

球形芽孢杆菌 Ts-1 品系的形态 发生和灭蚊毒蛋白形成的研究

张柏莉 任改新 王 健

(南开大学生物系, 天津 300071)

用酶联免疫吸附测定、荧光抗体定位和 SDS-PAGE 等方法, 结合球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) Ts-1 品系在芽孢形成过程中的形态变化和不同发育阶段菌样毒力的生物测定, 对毒蛋白的形成发生进行了比较研究。Ts-1 毒蛋白形成、毒力大小和芽孢形成过程中形态变化密切相关。首次用荧光抗体定位方法不仅证明带有伴孢晶体的芽孢荧光度强, 毒蛋白含量高; 而且生长 8 小时营养体的细胞壁上也有毒蛋白的同源成分。

关键词 酶联免疫吸附测定; 荧光抗体定位; 球形芽孢杆菌 Ts-1 品系; 毒蛋白

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) (以下简称 B.s) 一些高毒品系能够产生对蚊幼虫有毒效的伴孢晶体, 但它不同于苏云金芽孢杆菌的是位于两层胞外膜之间, 菌体自溶后, 以芽孢晶体复合物的形式存在^[1,2]。伴孢晶体有效成分是分子量为 43kD 毒蛋白。在这方面, Davidson^[3-5], Tinelli 等^[6], Baumann 等^[7], 于自然等^[8] 对不同品系均有过相应报道。Broadwell 和 Baumann 报道了从 B.s.2362 的 46 小时培养物得到的晶体蛋白分别为 125kD, 110kD, 63kD 和 43kD, 其中 125kD 和 110kD 是原毒素, 是 63kD 和 43kD 的前体。在后两者小分子多肽中, 只有 43kD 对蚊幼虫有毒性。同时进一步分析了 B.s.2362 在生长发育和芽孢形成过程中毒蛋白产生的变化^[9]。Kalfon 等借助电子显微技术, 研究了 B.s.2297 伴孢晶体发生和毒力的关系, 对其孢子形成过程进行了探讨^[2]。B.s. Ts-1 是我国 1982 年发现的对蚊幼虫有高毒效的菌株^[10,11], 其毒蛋白的提取和制备, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和毒力生物测定的相关性等工作都已有较全面的论述^[8,12]。但在常规培养发酵试验中除显微镜检测外, 对毒蛋白的形成、特性以及和形态发生的关系尚未有报道。作者在纯化制备 Ts-1 毒蛋白和其特异性抗体的基础上, 结合生物杀虫活性和 pH 值测定, 对 Ts-1 不同发育期菌样采用 ELISA、荧光抗体定位和 SDS-PAGE 进行了比较分析, 现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 供试菌株和幼虫

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) Ts-1 品系 (简称 B.s.Ts-1) 和苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) KAg 品系 (简称 B.t.KAg(H4a-4c)) 均由本实验室提供。球形芽孢

杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 1.170 品系 (简称 B.s.1.170) 由中国科学院微生物研究所菌种保藏室提供。

淡色库蚊 (*Culex pipiens pallens*) 幼虫由本实验室常年饲养。

(二) 培养基和培养条件

Ts-1 菌样制备是在 FBS 液体培养基发酵形态观察基础上^[13], 采用 MBSA 培养基^[2], 30 ℃ pH 7.2—7.3 固体培养, 每隔 4 小时收集菌苔, 用蒸馏水和 1mol/L NaCl 洗涤后, 冷冻干燥, 作为供试菌样, 置 -20 ℃ 保存备用。

