

杀蜚蠊毒素的研究*

王春生 陈涛 夏克祥 李彦** 刘勇 杨冬菊 尹明珍

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

长期以来, 筛选对蜚蠊具有高毒力的病原微生物的研究进展缓慢。1989年 Mekdad, 等人从自然死亡的马德拉蜚蠊 (*Leucophaea maderae*) 虫尸中分离获得一株高毒力的 *Bacillus cereus* B₁ 菌株^[1]。在用生物测定证明其病原性的同时, 用杯碟法对该菌株产生的杀蜚蠊毒素——磷酸酯酶 C (phospholipase C, 简称 PLC) 进行了测定, 证明了该菌株产生的 PLC 是致死蜚蠊的主要因子。

1989年, 我们从自然死亡的黑胸大蠊虫尸中分离筛选到一批有致病性的菌株^[2]。为快速筛选到对蜚蠊有高毒力的菌株, 在本实验室建立了杯碟法测定 PLC 的方法。用此法筛选了高产 PLC 的菌株 CW-W-90-3, 对该菌株产 PLC 的适宜条件, 以及纯化的 PLC 的杀蜚蠊活性等进行了研究, 现将结果报道如下。

材料和方法

(一) 培养基

1. LB 培养基^[3]。
2. 无机盐培养基是改进的 M₁ 培养基^[3]。

(二) 菌株及菌株培养

菌株 CW-W-90-3 来源于本实验室, 系从自然死亡的蜚蠊虫尸中初筛获得。

将活化的菌株接种于 LB 液体中, 25℃, 180—200r/min 培养 18 小时, 获得原菌液及其离心 (8000 r/min, 4min) 后的无细胞上清液作待测液。

(三) PLC 的测定

1. 杯碟法: 蛋黄琼脂皿的制备采用 Sheldon 等人的方法^[4]。
2. 分光光度法: 在试管中, 0.6ml 待测液加入 1.6ml 1% 的新鲜蛋黄悬液, 置 37℃ 培养 30min, 以磷酸缓冲液为对照, 测定其 O.D.₆₀₀ 的吸光度, 以代表 PLC 的相对活性。

(四) 产高活性 PLC 的适宜条件

1. 不同培养时间与 PLC 活性的相关性: 接种 LB 液体培养基, 分别培养 6、12、18、24、48、72、96、120、144 小时, 取其上清液利用杯碟法测定 PLC 活性, 并检测原菌液的 pH 值。

2. 不同培养基对 PLC 活性的影响:

(1) 将在 0.5% Tween-80 的 LB 液体培养基中^[5]培养 18 小时菌液, 在波长 600nm 测其 O.D 值, 同时检测 pH 值; 用杯碟法测其上清液的 PLC 活性。

(2) 将在 LB 和无机盐培养基中生长 18 小时的菌的上清液, 用杯碟法比较其 PLC 活性, 并检测其不同培养时间的 pH 值变化。

(五) PLC 的耐热性

取菌培养的上清液, 在沸水浴中处理 20、40、60 分钟; 同时将其在 108℃、113℃、121℃ 分别处理 20、

本文于 1991 年 11 月 8 日收到。

* 本研究项目得到湖北省自然科学基金资助。

** 武汉大学实习生。

20、30 分钟,以未处理的上清液作对照,测定其 PLC 活性。

(六) PLC 的初步纯化

纯化方法见参考文献[6、7]。

(七) PLC 杀虫毒性试验

供试虫为室内饲养 235 天的黑胸大蠊若虫。用上述部分纯化的 PLC 液和灭活的 PLC 液(121℃ 处理 30 分钟)各 0.4ml 拌于 1g 无菌饲料中,供 15 头黑胸大蠊取食,对照组用无菌水和饲料供虫取食,每种处理重复 3 次。每天供给饮用的无菌水,置于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的室温中饲养,观察其死、活虫数,将 20 天的结果进行数理统计分析。

