

寄生蜂毒液蛋白的研究进展

朱家颖 叶恭银* 胡 萃

(浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310029)

摘要: 寄生蜂毒液蛋白具有抑制寄主血细胞免疫、调控寄主生长发育、抑制寄主生殖系统发育、调节寄主内分泌等功能,但一直以来对其组成成分知之甚少。近年来,不仅研究了寄生蜂毒液蛋白的生化特性,而且通过分离纯化、酶活测定、基因克隆等方法明确了寄生蜂毒液的部分蛋白组分。根据这些毒液蛋白性质和功能,可将其分为麻痹毒素、抗菌活性物质、酶类、酶的抑制剂等,它们在害虫生防、药理学和生理学研究中有广阔的应用前景。该文作者就国内外对寄生蜂毒液蛋白组成成分的研究进展进行了综述,并对其应用前景进行了简要探讨。

关键词: 寄生蜂; 毒液; 蛋白质; 生化特性; 基因

Research progress on venom proteins of parasitic Hymenoptera

Zhu Jiaying Ye Gongyin* Hu Cui

(Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China)

Abstract: Venom proteins from parasitoid wasps are with the capability of regulating the hosts by affecting their hemocyte immunity, development and reproduction involving impacts on their endocrine system of providing a suitable environment for the offspring of parasitoids successfully fulfilling their life history, while their components are little known. In recent years, the biochemical properties of parasitoid wasp venom proteins are being actively investigated and their nature is gradually uncovered by purification, enzymatic assays, gene cloning, etc. According to their biochemical characterizations and physiological functions, venom proteins can be divided into toxins, antibacterial substances, enzymes, enzyme inhibitors and the others, which are potential sources of biological control, medical and physiological agents. In this article, the research progresses on the biochemical and molecular characteristics of the parasitoid wasp venom proteins are reviewed and the prospects of their potential use are discussed.

Key words: parasitoid wasp; venom; protein; biochemical property; gene

随着人类生活水平的提高,国际社会的广大公众对农产品安全性的要求日趋严格,对大幅度降低其化学农药污染与残留的期望日益迫切。自20世纪90年代以来,世界各国尤其是发达国家先后提出了倡导生物防治和农业防治为主的害虫治理策略,以减少化学农药用量的短期和长期行动计划。尽管如此,迄今生产上害虫防治仍过多依赖于化学农药,化学农药销售和用量仍有增无减,农药残留超

标问题尚未根本解决。寄生蜂是重要的害虫天敌资源,在减少化学农药使用 and 环境污染方面有着重要作用。然而,在生物防治中,至今仍大多使用寄生蜂个体防治害虫,这样其生产规模往往难以扩大,大田使用时还会受环境因子等影响而失去应有的效果。寄生蜂在寄生过程中把多种寄生因子注入寄主体内,调节寄主生长发育、调控寄主血淋巴营养成分以及扰乱寄主生殖和内分泌系统等以保证其后代在寄

基金项目:国家自然科学基金项目(30170626),教育部“新世纪人才支持计划”(NCET-05-0513)

作者简介:朱家颖,男,1984年生,博士研究生,研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, email: jiayingzhu001@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Author for correspondence), email: chu@zju.edu.cn

收稿日期:2008-05-07

主血腔或体表正常发育,这些寄生因子包括毒液(venom)、多分 DNA 病毒(polydnavirus, PDV)、类病毒颗粒(virus like particles, VLPs)、类病毒纤丝(virus like filaments, VLFs)、卵巢蛋白(ovarian proteins, OP)、畸形细胞(teratocyte)及其分泌蛋白(teratocyte secretory proteins, TSP)、卵表面的保护物和幼虫分泌物等^[1-3]。因为这些寄生因子有特殊的生理功能,若能结合现代生物技术,以这些活性物质为资源研制新型生防制剂或转基因作物,将有害虫生物防治开辟新的途径。为了明确它们的本质,自 20 世纪 80 年代起学术界对寄生蜂与寄主相互作用关系开展了大量的研究,特别是近十几年来发展十分迅速。国内外已先后对 20 余种内外寄生蜂如何干扰抑制寄主免疫和调控寄主生长发育等方面作了不同程度的研究,而寄生因子的生化与分子特性方面,对 PDV 和 VLPs 的研究相对较多,如 Espagne 等^[4]对甘蓝夜蛾盘绒茧蜂 *Cotesia congregata* 的 PDV 进行了全基因组测序,并且已明确许多 PDV 基因的结构和功能。毒液作为寄生蜂重要的寄生因子,能单独或与其它寄生因子互作对寄主起多种生理作用,其主要组分为蛋白质。近年来,对毒液蛋白生化与分子特性方面的研究也已取得了巨大进展,尤其是在茧蜂科 Braconidae 和姬蜂科 Ichneumonidae 的毒液中鉴定出了多种蛋白质和酶类^[3, 5],但目前这方面的研究工作尚十分薄弱。为此,作者主要就寄生蜂毒液蛋白的国内外研究概况作一综述,以增加人们对这一研究领域的认识,并对其应用前景进行了简要探讨。

