异。这表明, β -1,3-葡聚糖结合蛋白对 ProPO 的激活必须有真菌细胞壁成分 β -1,3-葡聚糖的存在。

2.3 菌丝裂解液激活的 PO 活性

在 β -1,3-葡聚糖结合蛋白存在或不存在的条件下, 各根虫瘟霉菌株的菌丝裂解液对小菜蛾幼虫血淋巴中 ProPO 免疫激活后 PO 活性的差异见表 1。结果表明, β -1,3-葡聚糖结合蛋白存在与否极显著影响根虫瘟霉菌丝裂解液对 ProPO 的免疫激活作用 ($F_{1,20} = 828, P < 0.01$), 对 ProPO 免疫激活作用的显著差异也存在于不同根虫瘟霉菌株的菌丝裂解液之间 ($F_{4,20} = 5\ 748, P < 0.01$), 及菌株裂解液与结合蛋白的不同组合间 ($F_{4,20} = 65, P < 0.01$)。其中, 菌株 ARSEF1342 的菌丝裂解液所激活的 PO 活性显著高于其他菌株的菌丝裂解液, 而对照所激活的 PO 活性显著低于各菌株菌丝裂解液所激活的 PO 活性, 尤以 β -1,3-葡聚糖结合蛋白不存在时的 PO 活性为最低。按显著性差异, 各菌株间所激活的 PO 活性由高到低依次为: ARSEF1342 > ARSEF2699 > F99101 > ARSEF1100。

Table 1 The effect of *Z. radicans* mycelial lysates on the PO activity in the hemocytes of *P. xylostella* in absence or presence of β -1,3-glucan binding proteins

Isolates tested	PO activity/U	
	Absence of binding protein	Presence of binding protein
ARSEF1100	38.65 $\pm$ 0.83 d B	42.22 $\pm$ 0.06 c A
F99101	42.22 $\pm$ 0.70 c B	48.48 $\pm$ 0.06 b A
ARSEF2699	46.25 $\pm$ 0.77 b B	49.44 $\pm$ 0.13 b A
ARSEF1342	50.46 $\pm$ 0.13 a B	60.43 $\pm$ 0.64 a A
CK	15.39 $\pm$ 0.06 e B	17.53 $\pm$ 0.26 d A

Means ($\bar{x} \pm s$) with different lowercase letters in each column or those with different uppercase letters in each line differed significantly ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test after two-way analysis of variance.

2.4 菌丝与原生质体裂解液激活 PO 活性的比较

在 β -1,3-葡聚糖结合蛋白存在的条件下, 根虫瘟霉菌丝裂解液与原生质体裂解液对血淋巴中 ProPO 免疫激活作用的影响见表 2。菌体类型对 PO 激活作用的差异极其显著 ($F_{1,20} = 3\ 811, P <$

0.01), 即菌丝裂解液引起的 PO 活性显著高于原生质体引起的酶活. 同时, 在根虫瘟霉不同菌株 ($F_{4, 20} = 684, P < 0.01$) 及菌株与裂解液的不同组合 ($F_{4, 20} = 259, P < 0.01$) 之间, ProPO 被免疫激活的水平也存在显著差异. 其中, 对照所激活的 PO 活性大大低于各菌株菌丝裂解液, 但与原生质体裂解液激活的 PO 活性相比差异较小. 各菌株间所激活的 PO 活性从高到低依次为: ARSEF1342 > ARSEF2699 > F99101 > ARSEF1100.

Table 2 Comparison of the PO activities in the hemocytes of *P. xylostella* larvae triggered by *Z. radicans* mycelial or protoplast lysates at the presence of β -1, 3-glucan binding protein

Isolates tested	PO activity/U	
	Mycelial lysate	Protoplast lysate
ARSEF1100	50.63 $\pm$ 0.51 d B	36.23 $\pm$ 1.31 d A
F99101	56.93 $\pm$ 0.22 c B	38.50 $\pm$ 0.15 c A
ARSEF2699	60.90 $\pm$ 1.46 b B	40.67 $\pm$ 0.29 b A
ARSEF1342	63.53 $\pm$ 1.82 a B	42.94 $\pm$ 0.88 a A
CK	35.51 $\pm$ 0.29 e	35.51 $\pm$ 0.29 d

Means ($\bar{x} \pm s$) with different lowercase letters in each column or those with different uppercase letters in each line differed significantly ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test after two-way analysis of variance.

