

家蝇幼虫抗菌物质组成及其理化性质

王远程 左晓峰

(中国农业科学院生物技术研究中心 北京 100081)

孙东旭 陈建新 管致和

(中国农业大学植保系 北京 100094)

摘要 用抑菌圈、酸碱性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)等方法,对家蝇幼虫免疫血淋巴抗菌物质组成及其理化特性进行了研究。结果表明,家蝇抗菌物质是蛋白质,呈碱性和近中性,由5种成分组成。家蝇抗菌物质有较稳定的理化特性。如对热,对较高浓度盐溶液,较极端的pH溶液,室温放置6h及冻融12次等处理均有较高的稳定性。

关键词 家蝇, 抗菌物质, 免疫

自80年代初,从天蚕中分离到抗菌肽并测定其一级结构后^[1,2],昆虫免疫机制的研究就成为一个非常活跃的领域。到目前为止,从鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目等的昆虫中诱导出抗菌物质,而已纯化的抗菌物质达50多种^[3]。由于这些物质具有抗菌力强、抗菌谱广及理化性质稳定等特点,因此应用前景广阔^[4]。

以往的研究大多集中于个体较大的昆虫,而家蝇由于个体小,对其免疫机制进行研究存在许多困难,另一方面家蝇又表现出极强的适应恶劣环境的能力,表明它们有一套有效的免疫体系,对此进行研究,具有潜在的理论和应用价值。作者曾报道了家蝇血淋巴的提取及抗菌物质的诱导^[5],在此基础上对家蝇免疫血淋巴抗菌物质组成进行了分析,测定了抗菌物质各种理化特性,为进一步分离纯化打下基础。

1 材料和方法

1.1 家蝇饲养

家蝇虫源来自北京农业大学植保系。饲养方法见参考文献[6]。

1.2 抗菌物质的诱导和血淋巴提取

大肠杆菌D31菌株(抗链霉素)来自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。诱导对象为处于次末龄的幼虫(孵化后约5d的幼虫)。诱导时将菌液从虫背部注入,每头注入1 μ l,含 1×10^5 个细菌。处理幼虫继续饲养24h,后用毛细管提取血淋巴,吹入指型管中。每天收集的血淋巴,存于-70 $^{\circ}$ C备用。

1.3 抗菌物质抑菌活性测定及电泳分析

抑菌活性测定参考 Faye 等^[7]方法, 其活性用抑菌圈直径(mm)表示。电泳为非失活条件下聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 参照孙晋武等^[8]的方法。凝胶浓度为 15%, 电泳后取下胶板, 板上铺菌, 37℃ 下过夜培养, 胶板上没有细菌生长的条带即为抗菌物质所在位置。

1.4 家蝇抗菌物质组成测定

1.4.1 蛋白酶对抗菌物质消化处理: 把蛋白酶(华美生物工程公司购进)溶于 50 mmol/L pH2.0 的 KCl/HCl 缓冲液中。在三只指型管中各加 100 μ l 免疫血淋巴(immune haemolymph, IH), 每管再加不同量的酶液, 使酶活力(U)与血淋巴蛋白总量(mg)的比分别为 5, 10, 20 U/mg, 以不加酶液的免疫血淋巴为对照, 以纯酶液作平行。37℃ 保温 10h 后测各管抑菌活性。

糜蛋白酶(Sigma)溶于 50 mmol/L pH8.5 的 NH₄Cl/NaOH 缓冲液中。对免疫血淋巴处理同胃蛋白酶。

1.4.2 免疫血淋巴抗菌物质酸碱特性及其组成: 对免疫血淋巴分别作酸性、碱性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.5 免疫血淋巴抗菌物质理化性质测定

