

球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株杀蚊 毒素的提取及其同源性研究*

周志宏** 张用梅 刘娥英

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

从球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株芽孢-晶体复合物中分别提取孢壁蛋白(S蛋白)和孢晶毒素。采用 SDS-PAGE 证明孢晶毒素具有 43 和 40kD 两种多肽, 但 S 蛋白只有一条 104kD 的蛋白带。后者经 NaOH 处理迅速降解成 43 和 40kD 的多肽。S 蛋白和用 Sephadex G-75 提纯的孢晶毒素对三龄致倦库蚊幼虫的 LC₅₀值(48h)分别为 267 和 10ng/ml。免疫双扩散试验证明 2362、1593、Bs-10 (H_{5a5b}) 和 2297 (H₂₅) 菌株的孢晶毒素能与 C₃-41 菌株的孢晶毒素抗血清发生交叉反应, 但 K (H₁)、SSII-1、1404 (H₂) 和 2315 (H₂₆) 菌株的孢晶毒素与此抗血清不发生交叉反应。同时还证明 C₃-41 菌株的 S 蛋白和孢晶毒素具有抗原同源性。

关键词 球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株; 毒素; 同源性

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 杀蚊是通过其毒素起作用的, 杀蚊活性主要来源于晶体和芽孢^[1]。对球形芽孢杆菌 1593、2362 等菌株的杀蚊毒素已有报道^[2-4]。

Baumann 的工作证明球形芽孢杆菌对蚊幼虫具有毒杀作用的是 43、63kD 的多肽^[5]。然而近几年来, 通过对芽孢-晶体复合物及纯晶体中孢晶毒素和晶体毒素的深入研究, 证明对蚊幼虫或蚊细胞株具有毒性的是 42 和 51kD 的多肽^[5-7]。并证实 42 和 51kD 多肽为二元毒素, 只有在二者同时参与下才具毒性, 单一多肽对蚊幼虫是无毒的^[6,7]。42 和 51kD 多肽在抗原性上不同源, 但这二种多肽均存在于 H_{5a5b}型菌株 1593、2362、1691, H₂₅型的 2297 和 H₆型的 IAB59 中, 而在 H₁型的 Kellen K、H_{2a2b}型的 SS I-1 和 H₆型无晶体菌株 718 中未检测出这二种多肽^[6]。

有的作用曾报道在 2362 菌株部分提纯的晶体制备物中, 其主要成分除 42 和 51kD 多肽外, 还有 122 和 110kD 蛋白质^[5]。然而, 对球形芽孢杆菌的孢壁表层蛋白(简称 S 蛋白)的研究证明 122 和 110kD 蛋白质是污染了 S 蛋白^[8], 进一步证明 110kD 蛋白对蚊幼虫具有毒性是由于污染了少量 51 和 42kD 多肽所引起^[7]。

本实验室分离的球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株杀蚊效果高于国内外的高毒株 Bs-10 和 2362^[9], 在野外大面积灭蚊试验和应用中杀蚊效果十分显著^[10-13], 对这一优良菌株的毒素有待了解。本文报道对其研究的结果。

本文于 1992 年 4 月 27 日收到。

* 本研究得到国家自然科学基金资助。

** 现在工作单位: 中国科学院微生物研究所。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株系本实验室分离^[14]; 2297、2362、1593、K、SS I-1、1404、2315 菌株均为本实验室保藏菌种; Bs-10 菌株系江苏省里下河地区农业科学研究所赠送; 无毒株 AS1. 1681 系中国科学院微生物研究所提供。

(二) 培养基

见文献 [14]。

(三) 细菌培养

保藏菌种转接斜面, 活化培养至芽孢形成, 活化一次的芽孢转接于固体平板上, 在 25—28℃ 下培养 96 小时, 收集菌苔 (芽孢)。

(四) 毒素的提取

1. 孢晶毒素的提取: 采用三种方法进行: ①用 1mol/L NaCl 和 0.01mol/L EDTA (pH8.0) 分别洗芽孢两次, 离心收集芽孢, 按 1:5 (芽孢: 蒸馏水, W/W) 加水制成悬液; 在 -30℃ 和室温间冻融 5—6 次; 加入与芽孢悬液等体积的 0.1mol/L NaOH 溶液, 在 25℃ 下以 100r/min 保温 3 小时, 12,000r/min 离心 20 分钟; 收集的上清液用 pH4.0 2mol/L 醋酸缓冲液调 pH 至 4.0, 在 4℃ 下过夜, 再以 12000r/min 离心 30 分钟, 弃上清液, 沉淀用 5ml pH6.5 的 10mmol/L 磷酸缓冲液溶解, 并对同样的缓冲液透析; ②是在①中省去用 NaCl 和 EDTA 洗涤芽孢步骤; ③则在①用 NaOH 提取后, 用 1mol/L HCl 中和提取液至 pH7.0, 其它程序与①完全相同。

