

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 2162011152407

UDC \_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

茶树抗性相关蛋白 (Cs-cystatin, Cs-Rip)

对假眼小绿叶蝉消化道组织的影响

Toxic Effects of Resistance Associated Proteins

(Cs-cystatin,Cs-Rip) of Tea on *Empoasca vitis*

指导教师姓名:

专 业 名 称:

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2014 年 4 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（     ）课题（组）的研究成果，获得（     ）课题（组）经费或实验室的资助，在（     ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年   月   日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（     ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于     年   月   日解密，解密后适用上述授权。

（     ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年   月   日

---

## 目 录

目录 .....	I
Contents .....	III
摘要 .....	1
Abstract .....	2
第一章 前言 .....	4
1. 假眼小绿叶蝉简介及其对茶树的危害 .....	4
2. 茶树叶蝉优势种的鉴定 .....	5
3. rDNA 在分子鉴定中的应用 .....	7
4. 植物对植食性昆虫的防御 .....	8
5. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Cystatin) 简介 .....	9
6. 核糖体失活蛋白 (Ribosome-inactivating proteins) 简介 .....	9
第二章 假眼小绿叶蝉的优势种鉴定 .....	12
1. 材料与方法 .....	12
2. 实验结果 .....	15
第三章 茶树半胱氨酸蛋白酶抑制剂 ( <i>Cs-Cystatin</i> ) 基因克隆、表达 .....	21
1. 材料与方法 .....	21
2. 实验结果 .....	26
3. 讨论 .....	34
第四章 茶树核糖体失活蛋白基因 ( <i>Cs-RIP</i> ) 克隆、表达 .....	35
1. 材料与方法 .....	35
2. 实验结果 .....	37
3. 讨论 .....	45
第五章 病理切片分析饲喂 <i>Cs-Cystatin</i> 、 <i>Cs-RIP</i> 后的假眼小绿叶蝉 .....	47
1. 材料与方法 .....	47
2. 实验结果 .....	50
3. 讨论 .....	56
第六章 总结与展望 .....	59
参考文献 .....	62

目录

---

附录 .....	67
致谢 .....	68

## Contents

<b>Contents .....</b>	<b>III</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>Chapter I Introduction.....</b>	<b>4</b>
1. The Brief introduction of <i>Empoasca vitis</i> .....	4
2. Identification of tea leafhopper species .....	5
3. Application of rDNA in the molecular identification.....	7
4. Plant defense against insect herbivores .....	8
5. The Brief introduction of Cystatin .....	9
6. The Brief introduction of RIP.....	9
<b>Chapter II The dominant species identification of <i>Empoasca vitis</i> .....</b>	<b>12</b>
1. Materials and methods.....	12
2. Experimental results .....	15
<b>Chapter III Cloning and expression of <i>Cs-Cystatin</i> gene in <i>C.sinensis</i>.....</b>	<b>21</b>
1. Materials and methods.....	21
2. Experimental results .....	26
3. Discussion .....	34
<b>Chapter IV Cloning and expression of <i>Cs-RIP</i> gene in <i>C.sinensis</i> .....</b>	<b>35</b>
1. Materials and methods.....	35
2. Experimental results .....	37
3. Discussion .....	45
<b>Chapter V Pathological analysis on <i>E.vitis</i> fed with <i>Cs-Cystatin</i> and <i>Cs-RIP</i> .....</b>	<b>47</b>
1. Materials and methods.....	47
2. Experimental results .....	50
3. Discussion .....	56
<b>Chapter VI Summary and Outlook.....</b>	<b>59</b>
<b>Reference.....</b>	<b>62</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>65</b>

## 摘要

假眼小绿叶蝉(*Empoasca vitis*)属半翅目(Hemiptera),叶蝉科(Cicadellidae)是中国茶区分布最广、危害最重的一种茶树害虫,一般可造成减产 15%左右,严重时甚至可达 50%。所以,如何有效防治该害虫是当前的研究热点。尽管目前对该物种有较多的研究,但就其分类归属问题一直存在争议;此外,在防治方法的建立方面很难兼顾生态安全性和防治有效性。据此,本文综合运用形态学和分子鉴定技术对该物种进行重新描述;应用分子生物学和组织病理学技术探讨了两种茶树抗性蛋白(Cs-Cystatin、Cs-RIP)对该害虫的毒性作用;以期为相关研究工作提供样本标准和参照以及为开发新型防治技术提供技术支撑。

