

## 家蝇血淋巴的提取及抗菌物质的诱导\*

王远程 刘伟\*\* 杨峰

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京 100081)

冯国蕾

(中国科学院动物研究所, 北京 100050)

本文报道了大肠杆菌注射和超声波处理家蝇 (*Musca domestica*) 后对家蝇抗菌物质的诱导效果, 抗菌物质的活性, 抗菌的专一性, 并研究了家蝇血淋巴的提取方法。结果表明, 通过超声波法和注射法均可诱导家蝇产生抗菌物质, 其活力高峰出现在诱导后 60 小时。诱导后 48 小时的血淋巴稀释 100 倍, 对大肠杆菌的溶菌活力达 0.115 单位。其抗菌物质对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大白菜软腐病菌 (*Erwinia carotovora*)、黑腐病黄色单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 等均有抑菌作用, 而对真菌白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 未发现抑菌作用。对幼虫的诱导效果好于成虫。血淋巴的提取方法由以往的毛细管吸取法改为离心的方法使产量提高 2 倍, 工作效率提高 50 倍。

**关键词** 家蝇; 血淋巴; 抗菌物质

昆虫不存在 B 和 T 淋巴系统, 但许多昆虫的抗病力却很强。最典型的例子是家蝇, 它从幼虫到成虫出没于杂菌横生的环境中, 常常对人类和其它动物传播疾病, 而它自己却很少得病。即使在人工饲养的条件下也不会发生大规模传染病而死亡。因此, 对家蝇抗病机理的研究不但可以揭示昆虫抗病机理的奥秘, 而且可以为新型杀菌剂的研制和基因工程抗病育种提供新的基因来源。

昆虫的免疫机制中存在细胞免疫和体液免疫两个途径。细胞免疫是血细胞通过吞噬作用将体内异物摄进细胞内消化。体液免疫的内含和脊椎动物的体液免疫有所不同, 虽然它也是由于异物物质或物理方法引起抗菌物质的产生, 但是却不存在免疫球蛋白。抗菌物质也缺乏特异性, 而且各种不同昆虫或同一昆虫的各种不同刺激方法所诱导的抗菌物质的种类和多少也有差异<sup>[1]</sup>。近年来, 国内外这方面的研究多集中于各种蚕类等大中小个体昆虫的诱导。到目前为止, 已从柞蚕 (*Antheraea pernyi*)<sup>[2]</sup>、家蚕 (*Bombyx mori*)<sup>[3]</sup>、天蚕 (*Hyalophora cecropia*)<sup>[3]</sup>、蓖麻蚕 (*Samia cynthia ricini*)<sup>[3]</sup>、大蜡螟 (*Galleria megacephala*)<sup>[4]</sup>、美洲蜚蠊 (*Periplaneta americana*)<sup>[5]</sup>、大头金蝇 (*Chrysomya megacephala*)<sup>[6]</sup> 等昆虫体内诱导出抗菌蛋白类物质。由于家蝇个体比较小, 向其体内注射诱导源和血淋巴的提取均存在一定困难。本文在国内首次报道了分别用注射大肠杆菌和超

本文于 1991 年 12 月 20 日收到。

\* 国家自然科学基金资助项目。中国科学院微生物研究所蔡金科先生给予指导和帮助; 中国农业科学院蔬菜花卉研究所徐玲给予大力协助, 在此一并致谢。

\*\* 北京农业大学植保系实习学生。

声波处理家蝇幼虫后,其体内抗菌物质的产生规律及抗菌活性。并用离心的方法和毛细管法吸取血淋巴,比较了两种方法提取血淋巴的优缺点。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

家蝇虫源来自中国科学院动物研究所。供试菌种分别来源于中国科学院微生物研究所菌种保藏中心,中国农业科学院土壤肥料研究所菌种保藏中心和蔬菜花卉所,北京大学等单位。

### (二) 方法

1. 家蝇的饲养: 参照参考文献[7]。

2. 抗菌物质的诱导: 超声波法参照祁国荣等<sup>[2]</sup>的方法。注射大肠杆菌的方法系用毛细管和微量进样器把菌液稀释在 0.15mol/L 昆虫生理盐水中,注入家蝇幼虫体内。