3 讨 论

β -1,3-葡聚糖结合蛋白是昆虫体内重要的免疫识别因子. 但该蛋白 rfm 在昆虫体内存在的部位报道不一, 如免疫细胞化学定位分析发现该蛋白 rfm 不仅位于昆虫血浆中, 而且还存在于昆虫的粒细胞和小球细胞中^[15]. 但是, RNA 印迹杂交却显示家蚕体内的 β -1,3-葡聚糖结合蛋白最初起源于脂肪体, 后再分泌释放到血淋巴中^[3]. 本研究用昆布多糖(可溶性 β -1,3-葡聚糖)亲和沉淀法从小菜蛾血浆中分离获得了蛋白质复合物, 分别由分子质量为 75.9 ku 和 83.2 ku 的两种蛋白质组成. 这与已报道飞蝗血浆中的结合蛋白(260 ku 和 85 ku)部分相似^[4]. 但该蛋白质复合物不同于其他昆虫中所发现的同类蛋白质, 如在家蚕、烟草天蛾及大头折翅蛾中分离的 β -1,3-葡聚糖结合蛋白是单体, 分子质量分别为 62 ku、53 ku 和 90 ku^[3, 5, 15].

在昆虫及其他节肢动物中, β -1,3-葡聚糖结合蛋白是酚氧化酶原激活系统(ProPO-AS)的组成部分^[7, 16]. 这类结合蛋白通常含有一个羧基端葡聚糖酶类似区, 其氨基酸序列分别与细菌、海胆来源的

β -1,3-葡聚糖酶相似^[17, 18], 但后者缺乏葡聚糖酶的活性, 其原因是催化位点的关键氨基酸残基被取代. 此外, β -1,3-葡聚糖结合蛋白在氨基端还具有一个由 100 个氨基酸残基组成的独特序列, 该序列对 β -1,3-葡聚糖具有很高的亲合力, 能特异性地结合 β -1,3-葡聚糖. 因此, 在 β -1,3-葡聚糖存在的条件下结合蛋白能强烈激活存在于血细胞中的 ProPO, 而它本身并不能诱导激活 ProPO^[5, 19], 这不失为寄主免疫防御及自我保护的一种有效策略. 据此, 可以对小菜蛾幼虫血淋巴的免疫防御系统作如下假设, 即当根虫瘟霉入侵小菜蛾幼虫时, 其胞壁成分 β -1, 3-葡聚糖与小菜蛾血浆中 β -1,3-葡聚糖结合蛋白进行免疫识别, 并通过某些途径与血细胞中的 ProPO 作用, 激活产生 PO. 但免疫识别后如何与 ProPO 发生作用, 目前还很难回答. 最近有研究报道称, 蚊子的免疫识别首先通过与丝氨酸蛋白酶作用, 然后作用于 ProPO, 使无活性的 ProPO 转化为有活性的 PO^[20].

在 β -1,3-葡聚糖结合蛋白存在的条件下, 根虫瘟霉原生质体裂解液激活的 PO 活性大大低于菌丝裂解液所激活的 PO 活性, 这充分说明虫霉侵入寄主血腔后以原生质体的形式繁殖可逃避寄主免疫识别. 在对灯蛾噬虫霉(*Entomophaga auilcae*)菌丝体和原生质体表面的超薄切片和生化研究中, β -1,3-葡聚糖被发现存在于菌丝体壁上, 而难见于原生质体表面^[21]. 同样, 根虫瘟霉原生质体因无细胞壁而缺少 β -1,3-葡聚糖, 可逃避寄主的免疫识别, 也不会激活小菜蛾幼虫血淋巴中的酚氧化酶激活系统. 不同根虫瘟霉菌株由于胞壁成分的可能差异, 在激活 PO 活性方面也存在差异, 而且与它们对小菜蛾的毒力趋势吻合, 说明虫霉在逃避寄主免疫识别上的差异与它们对寄主的毒力差异是相关联的.

参 考 文 献

1 Ashida M, Brey P. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey P, Hultmark D, eds. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. London: Chapman and Hall, 1998. 135 ~ 172

2 Yu X Q, Zhu Y F, Ma C, et al. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32 (10): 1287 ~ 1293

3 Ma C-C, Kanost M R. A β -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. J Biol Chem, 2000, 275 (11): 7505 ~ 7514

4 Duvic B, Brehélin M. Two major proteins from locust plasma are involved in coagulation and are specifically precipitated by laminarin, β -1,3-glucan. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 28 (12): 959 ~ 967