1 生化特性

寄生蜂毒液蛋白主要为酸性蛋白。经双向电泳分析,蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum*、丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 和顎茧蜂 *Asobara tabida* 毒液蛋白等电点分别主要集中在 4~7、5~8^[6-7] 和 5.1~6.5 之间^[8]。从近曲斑甲腹茧蜂 *Chelonus* sp. near *curvimaculatus* 毒液中分离到的 52 kD 蛋白等电点在 4.8~5.0 之间,菜粉蝶微红盘绒茧蜂 *Cotesia rubecula* 的毒液蛋白 Vn1.4 和 Vn1.5 分别为 3.99 和 10.01,米蛾小茧蜂 *Microbracon hebetor* 的 2 个毒液蛋白 A-MTX 和 B-MTX 等电点为 6.85 和 6.62^[9-12]。迄今研究过的寄生蜂毒液中均存在大于 100 kD 的高分子量蛋白,有些寄生蜂毒液中只存在高分子量蛋白,如近曲斑甲腹茧蜂、麦蛾茧蜂 *Bracon hebetor* 和

菜粉蝶绒茧蜂 *Apanteles glomeratus* 等的毒液蛋白分子量都大于 10 kD^[13-14]。除高分子量蛋白外,某些寄生蜂毒液中也存在多肽(<10 kD),如东方旋小蜂 *Eupelmus orientalis*、瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca*、顎茧蜂、菜粉蝶微红盘绒茧蜂、蝶蛹金小蜂、丽蝇蛹集金小蜂和颈双缘姬蜂 *Diadromus collaris* 等^[7, 11-12, 15-20]。有少数研究表明,某些寄生蜂毒液蛋白具有翻译后修饰现象,如糖基化和磷酸化^[13, 21-24]。此外,不同寄生蜂毒液蛋白之间拥有共同的抗原决定簇,寄生蜂毒液蛋白与其它物种毒液蛋白之间也存在相同的抗原决定簇。例如,棉铃虫裹尸薄茧小蜂 *Euplectrus comstockii* 33 kD 毒液蛋白抗体能与粘虫裹尸薄茧小蜂 *Euplectrus plathypenae* 中的 3 个毒液蛋白结合;近曲斑甲腹茧蜂毒液抗体能与蚂蚁、黄蜂和蜜蜂毒液蛋白结合;意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 毒液多抗能和东方旋小蜂的 4 个毒液蛋白结合^[13, 15, 25]。此外,研究还发现黑唇姬蜂 *Campoletis sonorensis* 的毒液蛋白还和其 PDV 以及卵巢蛋白具有共同的抗原决定簇^[26]。这些现象的存在,有助于研究寄生蜂毒液蛋白的组成成分,但值得注意的是这些免疫交叉反应有可能并非由于蛋白之间的氨基酸相同所致,而是由毒液蛋白的翻译后修饰所产生。毒液蛋白之间拥有相同的抗原决定簇的现象在蛇、胡蜂、蜜蜂等物种中很普遍,而且在进化上相近的物种之间表现更明显,但在寄生蜂中可能与此不同,它们涉及到与寄主相互协同进化的因素。如同属于同一个科的内寄生蜂与外寄生蜂,即使它们拥有相同的寄主,且都寄生相同发育阶段的寄主,因寄生方式不同它们在毒液蛋白组分上也存在较大差异。然而,如果寄主相同的寄生蜂,且它们的寄生方式和寄生寄主的发育阶段相同,即使属于不同的科,它们也拥有更多相同或相近的蛋白成分。

2 麻痹毒素

在寄生蜂毒液中存在一类很特殊的蛋白,该类毒液蛋白一般作用于寄主的中枢神经系统或神经-肌肉系统,起麻痹作用,这种作用有的是暂时的,有的是永久性不可逆转的,能使寄主很快死亡。现已从麦蛾茧蜂和米蛾小茧蜂毒液中分离得到 7 个具麻痹作用的毒液蛋白(表 1)。Brh-I、Brh-III、Brh-V、BrhTX-1 和 BrhTX-2 具有很强的杀虫活性,对 6 种夜蛾科幼虫的 LD₅₀ 小于 0.3 μg/g,其中 Brh-I 的活性最强,LD₅₀ 可达 2 pmol/g; BrhTX-1 的部分序列和磷

酸酯酶 A2 以及糜蛋白酶的部分序列相似^[14,27]。A-MTX 和 B-MTX 具有麻痹作用,其活性能被蛋白水解酶(proteolytic enzyme)和二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)所抑制,B-MTX 比 A-MTX 耐抑制,它们在

氨基酸组成上十分相似^[9]。一般具有麻痹作用的毒液蛋白只存在于外寄生蜂中,但在内寄生的瘤姬蜂中也发现了 2 个具该作用的 22 和 27 kD 毒液蛋白^[16, 28]。