提取的蛋白质经 Sephadex G-75 柱层析, 收集有毒组分。柱子: 70×2cm; 洗脱液: 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0); 洗脱速度: 15ml/h。

2. S 蛋白的提取^[15,16]: 收集的芽孢用 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 洗涤, 以 10000r/min 离心 15 分钟。lg 沉淀 (芽孢) 用 5ml (pH9.0) 的 100mmol/L 碳酸缓冲液悬浮, 再加入二硫苏糖醇 (DTT) 使其最终浓度为 50mmol/L, 在 27℃ 下处理 1 小时。然后以 12000r/min 离心 20 分钟, 弃沉淀, 上清液加饱和硫酸铵, 收集 0—50% 饱和度的沉淀即为 S 蛋白。再用 pH6.5 的 10mmol/L 磷酸缓冲液使沉淀溶解, 并在该缓冲液中透析。

3. 43 和 40kD 毒素多肽的电泳分离: 毒素粗品经制备电泳将 43 和 40kD 毒素多肽分离纯化。电泳采用文献 [17, 18] 的系统。垂直电泳在稳流 20mA 下进行。胶大小: 12×9.5cm, 凝胶厚度 3mm。将相应多肽带从胶上切下来并放入透析袋中, 然后水平电泳 (V=80V, I=63mA) 1 小时, 透析袋转 180 度继续电泳 15 分钟, 得到相应电洗脱组分。

(五) 毒素的测定

1. 蛋白质含量的测定: 用日本岛津 UV-300 型双光束 (差式) 双波长分光光度计通过 280nm 的光波吸收值测蛋白质含量, 用牛血清白蛋白作标准曲线。

2. 分子量的测定: 按文献 [19] 的方法, 用 SDS-PAGE 测定毒素的分子量。

3. 毒力测定: 采用倍比稀释法, 孢晶毒素生物测定使用 5.81—3000ng/ml 10 个稀释度, 提纯的孢晶毒素用 2.42—620ng/ml 9 个稀释度, 其冻干毒素粉剂用 3.91—500ng/ml 8 个稀释度, S 蛋白用 280—4480ng/ml 5 个稀释度。每个碗盛毒素液 200ml (对照盛生

物测定用水), 放 3 龄致倦库蚊幼虫 25 头, 在 25—26°C 下观察 48 小时, 每个处理设 3 个重复, 进行线性回归分析, 计算出 LC_{50} 值。

(六) 抗血清的制备

将冻干的含 43 和 40kD 的 C_3-41 菌株孢晶毒素生理盐水溶液 (1mg/ml) 作抗原, 按常规方法进行家兔皮下、脚蹼、静脉、腹腔注射, 总注射量 19.5mg/兔。心脏采血后得到 C_3-41 孢晶毒素抗血清。

结 果

(一) 毒素的提取

1. 孢晶毒素: 采用三种方法提取的孢晶毒素, 经 SDS-PAGE 后得到了 C_3-41 菌株孢晶毒素电泳图谱 (图版 1-3)。方法①提取的毒素出现两种图谱: 用碱抽提 1 小时, 有分子量 100、60 和 41kD 三条带; 碱抽提 3 小时呈现 60 和 41kD 两条带。方法②提取的毒素为 43 和 40kD 二种多肽。而方法③提取的毒素除了有 43 和 40kD 二条带外, 还有小分子量的多肽。

2. S 蛋白: 采用 DTT 提取的 S 蛋白经 SDS-PAGE 测定, 其分子量为 104kD。但再经 0.05mol/L NaOH 处理 1 小时后, 很快降解成 43kD 和 40kD 二种多肽 (图版 1-3 和图版 1-1)。

(二) 孢晶毒素的纯化

采用方法②提取的 C_3-41 孢晶毒素, 以 10000r/min 离心 10 分钟, 去沉淀后, 取上清液 2.5—3ml 上柱进行 Sephadex G-75 层析。其层析图谱有二个主峰 (图 1), 分别收集峰 1 和峰 2。用 Folin 试剂检测, 峰 1 没有颜色反应, 峰 2 很快变蓝。定性生物测定表明峰 1 无杀蚊活性, 峰 2 有杀蚊活性。SDS-PAGE 检测, 峰 1 无带, 峰 2 有 43 和 40kD 二条多肽带 (图版 1-3)。