1.5.1 免疫血淋巴倍比稀释试验: 免疫血淋巴用蒸馏水依次倍比稀释, 对各处理做酸性 PAGE。

1.5.2 室温下不同放置时间对抗菌物质活性的影响: 免疫血淋巴在室温下放置不同时间后测各处理抑菌活性。

1.5.3 冻融次数对抗菌物质活性的影响: 免疫血淋巴在 -20℃ 和室温两种温度下做不同次数的冻融处理。对各处理做 PAGE。

1.5.4 不同加热处理对抗菌物质活性的影响: 4 只指形管中各加 200 μ l 免疫血淋巴, 再加等体积的缓冲液(40 mmol/L 乙酸铵和 1mol/L 乙酸铵按 2:1 体积比混合而成, pH3.6), 混匀后分别在 70、80、90、100℃ 水浴中处理 4min, 后 10000 r/min 离心 10min。测各处理上清液抑菌活性。

1.5.5 不同浓度乙酸铵溶液处理对抗菌物质活性的影响: 把免疫血淋巴分别与等体积的 4mol/L 乙酸铵及其系列倍比稀释液混合后室温放置 1.5h, 对各处理做酸性 PAGE。

1.5.6 不同 pH 溶液处理对抗菌物质活性的影响: 用盐酸和氨水配 pH 分别为 1、3、5、7、9、11 的溶液。以这些溶液等体积与免疫血淋巴混合, 室温放置 1.5h 后做酸性 PAGE。

2 结果和分析

2.1 家蝇抗菌物质组成测定

2.1.1 蛋白酶消化处理: 胃蛋白酶和糜蛋白酶处理免疫血淋巴 10h 后, 各处理液呈黄色, 依酶量增加各处理沉淀量依次增加, 二者处理后抑菌结果见表 1。

从表 1 中看到, 随着蛋白酶量的增加, 各处理抑菌活性依次下降, 因此可推断免疫血淋巴的抗菌物质是蛋白质。

2.1.2 免疫血淋巴抗菌物质酸碱特性及其组成: 免疫血淋巴经碱性 PAGE 分离后, 凝

表1 蛋白酶处理对免疫血淋巴抑菌活性的影响

Table 1 Effect of protease treatment on the antibacterial activity of IH

	酶活力与血淋巴蛋白含量比值(U/mg) Rate of enzyme activity and plasma protein			平行 Parallel	对照 Control
	5	10	20		
胃蛋白酶 Pepsin	1.5	1	0	0	2
糜蛋白酶 Chymotrypsin	4	3	1	0	10

注: 表中结果为5次重复平均值。

Note: The values are the means of the values from five replications.

2.2.1 免疫血淋巴倍比稀释后酸性 PAGE 结果: 由图 1 可见, 免疫血淋巴稀释到 16 倍, 其最强的抗菌物质仍可显示出来, 32 倍及其以下的稀释液因抗菌物质浓度太低而无抑菌带出现。

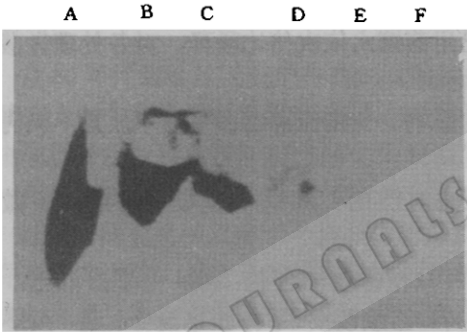


图1 免疫血淋巴系列倍比稀释液酸性 PAGE

A, B, C, D, E, F 分别为稀释 2, 4, 8, 16, 32, 64 倍的结果。

Fig. 1 Acid PAGE of different dilutions of immune haemolymph (IH)

A, B, C, D, E, F indicate respectively the results of Acid PAGE of IH diluted with 2, 4, 8, 16, 32, 64 parts of distilled water.

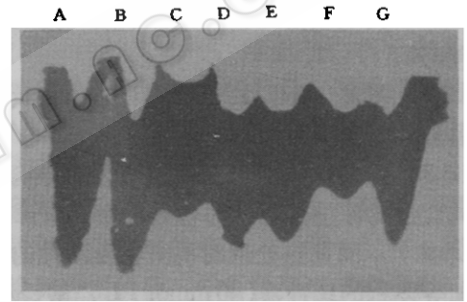


图2 不同冻融次数对抗菌物质活性的影响

A, B, C, D, E, F, G 分别是冻融 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 次后的结果。

Fig. 2 Effect of different freezing and thawing times on the activity of antibacterial matters

A, B, C, D, E, F, G indicate respectively the results of Acid PAGE of IH freezing and thawing 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 times.

