

## 球形芽孢杆菌 Ts-1 灭蚊毒蛋白的酶联 免疫吸附测定\*

王 健 任改新 尚克进

(南开大学生物系, 天津)

通过 Sephadex G-200 柱层析纯化得到球形芽孢杆菌 Ts-1 毒蛋白, 其中主要是 42kDa 和 43kDa 两种毒蛋白。用此毒蛋白免疫家兔获得抗血清。利用 ELISA 双抗体夹心法比较测定了三种灭蚊球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 高毒株和两种无毒株, 证明 ELISA 具有很强的特异性。ELISA 测定球形芽孢杆菌 Ts-1 纯化毒蛋白, 最低可检值为  $1.56 \times 10^{-7}$  mg/ml。球形芽孢杆菌 Ts-1 发酵液的最低可检度为 1:16000 倍稀释。ELISA 测定 12 和 24 小时发酵培养的 Ts-1 样品处理液中毒蛋白的含量, 分别为 0.049 mg/ml 和 0.22 mg/ml, 毒蛋白含量相差 4.59 倍。而相应的生物测定 LC<sub>50</sub> 值分别为 0.71 ppm 和 0.154 ppm, 毒力相差 4.61 倍。ELISA 与生物测定方法结果吻合。

**关键词** 酶联免疫吸附法; 球形芽孢杆菌; 毒蛋白

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 已被证明对库蚊属、部分按蚊及伊蚊幼虫具有很高的毒效, 而对高等动物和非目标生物无毒害<sup>[1]</sup>。目前发现除球形芽孢杆菌 2297 外, 其高毒株都集中于血清型 H5a5b。它已被世界卫生组织 (WHO) 列为最有开发前途的生物杀虫剂之一。但是迄今, 测定该菌毒力的常规方法仍是通过敏感试虫的生物测定。该法需常年恒温 and 专人饲养大量供试幼虫, 要求一定的技术条件, 工作量大, 出结果慢, 而且各步骤操作处理很难标准化。本文试图将敏感性和特异性较强的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 引入球形芽孢杆菌的毒力测定, 寻求建立一种快速、简便、特异、准确、易于标准化的生化测定方法。同时, ELISA 方法的建立, 也将为该菌生物基因工程中有毒株的筛选, 以及对毒蛋白的检测, 提供大规模快速检测手段。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株培养和抗原制备

供试球形芽孢杆菌 Ts-1 (本实验室分离保存) 在 MBS 固体培养基上, 28℃ 培养 10 天。用 0.05 mol/L NaOH 溶液抽提该菌孢晶复合物中的蛋白质, 经 37000 × g 离心 30 min, 弃沉淀, 上清液对水透析过夜, 通过 0.22 μm 微孔滤膜, 滤液用 1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液将 pH 调至 4.4, 弃上清, 将沉淀用少量 20 mmol/L pH7.5 磷酸钾缓冲液溶解, 通过 Sephadex G-200 层析柱 (70 × 2.5 cm), 流速 3 ml/14 min, 每 3 毫升一管, 分部收集, 用 20 mmol/L pH7.5 的磷酸钾缓冲液洗脱。生物测定后

本文于 1988 年 12 月 7 日收到。

本文得到军事医学科学院朱关福教授指导, 特此致谢。

\* 国家 75-38-02-06 项目资助部分经费。

将毒性部分合并,冷冻干燥。用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测该毒蛋白的分子量。用 7% 凝胶制备电泳分离各区带<sup>[2]</sup>。

### (二) 抗血清的制备

将纯化毒蛋白溶于 0.5ml 生理盐水中,与等量福氏完全佐剂混合乳化后,多点皮下注射家兔。随后,进行静脉注射。每只 2.5kg 家兔注射总剂量为 18mg。双向琼脂糖免疫扩散测抗血清效价。抗血清用 33% 的饱和硫酸铵沉淀两次。通过 DEAE-52 层析柱 (10 × 2cm), 流速 5ml/6min, 每 5 毫升一管,用 0.01mol/L pH7.4 的磷酸钠缓冲液洗脱,获取纯化 IgG。