(三) 方法

Ts-1 毒蛋白分离纯化、特异性抗体制备和其效价测定参考于自然等^[8] 和王健等^[12] 的方法。不同发育期菌样涂片染色, 用研究显微镜 (型号 Amplival) 观察和拍照。毒力生物测定采用常规方法^[14]。毒蛋白抽提是将各菌样 (5 mg/ml) 溶于等体积的 0.1 mol/L NaOH 中, 室温振荡 1.5 小时, 离心 (17500×g, 30 分钟), 取上清液, 透析得到各发育期毒蛋白粗制品, 供电泳和 ELISA 测定。样品配成浓度 2mg/ml, 以无毒株 B.s.1.170 和非同源株 B.t.K_{Ag} 相同方法处理的样品作为阴性对照, 用 ELISA 双抗体夹心法测定 OD₄₉₀ (以阴性对照 OD₄₉₀ 不大于 0.3 为起点)。毒蛋白荧光抗体定位研究参考许屏^[15] 直接法, 取 20mg IgG 溶于 1ml 0.01 mol/L pH9.0 磷酸盐—生理盐水缓冲液, 另取 0.2mg FITC 色素溶于 0.1ml 0.5 mol/L pH9.0 磷酸盐—甘油缓冲液, 逐滴混合, 25 ℃ 避光搅拌约 2 小时, 避光透析, 求得标记物克分子比 ($0.41 \times \mu\text{g/ml}$ 色素 ÷ mg/ml IgG) (克分子比在 1—4 之间说明标记成功)。FITC-IgG 标记物分装于无菌安瓿瓶中, -20 ℃ 避光保存。菌样涂片, K 氏固定液固定 8 分钟, 37 ℃ FITC-IgG 染色 40 分钟。用 UNIVER 荧光光度计观察和拍照。

结 果

碱抽提和 Sephadex G-200 柱层析得到 Ts-1 毒蛋白主要是 43kD 和 42kD 两种毒蛋白。琼脂糖双扩散法测其抗体 IgG 效价为 64。

Ts-1 不同发育期菌样的形态观察 (图版 I-1) 和 ELISA 测定及毒力的生物测定 (图 1) 表明: 8 小时菌样基本为营养体, ELISA OD₄₉₀ 值为 0.67, 为阳性, 生物测定 LC₅₀ 值约为 1.32ng/ml, 有弱毒力。随着培养, 芽孢逐渐形成, 毒力也逐渐增加, 28—32 小时菌样, 约 50—60% 芽孢游离, ELISA OD₄₉₀ 达到最高值 1.10, LC₅₀ 值为最低 0.24ng/ml, 说明毒力最高。36—40 小时后, 大量芽孢游离和部分菌体自溶, 测得 pH 值达 8.2 以上, ELISA OD₄₉₀ 值降低, LC₅₀ 值升高, 说明毒力开始下降。从图 1 也说明了 ELISA 测定结果和毒力生物测定 LC₅₀ 值具有一定相关性。

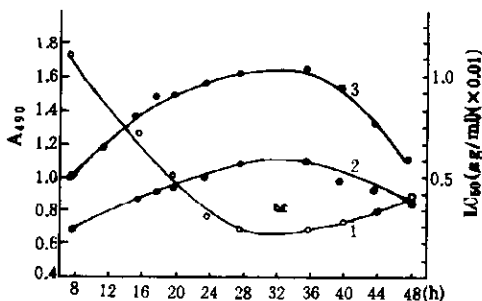


图 1 Ts-1 不同发育期菌样的酶联免疫吸附测定和毒力生物测定

Fig. 1 ELISA and bioassay of the different Ts-1 stage preparations

1. 生物测定 Bioassay curve

2、3. 酶联免疫吸附测定 ELISA

2. 抗原 500 倍稀释 Antigen dilution 500

3. 抗原 250 倍稀释 Antigen dilution 250

Ts-1 不同发育期菌样 PAGE 和 SDS-PAGE 分析 (图版 II) 表明: 8 小时和 12 小时菌样有一条明显的 125—130kD 蛋白带, 同时也可看到较浅的 110kD 蛋白带; 培养到 16 小时, 除 125—130kD 蛋白带外, 增加了 110kD、63kD 和 43kD 各一条蛋白带, 继续培养, 更为明显。

FITC-IgG 标记物克分子比为 1.92, 标记效果良好。UNIVER 荧光显微照相结果说明: 带有伴孢晶体的芽孢上有较明显的荧光强度, 菌体细胞壁上也有荧光, 较弱 (图版 1-2)。

讨 论

Ts-1 菌株在培养过程中首先产生原毒素, 在一定条件下可裂解为对蚊幼虫有毒的毒素, 这和对鳞翅目幼虫有毒效的苏云金芽孢杆菌的伴孢晶体毒素相类似。

30℃ 培养 8 小时菌样为营养体, 电泳分析明显有一条 125—130kD 蛋白带, 说明晶体蛋白产生在芽孢形成之前。Broadwell 和 Baumann 研究 B.s.2362 株时有类似报道^[9]。8 小时菌样被蚊幼虫食入后, 中肠的碱性条件和碱性蛋白酶将分子量为 125—130kD 的原毒素裂解为有活性的 43kD 毒蛋白, 使蚊幼虫中毒死亡。原毒素是 43kD 毒蛋白的前体, 具有和 43kD 毒蛋白相同的抗原决定簇, 因而有同源交叉反应^[9], 故 ELISA 结果为阳性。荧光抗体定位研究也证明了菌体细胞壁上有晶体蛋白的同源成分。