研究结果显示:

(1) 形态学描记:假眼小绿叶蝉通体淡绿或黄绿色,头部及前胸背板无白色斑纹。前翅淡黄绿色,翅端透明;后翅整体透明,翅脉淡黄色。足部与体呈同色,各足胫节端部灰色或褐色。雌性腹部末端具产卵瓣,雄性具三角形骨板(基瓣)。分子鉴定:获取了假眼小绿叶蝉的 28S rDNA 序列,系统发育分析表明该物种与小叶蝉属 *Typhlocyba serrata* 的亲缘关系最近。此外还克隆了 ITS2 序列,通过在 GenBank 中比对确认为叶蝉科昆虫首次获得序列。

(2) 从茶树(*Camellia sinensis*)中克隆了半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因(Cs-Cystatin)和核糖体失活蛋白基因(Cs-RIP),前者共 306 bp 碱基,编码 101 aa 的蛋白质;后者共 1713 bp 碱基,编码 570 aa 的蛋白质。通过构建体外表达系统,成功获取 Cs-Cystatin 和 Cs-RIP 蛋白。通过在培养基中添加这两种抗性蛋白喂饲假眼小绿叶蝉表明 Cs-RIP 显著地降低了其存活率,而 Cs-Cystatin 的效果不明显。通过组织病理切片观察发现取食含有 Cs-RIP 培养基的假眼小绿叶蝉其食管剧烈收缩并凝结成块,前中肠腔体显著收缩、壁上的绒毛突起解体并落入肠腔;随着取食时间的增加,胸部的飞行肌也开始出现解体现象。而饲喂 Cs-Cystatin 的组织切片中,未发现消化道的病变。研究结果提示 CsRIP 对假眼小绿叶蝉具有明显的毒性作用,在害虫防治中具有潜在的应用价值。

**关键词:** 假眼小绿叶蝉; 分类地位; ITS2; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Cs-Cystatin); 核糖体失活蛋白(Cs-RIP); 毒性作用

## Abstract

*Empoasca vitis* (Hemiptera, Cicadellidae) is a major insect pest threatening tea production throughout China. *E.vitis* cause a decreased of 15% in tea yield, even up to 50%. Thus, study how to effectively control the pest is the research hotspot currently. Nowadays, there are many studies about this species but the classification of this species has been controversial. In addition, it is difficult to give consideration to ecological safety and efficacy at the same time. Accordingly, the species were redescribed by morphological and molecular identification technology in this paper. The toxic effects from two kinds of tea plant proteins (Cs-Cystatin, Cs-RIP) on *E.vitis* were investigated by molecular biology and tissue pathology technique. In order to provide technological sustentation for developing a new control technology and provide sample standards for related research work.

Result showed:

(1) Morphological description:

The whole body of *E.vitis* is green or yellow-green. There are no white spots in the head and prothorax backboard. The forewing is yellowish green, the wing side is transparent. The whole latter wing is transparent, the Wing veins is faint yellow. Foot and body are the same color. The metathoracic tibia end is grey or brown. In The end of the female abdomen with stylomere, Male with a triangular bone plate (Base flap) .

Molecular identification: We get the 28S rRNA sequence of *E.vitis*, phylogenetic analysis showed that species has the closest relationship with *Typhlocyba serrate*. In addition, we cloned ITS2 sequence, and confirmed this is the first time to get this sequence in *Cicadellidae* insects by sequence alignment.

(2) Cs-Cystatin and Cs-RIP gene was cloned from tea plant. Sequence of Cs-Cystatin consisted of 306 bp, encoding a protein of 101 aa. The Cs-RIP gene consisted of 1713 bp, encoding a protein of 570 aa. We successfully obtained Cs-Cystatin and Cs-RIP proteins by construction of vitro expression system. The results from feeding the *E.vitis* with these two resistant proteines on the culture mixed, showed that Cs-RIP significantly reduced the survival rate, but the Cs-Cystatin has no effects. Observation

by paraffin section showed that esophagus contained the *E.vitis* had feeding with Cs-RIP on the culture mixed had obvious collapsed and the lumen totally occluded. The fore- and mid-gut obviously shrank, the villus broke down and fell into the lumen; the flight muscle in the thorax also dissolved with the increase of the feeding time. But no gastrointestinal lesions were found in the tissue sections feeding Cs-Cystatin. The results suggested that Cs-RIP has significant toxic effects on *E.vitis*, with potential application in pest control.