- 5 Söderhäll K, Rögener W, Söderhäll I, *et al.* The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β -1, 3-glucan. *Insect Biochemistry*, 1988, **18** (3): 323 ~ 330
- 6 Ochiai M, Ashida M. Purification of β -1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem*, 1988, **263** (24): 12056 ~ 12062
- 7 Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M. Purification of peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem*, 1996, **271** (23): 13854 ~ 13860
- 8 Jomori T, Natori S. Molecular cloning of cDNA for lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana*. Similarity of the protein with animal lectins and its acute phase expression. *J Biol Chem*, 1991, **266** (20): 13318 ~ 13323
- 9 Cabib E, Bowers B, Sburlati A, *et al.* Fungal cell wall synthesis: the construction of abiological structure. *Microbiological Sciences*, 1988, **5** (12): 370 ~ 375
- 10 Boucias D G, Pendland J C. The fungal cell wall and its involvement in the pathogenic process in insect hosts. In: Latge J P, Boucias D G, eds. *Fungal Cell Wall and Immune Response*. Heidelberg: Springer-Verlag KG, 1991, 303 ~ 316
- 11 Butt T M, Beckett A, Wilding N. Protoplasts in the *in vivo* live cycle of *Erynia neoaphidis*. *J Gen Micro*, 1981, **127** (2): 417 ~ 421
- 12 刘青娥, 徐均焕, 冯明光. 不同寄主来源的根霉菌株对小菜蛾幼虫的毒力比较. *昆虫学报*, 2003, **46** (4): 447 ~ 453
Liu Q E, Xu J H, Feng M G. *Acta Entomologica Sinica*, 2003, **46** (4): 447 ~ 453
- 13 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (259): 680 ~ 685
- 14 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1/2): 248 ~ 254
- 15 Ochiai M, Niki T, Ashida M. Immunocytochemical localization of β -1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res*, 1992, **268** (3): 431 ~ 437
- 16 Satoh D, Horii A, Ochiai M, *et al.* Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori* purification, characterization and cDNA cloning. *J Biol Chem*, 1999, **274** (11): 7441 ~ 7453
- 17 Yahata N, Watanabe T, Nakamura Y, *et al.* Structure of the gene encoding β -1, 3-glucanase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. *Gene*, 1990, **86** (1): 113 ~ 117
- 18 Bachman E S, McClay D R. Molecular cloning of the first metazoan β -1,3-glucanase from eggs of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1996, **93** (13): 6808 ~ 6813
- 19 Duvic B, Söderhäll K. Purification and characterization of β -1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem*, 1990, **265** (16): 9372 ~ 9382
- 20 Gorman M J, Paskewitz S M. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, **31** (3): 257 ~ 262
- 21 Beauvais A, Paullatgé J P, Vey A, *et al.* The role of surface components of the entomopathogenic fungus *Entomophaga aulicae* in the cellular immune response of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J Gen Micro*, 1989, **135** (2): 489 ~ 498

Extraction of β -1,3-Glucan Binding Proteins From The Lymphocytes of *Plutella xylostella* larvae and Their Immune Response to *Zoophthora radicans* Infection*

LIU Qing-E^{1,2)}, XU Jun-Huan^{1)*}, FENG Ming-Guang¹⁾

⁽¹⁾ Institute of Microbiology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

⁽²⁾ Department of Biology, Lishui Teachers College, Lishui 323000, China)

Abstract Two major β -glucan binding proteins (β -GBPs), 75.9 ku and 83.2 ku, were extracted from the hemolymph of *Plutella xylostella* larvae by using β -1,3-glucan affinity precipitation method. The proteins were present in plasma but absent in haemocytes. The β -GBPs had a specific affinity to β -1, 3-glucan, a prophenoloxidase (ProPO) trigger in *P. xylostella* hemolymph. The phenoloxidase (PO) activity induced by the coexistence of both β -GBPs and β -1,3-glucan was significantly higher than that by the β -GBPs or β -1,3-glucan alone. Moreover, the PO activities induced by mycelial lysates of four *Zoophthora radicans* isolates at the presence of β -GBPs were much higher than that triggered by their protoplast lysates. The results indicate that the β -GBPs may trigger the ProPO activity in *P. xylostella* hemolymph only if they specifically recognized β -1,3-glucan from *Z. radicans* cell walls. This is a proof for a hypothesis that entomophthoralean protoplasts may evade from insect host immune defense. The protoplast or mycelial lysates of different *Z. radicans* isolates differed in ability to trigger the PO activities in the following order: ARSEF1342 > ARSEF2699 > F99101 > ARSEF1100. This trend was in accordance with that of their virulence to *P. xylostella* larvae, suggesting a possible relationship between host immune defense and fungal virulence.

Key words *Plutella xylostella*, β -1,3-glucan binding proteins, *Zoophthora radicans*, mycelium, protoplast, insect immunity, entomophthorales

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30070025), The Natural Science Foundations of Zhejiang Province (302016), The Special Funds for Major State Basic Research of China (G2000016208-04).

** Corresponding author. Tel: 86-571-86434359, E-mail: xujh@zju.edu.cn

Received: November 21, 2003 Accepted: December 29, 2003