随着芽孢逐渐形成, 毒力也逐渐增加。电泳分析除 125—130kD 蛋白带外, 又增加了 110kD、63kD 和 43kD 各一条蛋白带。这与 Broadwell 和 Baumann 研究 B.s.2362 株的结果相符。

培养到 36—40 小时后, 大量芽孢游离, 部分菌体自溶, 此时生物测定和 ELISA 结果均表明毒力开始下降。液体和固体培养的 pH 值都升高到 8.2 以上, 液体培养尤为明显。Broadwell 和 Baumann 研究 B.s.2362 株时, 用免疫印迹方法测得培养到 25 小时左右毒力开始下降, 认为培养后期 pH 值升高, 菌体分泌的胞外碱性蛋白酶对毒蛋白毒力的降低有一定作用^[9]。因此严格控制发酵周期, 及时集菌处理, 对提供发酵产品毒力是有利的。

参 考 文 献

- [1] Yousten, A. A.: *Adv. Biotechnol. Processes*, 3: 315—343, 1984.
- [2] Kalfon, A.: *J. Gen. Microbiol.*, 130: 893—900, 1984.
- [3] Davidson, E. W. and P. Myers: *FEMS Microbiol. Lett.*, 10: 261—265, 1981.
- [4] Davidson, E. W.: *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 6—9, 1982.
- [5] Davidson, E. W.: *Can. J. Microbiol.*, 20: 271—275, 1983.
- [6] Tinelli, R. et al.: *FEBS Lett.*, 142: 155—158, 1982.
- [7] Baumann, P. et al.: *J. Bacteriol.*, 163(2): 738—747, 1985.
- [8] 于自然等: 微生物学报, 30(4): 254—258, 1990.
- [9] Broadwell, A. H. and P. Baumann: *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(4): 758—764, 1986.
- [10] 任改新等: 昆虫学报, 25(3): 349—350, 1982.
- [11] 任改新等: 昆虫学报, 30(1): 21—25, 1987.
- [12] 王健等: 微生物学报, 30(5): 369—374, 1990.
- [13] 任改新等: 微生物学报, 23(2): 163—167, 1983.
- [14] WHO: *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 59(6): 857—863, 1981.
- [15] 许 屏: 荧光和免疫荧光染色技术及应用, 人民卫生出版社, 北京, 1983 年。

MORPHOGENESIS OF *BACILLUS SPHAERICUS* Ts-1 AND FORMATION OF TOXIC PROTEINS TO MOSQUITO LARVA

Zhang Baili Ren Gaixin Wang Jian

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

The close relationships between morphogenesis of *Bacillus sphaericus* Ts-1 and formation of toxic proteins were studied systematically and comparatively by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, FITC-IgG Location and SDS-PAGE etc. This study showed that the toxic proteins of Ts-1 were produced in 8h culture at 30 °C. The toxicity increased steadily along with the sporification and then declined as the free spores increased greatly without collection immediately. It is suggested that substances homologous with crystal toxic proteins were situated on the cell walls.

Key words Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; FITC-IgG Location; *Bacillus sphaericus* Ts-1; Toxic proteins

图 版 说 明

Explanation of plates

图版 I

1. Ts-1 不同发育期菌样形态显微照相 ($\times 6800$); 2. Ts-1 菌样荧光抗体定位显微照相 ($\times 6800$): a. B.t.KAg 对照株; b. Ts-1 芽孢; c. Ts-1 营养体。

图版 II

Ts-1 不同发育期菌样碱溶蛋白的 10% PAGE 和 SDS-PAGE: 1. 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 2. 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。Ag-Ts-1 毒蛋白; SP: 标准蛋白; 8-48: 8-48 小时碱溶蛋白。

Plate I

1. Microphotograph of the different stage preparations of Ts-1 liquid cultures; 2. Microphotograph of Ts-1 stained by FITC-IgG: a. Control; b. Spore; c. Vegetable.

Plate II

10% PAGE and SDS-PAGE of the alkali-solubilized proteins of the different Ts-1 stage preparations. Ag: Ts-1 toxic proteins; SP: Standard proteins; 8-48: 8-48 h alkali-solubilized proteins.