结 果

(一) PLC 菌株的筛选

从自然死亡的黑胸大蠊虫尸体中,分离筛选到一批致病性程度不同的菌株。为快速确定其杀虫毒素,用杯碟法对下述菌株进行了测定。其中菌株 BT40-1、30、18、7B-2、56、59 均无透明圈出现,而菌株 42、46 和 CW-W-90-3 有透明圈。其中以 CW-W-90-3 菌株的透明圈直径最大,在样品中加入 BSA 后,透明圈增大。

(二) PLC 高产的适宜条件

1. 培养时间与 PLC 活性的相关性: 表 1 结果表明, CW-W-90-3 菌株培养 12—18 小时, PLC 活性最高,随培养时间的延长,活性明显下降,96 小时以后,趋于稳定。pH 与 PLC 活性密切相关。在培养 18 小时以内,产生 PLC 的高峰时 pH 值由 7.0 上升至 8.0。24 小时后, PLC 活性下降,则 pH 值上升。96 小时后, PLC 活性和 pH 均趋于稳定。

表 1 不同培养时间与 PLC 活性及 pH 的相关性

培养时间 (h)	6	12	18	24	48	72	96	120	144
透明圈直径(mm)	14.0	15.3	15.1	13.5	12.4	11.0	10.0	10.0	10.0
pH 值	7.0	7.5	8.0	8.0	9.0	9.0	10.0	10.0	10.0

2. 不同培养基对 PLC 活性的影响: CW-W-90-3 菌株在含有 0.5% Tween-80 的 LB 培养基中生长 18 小时的培养液,其 O.D 值比在 LB 培养基中的高,即前者的菌数比后者高。同时,经杯碟法测定前者的透明圈直径(23.0mm)明显大于后者(18.0mm)。由此表明, Tween-80 有促进菌生长繁殖的作用。因为菌数高,其 PLC 产量也高,即活性强。此外, Tween-80 对培养液的 pH 有缓冲作用,使培养液的 pH 保持在 8.0 左右,此 pH 适宜于菌产生 PLC。

CW-W-90-3 菌株在 LB 培养基和无机盐培养基中培养 18 小时的菌液,经杯碟法测定的透明圈直径分别为 19.0mm 和 20.3mm,即表明后者 PLC 活性比前者高,无机盐培养基更有利于菌的生长繁殖和 PLC 的产生。检测无机盐培养基的不同培养时间菌液的 pH,其值一直维持在 8.0 左右,这是无机盐培养基中具有缓冲作用的结果。

(三) PLC 的耐热性

从表 2 看出, PLC 在沸水浴中 60 分钟,甚至在 113°C 中 20 分钟仍保持很强的活性,其透明圈直径仅减少 3mm。在 121°C , 30 分钟时, PLC 活性丧失。

(四) PLC 的初步纯化

PLC 粗酶液经 Sephadex G-100 层析柱的洗脱曲线如图 1。用分光光度计法测定 PLC 相对活性

表 2 PLC 的耐热性

处理方式	对照 (未处理)	沸水浴(100℃)			灭菌锅内加压		
					108℃	113℃	121℃
处理时间 (min)	0	20	40	60	20	20	30
实验编号	1	2	3	4	5	6	7
透明圈直径 (mm)	17.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	0

注: 培养 24 小时后的透明圈直径。

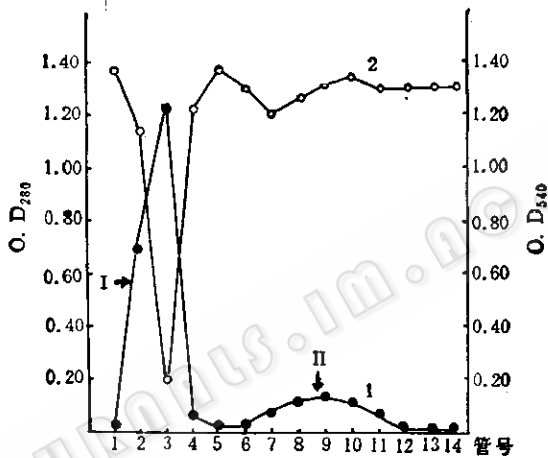


图 1 PLC 的 Sephadex G-100 层析蛋白洗脱曲线及相对酶活性曲线
1. O.D.₂₈₀ 蛋白吸收值; 2. O.D.₅₄₀ PLC 的相对活性。