2.2.2 室温下放置不同时间对免疫血淋巴抑菌活性影响: 表 2 结果表明, 随着室温下放置时间的延长, 血淋巴颜色逐渐加深, 沉淀量随着增多。抑菌活性也有所减弱, 但对各处理与对照(处理时间为 0 样品)的差异进行 T 值测验发现, 差异并不显著, 说明抗菌物质活性损失很小。

2.2.3 不同冻融次数对免疫血淋巴抗菌物质的影响: 图 2 结果表明, 各处理间抑菌带大小、条数都相似, 抗菌物质对反复冻融处理(达 12 次)有很高的稳定性。

2.2.4 不同加热处理对抗菌物质的影响: 表 3 结果表明, 加热处理后各样品呈凝固状, 离心所得上清液体积与所加血淋巴量相等。抑菌活性测定结果显示各处理组间差异很

胶板上铺菌, 未发现抑菌带。相反, 在酸性 PAGE 凝胶板上就显示出 5 条抑菌带。因此, 家蝇免疫血淋巴的抗菌物质主要是近中性和碱性蛋白, 由 5 种组分构成, 其中碱性最强的一种其抑菌活性也最大。

2.2 抗菌物质理化性质测定

表2 室温下不同放置时间对免疫血淋巴抑菌活性的影响

Table 2 Effect of different living time in room temperature on the antibacterial activity of IH

	t / h						
	0	1	2	3	4	5	6
I	6.0	7.0	6.0	5.0	5.0	5.0	5.0
II	6.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0	4.0
平均 Average	6.0	6.0	5.5	5.0	5.0	4.5	4.5

注: 表中结果为5次重复平均。

Note: The values are the means of the values from five replications.

表3 加热处理对免疫血淋巴抑菌活性的影响

Table 3 Effect of different heating treatment on the antibacterial of IH

	t / °C				对照(免疫血淋巴)
	70	80	90	100	Control (IH)
I	4.0	4.5	5.0	4.5	6.0
II	5.5	4.5	4.5	5.0	5.0
平均 Average	4.75	4.5	4.75	4.75	5.5

注: 表中结果为5次重复平均。

Note: The values are the means of the values from five replications.

小, 而与对照相比, 处理样品抑菌活性都有所减弱, 但未达到显著差异水平。

酸性 PAGE 结果表明, 在凝胶板上走在最前端的那部分抗菌物质具有很高的热稳定性, 其他部分相对较弱。

2.2.5 用不同浓度的乙酸铵溶液处理免疫血淋巴: 结果表明, 当盐的浓度为 1 ~ 2 mol / L 时, 可使一种抗菌物质丧失活性, 而当盐的浓度在 0.5 mol / L 以下时则不会破坏此物质的活性。但与未处理的免疫血淋巴相比, 除抗菌活性最强的那部分物质没有明显损失外, 其他几种抗菌物质都有一定损失。

2.2.6 不同 pH 溶液处理对抗菌物质活性的影响: 从图 3 中看到, 当 pH1 时, 抗菌物质几乎全部失活, 处理时此管中样品呈凝胶状, 蛋白质在 pH1 时几乎都变性沉淀下来。其他不同 pH 溶液对抗菌物质影响相差很小, 但在碱性时(pH9, 11)抗菌活性有所减弱。

