

球孢白僵菌毒素的分离、毒力检测及结构鉴定*

武 艺¹ 黄秀梨¹ 邓继先² 洪 洞¹

(1 北京师范大学生物系 北京 100875)

(2 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 用吸附法从球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*) 1003-V 的代谢产物中分离出导致昆虫患病的毒素粗提物(以下简称毒素), 并对其进行了毒力检测。结果表明, 该毒素对白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) 幼虫有明显毒性; 对棉铃虫(*Heliothis zea*) 幼虫口服毒性较弱, 腹腔注射毒性较强; 仅对革兰氏阳性细菌有抑菌作用。对草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) Sf-21 细胞株的毒力测定结果表明, 毒力回归方程为 $y = 2.03 + 2.39x$, 半致死浓度是 0.01751%, 其 95% 可信极限为 0.01517%~0.0202%。高压液相色谱和红外光谱分析表明, 该毒素含有三种在结构和性质上非常相近的物质。

关键词 球孢白僵菌, 毒素, 草地夜蛾 Sf-21 细胞株, 棉铃虫, 白纹伊蚊

分类号 Q939.9

球孢白僵菌是应用广泛的一种虫生真菌, 有人认为真菌对昆虫的致死作用是毒素^[1,2]。Hamil^[3]首次从球孢白僵菌的菌丝体中提纯了白僵素(Beauvericin), 是一个环状三羧酸肽, 含有(L)-N甲基苯丙氨酸和(D)- α -羟基异戊酸, 分子式为 $C_{45}H_{57}N_3O_9$, 分子量为 783。Suzuki^[4]从球孢白僵菌菌丝体中提纯了另外一种毒素, 命名为 Bassianolide, 是一个环状四羧酸肽, 含有(L)-N甲基亮氨酸和(D)- α -羟基异戊酸, 分子式为 $C_{48}H_{84}N_4O_{12}$, 分子量为 908, 于饲料中加入该毒素 13×10^{-6} , 便能引起家蚕 5 龄幼虫肌肉收缩迟缓, 最后死亡。Genthner 等人用二氯甲烷从冷冻干燥的球孢白僵菌菌丝体中抽提得到的无极性提取液对糠虾(Mysidacea) 具明显毒性^[2]。作者以球孢白僵菌 1003-V 菌株为材料, 从其培养液中获得使昆虫致病的毒素, 并对该毒素进行结构分析和毒力检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 球孢白僵菌: 1003 菌株系本室保藏; 1003-V 菌株为本室分离。

1.1.2 白纹伊蚊: 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所昆虫室提供。

1.1.3 棉铃虫: 北京农业大学植保系农虫专业昆虫室提供。

1.1.4 草地夜蛾 Sf-21 体外培养细胞: 军事医学科学院生物工程研究所细胞室提供。

* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1996-11-21

1.1.5 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 AS 1.89: 本实验室保藏菌种。

1.2 方法

1.2.1 毒素的提取: 采用南开大学生物系的吸附法提取毒素粗提物(以下简称毒素)。

1.2.2 毒力初步检测:

毒素饲养法: 将毒素作系列稀释, 分别加入人工饲料中, 饲喂白纹伊蚊及棉铃虫 2 龄幼虫, 每隔 24h 记录死亡幼虫数, 直至幼虫全部死亡或化蛹为止。

注射毒素法: 取棉铃虫 4 龄幼虫, 乙醚麻醉, 由最后一对腹足注入不同浓度的毒素溶液, 每头 10μl, 并注入同样剂量的蒸馏水作为对照, 观察并记录结果。

抑菌作用检测: 将浸有不同浓度毒素溶液的圆滤纸片(直径 5mm)贴于细菌平板上, 37℃ 培养 24h, 观察抑菌环的出现并测量其直径。

1.2.3 毒素对 Sf-21 体外培养细胞的毒力测定: 根据预测, 将毒素配制 5 个稀释度, 使其最高浓度死亡率在 90%~95%, 最低在 10%~20%, 分别加入细胞培养液中, 培养 48h, 苔盘蓝染色 3min, 光学显微镜下观察, 死细胞染成蓝色, 活细胞不着色, 记录细胞死亡率。按机率值分析法^[6]进行数据分析。