3. 血淋巴的提取: 毛细管法是先把虫体麻醉(幼虫放在冰上,成虫用乙醚)。幼虫取血淋巴时将其头部用眼科剪剪去,流出的血淋巴吸入毛细管中。成虫取血淋巴时将其翅撕掉,同样用毛细管收集。离心的方法是 将 400 只幼虫、蛹或成虫分别放于冰浴条件下的研钵中加入 2ml 预冷的昆虫生理盐水后研磨,研磨液于 4℃ 下 15000r/min 离心 30 分钟,取上清液减去 2ml 的生理盐水量即为血淋巴量。

4. 溶菌物质活力的测定: 取 3ml 大肠杆菌的悬浊液,分别加入 5 $\mu$ l 注射和超声波法诱导 48 小时不同浓度的血淋巴,37℃ 体温 2 小时后取出,置冰浴中测定反应前后菌液 600nm 的消光值(A)的变化,其活力按 Hultmark<sup>[8]</sup>的方法计算。U(溶菌活性单位)= $A_0 - A/A_0$ ,其中  $A_0$  为对照在 600nm 处的光密度。

5. 抑菌活力的测定: 大肠杆菌、苏云金芽孢杆菌、大白菜软腐病菌、甘蓝黑腐病菌接种于 LB 培养基上,白僵菌接入 PAG 培养基上,培养基上打孔,每孔加 2 $\mu$ l 血淋巴,测量抑菌圈的大小。

6. 诱导时间测定: 以注射大肠杆菌法诱导抗菌物质,并以其为指示菌,分别取诱导后 6、12、18、24、36、48、60、72 小时的家蝇血淋巴做抑菌实验,测其抑菌圈大小。

7. 诱导强度测定: 分别用  $10^3$ — $10^9$  个细菌注射家蝇幼虫后诱导抗菌物质,以大肠杆菌为指示菌做抑菌实验,测抑菌圈直径。

## 结 果

### (一) 家蝇血淋巴的提取量

1. 毛细管法: 用毛细管法所取幼虫血淋巴量远远大于成虫的量,相差约 8 倍(见表 1),而蛹用毛细管几乎无法取到血淋巴。成虫每只大约可取 0.395 $\mu$ l。雌性成虫血淋巴量较大,雄性成虫血淋巴量很小,甚至取不到,而末龄幼虫每头大约可取 3.14 $\mu$ l 血淋巴。

2. 离心法: 实验结果表明,离心法提取血淋巴量大于毛细管法。离心法提取 400 只成虫、幼虫和蛹的血淋巴量分别为 0.84ml、4.0ml 和 1.68ml,平均每只分别为 2.10 $\mu$ l、10 $\mu$ l 和 4.21 $\mu$ l。而用毛细管法所得血淋巴量每只幼虫平均为 3.14 $\mu$ l,成虫为 0.40 $\mu$ l 左右,蛹血淋巴由于被大量脂肪体所包围,用毛细管几乎取不出血淋巴。此外,用毛细管法

表 1 毛细管法提取成虫、幼虫血淋巴量对比表(每组 3 只)  
Table 1 Comparison of the quantities of hemolymph drawn by capillary method from larval and adult house flies (μl)

次 数 Times	组 Group									
	1		2		3		4		5	
	幼虫 Larva	成虫 Adult	幼虫 Larva	成虫 Adult	幼虫 Larva	成虫 Adult	幼虫 Larva	成虫 Adult	幼虫 Larva	成虫 Adult
1	7.33	2.00	11.00	0.33	7.33	1.33	8.67	3.00	8.67	1.33
2	10.67	0.66	8.67	2.66	10.67	2.00	14.00	1.00	7.33	2.00
3	11.00	1.33	9.30	0.50	16.00	2.00	10.00	0.33	8.67	0.50
4	8.67	0.33	8.00	1.00	9.30	1.33	7.33	1.00	11.00	2.00
5	10.00	0.50	8.80	1.00	6.00	0.33	7.33	1.00	10.00	2.00
平均/组 Average number/Group	9.53	1.966	9.13	1.09	9.86	1.39	9.46	1.26	9.11	1.23
平均/只 Average number/Insect	3.18	0.32	3.04	0.36	3.28	0.46	3.15	0.42	3.03	0.41

无法取得大量血淋巴,而离心法一次可取几毫升或更多,为进一步工作打下基础,但用毛细管法所取血淋巴纯度高。

(二) 溶菌酶活力测定

家蝇幼虫经注射大肠杆菌诱导后或超声波法处理后,其溶菌酶活力有很大提高(见表 2)。实验结果表明,注射大肠杆菌法诱导家蝇幼虫血淋巴中溶菌酶的活力高于用超声波诱导的活力。随稀释度的提高溶菌酶的活力呈下降趋势。