**Keywords:** *Empoasca vitis*; Taxonomy; ITS2; *Cs-Cystatin*; *Cs-RIP*; Toxicity

## 第一章 前言

### 1. 假眼小绿叶蝉简介及其对茶树的危害

假眼小绿叶蝉 (*Empoasca vitis*) 广布国内茶区, 属半翅目 (Hemiptera), 叶蝉科 (Cicadellidae)。假眼小绿叶蝉原属林木中的一种重要害虫, 食性较杂, 当茶树种植开始产业化向半山区发展时, 该虫从草地林区侵入茶园, 除了为害茶树外, 还能为害蔬菜、豆类等植物。假眼小绿叶蝉每年出现两个生长高峰, 与当地茶叶嫩叶生长季节一致, 在福建沿海, 第一高峰出现在 5 月下旬至 6 月上旬, 夏茶受害严重; 第二高峰出现在 9 月中下旬至 11 月上旬, 危害秋茶。

假眼小绿叶蝉为不完全变态昆虫, 共分为 5 龄若虫: 1 龄若虫为乳白色, 体表有细毛; 2 龄浅黄色, 体节明显, 随着生长, 形体颜色变深; 3 龄逐渐变为绿色, 开始生长出翅芽; 4 龄时翅芽变得明显; 5 龄翅芽伸展完全, 达到腹部第 5 节, 与成虫体形近似 (图 1-1)。假眼小绿叶蝉刺吸茶树等植物嫩梢、取食芽叶汁液, 并且在嫩梢上产卵, 植物输导组织遭到其破坏; 茶树受害后叶片卷曲, 叶缘变黄, 严重时叶尖、叶缘红褐焦枯, 芽叶生长停滞, 甚至全叶焦枯, 对茶叶产量危害很大 (图 1-2)。假眼小绿叶蝉分布广泛, 我国茶区普遍危害严重, 国外在斯里兰卡、日本、越南、印度及非洲一些国家也频繁发生。

国内外学者大量研究过假眼小绿叶蝉的防治工作, 但因为该虫世代重叠比较明显, 防治难度比较大, 所以长期以来主要以化学农药对其防治, 并且不少茶农在农药防治过程中, 农药使用量, 喷药次数随意增加, 甚至在个别地方出现过采一次茶喷一次药的过度使用农药现象, 因此对假眼小绿叶蝉的防治每年花费为茶树各类害虫之首, 也是引起茶叶中农药残留超过目标重要因素之一。

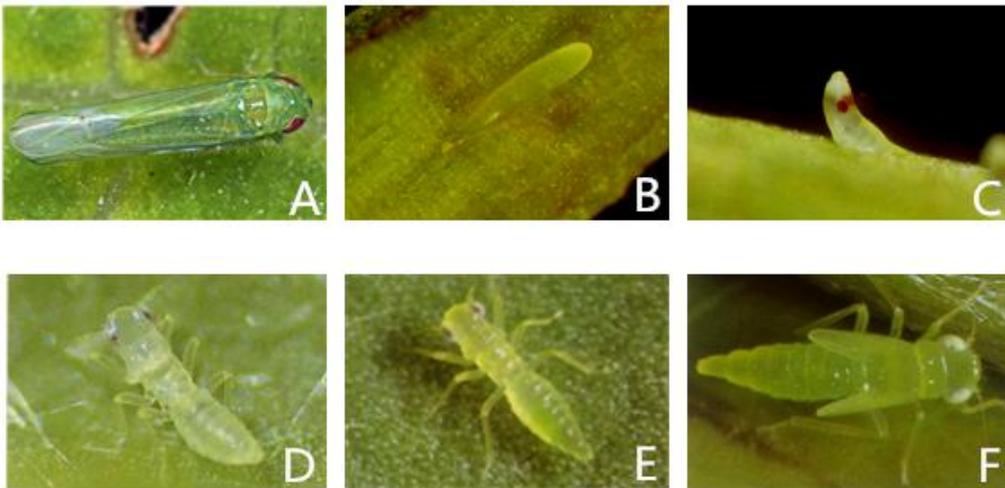


图 1-1 假眼小绿叶蝉生活史

Fig.1-1 *Empoasca vitis* life cycle

(引自: <http://baike.baidu.com/picview/1078837/1078837/0/6391e903408de88b08fa93cf.html?fr=lemma#albumindex=0&picindex=0>)