1.2.4 毒素成分和结构分析:

红外光谱分析法: 将毒素充分干燥后, 取 3mg, 加 200mg KBr 压片, 美国尼高力公司 170SXFTIR 仪在 4000~400cm⁻¹ 红外区扫描, 测其红外吸收光谱。

高压液相色谱法: 取少量毒素溶于去离子水中, 上 ODSC-18 键合柱, 250mm×4mm; 流动相为 CH₃CN:H₂O, 50%~70%, 流量为 0.5ml/min, 室温 24℃, KONTRON600HPLC 仪, UVIKON 紫外检测仪检测, 波长 215nm。

2 结果

2.1 毒素产量的比较

1003 菌株和 1003-V 菌株为不同的毒力株, 后者为高毒力株, 其毒素产量见表 1。

表1 1003菌株和1003-V菌株毒素产量的比较

Table 1 Comparison between yields of the toxin from 1003 strain and 1003-V strain

编号 No.	1003-V菌株 1003-V strain			1003菌株 1003strain		
	孢子数	毒素总量	毒素/孢子	孢子数	毒素总量	毒素/孢子
	Spore number	Total of toxin (g)	Toxin/Spore (μg)	Spore number	Total of toxin (g)	Toxin/ Spore (μg)
1	1.08×10 ¹³	0.941	8.71×10 ⁻⁸	9.96×10 ¹²	0.359	3.97×10 ⁻⁸
2	1.64×10 ¹³	1.013	6.18×10 ⁻⁸	1.73×10 ¹³	0.493	2.85×10 ⁻⁸
3	1.33×10 ¹³	0.901	6.77×10 ⁻⁸	1.21×10 ¹³	0.421	3.48×10 ⁻⁸
平均 Average	1.35×10 ¹³	0.952	7.05×10 ⁻⁸	1.31×10 ¹³	0.436	3.33×10 ⁻⁸

2.2 毒素毒力的初步检测

2.2.1 毒素对白纹伊蚊幼虫毒力: 毒素对白纹伊蚊幼虫毒力较强, 其结果见表 2。

2.2.2 毒素对棉铃虫幼虫口服毒性: 毒素对棉铃虫幼虫口服毒性较低, 只有毒素浓度达到 10% 时, 第2、第 3 两天才各有一只幼虫死亡。

表2 毒素对白纹伊蚊幼虫的毒性*

Table 2 The effect of toxin to larva of *Aedes albopictus*

毒素浓度 Concentration of toxin (%)	1d		2d		3d		4d		
	死亡数 Death number	死亡率 Death rate (%)	死亡数 Death number	死亡率 Death rate (%)	死亡数 Death number	死亡率 Death rate (%)	总死亡率 Total of death rate (%)	发育时期 Growth period	幼虫百分率 Larva percentage (%)
0	0	0	0	0	0	0	0	20成虫 Adult	0
0.125	0	0	0	0	2	10	10	2成虫Adult 4蛹Pupa 12幼虫 Larva	66.65
0.25	0	0	3	15	2	10	25	1成虫Adult 2蛹Pupa 12幼虫 Larva	80
0.5	0	0	5	25	6	30	55	9幼虫Larva	100
1	18	90	2	10	—	—	—	100	—
2	20	100	—	—	—	—	—	100	—

* 试虫条数为20条 Determining twenty worms.

2.2.3 毒素对棉铃虫幼虫注射毒性: 毒素对棉铃虫幼虫注射毒性较高, 结果见表 3。

表3 毒素对棉铃虫幼虫的注射毒性*

Table 3 The toxicity of toxin to injected larva of *Heliothis zea*

毒素浓度 Concentration of toxin (%)	1d		2d		3d		4d
	死亡数 Death number	死亡率 Death rate (%)	死亡数 Death number	死亡率 Death rate (%)	死亡数 Death number	死亡率 Death rate (%)	总死亡率 Total death rate (%)
0	0	0	0	0	0	0	0
0.625	0	0	0	0	0	0	0
1.250	0	0	0	0	1	10	10
2.500	2	20	1	10	1	10	40
5.000	3	30	3	20	1	10	70
10.000	5	50	3	30	1	10	90

* 试虫条数为10条 Determining ten worms.