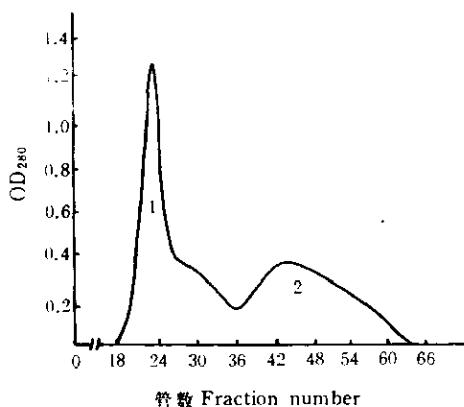


图 1 孢晶毒素的 Sephadex G-75 凝胶过滤层析图

峰 1. 非蛋白质吸峰; 峰 2. 43 和 40kD 毒素蛋白。

Fig. 1 Sephadex G-75 chromatography of NaOH-solubilized spore-crystal toxin

Peak 1. Non-protein OD_{280} absorbing material; Peak 2. 43 and 40 kD toxin

用制备电泳分离 43 和 40kD 毒素多肽,经一次或二次制备电泳后可将 43 和 40kD 多肽分离纯化出来(图版 1-4 和图版 1-2)。

(三) 毒素的提取收得率

将牛血清白蛋白用 pH6.5 的 10mmol/L 磷酸缓冲液稀释成系列浓度,用同样的缓冲液作对照,测其 280nm 处的 OD 值,画出标准曲线。测定 C₃-41 各种毒素的 OD₂₈₀后,从标准曲线中查出相应的蛋白质含量,并换算成毒素总量。然后根据提取毒素前的细菌总量(湿重),可计算出各种毒素的提取收得率。其结果是:7.3g(湿重)细胞提取孢晶毒素 151mg,经 Sephadex G-75 凝胶过滤层析,得纯化毒素 43.5mg,纯化孢晶毒素收得率为 0.597%;1g 湿重细胞提取 S 蛋白 5.75mg,其收得率为 0.58%。

(四) 毒素的毒力

将 S 蛋白、孢晶毒素和用 Sephadex G-75 提纯的孢晶毒素及其冻干粉分别进行生物测定,计算出它们对三龄致倦库蚊幼虫的 LC₅₀值 24 小时分别为 3054.9、1037.7、303.4 和 305.5ng/ml;48 小时的 LC₅₀值分别是 267.8、53.2、9.97 和 10.76ng/ml(表 1)。

表 1 毒素的杀蚊幼虫活性

Table 1 Larvicidal activities of toxin of *B. sphaericus* C₃-41

毒 素 Toxin	24h			48h		
	线性回归式 Linear regression formula (Y)	相关系数 Relative coefficient (r)	半致死浓度 LC50(ng/ml)	线性回归式 Linear regression formula (Y)	相关系数 Relative coefficient (r)	半致死浓度 LC50 (ng/ml)
孢晶毒素 Sporecrystal toxin	1.21+2.06x	0.999	1037.7	1.42+2.07x	0.997	53.2
提纯的孢晶毒素 Sporecrystal toxin purified	3.28+3.34x	0.992	303.39	1.92+3.12x	0.957	9.972
孢晶毒素粉剂 Powder of sporecrystal toxin	0.39+1.85x	0.965	305.49	2.24+2.68x	0.979	10.76
S-蛋白 Sporewall protein	0.87+1.68x	0.933	3054.9	6+0.164x	1.000	267.80

(五) 杀蚊毒素的免疫学分析

1. 抗体效价:以提纯的 C₃-41 孢晶毒素为抗原,免疫家兔,得到抗血清,进行免疫双扩散试验,证明抗血清效价为 16。

2. 不同菌株杀蚊毒素的同源性:将不同血清型的菌株分别提取孢晶毒素,并使其与 C₃-41 孢晶毒素抗血清进行免疫双扩散试验,结果 H_{55b}型的 2362、1593、Bs-10 及 H₁₃型的 2297 菌株的毒素与 C₃-41 孢晶毒素抗血清具有沉淀反应,但 H₁型的 K 菌株、H₂型的 SS I-1 和 1404 菌株及 H₂₆型的 2315 菌株的相应毒素与 C₃-41 孢晶毒素抗血清不发生交叉反应(图 2)。