6391e903408de88b08fa93cf.html?fr=lemma#albumindex=0&picindex=0)

A: 成虫; B:卵; C: 卵; D: 1 龄若虫; E: 2 龄若虫; F:5 龄若虫



图 1-2 A: 假眼小绿叶蝉的危害; B: 假眼小绿叶蝉在茶树叶片上刺吸取食

Fig.1-2 A: The damage of the *Empoasca vitis* on tea garden

B: Probing and feeding behaviors of the *Empoasca vitis* on tea leaves

## 2. 茶树叶蝉优势种的鉴定

80 年代, 贵州统计的茶树叶蝉种类有 20 种<sup>[1]</sup>。2002 年邓欣调查了湖南衡山茶园中存在的叶蝉, 共有 4 种, 分别为假眼小绿叶蝉 (*Empoasca vitis*), 大青叶蝉 (*Cicadella viridis*), 棉叶蝉 (*Empoasca biguttula*), 黄褐角顶叶蝉 (*Deltocephalus brunnescens*), 其中假眼小绿叶蝉占绝对优势的地位<sup>[2]</sup>。

小绿叶蝉属 (*Empoasca*) 是半翅目 (Hemiptera) 叶蝉科 (Cicadellidae) 中较大的一个属。该属包含昆虫种类多样, 受这些昆虫危害的寄主植物种类同样丰富, 加之属内各种之间外部形态特征很相似, 故仅依据外部形态特征很难对它们作出正确的鉴定。而较早的研究所依据的特征主要是外部形态, 这就使得在生产实践中对有关种的识别常会出现混淆现象。

长期以来, 对茶树中造成重大危害的是茶小绿叶蝉还是假眼小绿叶蝉这一问题一直有分歧, 定名混乱。70-80 年代, 葛钟麟<sup>[3]</sup>经过形态鉴定认为, 危害种为假眼小绿叶蝉 (*Empoasca pirusuga*), 后更名为 *Empoasca vitis*。但以后的各种文献和论文中, *Empoasca vitis*, *Empoasca pirusuga* (Matsuotra)<sup>[4]</sup>, *Empoasca aoescens* (Fabricius)<sup>[5,6]</sup> 都仍然存在。

为了明确对茶树造成危害的优势叶蝉的种类, 并且对其进行准确的命名, 很多研究人员做了大量的工作。赵冬香对假眼小绿叶蝉的翅脉, 生殖板、抱握器、阴茎、肛钩等形态特征做了观察和图解, 在上百份标本中, 并未发现小绿叶蝉 *Empoasca flavescens* (Fabricius), 认为茶树叶蝉优势种应该为假眼小绿叶蝉, 归属小绿叶蝉属, 种名为 *Empoasca vitis*<sup>[5]</sup>。

随着分子系统学和生物信息学的发展, 对物种的鉴定开始走出传统的观察和图解, 人们开始以分子数据来描述昆虫各个种群之间的关系和遗传距离。Jesse H, de León (2006) 对玻璃叶蝉 (*Homalodisca coagulata*) 和烟树叶蝉 (*Homalodisca liturata*) 利用 COI, COII 和 ITS2 做了系统研究, 并且对玻璃叶蝉用 DNA 指纹图谱检测其 DNA 多态性<sup>[7-9]</sup>。Dietrich (2001) 用长为 3.5 kb, 包含 D2~D10 变异区的 28S rDNA 序列片段研究了半翅目 Hemiptera 角蝉总科 Membracoidea 中主要类群的系统发育, 其结果支持根据化石和生物地理学所提出的假说, 即角蝉 (犁胸蝉科 Aetalionidae 和角蝉科 Membracidae) 起源于叶蝉 (叶蝉科 Cicadellidae)<sup>[10,11]</sup>。戴怀仁 (2008) 对叶蝉科分子系统学方面的研究做了一个系统总结, 并且在国内首次利用 28S rDNA D2 和 16S rDNA 基因序列区段, 结合 50 个形态特征对角顶叶蝉亚科 (Deltocephalinae) [半翅目 (Hemiptera): 叶蝉科 (Cicadellidae)] 19 个属进行系统发育分析研究<sup>[12]</sup>。可以看到叶蝉总科中已进行分子系统学研究的类群很少, 利用的基因主要是 12S、16S、28S、COI、COII 以及 ITS2<sup>[13]</sup>。付建玉, 韩宝瑜 (2007) 利用 16 条随机引物对来自江苏、福建、安徽、云南、海南、浙江和山东等 7 个省茶区的假眼小绿叶蝉种群进行 RAPD