2.2.4 毒素对细菌的毒性: 毒素对大肠杆菌抑菌作用很小, 当毒素浓度达 13% 时, 只有 1mm 抑菌环出现, 而对金黄色葡萄球菌 AS1.89 毒性较强, 当毒素浓度 (%) 为 1.3、2.6、6.5、13 时, 其抑菌环平均值 (取三个样品) 分别为 0、0.5、2.0、2.4 (mm)。

2.3 球孢白僵菌毒素对草地夜蛾 Sf-21体外培养细胞的毒力测定

2.3.1 毒素对 Sf-21细胞株的毒力测定：结果见表 4

表4 机率值分析数据表
Table 4 The table of data by probit value analysis

毒素浓度 Concentrat ion of toxin (%)	供试细胞数 Number of test cells n	死亡细胞数 Number of death cell	死亡率 Death rate (%)	校正死亡率 Corrected death rate (%)	浓度对数(+3) Logarithm of concentration x	死亡机率 Death probit y'	期望机率 Expected probit Y
0.00625	69	11	15.9	14.2	0.7959	3.92	3.89
0.0125	94	36	38.3	37.0	1.0969	4.67	4.60
0.0250	76	47	61.8	61.0	1.3979	5.28	5.37
0.0500	91	79	86.8	86.5	1.6990	6.13	6.18
0.1000	83	81	97.6	97.6	2.0000	7.05	6.90
对照 CK	98	2	2.0				

工作机率 Working probit y	权重系数 Weight coefficient w	权重 Weight nw	nwx	nwy	nwx ²	nwy ²
3.932	0.405	27.95	22.2454	109.8994	87.4689	17.7051
4.666	0.601	56.494	61.9683	263.6010	289.1441	69.9730
5.297	0.601	45.676	63.8505	241.1236	337.0668	89.2566
6.100	0.405	36.833	62.6167	224.8155	381.9619	106.3858
6.974	0.154	12.782	25.2640	89.1417	176.1911	50.5280
		Σ=79.757	Σ=235.9449	Σ=928.5812	Σ=1271.8328	Σ=331.8485
						Σ=4928.2439

2.3.2 临时毒力回归线：将死亡机率对浓度对数+3 作出一条临时毒力回归线，见图 1。

2.3.3 毒力回归方程：依照机率值分析法，得出该方程为 $y = 2.03 + 2.39x$ ，其中 y 为工作机率值，x 为浓度对数 + 3。

2.3.4 半致死浓度 (LC_{50})：当 $x = LC_{50}$ 时， $y = 5$ 代入毒力回归方程，则 $x = (5 - 2.03) / 2.39 = 1.2433$ 。将 $x-3$ 查反对数为 0.01751%。进一步计算分析 LC_{50} 的 95% 可信极限为 0.01517~0.0202%。