表 1 寄生蜂毒液中的麻痹毒素
Table 1 Paralytic toxins from venom of parasitoids

物种 Specie	名称 Toxin name	登录号 Accession no.	分子量 MW (kD)
麦蛾茧蜂 <i>Bracon hebetor</i> ^[14]	Brh-I	AAB33954	73
	Brh-III	AAB33956	73
	Brh-V	AAB33955	73
	BrhTX-1	AAB15687	15, 17, 21, 34 (4 个亚基 Four subunits)
	BrhTX-2	AAB15688	17, 18.5, 21, 34 (4 个亚基 Four subunits)
米蛾小茧蜂 <i>Microbracon hebetor</i> ^[9]	A-MTX		43.7
	B-MTX		56.7
瘤姬蜂 <i>Pimpla hypochondriaca</i> ^[16, 28]			22, 27

3 抗菌活性物质

抗菌肽能在包括细菌、真菌、昆虫、被囊动物、两栖类动物、甲壳类动物、鸟类、鱼类、哺乳动物(包括人类)以及植物在内的所有生物体中产生,蛇、胡蜂、蜜蜂等毒液中蕴含着丰富的抗菌肽资源,最近研究发现寄生蜂毒液中也存在抗菌活性物质。利用革兰氏阴性菌(大肠杆菌 *Escherichia coli*、油菜黄单胞菌 *Xanthamonas campestris* 和丁香假单孢菌 *Psuedomonas syringae*)以及革兰氏阳性菌(蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*)测定瘤姬蜂毒液的抗菌活性,该蜂毒液能抗大肠杆菌和油菜黄单胞菌^[17]。邴卫弟^[19]也发现颈双缘姬蜂的毒液对大肠杆菌有抗菌活性。迄今为止,尚未从寄生蜂毒液中分离得到真正的抗菌肽。虽然寄主的免疫系统可以抵御异物入侵,并清除血腔内的致病微生物,但当寄生蜂成功寄生时,其抗菌功能将减弱或丧失,Bucher^[29]还报道寄生蜂在寄生时能把病原菌传给寄主。毒液里的抗菌活性物质可能起到阻止病原菌在寄生蜂寄生时侵入寄主的作用,以保证寄生蜂后代在寄主体内存活。

4 酶类及其抑制剂

社会性膜翅目昆虫毒液中普遍存在磷酸酯酶、羧酸酯酶、溶血磷脂酶和透明质酸酶,寄生蜂毒液中也存在大量酶类,现已通过酶活测定、基因序列分析和免疫染色等方法鉴定出 10 余种酶类(表 2)。大

多数寄生蜂毒液蛋白酶类具有水解酶活性,对高温敏感,能在寄主体内起多种多样的功能^[17]。顎茧蜂中的天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶可能具有产生天冬氨酸和神经传递介质的作用,该酶由 18 kD 和 30 kD 的两个亚基组成,N 端序列中具有几个保守的与其底物结合的氨基酸位点^[18, 30];无网长管蚜茧蜂 *Aphidius ervi* 中的 γ -谷氨酰转肽酶通过扰乱寄主谷胱甘肽的代谢而引起寄主卵巢细胞凋亡^[31];近曲斑甲腹茧蜂中的几丁质酶和东方旋小蜂中的透明质酸酶具有细胞毒性和组织裂解作用^[10, 15];瘤姬蜂中的酚氧化酶和漆酶可能能扰乱寄主的免疫系统,海藻糖酶可能起分解寄主血淋巴中的海藻糖为寄生蜂卵的发育提供碳源的作用,肽链内切酶和氨肽酶因具切割蛋白质和多肽的功能可能在血细胞信号传导中起作用,丝氨酸蛋白酶能抑制寄主血淋巴黑化,金属蛋白酶基因序列的部分区域与去整合类似蛋白相同而可能具有抑制寄主免疫的作用^[17, 21, 32-34]。寄生蜂毒液中的有些酶类,虽然能从毒腺中克隆到基因序列,但不能通过测定酶活性的方式检测其存在,这可能是由于该酶以前体或非活性形式贮存在毒囊中的缘故。在顎茧蜂中,利用人的透明质酸酶抗体能检测到该蜂毒液有透明质酸酶存在,但利用酶活测定的方法检测不到该蜂毒液具有透明质酸酶活性^[18]。同样,瘤姬蜂中也检测不到其毒液具有丝氨酸蛋白酶活性。在基因结构上,寄生蜂毒液中的某些酶类基因序列和其它昆虫的同类酶之间存在较大差异。如,酚氧化酶基因一般存在于血细胞或血淋巴中,无