分析，构建系统发育树之后也未发现具有种间特异性的个体<sup>[14]</sup>。为确立假眼小绿叶蝉是茶园叶蝉的优势种在分子水平上提供了证据。

而对假眼小绿叶蝉，NCBI 数据库中则只有李乐、肖强 2012 年上传的 16S rRNA 序列和 COI 基因<sup>[15]</sup>。他们利用 K2P 双参数模型采用 NJ 和 ML 法构建 12 个地理种群假眼小绿叶蝉及其近缘种的线粒体 DNA COI 基因分子系统树。得出结论为：假眼小绿叶蝉不同地理种群的个体在聚类中分支不明显，呈现一种平行式的分布关系；假眼小绿叶蝉与葡萄叶蝉的亲缘关系比桃一点斑叶蝉近，而青岛葡萄叶蝉种群与假眼小绿叶蝉的关系最近。

### 3. rDNA 在分子鉴定中的应用

rDNA 是编码核糖体 RNA 的基因，序列常用来鉴定物种同源性，rDNA 一般由转录区和非转录区（NTS）构成。转录区由 5S、5.8S、18S 和 28SrDNA 组成，其中一个转录单元由 18S、5.8S 和 28S rDNA 基因组成，产生一个前体 RNA。内转录间隔区 ITS(internal transcribed space)，分别位于 18S 和 5.8S rDNA(ITS1) 之间以及 5.8S 和 28SrDNA 之间（ITS2），ITS1 和 ITS2 合称为 ITS 序列，通常 5.8 SRNA 基因也包括在 ITS 之内。外转录间隔区 ETS 位于 18S rDNA 基因上游和 28S rDNA 基因下游。

rRNA 各区的进化速度不同，编码区较保守，其中 18S rDNA、28S rDNA 基因序列较长且进化速度较慢。28s rDNA 是编码细胞质核糖体 28S rRNA 的基因，因为其生物学功能重要，所以在进化过程中表现得比较保守，而且在保守区还有 12 个高变区，适合从种到属水平上的系统发育关系研究<sup>[16]</sup>，江世宏利用 28S rDNA 基因序列进行比较，研究了叩甲科（Elateridae）分子系统发育关系<sup>[17]</sup>。

5.8S rDNA 基因高度保守且分子量比较小，因此较少用于系统学研究中。而 ITS 和 IGS 不参与 rDNA 成熟过程，进化速度较快，适用于低级阶元的系统学研究。ITS 序列是核糖体 DNA 上的一个非编码区域，进化速度相对较快，18S rDNA 进化速度大约是其十分之一。ITS 不参与蛋白质的合成，可以作为一个很重要的分子标签，广泛应用于物种的属内及种间低级阶元的进化关系研究。rDNA 是目前广泛使用的细胞核 DNA 分子标记，由于 rDNA 基本单元是由一系列编码区和非编码区组成，所以可以设计保守的通用引物，从而可以扩增不同物种中有变异性较高的非编码区。