2.3.5 X^2 检验：经计算 $X^2 = 4.6524$ 从 X^2 分布表中得出 $X^2_{0.05} = 7.8$ ，所以， $X^2 < X^2_{0.05}$ 。

2.4 毒素的高压液相色谱

结果见图 2。

图 2 表明，该毒素组分紫外吸收峰非常

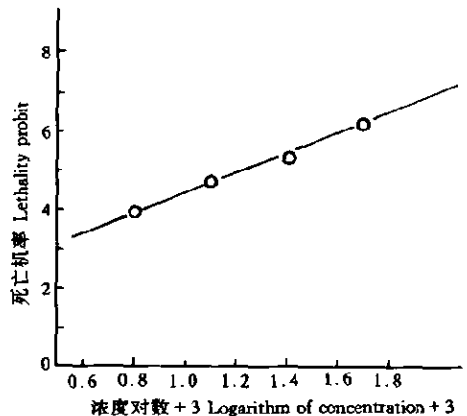


图1 临时毒力回归线

Fig. 1 Provisional regression line of toxicity

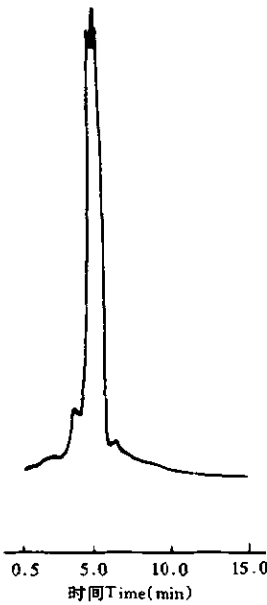


图2 毒素的高压液相色谱

Fig. 2 HPLC of toxin

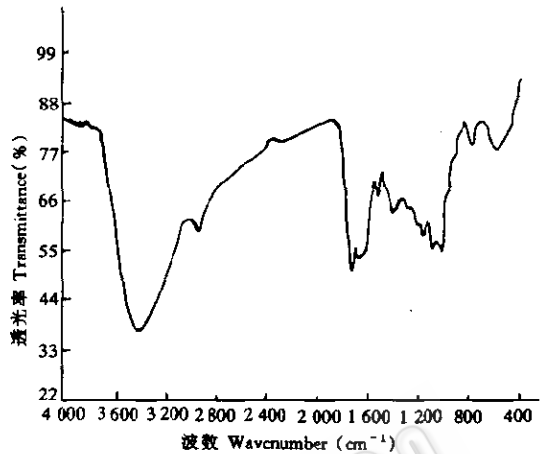


图3 毒素的红外光谱

Fig. 3 Infrared spectrum of toxin

集中,在2.5~6.8min之间出现5个峰,其中第2、3、4三个峰连续出现,分别在4.73min、4.95min、5.22min,峰值很高,即这三种物质在毒素中的含量很高,并且三个峰没有分开,彼此相连,是性质非常接近的三种物质。

2.5 毒素的红外光谱分析

结果见图3。

3 讨论

毒素含量与菌株的毒性相关:结果表明,在相同培养条件下,1003-V菌株毒素产量比1003菌株高出近一倍。

毒素的作用方式及对象不同,其毒性的强弱不同:蚊2龄幼虫对毒素的敏感性较高,当毒素浓度为2%时,2d内幼虫全部死亡。棉铃虫2龄幼虫对口服毒素敏感性低,只有当毒素浓度达10%时,第二、第三天才各有一只幼虫死亡。对经腹腔注射的毒素敏感性较高,当毒素浓度为10%时,幼虫死亡率达90%,经注射毒素未死亡的幼虫发育较正常幼虫迟缓。毒素对革兰氏阳性细菌有较强的抑菌作用,而对革兰氏阴性细菌抑菌作用很小,其原因有待进一步研究。

体外细胞培养测定毒力的准确性:体外培养细胞可以摆脱体内其他组织和体外无关微生物的干扰,并且受药量均匀一致,能比较直观准确地说明问题。作者以机率值分析法对数据进行处理和分析。首先,因对照组可能有死亡,必须用Abbott公式校正处理组细胞死亡率,使结果准确。另外,浓度和死亡率的对应关系是一条不对称的S形曲线,进行毒力测定时,一般只用5~6个不同浓度进行处理,用这样几个浓度来作一条S形曲线是不够准确的。如果把浓度换算成浓度对数,死亡率换算成死亡机率,S形曲线即转化成直线

了,将浓度对数 + 3(本实验为使其成为正数,故 + 3 设为 x) 对死亡机率,作出一条临时毒力回归线,并由该回归线读出某浓度下的期望死亡机率,查工作机率值系数和权重系数表,得出某期望机率值相对应的工作机率值系数 y_0 和 k ,由 $y = y_0 + kp$, (p 为死亡百分率) 计算得出某浓度下的工作机率 (y)。于是,可以用 x 与 y 的直线回归式即毒力回归方程 $y = 2.03 + 2.39x$ 来代表这条直线。将不同的 x 值分别代入方程,求得相应的 y 值与实测死亡机率值和期望机率值相比较,差异均小于 0.2,即通过回归方程计算,一定毒素浓度对应的死亡机率和实测死亡机率差异很小,因此,可以认为该直线是符合实际情况的。