### (三) 酶标记抗体的制备

利用过碘酸钠法<sup>[3]</sup>将辣根过氧化物酶结合到纯化的 IgG 上。

### (四) ELISA 待测抗原的处理

球形芽孢杆菌 Ts-1 和标准菌无毒株 1170,在 30℃ 下,发酵培养 28 小时。取一定量发酵液加入等量 0.1mol/L 的 NaOH 溶液,4℃ 振荡 2 小时,离心弃沉淀,上清液调 pH 至 7.0。

### (五) ELISA 双抗体夹心法<sup>[4]</sup>

固相载体使用国产 40 孔聚苯乙烯微量凹孔板。包被抗体用纯化 IgG (1:200 稀释)。标准及待测抗原倍比稀释,酶标记抗体 1:200 稀释。

### (六) 生物测定

毒蛋白杀虫活性的测定,采用 2—3 龄蚊幼虫。每只 25ml 的烧杯中,加 10ml 水和 10 头幼虫。加入一定量待测毒蛋白,25℃ 下,24 和 48 小时检查幼虫死亡数。利用机值分析方法<sup>[5]</sup>测发酵液 LC<sub>50</sub> 值。

## 结果和讨论

### (一) 纯化毒蛋白的电泳分析

将 Sephadex G-200 柱层析纯化的毒蛋白:通过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电

泳得到两条主要区带。薄层扫描分析这两条区带的蛋白质总含量在 90% 以上。经计算分子量分别为 42kDa 和 43kDa(图 1)

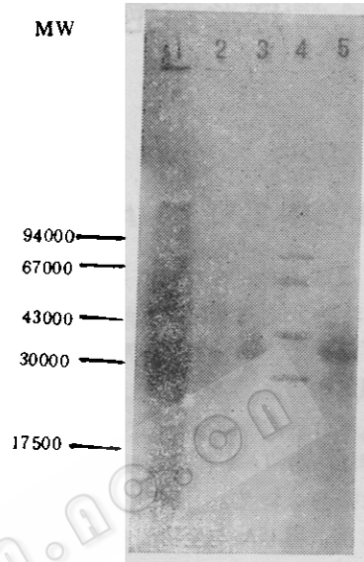


图 1 Sephadex G-200 柱层析纯化的 Ts-1 毒性部分的 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳  
Fig. 1 10% SDS-PAGE of the Ts-1 toxin purified by Sephadex G-200 column chromatography

1. 上柱液 No purified toxic protein; 2, 3 和 5. 三批纯化的毒蛋白 Purified toxic protein, respectively; 4. 分子量标准蛋白 Molecular weight standards

进一步利用制备电泳分离各区带得到 a, b, c 三条区带。生物测定表明,这三条区带都具有较高的灭蚊毒性(图 2, 表 1)。根据 SDS-PAGE 电泳结果推测毒性成分可能是由两种蛋白质组成。只是因为毒蛋白纯化过程中,未使用蛋白酶抑制剂予以保护,加之碱抽提蛋白质的条件比较剧烈,有可能其中一种蛋白质的某些基团或片段在纯化过程中失掉,造成电荷上的差异,导致制备电泳中出现三条区带。

### (二) 双向琼脂糖凝胶扩散分析

由于 a, b, c 三条区带都具有较高的灭蚊毒性,用其免疫家兔获得的抗血清与

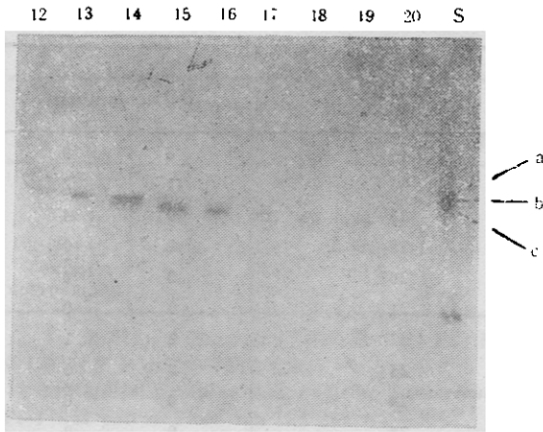


图2 制备电泳各凝胶切片抽提液的聚丙烯酰胺凝胶电泳(7%)