表 2 寄生蜂毒液中的酶类
Table 2 Enzymes reported in venom of parasitoids

物种 Specie	酶名称 Enzymes name	分子量 MW (kD)
顎茧蜂 <i>Asobara tabida</i> ^[18]	天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶 Aspartylglucosaminidase	18, 30 (2 个亚基 Two subunits)
无网长管蚜茧蜂 <i>Aphidius ervi</i> ^[31]	γ -谷氨酰转肽酶 γ -glutamyl transpeptidase	56.9
麦蛾茧蜂 <i>Bracon hebetor</i> ^[27]	磷酸酯酶 A2 Phospholipase A2	21, 22 (2 个亚型 Two subtypes)
	内肽酶 Endopeptidase	34
近曲斑甲腹茧蜂	几丁质酶 Chitinase	52
<i>Chelonus</i> sp. near <i>curvimaculatus</i> ^[10]		
东方旋小蜂	透明质酸酶 Hyaluronidase	
<i>Euplectrus orientalis</i> ^[15]	磷酸酯酶 Phospholipase	
丽蝇蛹集金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i> ^[24]	酚氧化酶 Phenoloxidase	68, 160
瘤姬蜂	酚氧化酶 I, II, III Phenoloxidase I, II, III	79, 79.3, 79.5
<i>Pimpla hypochondriaca</i> ^[17, 21, 33-35]		(3 个亚型 Three subtypes)
	丝氨酸蛋白酶 Serine protease	28,30 (同工 Isoforms)
	金属蛋白酶 Metalloprotease	39.9
	海藻糖酶 Trehalase	61
	漆酶 Laccase	76
	血管紧张肽转化酶 Angiotensin-converting enzyme	74
	内肽酶 Endopeptidase	
	氨肽酶 Aminopeptidase	
	酸性磷酸酶 Acid phosphatase	
	β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	
	酯酶 Esterase	
	β -半乳糖苷酶 β -galactosidase	
	酯酶脂肪酶 Esterase lipase	
	脂肪酶 Lipase	
	1-萘酚-AS-B1-磷酸水解酶	
	1-naphthol-AS-B1-phosphohydrolase	
	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	
	亮氨酸氨基转移酶 Leucine arylamidase	
	胱氨酸氨基转移酶 Cystine arylamidase	
	α -糜蛋白酶 α -chymotrypsin	
蝶蛹金小蜂	酸性磷酸酶 Acid phosphatase	
<i>Pteromalus puparum</i> ^[7]	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	
	酯酶 Esterase	
	磷酸酯酶 A Phospholipase A	
	磷酸二酯酶 Phosphodiesterase	
	广谱蛋白酶 Protease	

信号肽,对细胞无毒性作用,N 端有蛋白水解酶的酶切位点,需外源蛋白酶激活才能够表现活性,而瘤姬蜂中的酚氧化酶在基因结构上与此相反,以活性形

式存在于毒液中^[33]。Abt 等^[24]还发现寄生蜂毒液中的酚氧化酶对寄主血细胞具有毒性。除以上所述的酶类具有生理活性外,其它许多已经检测到的寄

生蜂毒液酶类还没有相应的功能研究报道,其中部分酶类可能起维持其它毒液蛋白活性的功能^[7, 35-36]。例如,在瘤姬蜂毒液中存在大量的酸性磷酸酶,它的最适 pH 值为 4.8,但其寄主血淋巴的 pH 值为 6.7,因此它很难在寄主体内发挥相应的酶活力,研究也表明该酶对寄主血细胞不存在毒性,它的功能很有可能是维持毒液的 pH 值,从而保持其它毒液成分的活性。此外,其它膜翅目昆虫毒液在相近的种之间存在相同的酶类(如中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 和意大利蜜蜂),但不同的寄生蜂毒液中,其酶类呈现出多样性,这可能是寄生蜂与寄主长期协同进化的结果。

除蛋白酶外,寄生蜂毒液中还可能存在蛋白酶抑制剂,它们可能直接作用于寄主,也可能起保持或修饰毒囊中其它毒液蛋白活性的作用。Parkinson 等^[37]从瘤姬蜂中获得几个富含半胱氨酸的毒液蛋白基因,从基因结构上推断它们与胰蛋白酶抑制剂和类似 Kunitz 抑制剂相似。同时,其中一类似 pacifastin 的毒液蛋白可能起抑制该蜂毒液中的酚氧化酶活性的作用。