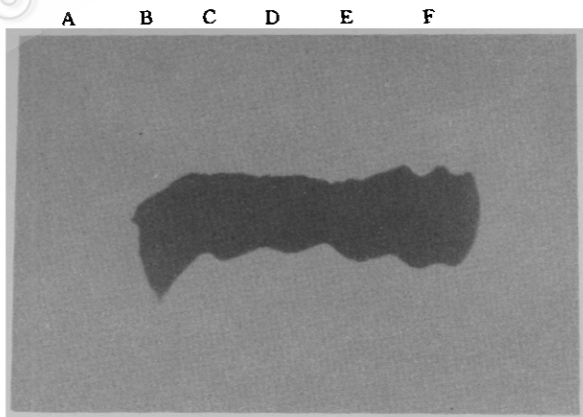


图3 不同 pH 溶液(盐酸或氨水溶液)处理对抗菌物质活性的影响
A, B, C, D, E, F 分别是 pH 为 1, 3, 5, 7, 9, 11 的溶液处理后的结果。

Fig. 3 Effect of different pH solutions (HCl or $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ solutions) on the activity of antibacterial matters.

A, B, C, D, E, F indicate respectively the results of Acid PAGE of IH which pH are 1, 3, 5, 7, 9, 11.

3 讨论

在抑菌活性测定和酸性 PAGE 试验中, 由于所用指示菌为大肠杆菌 D31 菌株(抗链霉素), 因此只要使培养基中链霉素浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$, 杂菌一般不能生长而大肠杆菌生长良好, 这便于试验操作。抑菌圈测定中有时抑菌圈不规则, 我们量其中最大和最小直径然后再平均, 培养皿底部不平也可能影响试验结果。酸性 PAGE 试验中除一种抑菌带能稳定显示外, 其他几条带显示易受某些因素影响, 如铺菌厚度、浓度等, 这与其自身含量、抑菌活性及理化稳定性等有关。

到目前为止, 昆虫中研究得最多分布也最广的一类抗菌物质是天蚕素类。这类物质是强碱性蛋白质, 具有分子量小, 理化性质稳定, 广谱的抗菌活性等特点^[9]。而从本实验及前文^[5]结果知道, 家蝇免疫血淋巴中在酸性 PAGE 凝胶板上走在最前端的那种抗菌物质具有类似特性。因此, 推断此种物质类似于天蚕素, 待对此类物质进行纯化并测定结构后才能进一步确定。

参 考 文 献

- [1] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T *et al.* *Eur J Biochem*, 1980, 106: 7 ~ 16.
- [2] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A *et al.* *Nature*, 1981, 292: 246 ~ 248.
- [3] Hultmark D. *Trends in Genetics*, 1993, 9(5): 178 ~ 183.
- [4] Jaynes J M, Xanthopoulos K G, Destefano-Beltran L *et al.* *Bioassays*, 1987, 6(6): 263 ~ 270.
- [5] 王远程, 刘伟, 扬峰, 等. 微生物学报, 1992, 32(6): 439 ~ 444.
- [6] 李宝珍. 昆虫知识, 1963, 7(1): 49.
- [7] Faye I, Wyatt G R. *Experientia*, 1980, 36: 1325 ~ 1326.
- [8] 孙晋武, 王扬声. 用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定酶的纯度. 见: 张树政等主编酶学研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1987, 86 ~ 98.
- [9] Bulet P, Coccoanchich, S, Reuland M *et al.* *Eur J Biochem*, 1992, 209: 977 ~ 984.

THE ASSAY OF COMPOSITION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ANTIBACTERIAL MATTERS FROM HOUSEFLY LARVAE

Wang Yuancheng Zuo Xiaofeng

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

Sun Dongxu Chen Jianxin Guan Zhihe

(*Department of Plant Protection, Beijing Agricultural University, Beijing 100094*)

Abstract Using the methods of plate growth inhibition assay and acid/basic polyacrylamide gel electrophoresis, the composition and physicochemical characteristics of antibacterial matters from housefly (*Musca domestica*) were studied. The results showed that the antibacterial matters from housefly were basic and neutral proteins consisting of five components. They have stable physicochemical properties such as heat stability, resistance to treatment with high ion concentration, relatively extreme pH solution, living in room temperature for 6h, freezing and thawing for 12 times.

Key words Housefly, Antibacterial matters, Immune