Fig. 2 7% PAGE of extract from Gel section of preparative electrophoresis

S: Sephadex G-200 柱层析纯化的样品, 包括 a, b, c 三条区带。12-20: 分别表示制备电泳各凝胶切片抽提液的管号。12, 13: 主要是区带 a; 14 管: a, b, c 三条区带并存; 15 管: 主要是区带 b; 16 管: 区带 c。

S: Toxic protein purified by Sephadex G-200 column chromatography, including three bands a, b, c. 12-20: Tube number of extract from Gel section; 12, 13: Band a; 14: Including bands a, b, c; 15: Band b; 16: Band c.

纯化的毒蛋白反应, 形成两条清晰的沉淀线。这进一步证实了纯化毒蛋白是由两种蛋白质组成的推测。

### (三) ELISA 与生物测定的相关性

以球形芽孢杆菌 Ts-1 纯化毒蛋白做为抗原, 制作剂量反应标准曲线(图3)。测定发酵液 ELISA 值, 在标准曲线中找出相应的含量, 即为发酵液中毒蛋白含量。ELISA 测定 Ts-1 发酵培养 12 小时的样品处理液, 毒蛋白含量为 0.049 mg/ml; 该发酵液继续培养至 24 小时, 其样品处理液中毒蛋白含量为 0.225 mg/ml (表 2)。对发酵时间不同的两种发酵液进行生物测定。发酵培养 12 小时的样品  $LC_{50}$  值为 0.71 ppm, 发酵

培养 24 小时的样品  $LC_{50}$  值为 0.154 ppm (表 3)。用 ELISA 测知, 球形芽孢杆菌 Ts-1 发酵培养 24 小时的样品处理液的毒蛋白含量比发酵培养 12 小时的样品处理液的毒蛋白含量高 4.59 倍。生物测定球形芽孢杆菌 Ts-1 发酵培养 24 小时样品的毒性比发酵培养 12 小时样品的毒性高 4.61 倍。结果表明, ELISA 与生物测定方法在测定 Ts-1 的毒性方面有很好的吻合性。

### (四) ELISA 双抗体夹心法的特异性

球形芽孢杆菌高毒株 Ts-1 培养 28 小时样品处理液, 用 Lowry 法测总蛋白浓度为 2.12 mg/ml。球形芽孢杆菌无毒株 1170 培养 28 小时样品处理液总蛋白浓度 1.95 mg/ml。两种样品处理液总蛋白含量基本相当。球形芽孢杆菌 Ts-1 培养 28 小时样品的 ELISA 值随蛋白质浓度增加而增高; 而球形芽孢杆菌 1170 培养 28 小时样品的 ELISA 值很低, 并且随蛋白质浓度的增加变化不大(图 4)。因球形芽孢杆菌 1170 株产孢