5 其它毒液蛋白

除麻痹毒素、抗菌活性物质、酶类及其抑制剂外,现已从寄生蜂毒液中分离纯化或是从毒腺 cDNA 文库测序获得了不少毒液蛋白(表 3)。Taylor 等^[38]于 1990 年第一次从近曲斑甲腹茧蜂毒液中分离得到了一个 32.5 kD 的蛋白,该蛋白占总毒液蛋白的 25%,每个毒囊中含 3~6 pmol,分子内无二硫键,离体活性和全毒液相似。此后, Jones 等^[39]又从此蜂中克隆到第一个寄生蜂毒液蛋白基因序列,分子量为 33 kD,编码一个信号肽,有 α 螺旋、 β 折叠、转角等二级结构,紧接 N-端有一由一系列带电串联重复序列组成的 5 000 kD 疏水结构域,该蛋白和墨西哥利什曼原虫 *Leishmania amazonensis* 免疫保护表面糖基化蛋白相似,具体功能尚不清楚,但该蜂卵的成功发育必须有该蛋白的存在。Strand 等^[40]制备了埃及粘虫侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor* 2 个主要毒液蛋白(64.5 和 30.8 kD)的单克隆抗体,利用这两个抗体,通过酶联免疫的方法测定了该蜂每次注入寄主体内的毒液量为 0.02~0.05 个毒囊当量,毒液在寄主体内存留的时间为 12 h。棉铃虫裹尸薄茧小蜂毒液中的 66 kD 蛋白仅需纳克级的量就能够阻止粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 4 龄幼虫蜕皮,但该蛋

白对温度、pH 值、有机溶剂和蛋白酶敏感^[41]。姬小蜂 *Eulophus pennicornis* 中的 43~158 kD 毒液蛋白也能抑制寄主番茄夜蛾 *Lacanobia oleracea* 的生长发育^[42]。无网长管蚜茧蜂毒液中的 21 和 36 kD 蛋白能引起寄主无网长管蚜 *Acyrtosiphon pisum* 血细胞凋亡^[43]。菜粉蝶微红盘绒茧蜂中的 4.6 kD 毒液蛋白(Vn4.6),其基因上游序列部分与该蜂 PDV 蛋白 Crp32 的相同,氨基酸序列中有 4 个半胱氨酸,能形成类似胰蛋白酶抑制剂的分子内二硫键,可以抑制寄主血淋巴的酚氧化酶活性^[11]。该蜂的 1.598 kD 毒液蛋白(Vn1.5),仅含 14 个氨基酸,是该蜂 PDV 基因在寄主血细胞中表达的必须蛋白^[12]。Asgari 等^[22]还从该蜂毒液中分离得到一 50 kD 的蛋白(Vn50),其 C 端有一个丝氨酸蛋白酶结构域, N 端有一个剪切结构域,但该蛋白与其它丝氨酸蛋白酶相比在丝氨酸蛋白酶结构域中缺少一个丝氨酸,它能抑制酚氧化酶前体的激活,从而抑制血细胞黑化现象的产生。Vn4.6 和 Vn50 在扰乱寄主免疫功能时,均与 PDV 和萼液蛋白一起发生协同作用^[11, 21]。毒液蛋白研究最清楚的寄生蜂应属瘤姬蜂, Parkinson 等^[28]检测到该蜂的 12 kD 毒液蛋白能抑制寄主血细胞酚氧化酶活性,小于 13 kD 的毒液蛋白组分不仅能抑制寄主血细胞酚氧化酶活性,还对 SF 21 细胞系有毒性作用。Dani 等^[17]从该蜂中还分离得到另一具蛋白酶水解活性的 74 kD 毒液蛋白。此外,利用该蜂毒腺 cDNA 文库随机测序的方法,还在该蜂中获得了类似 atracotoxin(4.265 kD)和芋螺毒素(10.354 kD)的毒液蛋白^[34, 37]。Labrosse 等^[23]从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的环腹瘿蜂 *Leptopilina boulardi* 毒液中分离到一 35 kD 的 P4 蛋白, P4 在 30 到 208 个氨基酸之间有一 Ras 类似 GTP 酶激活蛋白(Ras homologous GTPase Activating Protein, RhoGAP)结构域。在原核细胞中, RhoGAP 通过控制肌动蛋白来影响细胞的粘着能力和细胞形态, P4 蛋白因这一特殊的结构域,对果蝇幼虫血细胞也有相应的功能。

6 应用前景

寄生蜂毒液因内含丰富多样的活性物质,在害虫生防、药理学和生理学研究中具有广阔的应用前景。瘤姬蜂毒液可提高番茄夜蛾幼虫对蜡状芽孢杆菌和白僵菌的敏感性^[44],微孢子虫对寄生蜂 PDV 和毒液处理的昆虫有更好的杀虫效果^[45],寄生蜂毒

表 3 寄生蜂毒液蛋白组分的特性与功能
Table 3 Venom proteins characterized in different parasitoids