表 2 不同浓度血淋巴溶菌酶活力测定表  
Table 2 The activities of lysozyme of hemolymph at different dilutions (O. D. = 600nm)

血淋巴浓度 Concentration of Hemolymph	1×	10×	20×	40×	80×	100×
对照 Ao CK	0.0350	0.0333	0.0350	0.0334	0.0334	0.0340
注射大肠杆菌 A1 Injecting E. coli	0.0179	0.0198	0.0209	0.0226	0.0280	0.0311
超声波处理 A2 Sonic treatment	0.0203	0.0224	0.0265	0.0273	0.0316	0.0340
(Ao - A1)/Ao	0.5000	0.4050	0.4020	0.3230	0.1620	0.0850
(Ao - A2)/Ao	0.4200	0.3270	0.2400	0.1820	0.0540	0.0000

(三) 抑菌物质对部分细菌、真菌的抑菌活力的分析

经诱导的家蝇血淋巴对多种细菌均有抑菌作用,抑菌圈大小见表 3。从表 3 可见,抗菌物质对软腐病和黑腐病细菌所产生的抑菌圈都很大,而对大肠杆菌和苏云金杆菌次之,对金黄色葡萄球菌产生的抑菌圈较小,而对白僵菌几乎看不到抑菌作用。家蝇抗菌物质虽有广谱性,但对不同细菌所产生的抗菌效果还是有很大差别。

(四) 注射大肠杆菌诱导后抗菌物质产生高峰的测定

表3 家蝇血淋巴对细菌、真菌抑菌活力对比表  
Table 3 The antibacterial and antifugal activities of house fly hemolymph

抑菌直径 (cm) Diameter of inhibitory ring	苏云金杆菌 <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia</i> <i>coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	黑腐菌 <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i>	软腐菌 <i>Erwinia</i> <i>carotovora</i>	白僵菌 <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>
1	2.0	2.05	1.15	2.25	3.45	—
2	2.1	2.10	1.15	2.10	3.20	—
3	1.8	1.75	1.00	2.40	2.90	—
4	1.5	2.30	1.15	2.60	3.00	—
5	1.85	2.40	1.40	2.50	3.40	—
平均值 Average	1.85	2.12	1.15	2.37	3.25	—

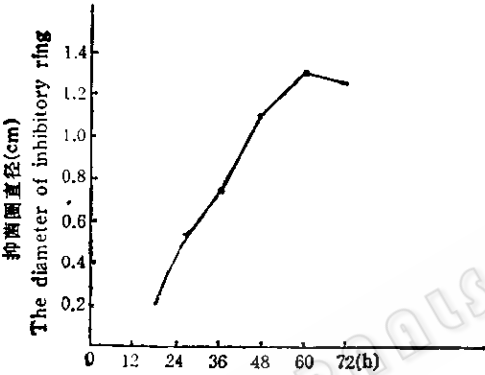


图1 诱导家蝇产生抗菌物质的时间变化  
Fig. 1 Variation of antibacterial activities after induction

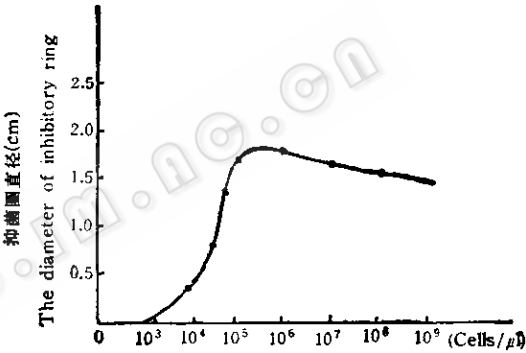


图2 诱导源浓度与诱导效果的关系  
Fig. 2 Relation between inducing concentration and effect

经大肠杆菌诱导后,家蝇抗菌物质的基因启动并表达,产生抗菌物质并随时间延长而增多。诱导后 60 小时达最大值。但此时有大部分幼虫化蛹,用毛细管法所取的血淋巴量下降,结果见图 1。

(五) 诱导强度与诱导效果的关系

1. 用不同浓度的大肠杆菌对家蝇进行抗菌物质的诱导: 结果(图 2)表明, 诱导源浓度过高或过低,诱导效果均不理想。当浓度为  $10^5$  菌体/ $\mu\text{l}$  时效果最好, 浓度太高易引起