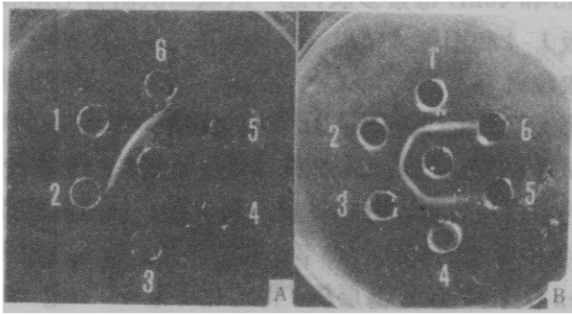


图 2 不同菌株的孢晶毒素与 C₃-41 菌株的孢晶毒素抗血清的免疫双扩散试验

Fig. 2 Ouchterlony immunodiffusion experiment involving NaOH-sulubilized spore-crystal toxins from different strain tested against antiserum of C₃-41 spore-crystal toxin

- A: 1. 2297; 2. SS I-1; 3. K; 4. 1404; 5. 2315; 6. 生理盐水 Saline
B: 1. 2362; 2. 1593; 3. Bs-10; 4. 2297; 5. K; 6. SS I-1

3. 孢晶毒素、S 蛋白的同源性: 将孢晶毒素抗血清加入中心孔, 周围孔加 S 蛋白, 抗原抗体之间有沉淀线出现, 这表明孢晶毒素和 S 蛋白是同源的 (图 3)。

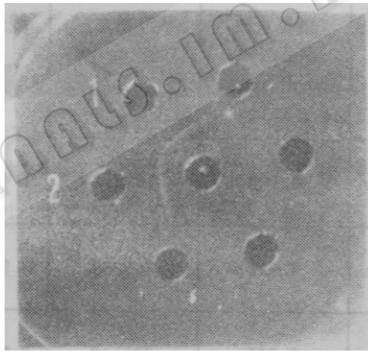


图 3 C₃-41 孢晶毒素和 S 蛋白与其孢晶毒素抗血清的免疫双扩散试验

1. 孢晶毒素; 2. S 蛋白

Fig. 3 Ouchterlony immunodiffusion experiment involving spore-crystal toxin and spore-wall protein from strain C₃-41 tested against antiserum of C₃-41 spore-crystal toxin

1. Spore-crystal toxin; 2. Spore-wall protein.

讨 论

1. 提纯的 C₃-41 菌株的孢晶毒素 48 小时对 3 龄致倦库蚊幼虫的 LC₅₀ 为 10ng/ml, 其毒力高于国外报道的高毒菌株 2362 的毒素毒性水平^[5], 这可能是 C₃-41 菌株杀蚊效果佳的主要原因。

2. 属于 H_{5a5b} 型的 2362、1593、Bs-10 和 H₂₅ 型的 2297 菌株的孢晶毒素能与 C₃-41 菌株的孢晶毒素抗血清发生交叉反应, 但 K (H₁)、SS I-1、1404 (H₂) 和 2315 (H₂₆) 菌

株的相应毒素与 C₃-41 菌株的孢晶毒素抗血清不发生交叉反应。同时证明 C₃-41 菌株的 S 蛋白及其孢晶毒素具有抗原同源性。上述结果分别与文献 [5, 6] 和 [8] 的报道完全一致。

3. 不同提取方法所得的毒素成分有差异。方法①得到 60 和 41kD 两种成分, 这与文献 [5] 的结果 (63 和 43kD) 相近; 方法②得到 43 和 40kD 两种成分, 与于自然等^[20]的结果 (43 和 42kD) 一致。方法①和②的不同, 仅在前者用 EDTA 和 NaCl 洗涤, 后者省略此步骤。EDTA 是螯合剂, 它能与金属离子结合使一些酶缺少必要的中心而失去活性。正是这一差别可能使毒素蛋白降解的形式产生差异。方法③加入 1mol/L HCl 处理步骤, 结果除 43 和 40kD 成分外, 还出现小分子蛋白带。