物种 Specie	分子量 MW (kD)	分离方法 Method of identification	功能 Function
无网长管蚜茧蜂 <i>Aphidius ervi</i> ^[43]	21, 36	高效液相色谱 HPLC (high performance liquid chromatography) with Sephadex G-75	引起细胞凋亡 Induce cellular apoptosis
近曲斑甲腹茧蜂 <i>Chelonus</i> sp. near <i>curvimaculatus</i> ^[38-39]	33	高效液相色谱 HPLC with Mono-Q column	寄生蜂卵存活所需要 Necessary for the survival of parasitic egg
	32.5	离子交换色谱 Anion-exchange chromatography	与整体毒液功能相同 Elicit an effect comparable with the complete venom
菜粉蝶微红盘绒茧蜂 <i>Cotesia rubecula</i> ^[11, 13, 22]	1.598	高效液相色谱 HPLC with C18 column	PDV 基因在血细胞里表达 Necessary to the expression of PDVs genes in host hemocyte
	4.6		抑制酚氧化酶活性 Inhibit the host pro-phenoloxidase activating cascade
	50		水解蛋白活性 Interferes with the proteolytic cascade
棉铃虫裹尸薄茧小蜂 <i>Euplectrus comstockii</i> ^[41]	66	电泳 Electrophoresis	抑制寄主发育 Developmental arrestant
埃及粘虫侧沟茧蜂 <i>Microplitis demolitor</i> ^[40]	30.8, 64.5		未知 None identified
瘤姬蜂 <i>Pimpla hypochondriaca</i> ^[17, 28, 34, 37]	< 13	快速液相色谱 FPLC (fast protein liquid chromatography) with Superose-12 HR 10/30 column	SF 21 细胞系毒性 Cytotoxic to SF 21 cell line
	12, < 13		抑制酚氧化酶活性 Inhibitor of phenoloxidase
	74		水解蛋白活性 Proteolytic activity
	32	随机测序	未知 None identified
	57	Random sequence analysis	与果蝇一未知功能蛋白相似 Similar to a <i>Drosophila melanogaster</i> protein of unknown function
	4.265	快速液相色谱和随机测序	与 atracotoxin 相似 Similar to atracotoxin
	10.354	FPLC with a Superose-12	与芋螺毒素相似 Similar to conotoxin
	9.943	HR 10/30 column and random	未知 None identified
	4.556	sequence analysis	未知 None identified
	4.302		未知 None identified
姬小蜂 <i>Eulophus pennicornis</i> ^[42]	43 ~ 158	快速液相色谱 FPLC with Superose-12 HR 10/30 column	阻止寄主蜕皮 Suppression of moulting
环腹瘦蜂 <i>Leptopilina boulardi</i> ^[23]	35	电洗脱 Electro-elution	影响血细胞聚集,改变血细胞形态 Induce modification of adhesive properties and morphology of host cells

液可提高寄主昆虫对杆状病毒的敏感性^[46],这说明寄生蜂的免疫抑制因子可通过抑制寄主免疫系统,提高其它生防制剂的防治效果。寄生蜂中含有杀虫毒素^[9, 14, 27],它们能直接杀死害虫,是很好的生物农药开发材料。寄生蜂毒液中还有丰富的抗菌肽资源^[17, 19],也是潜在的医药资源。利用寄生蜂毒液蛋白作为生物杀虫剂,首先必须保证毒液蛋白进入害虫体内,并且避免其被害虫体内的酶降解,结合现代

生物技术,这一问题能得到很好的解决,部分蛇、蝎子、蜘蛛和社会性膜翅目昆虫的毒液蛋白的开发利用已经成为现实。例如,把蜘蛛毒液的一杀虫活性毒素和雪莲花凝聚素进行融合,因雪莲花凝聚素能抑制昆虫中肠酶的降解,该融合蛋白经喂食后仍然具有杀虫活性^[47-48]。此外,通过转基因技术把这些毒液蛋白转入植物体内,可直接应用于生产实践。Khan 等^[49]已成功将 *Hadronyche versuta* 的毒液蛋白

omega-ACTX-Hv1a 转入植物体内,并表现出很好的杀虫活性。Yevtushenko 等^[50]利用一启动子与意大利蜜蜂抗菌肽基因结合后构建的质粒载体转入烟草,该抗菌肽基因能在烟草中高效表达,并对烟草上的苜蓿根腐病菌 *Fusarium solani* 表现出很强的抗性。蛇、蝎子、蜘蛛等的毒液一般对人和高等动物具有神经麻痹作用,相比之下,寄生蜂毒液仅能抑制寄主免疫和调控寄主的发育或仅对寄主昆虫具有神经麻痹作用,在抗虫作物培育和基因工程微生物杀虫剂研制方面对生态和食品的安全性更高。况且,寄生蜂其它的寄生因子,如 PDV 基因组整合于寄生蜂的基因组中,其应用不及毒液蛋白容易。以寄生蜂毒液研发安全型的生防制剂、新生代基因工程杀虫剂及安全型转基因抗虫作物,在抗虫作物安全性广受批评的今天,会给转基因研究带来新的转机^[2]。