表4 50W 超声波处理后家蝇血淋巴抑菌效果(对大肠杆菌)  
Table 4 Effect of 50W sonic treatment on the hemolymph antibacterial activity to *E. coli*

处理时间 (min) Treatment time		1	2	3	4	5	10
抑菌圈直径 Diameter of inhibitory ring (cm)	1	1.5	2.0	3.5	3.6	3.5	3.8
	2	1.7	2.5	3.7	3.0	4.0	3.6
	3	1.6	2.2	3.6	3.8	3.5	3.0
	平均 Average	1.6	2.2	3.6	3.5	3.7	3.5

幼虫死亡,浓度太低诱导效果不好。

2. 用超声波法对家蝇幼虫进行处理:结果表明,诱导功率大于 100W 时幼虫大部分死亡,而较为理想的处理功率为 50W,但延长处理时间到 3—5 分钟时诱导效果最佳(表 4)。处理 10 分钟,有 50% 左右家蝇幼虫死亡。

## 讨 论

1. 由于家蝇个体小,用注射法诱导抗菌物质和取得大量样品都存在一定困难,所以我们采用了超声波法、加热法、冷冻法等物理方法进行处理。这在其它大个体昆虫处理上已有类似报道<sup>[1,9]</sup>。血淋巴的提取采用研磨后高速离心的方法。结果是在不同的物理处理方法中以超声波法最佳,而用离心的方法则可以取得较大量的血淋巴,为抗菌物质的分离纯化等实验打下一定基础。

2. 在用毛细管法取血淋巴时,我们通常以每 2—3 头家蝇为一份样品做抑菌或溶菌试验,因为要大量取得血淋巴较难。此外,在注射大肠杆菌过程中,个别幼虫存在注射进的菌液倒流出体外的情况,实验中应注意避免。在测量抑菌圈直径时,有些抑菌圈形状不太圆,我们采用测量其最大、最小直径后平均的办法处理。

3. 从目前对昆虫抗菌肽及溶菌酶的研究进展来看,利用昆虫抗菌物质来研究生产新型抗菌物质正受到重视,利用昆虫抗菌基因培育新型抗病作物品种也正兴起<sup>[10]</sup>,而选择杀菌力强、杀菌谱广的物质则是这些工作的基础。通过我们的实验证明,家蝇抗菌物质符合以上要求。可以预料,这一工作将有广泛的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] 屈贤铭等: 昆虫学报, 27(3): 275—278, 1984。
- [2] 祁国荣等: 科学通报, 28(10): 622—624, 1983。
- [3] Boman, H. G. et al.: *Insect Biochem.*, 11: 33—42, 1981。
- [4] Pomning, R. F. et al.: *Comp. Biochem. Physiol.* 55(B): 221—223, 1976。
- [5] 张 然等: 昆虫学报, 33(1): 7—13, 1990。
- [6] 王晓东等: 昆虫知识, 35(1): 40—42, 1991。
- [7] 李宝珍等: 昆虫知识, 7(1): 49, 1963。
- [8] Hultmark, D. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 106: 7—16, 1980。
- [9] 屈贤铭等: 昆虫学报, 28(1): 1—7, 1985。
- [10] 黄自然: 高技术新技术农业应用研究, 第 328—331 页, 中国科学技术出版社, 北京, 1991。

## ABSTRACTION OF HEMOLYMPH OF HOUSE FLY AND THE INDUCING OF ITS ANTIBACTERIAL MATTER

Wang Yuancheng   Liu Wei   Yang Feng

(Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Feng Guolei

(Institute of Zoology, Academy Sinica, Beijing 100080)

Antibacterial matter was induced from house fly (*Musca domestica*) by injecting *E. coli* into its body and by using sonic treatment. The activity and specificity of antibacterial matter were reported and the abstraction method of hemolymph was also described. The results shows that both injection and sonic method were able to induce antibacterial matter from house fly and the activity peak value appeared across 60 hours after treatment. After 48 hours and at the dilution of 100 times, the activity of antibacterial matter in hemolymph is 0.115 unit. The antibacterial matter could also have restriction effect on the growth of *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas campestris*, and *Bacillus thuringiensis* but it could not act on *Beauveria bassiana*. Inducing effect of the antibacterial matter on larva is higher than on adult insect. By using centrifuge method the yield of hemolymph is 2 times than capillary method used. The efficiency of centrifugal method is 50 times that of the capillary method.

**Key words**   *Musca domestica*; Hemolymph; Antibacterial matter