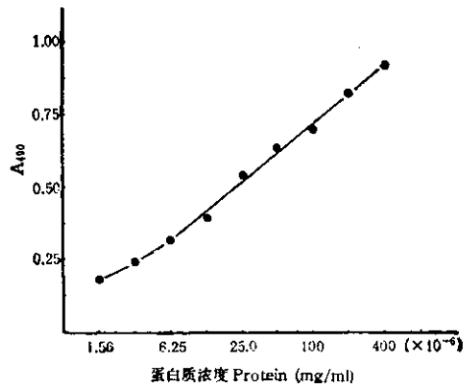


图3 Ts-1 纯化毒蛋白剂量反应标准曲线

Fig. 3 Standard curve of Ts-1 purified toxic protein for ELISA

率很低, 并且在球形芽孢杆菌分类中与

表1 制备电泳各凝胶切片抽提液的生物测定

Table 1 Bioassay of extract from gel section of preparative electrophoresis

抽提液管号 Tube No. of eluted band	死亡数* Delth numbers		抽提液管号 Tube No. of eluted band	死亡数* Delth numbers	
5	0	1	16	8	9
6	1	1	17	1	2
7	3	2	18	0	4
8	1	3	19	0	0
9	2	1	20	0	0
10	1	1	21	0	0
11	2	4	22	0	1
12	7	9	23	0	0
13	9	10	24	0	0
14	10	10	25	0	0
15	9	10	S(25 $\mu$ g/cup)**	7	10

\* 每杯 10ml 水,放入 10 条 3 龄蚊幼虫, 25 $^{\circ}$ C, 24 小时检查各杯中蚊幼虫死亡数。重复一次。

\*\* Sephadex G-200 柱层析纯化的毒蛋白样品。

\* Delth numbers are detected by using 10 mosquito larvae in 10 ml water/cup for 24h at 25 $^{\circ}$ C. Each sample is repeated.

\*\* Toxic protein purified by Sephadex G-200 column chromatography.

表2 ELISA 法测定球形芽孢杆菌 Ts-1 的发酵液

Table 2 ELISA method for determination of *Bacillus sphaericus* Ts-1 fermentation solution

样品 Sample	吸光率 A 490 nm								样品稀释倍数 Dilution fold	蛋白质含量 Protein Conc. (mg/ml)
	1	2	3	4	5	平均值 X	标准方差 Sx	变异系数 C. V.		
S12	0.57	0.70	0.78	0.58	0.73	0.67	0.09	0.14	50	0.049
S24	0.48	0.48	0.41	0.59	0.42	0.48	0.07	0.15	1000	0.225
阳性对照	0.83	0.90	0.91	0.94	0.90	0.90	0.04	0.045	500	2
阴性对照	0.10	0.11	0.09	0.12	0.10	0.104	0.01	0.11	50	—

S.2 和 S24 分别为球形芽孢杆菌 Ts-1 发酵培养 12 小时和 24 小时样品处理液。

阳性对照为 Sephadex G-200 柱层析纯化的毒蛋白。

阴性对照为标准球形芽孢杆菌无毒株 1170 发酵培养 24 小时的样品处理液。

S12 and S24: Samples of *Bacillus sphaericus* Ts-1 cultures for 12 and 24 h.

Positive contrast: Toxic protein purified by Sephadex G-200 chromatography.

Negative contrast: Sample of *Bacillus sphaericus* 1170 culture for 24 h.

Ts-1 的血清型不同,所以进一步实验球形芽孢杆菌 2362(与Ts-1血清型相同的高毒株);球形芽孢杆菌 2297(不同血清型的高毒株);球形芽孢杆菌 84-5(产孢率高的无毒株,该菌株为本实验室分离,尚未报道),结果如图 5。以上实验有力地证明 ELISA 具有很强的特异性。

### (五) ELISA 敏感性

倍比稀释球形芽孢杆菌 Ts-1 纯化抗原进行 ELISA 检测,其毒蛋白含量的最低可检值为  $1.56 \times 10^{-5}$  mg/ml。Ts-1 发酵培养的样品处理液最低可检度为 1:16000 倍稀释。测定 Ts-1 发酵液的敏感性低于纯化抗原的敏感性。这是由于发酵液中成分复杂,除含有被测抗原外,还含有各种微量元素及培养基等,这些物质都可能影响

表 3 ELISA 与生物测定的比较

Table 3 Comparison of ELISA method and bioassay

样品 Sample	半致死浓度 LC <sub>50</sub> (ppm)	毒蛋白浓度 ELISA (Pro. conc. mg/ml)
S12	0.71	0.049
S24	0.154	0.225
毒性比较 Toxicity comparison	4.61倍 (times)	4.59倍 (times)

S12 和 S24: 分别表示球形芽孢杆菌 Ts-1 发酵培养 12 小时和 24 小时的样品处理液。

S12 & S24: Samples that *Bacillus sphaericus* Ts-1 was cultured for 12h and 24h.