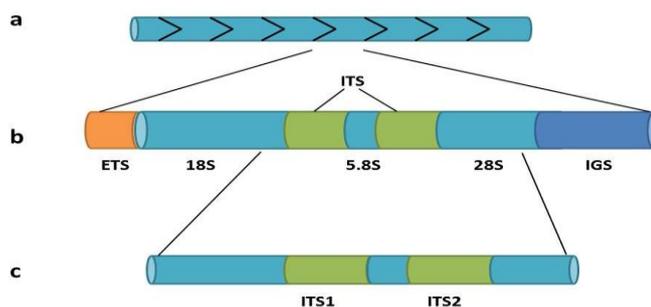


图 1-3 rDNA 结构

Fig. 1-3 The structure of rDNA

#### 4. 植物对植食性昆虫的防御

早在 19 世纪初，昆虫学之父 Kirby 就提出，没有一种植物能够避免昆虫的取食对其造成危害，但是同时也不会有一种植物会被所有植食性昆虫取食危害。后一种情况表明了植物对昆虫取食的防御作用。在植物和植食性昆虫的漫长协同进化中，植物形成了各种的防御机制，其类型可基本分为两种，组成型防御和诱导型防御<sup>[18]</sup>。组成型防御是在昆虫侵袭植物之前就已经存在的防御机制，具有全株性，贯穿植物的一生并且始终起作用，包括植物的叶片类型、表面蜡质、色泽、茸毛、角质层厚度等物理结构，以及植物以初生代谢产物为原料在一系列酶催化作用下形成的一些非自身发育所必需的次生代谢产物。植物特殊的物理结构对避免植食性昆虫对其造成伤害有着显著的作用：瓢虫捕食效率在蜡质含量少的豌豆品种上要明显优于其他蜡质含量较高的品种<sup>[19]</sup>。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 体内的木葡聚糖内糖基转移酶基因发生基因突变后，植株更易遭受桃蚜 (*Myzus persicae*) 的侵害，这充分说明细胞壁加固对植物防御起很重要的作用<sup>[20]</sup>。植物还可以通过加固自身细胞壁来增加对植食性昆虫取食时的机械阻碍，尤其对于那些刺吸式害虫，从而限制害虫取食，避免害虫伤害<sup>[21]</sup>，当植物体受到植食性害虫侵害时，许多与有关叶面细胞固化的基因表达上调，这些基因包括纤维素合成酶、果胶质酶、细胞壁扩展蛋白和木葡聚糖内糖基转移酶<sup>[22]</sup>。

植物所合成的次生代谢产物有些能刺激昆虫产卵和抑制发育，有些能够引诱植食性昆虫的天敌聚集，有些能够感染昆虫的嗅觉传感系统。寄主植物的挥发性萜烯类化合物对松墨天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 成虫交配有重要作用<sup>[23]</sup>；

马铃薯长管蚜 (*Macrosiphum euphorbiae*) 的行为受西红柿 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 叶片提取物中的挥发物干扰甚至导致其死亡<sup>[24]</sup>；茶树与假眼小绿叶蝉共同作用产生的化合物，是捕食性天敌如白斑猎蛛 (*Evarcha albaria*)、樱小蜂 (*Mymaridae*) 等捕食假眼小绿叶蝉的主要定位线索<sup>[25]</sup>。植物能产生防御性的蛋白来减弱昆虫对食物的消化能力，还能产生有毒的次生化合物可以直接杀伤昆虫和病原体。防御性蛋白主要包括蛋白酶抑制剂类、多酚氧化酶、几丁质酶、氨基酸降解酶<sup>[26]</sup>。

## 5. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Cystatin) 简介

蛋白酶抑制剂类是一类对蛋白水解酶的活性有着明显抑制作用的大分子蛋白，在动植物体内，蛋白酶抑制剂普遍存<sup>[26]</sup>。当昆虫摄入蛋白酶抑制剂并在肠道内积累后，其消化腺或者肠道分泌的蛋白酶会被蛋白酶抑制剂特异性的结合并且活性降低；此外，能引起蛋白酶分泌腺体的代偿反应，通常会造成昆虫的消化不良，代谢紊乱，最终会导致昆虫的发育不良并直至死亡<sup>[27]</sup>。

目前发现的蛋白酶抑制剂主要有四类：丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cystatin)，金属蛋白酶抑制剂 (metallo proteinase inhibitor) 和天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (aspartic protease inhibitors)<sup>[28]</sup>。而在转基因技术中目前常用到的蛋白酶抑制剂主要是丝氨酸蛋白酶抑制剂和半胱氨酸蛋白酶抑制剂。其中水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、茶树 (*Camellia sinensis*) 等作物的半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因全长已经被克隆。Mónica Pernas 利用板栗 (*Castanea mollissima*) 的重组 cystatin 测定了其对细菌和真菌等微生物的毒性<sup>[29]</sup>。