4. C₃-41 的 S 蛋白对蚊幼虫具有毒性, 可能由于污染了少量孢晶毒素所引起^[7]。

参考文献

- [1] Payne, J. M. et al.: *J. Invert. Pathol.*, **43**: 383-388, 1984.
- [2] Myers, P. S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39** (6): 1205-1211, 1980.
- [3] Davidson, E. W.: *J. Invert. Pathol.*, **39**: 6-9, 1982.
- [4] Davidson, E. W.: *Can. J. Microbiol.*, **29**: 271-275, 1983.
- [5] Baumann, P. et al.: *J. Bacteriol.*, **163**: 738-747, 1985.
- [6] Baumann, P. et al.: *Microbiological Reviews*, **55** (3): 425-436, 1991.
- [7] Baumann, L. et al.: *Current Microbiol.*, **23**: 51-57, 1991.
- [8] Bowditch, R. et al.: *J. Bacteriol.*, **171** (8): 4178-4188, 1989.
- [9] 杨允聪等: 中国媒介生物及控制杂志, **3** (1): 1-6, 1992.
- [10] 张用梅等: 中华流行病学杂志, **10** (7): 7-9, 1989.
- [11] 夏世国等: 中华流行病学杂志, **10** (7): 27-30, 1989.
- [12] 甄天民: 中华流行病学杂志, **10** (7): 36-40, 1989.
- [13] 李钦白: 中华流行病学杂志, **10** (7): 31-35, 1989.
- [14] 张用梅等: 杀虫微生物 (1), 第 98-100 页, 北京农业大学出版社, 北京, 1987 年.
- [15] Narasu, M. L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**: 756-761, 1986.
- [16] Aronson, A. I. et al.: *J. Bacteriol.*, **108** (1): 571-578, 1971.
- [17] T·曼尼阿蒂等著 (余茂勋译): 分子克隆, 第 111 页, 科学出版社, 北京, 1986 年.
- [18] 李荣森等: 微生物防治害虫, 第 242 页, 科学出版社, 北京, 1983.
- [19] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 第 112-118 页, 高等教育出版社, 北京, 1981 年.
- [20] 于自然等: 微生物学报, **30** (4): 254-258, 1990.

EXTRACTION AND HOMOGENY OF LARVICIDAL TOXIN IN *BACILLUS SPHAERICUS* STRAIN C₃-41

Zhou Zhihong Zhang Yongmei Liu Eying

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

Spore-crystal toxin and spore-wall protein of *Bacillus sphaericus* C₃-41 were extracted respectively from spore-crystal complex. When subjected to SDS-PAGE, spore-crystal toxin might give two toxic protein bands (43 and 40 kilodaltons), but spore-wall protein had only a protein band (MW 104 kD), which was degraded into toxic 43 and 40 kD proteins by using NaOH. The LC₅₀ values of spore-wall protein and spore-crystal toxin purified by Sephadex G-75 were 267 and 10 ng/ml respectively against the third instar larvae of *Culex quinquefasciatus* at 48 hours. The results of immunodiffusion showed that sodium hydroxide-solubilized spore-crystal toxins from spore-crystal complex of strain 2362, 1593, Bs-10 (H_{5a5b}) and 2297 (H₂₅) revealed cross reactions with 43 and 40kD antiserum of strain C₃-41, but those of strain K (H₁), SS I-1, 1404 (H₂) and 2315. (H₂₆) without cross reaction with the same antiserum.

Key words *Bacillus sphaericus* strain C₃-41; Toxin; homogeny

图版说明

Explanation of plate

1、2. 孢晶毒素的 10%SDS-PAGE 图谱。1. a. 标准蛋白; b. 孢晶毒素; c. S 蛋白。2. a. 方法②提纯的孢晶毒素; b、c. 电泳提纯的 43kD 毒素。3. 毒素的 10% SDS-PAGE 图谱。a. 标准蛋白; b、c. 碱分别提取 1 和 3 小时的孢晶毒素; d. 提纯的孢晶毒素; e. 方法②提纯的孢晶毒素; f. 方法③提纯的孢晶毒素; g. S 蛋白。4. 孢晶毒素的 7.5%SDS-PAGE 图谱。a. 标准蛋白; b、d. 电泳提纯的 40kD 毒素; c. 方法③提纯的孢晶毒素; e、f. 方法②提纯的孢晶毒素; g. 方法①提纯的孢晶毒素。

1, 2. Spore-crystal toxins detected in an electroblot of gels from 10% SDS-PAGE. 1. a. Standard proteins; b. Spore-crystal toxin; c. NaOH-solubilized spore-wall protein. 2. a. Spore-crystal toxin extracted by method 2; b, c. 43 kD toxin purified by electrophoresis. 3. Spore-crystal toxins detected in an electroblot of gels from 10% SDS-PAGE. a. Standard proteins; b, c. Spore-crystal toxins extracted by NaOH for and 3h respectively; d. Spore-crystal toxins purified by Sephadex G-75; e. Spore-crystal toxins extracted by method 2; f. Spore-crystal toxins extracted by method 3; g. Spore-wall protein. 4. Spore-crystal toxin detected in an electroblot of gels from 7.5% SDS-PAGE. a. Standard proteins; b, d. 40 kD toxin purified by electrophoresis; c. Spore-crystal toxin extracted by method 3; e, f. Spore-crystal toxin extracted by method 2; g. Spore-crystal toxin extracted by method 1.