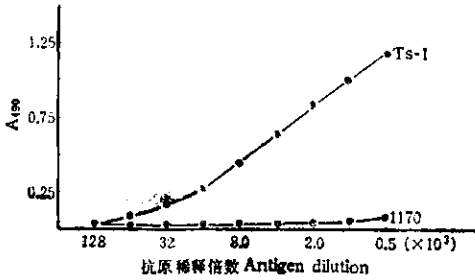


图 4 ELISA 测定球形芽孢杆菌 Ts-1 和 1170 发酵培养 28 小时的样品处理液

Fig. 4 ELISA method for determination of *Bacillus sphaericus* Ts-1 and 1170 cultures grown for 28 h

抗原抗体的结合反应，干扰 ELISA 的测定。

(六) ELISA 重复性

测定球形芽孢杆菌纯化毒蛋白的重复性优于培养 12 和 24 小时发酵液的重复性。前者测定所得结果的变异系数 (C.

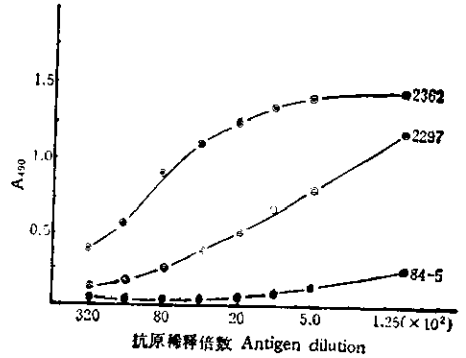


图 5 ELISA 测定球形芽孢杆菌 2297、2362 和 84-5 样品处理液

Fig. 5 ELISA method for determination of *Bacillus sphaericus* 2297, 2362, and 84-5 cultures

V.) 为 0.045, 后者依次为 0.14 和 0.15 (表 2)。

上述 ELISA 的相关性、特异性、敏感性和重复性实验表明, ELISA 用于球形芽孢杆菌毒性的快速检测和有毒株的筛选是可行的。

参 考 文 献

- [1] Shaddock, J. A. et al.: *Environ. Entomol.*, 9: 403—406, 1980.
- [2] 于自然等: *微生物学报*, 30(4): 248—252, 1990.
- [3] Nakane, L. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1084, 1974.
- [4] Wic, S. I. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 891—894, 1982.
- [5] 龚坤元: 杀虫药剂与昆虫毒理进展(1), 龚坤元主编, 科学出版社, 北京, p. 152, 1964.

## ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF LARVICIDAL TOXIC PROTEINS OF *BACILLUS SPHAERICUS* Ts-1

Wang Jian Ren Gaixin Shang Kejin

(Departments of Biology, Nankai University, Tianjin)

*Bacillus sphaericus* Ts-1 Mosquito larvicidal toxins 42 k Da and 43 k Da were isolated by Sephadex G-200 chromatography. Three strains of highly toxic *B. sphaericus* and two non toxic strains were screened for toxic proteins using ELISA. The lowest detectable toxin level was  $1.56 \times 10^{-5}$  mg/ml. Non toxic strains did not produce antigens reacting to either the 42 kDa or the 43 kDa antibodies.

Ts-1 cultures were examined at 12 and 24 h by LC<sub>50</sub> bioassay against *Culex pipiens*.

The LC<sub>50</sub>'s at 12 h and 24 h were 0.71 ppm and 0.154 ppm, respectively, i.e., the toxin level at 24 h was 4.6 times the level at 12 h. ELISA tests established total toxin at 0.049 mg/ml and 0.225 mg/ml at 12 h and 24 h, respectively, confirming the LC<sub>50</sub> study.

### Key words

*Bacillus sphaericus* Ts-1; Toxic protein; ELISA