表 3 PLC 对黑胸大蠊若虫的毒性

处理	总虫数(头)	20 天后检查结果			相对毒力指数
		活虫数(头)	死虫数(头)	死亡率(%)	
灭活 PLC 液	45	28	17	37.78	100.00
PLC 液	46	13	33	71.74	189.89

表明,峰 I 为 PLC,峰 II 为杂蛋白。用杯碟法测定 3 号管收集液在蛋黄琼脂平板上出现 15.0mm 的透明圈,而 9 号管液未出现透明圈,这就更证明峰 I 含有 PLC,峰 II 为杂蛋白。将收集的部分纯化的 PLC 保存于冰箱,用于毒力测定。

(五) PLC 杀虫毒性

PLC 对蜚蠊若虫的毒性见表 3。饲喂提纯 PLC 液,20 天死亡率为 71.74%,而喂食灭活的较纯 PLC 液,20 天死亡率为 37.78%,前者的相对毒力指数为后者的 1.90 倍。由此认为,PLC 是蜚蠊致死的主要因子,故 PLC 被认为是杀蜚蠊的毒素^[1]。

讨 论

用蛋黄琼脂的杯碟法对 PLC 活性的测定是准确可靠的^[1,2,3]。本研究用黑胸大蠊若虫的生物测定证明, CW-W-90-3 菌的部分纯化的 PLC 对其有 71.74% 的死亡率。同时, 用蛋黄琼脂的杯碟法也证明, CW-W-90-3 菌的发酵液或其上清液均产生大而明显的透明圈, 这种透明圈是 PLC 与蛋黄作用的结果。我们的研究与 Mekdad Rahmet-Alla 等人^[1]的结果一致, 因而为快速筛选到产 PLC 的菌株, 建立了蛋黄琼脂的杯碟法。

对 CW-W-90-3 菌株的研究表明, 该菌产生最大 PLC 活性是在培养 12—18 小时, 此时也是菌生长对数期, 这与 *Bacillus cereus* B,^[4] *Pseudomonas aeruginosa*^[5], *Yersinia enterocolitica*^[7] 等菌的结果基本一致。而且此时培养液的 pH 值在 7.5—8.0 之间, 随着培养时间的延长, PLC 酶活性降低, 培养液 pH 也随之上升到 9.0 以上。在 LB 培养液中加入 Tween-80 或用配制的无机盐培养基都有增加 CW-W-90-3 菌的 PLC 的作用。这些将有利于 CW-W-90-3 菌株的发酵生产及杀蠊制剂的研制。

参 考 文 献

- [1] Mekdad, R. A. et al.: *J. Invers. Pathol.*, 53:190—196, 1989.
- [2] 陈海等: 杀虫微生物(第3卷), 第239—240页, 华中师范大学出版社, 武汉, 1989。
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning* p.68, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [4] Sheldon, D.R. et al.: *J. Bacteriol.*, 27:375—382, 1959.
- [5] Chin, J.C. et al.: *J. General. Microbiol.*, 134:2567—2575, 1988.
- [6] 赵永芳编: 生化技术, 武汉大学出版社, 武汉, 1988。
- [7] Toora, S. T. et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 66:303—309, 1989.

STUDIES OF COCKROACHCIDAL TOXIN

Wang Chunshen Chen Tao Xia Kexiang Li Yan Liu Yong
Yang Dongju Yin Mingzhen

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

A cockroachcidal bacterial isolate CW-W-90-3 was selected by egg yolk agar plate. The isolate produced phospholipase C (PLC) which was pathogenic to the nymph of cockroach. The conditons for production of high level PLC in dicated that using LB medium supplement Tween-80 or minimal medium could effectively increase the activity of PLC. The optical phase for production of PLC was in the period of 12—18 hours and below pH8.0. The activity of PLC was reduced along with the culture time until 48 hours. The PLC was resistant to heat. The partially purified PLC from the culture supernatant was assayed by using cockroach nymphes and produced 71.74% mortality.

Key words CW-W-90-3; Phospholipase C