7 展望

近年来,人们对寄生蜂毒液蛋白的研究取得了巨大进展,随着对这些蛋白分子特性的深入了解,特别是毒液蛋白基因的获得,加深了人们对寄生蜂与寄主相互作用关系的认识,为寄生蜂毒液的应用奠定了坚实的基础。作者认为,以下几方面很值得进一步深入探究:(1)每种寄生蜂毒液中都存在上百个蛋白组分,现在仅了解其中为数很少的几个蛋白组分的功能,但毒液里的每个蛋白组分都可能对寄主起重要作用,更多的毒液活性组分有待获得;(2)迄今为止,只研究过寄生蜂毒液里的单一活性蛋白对寄主作用下的生理功能,但在寄主体内这些蛋白之间更有可能是相互协同作用,应加强这些毒液蛋白之间的互作研究;(3)研究发现毒液蛋白能和其它寄生因子(如 PDV 和萼液蛋白)协同作用,但它们之间的协同机制尚不清楚;(4)不同寄生蜂毒液之间共同拥有相同抗原决定簇的现象,说明它们存在一定程度的进化偶联关系,但不同寄生蜂所含酶类之间存在较大差异,所以更好地探究寄生蜂毒液蛋白的合成进化方式,有助于获得更多毒液蛋白的相关特性;(5)寄生蜂毒液蛋白因量少而很难获得,不利于分离纯化,毒液蛋白的蛋白质组学研究和毒腺 cDNA 文库的大规模测序,将能获得更多的毒液蛋白。

参 考 文 献(References)

- [1] Stettler P, Trenczek T, Wyler T, et al. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology*, 1998, 44(9): 817–831
- [2] Beckage N E, Gelman D B. Wasp parasitoid disruption of host development; implications for new biologically based strategies for insect control. *Annual Review of Entomology*, 2004, 49: 299–330
- [3] Asgari S. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: Their role in host-parasite interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2006, 61(3): 146–156
- [4] Espagne E, Dupuy C, Huguet E, et al. Genome sequence of a polydnavirus: Insights into symbiotic virus evolution. *Science*, 2004, 306(5694): 286–289
- [5] Schmid O. At the core of parasitoid-host interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2006, 61(3): 107–109
- [6] Zhang Z, Ye G Y, Cai J, et al. Comparative venom toxicity between *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward the hemocytes of their natural hosts, non-target insects and cultured insect cells. *Toxicon*, 2005, 46(3): 337–349
- [7] 张忠. 蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液的生化特性与生理功能. 浙江大学博士学位论文, 2005
- [8] Moreau S J M, Guillot S. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35(11): 1209–1223
- [9] Visser B J, Labruyère W T, Spanjer W, et al. Characterization of two paralyzing protein toxins (A-MTX and B-MTX), isolated from a homogenate of the wasp *Microbracon hebetor* (Say). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1983, 75B(3): 523–530
- [10] Krishnan A, Nair P N, Jones D. Isolation, cloning, and characterization of new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(33): 20971–20976
- [11] Asgari S, Zareie R, Zhang G, et al. Isolation and characterization of a novel venom protein from an endoparasitoid, *Cotesia rubecula* (Hym.: Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2003, 53(2): 92–100
- [12] Zhang G M, Schmidt O, Asgari S. A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(40): 41580–41585
- [13] Leluk J, Schmidt J, Jones D. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. *Toxicon*, 1989, 27(1): 105–114
- [14] Quistad G B, Nguyen Q, Bernasconi P, et al. Purification and characterization of insecticidal toxins from venom glands of the