本实验通过计算得出毒力测定中的重要参数——半致死浓度 (LC_{50}) 和其 95% 的可信极限。经 X^2 检验进一步证实了测定数据是可靠的,毒力回归方程和 LC_{50} 也是符合实际情况的。但在实验中得到的对昆虫组织体外培养细胞具有毒性的真菌毒素,不能直接用于害虫防治,有待于室内虫试和田间实验后才能推广应用。

提取毒素的可能结构及基团:红外光谱分析表明,毒素是一环状化合物分子,本提取物为大分子物质,因在 3000nm 处未出现长链应有的 3 号峰故认为长碳链成环。化合物中含有 OH— ,通过 140°C 干燥后水分已全部蒸发,故该峰不是 H_2O 中的 OH— ; NH— 和 OH— 在 $3300\sim 3500\text{cm}^{-1}$ 区域内均有伸缩振动吸收,但 NH— 的氢键比 OH— 强,故其峰形应加强,相反,在 3398.594cm^{-1} 处的吸收峰平缓,强度中等,说明此为 OH— 伸缩振动引起的。 1167.824cm^{-1} 为 —C—N— 伸缩振动峰,进一步证明了没有 NH— 的存在。化合物中的苯基及含苯基的芳香化合物应在图谱上 $3010\sim 3100\text{cm}^{-1}$ 处出现吸收峰,但实际上没有发现峰的存在,推测可能是被临近基团的吸收峰所掩盖。

由于作者没有得到白僵菌培养液中提取毒素的标准品,无法做对照实验,只能通过与已报道的菌丝体提取毒素白僵素相比较,发现二者在结构组成上具有一定的相似性。推测培养液中的毒素,可能是经细胞膜向外分泌过程中经过了某种修饰的菌丝体内毒素。

致谢 高压液相色谱和红外光谱是在北京师范大学测试中心的谢孟峡和张永安老师帮助下完成的,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Tomanoff C. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1981, 9: 462~482.
- [2] Genthner F J, Cripe C M, Crosby D J. *Arch Environ Conlam Toxicol*, 1994, 26: 90~94.
- [3] Hamill R L, Higgins C E, Boaz H E et al. *Tetrahedron Letters*, 1969, 49: 4255~4258.
- [4] Suzuki A, Kanaoka M, Isogai A et al. *Tetrahedron Letters*, 1977, 25: 2167~2170.
- [5] 南开大学生物系昆虫专业. 武汉化工(微生物农药专辑), 1976, 增刊: 15~20.
- [6] 唐振华. 农业害虫抗药性. 北京: 农业出版社, 1982.
- [7] 宁永成. 有机化合物结构测定与有机波谱. 北京: 清华大学出版社, 1991.
- [8] 谢晶曦. 红外光谱在有机化学和药物化学中的应用. 北京: 科学出版社, 1987.
- [9] 程振衡, 邢海萍. 昆虫学报, 1984, 27(1): 23~27.

ISOLATION, DETECTION TOXICITY AND STRUCTURE OF TOXIN FROM *BEAUVERIA BASSIANA*

Wu Yi¹ Huang Xiuli¹ Deng Jixian² Hong Jiong¹

(1 Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)

(2 Biological Engineering Institute, Military Medical Academy of Sciences, Beijing 100071)

Abstract In this experiment, the crude toxin from the metabolite of *Beauveria bassiana* was isolated and its toxicity was detected. The result shows that indicates toxin has toxicity on larva of *Aedes albopictus* obvious. Though it with low toxicity to larva of *Heliothis zea* when swallowed, but has high toxicity when injected into the blood. For bacteria it only inhibites G^+ . When it applied to cultured cells of *Spodoptera frugiperda* sf-21, the regression equation of toxicity is $y = 2.03 + 2.39x$. The half lethal concentration (LC_{50}) is 0.01751%. 95% believable limit is 0.01517~0.0202%. There are three substances which have similar atomic group when analysed by HPLC and infrared spectrum.

Key words *Beauveria bassiana*, Toxin, *Spodoptera frugiperda* sf-21 cell strain, *Heliothis zea*, *Aedes albopictus*