半胱氨酸蛋白酶抑制剂和豇豆胰蛋白酶抑制剂的抗虫作用具有互补性。在一些丝氨酸蛋白酶抑制剂含量比较丰富的植物器官体内，比如豇豆 (*Vigna unguiculata*) 的种子，也会被豇豆象 (*Cowpea weevil*) 所摄食，它就是用半胱氨酸蛋白酶完成消化的。取食蛋白酶抑制剂后，昆虫会迅速分泌对抑制剂不敏感的蛋白酶，而使蛋白酶抑制剂失效，这可能是昆虫对植物蛋白酶抑制剂的一种适应机制。比如 Broadway 通过研究表明，美洲棉铃虫 (*Heliothis zea*) 和菜粉蝶 (*Pieris rapae* Linne) 在取食了丝氨酸蛋白酶抑制剂的食物后，产生了抗蛋白酶抑制剂的胰蛋白酶<sup>[30]</sup>。

## 6. 核糖体失活蛋白 (Ribosome-inactivating proteins) 简介

核糖体失活蛋白是一类能够使核糖体失去活性从而抑制蛋白质合成的有毒蛋白，它具有抗肿瘤、抗病毒、抗真菌等多种的作用。其首先发现是 Stillmark 于 1988 年从蓖麻 (*Ricinus communis*) 中发现的，并命名为蓖麻毒素<sup>[31]</sup>，随后在其他植物和真菌细菌中也发现了核糖体失活蛋白的存在。到目前为止，人们已经在 18 种单子叶植物和 122 种双子叶植物中检测到了 RIPs 的存在<sup>[32]</sup>。RIPs 按照结构不同可以分为三种：I 型、II 型和 III 型。I 型为单链蛋白，具有 RNA N-糖苷酶活性，比如商路 (*Radix phytolaccae*) 抗病毒蛋白<sup>[33]</sup>。II 型分子量约为 60 KD，具有两条链：A 链和 B 链，两条链之间以二硫键连接。A 链有 RNA N-糖苷酶活性，B 链是一个对半乳糖专一的凝集素，具有糖结合活性，能协同 A 链进入细胞，如蓖麻毒蛋白 (ricin)。I 型与 II 型的 A 链都被证实具有 RNA N-糖苷酶活性，能切除核糖体最大亚基上的 3' 端颈环结构的腺嘌呤残基，干扰核糖体与延伸因子的结合，从而抑制靶细胞中蛋白质的合成<sup>[34, 35]</sup>。III 型核糖体失活蛋白在植物中比较少见，仅在玉米 (*Zea mays*) 和大麦 (*Hordeum vulgare*) 中被发现，其只有一条多肽链，以无活性的蛋白前体形式在合成时出现，当水解掉活性位点氨基酸中间的二硫键和 C-末端和 N-末端的扩展序列以后，III 型 RIPs 才获得活性<sup>[36]</sup>。

#### a) RIPs 的酶学特性:

RIPs 主要的酶活性表现为 RNA N-糖苷酶活性和 RNA 水解酶活性。RIPs 可特异地把生物核糖体大亚基 rRNA 3' 端的腺嘌呤残基水解掉，干扰延伸因子与核糖体的结合，从而抑制细胞中蛋白质的合成<sup>[37]</sup>。RIPs 的 RNA 水解酶活性能够专一水解掉 28S rRNA 第 G4325-A4326 位之间的磷酸二酯键，在 28S rRNA 的 3' 末端切下长约 450 bp 的片段，从而引起构象变化，使核糖体失活，抑制蛋白质的合成<sup>[38]</sup>。

RIPs 的毒性是广为人知的，目前，对 RIPs 的研究在抗病毒、抗真菌、抗昆虫、抗肿瘤及艾滋病的治疗等方面均有涉及。一般来说，II 型的 RIPs 的毒性要比 I 型的 RIPs 强，原因可能是因为 I 型的 RIPs 缺少 B 链，难以进入细胞；而 II 型的 RIPs 的 B 链具有糖结合活性，能够与细胞表面的半乳糖残基结合，便于 RIPs 进入细胞<sup>[39]</sup>。

#### b) 对昆虫的主要毒性:

Patrick F, Dowd 等将玉米的 RIP 基因转入烟草后，发现转基因烟草对玉米

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