[1] Stettler P, Trenczek T, Wyler T, et al. Overview of parasitism

- parasitic wasp, *Bracon hebetor*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1994, 24(10): 955–961
- [15] Doury G, Bigot Y, Periquet G. Physiological and biochemical analysis of factors in the female venom gland and larval salivary secretions of the ectoparasitoid wasp *Eupelmus orientalis*. Journal of Insect Physiology, 1997, 43(1): 69–81
- [16] Parkinson N, Smith I, Audsley N, et al. Purification of pimplin, a paralytic heterodimeric polypeptide from venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*, and cloning of the cDNA encoding one of the subunits. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(12): 1769–1773
- [17] Dani M P, Richards E H, Isaac R E, et al. Antibacterial and proteolytic activity in venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Journal of Insect Physiology, 2003, 49(10): 945–954
- [18] Moreau S J M, Cherqui A, Dubois F, et al. Identification of an aspartylglucosaminidase-like protein in the venom of the parasitic wasp *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 34(5): 485–492
- [19] 酃卫弟. 颈双缘姬蜂调控寄主小菜蛾的生理机制研究. 浙江大学博士学位论文, 2005
- [20] Zhu J Y, Ye G Y, Hu C. Morphology and ultrastructure of the venom apparatus in the endoparasitic wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). Micron, doi:10.1016/j.micron.2007.11.005
- [21] Parkinson N, Richards E H, Conyers C, et al. Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(7): 729–735
- [22] Asgari S, Zhang G, Zareie R, et al. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 33(10): 1017–1024
- [23] Labrosse C, Stasiak K, Lesobre J, et al. A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(2): 93–103
- [24] Abt M, Rivers D B. Characterization of phenoloxidase activity in venom from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 94(2): 108–118
- [25] Coudron T A, Wright M M K, Puttler B, et al. Effect of the ectoparasite *Necremnus breviramulus* (Hymenoptera: Eulophidae) and its venom on natural and factitious hosts. Annals of the Entomological Society of America, 2000, 93(4): 890–897
- [26] Webb B A, Summers M D. Venom and viral expression products of the endoparasitic wasp *Campoletis sonorensis* share epitopes and related sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(13): 4961–4965
- [27] Windass J D, Duncan R E, Christian P D, et al. International Patent—WO 96/16171. 1996
- [28] Parkinson N M, Weaver R J. Noxious components of venom from the pupa-specific parasitoid *Pimpla hypochondriaca*. Journal of Invertebrate Pathology, 1999, 73(1): 74–83
- [29] Bucher G E. Transmission of bacterial pathogens by the ovipositor of a hymenopterous parasite. Journal of Insect Pathology, 1963, 5: 277–283
- [30] Besson M T, Soustelle L, Birman S. Selective high-affinity transport of aspartate by a *Drosophila* homologue of the excitatory amino-acid transporters. Current Biology, 2000, 10(4): 207–210
- [31] Falabella P, Riviello L, Caccialupi P, et al. A γ -glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(5): 453–465
- [32] Parkinson N, Conyers C, Smith I. A venom protein from the endoparasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* is similar to snake venom reprolysin-type metalloproteases. Journal of Invertebrate Pathology, 2002, 79(2): 129–131
- [33] Parkinson N, Smith I, Weaver R, et al. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 31(1): 57–63
- [34] Parkinson N M, Conyers C M, Keen J N, et al. cDNAs encoding large venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* identified by random sequence analysis. Comparative Biochemistry and Physiology, 2003, 134(4): 513–520
- [35] Dani M P, Edwards J P, Richards E H. Hydrolase activity in the venom of the pupal endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*. Comparative Biochemistry and Physiology, 2005, 141(3): 373–381
- [36] Zhu J Y, Ye G Y, Hu C. Molecular cloning and characterization of acid phosphatase in venom of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). Toxcon, doi:10.1016/j.toxicon.2008.03.008
- [37] Parkinson N M, Conyers C M, Keen J N, et al. Towards a comprehensive view of the primary structure of venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 34(6): 565–571
- [38] Taylor T, Jones D. Isolation and characterization of the 32.5 kDa protein from the venom of an endoparasitic wasp. Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1035(1): 37–43

- [39] Jones D, Sawicki G, Wozniak M. Sequence, structure and expression of a wasp venom protein with a negatively charged signal peptide and a novel repeating internal structure. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(21): 14871 – 14878
- [40] Strand M R, Johnson J A, Noda T, et al. Development and partial characterization of monoclonal antibodies to venom of the parasitoid *Microplitis demolitor*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1994, 26(2/3): 123 – 136
- [41] Coudron T A, Brandt S L. Characteristic of developmental arrestant in the venom of the ectoparasitoid wasp *Euplectrus comstockii*. *Toxicon*, 1996, 34(11/12): 1431 – 1441
- [42] Weaver R J, Marris G C, Olieff S, et al. Role of ectoparasitoid venom in the regulation of haemolymph ecdysteroid titres in a host noctuid moth. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1997, 35(1/2): 169 – 178
- [43] Digilio M C, Isidoro N, Tremblay E, et al. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *Journal of Insect Physiology*, 2000, 46(6): 1041 – 1050
- [44] Dani M P, Richards E H, Edwards J P. Venom from the pupal endoparasitoid, *Pimpla hypochondriaca*, increases the susceptibility of larval *Lacanobia oleracea* to the entomopathogens *Bacillus cereus* and *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2004, 86(1/2): 19 – 25
- [45] Hoch G, Schopf A. Effects of *Glyptapanteles liparidis* (Hym. : Braconidae) parasitism, polydnavirus, and venom on development of microsporidia-infected and uninfected *Lymantria dispar* (Lep. : Lymantriidae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2001, 77(1): 37 – 43
- [46] Coudron T A, Iqbal M, Rice W C, et al. Mediated pathogenicity of the baculovirus AcMNPV by the venom from *Euplectrus comstockii* Howard (Hymenoptera: Eulophidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1999, 124(3): 231 – 240
- [47] Fitches E, Woodhouse S, Edwards J P, et al. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis agglutinin*; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *Journal of Insect Physiology*, 2001, 47(7): 777 – 787
- [48] Fitches E, Edwards M G, Mee C, et al. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *Journal of Insect Physiology*, 2004, 50(1): 61 – 71
- [49] Khan S A, Zafar Y, Briddon R W, et al. Spider venom toxin protects plants from insect attack. *Transgenic Research*, 2006, 15(3): 349 – 357
- [50] Yevtushenko D P, Romero R, Forward B S, et al. Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(416): 1685 – 1695