

活性氧对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的损伤作用

王文军* 钱传范 申继忠 杨韶松

(中国农业大学应用化学系 北京 100094)

摘要 用 SDS-PAGE 电泳分析和生物测定方法研究了过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基($\cdot OH$)对苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)伴孢晶体的损伤作用。结果表明,这两种活性氧对伴孢晶体均有一定程度的损伤作用,这种损伤作用与活性氧的浓度成正相关,并且 $\cdot OH$ 对伴孢晶体的损伤作用明显强于 H_2O_2 。

关键词 过氧化氢 羟自由基 苏云金芽孢杆菌伴孢晶体

分类号 S482.7 **文献标识码** A **文章编号** 0001-620X(1999)05-0469-74

研究报道,X-射线、 γ -射线、紫外线等辐射以及生物体内进行的许多生命活动都涉及到活性氧的产生或作用,活性氧对蛋白质的氧化损伤是自由基生物学与医学的前沿研究领域^[1]。活性氧对蛋白质的作用有以下几种形式^[2~4]:1. 修饰氨基酸残基使蛋白质变性,导致蛋白质功能丧失。2. 使蛋白质交联。氧自由基对蛋白质分子有抽提氢作用,蛋白质分子中的酪氨酸被 $\cdot OH$ 抽提氢后形成双酪氨酸,半胱氨酸的-SH被抽提氢后形成二硫键,这样便造成了蛋白质的交联。蛋白质发生交联后,溶解性能下降。3. 使肽链断裂。蛋白质被 $\cdot OH$ 断裂是一个有选择性的过程, $\cdot OH$ 抽提某个氨基酸 α -碳原子上的氢,最后使肽链断裂。

苏云金芽孢杆菌的伴孢晶体是一种具有杀虫活性的蛋白质。它不溶于水,易被紫外线钝化而丧失杀虫活性。Ignoffo等人研究发现紫外线辐射苏云金芽孢杆菌伴孢晶体、核多角体病毒的包涵体(PIB)等病原微生物的水悬液时,加入过氧化物酶或抗氧化剂可起到一定的保护作用。据此,他们推测紫外线对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体、PIB及其它病原微生物的钝化作用可能是由于紫外线辐射产生的 H_2O_2 或过氧化物自由基所致^[5~7]。但目前为止,尚无任何实验证据证明活性氧对病原微生物的直接作用。本文依据上述推测,研究了 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 对苏云金芽孢杆菌库斯塔克变种(*Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*)HD-1菌株的伴孢晶体的直接损伤作用。

1 材料和方法

1.1 菌体培养与伴孢晶体的提纯

1.1.1 供试菌株 苏云金芽孢杆菌库斯塔克变种(*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*)HD-1菌株。

1.1.2 液体培养基组成 牛肉膏 6g,细菌蛋白胨 6g,右旋葡萄糖 5g, KH_2PO_4 1g,混合盐

* 1998 届硕士毕业生,现为北京大学环境科学中心博士研究生

收稿日期:1997-10-06,修回日期:1998-01-19

溶液 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4%)0.5mL ,氯化钙溶液($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.5%)0.5mL ,定容至 1L。固体培养基为在液体培养基中添加 1.7%的琼脂。

1.1.3 菌体培养与伴孢晶体的提纯 加热使培养基溶解后用 NaOH 溶液调 pH 为 7.0~7.2。高温灭菌 ,用斜面复壮菌接种 ,200r/min ,30℃ 培养到菌体完全成熟。收获菌体 ,参照 Pendleton 等的液体双相法^[8]提纯伴孢晶体。将提纯的伴孢晶体悬浮于适量蒸馏水中 ,储于 4℃ 备用。

1.2 毒力测定用昆虫

棉铃虫(*Heliothis armigera*)初孵幼虫。

1.3 SDS-PAGE 电泳分析

1.3.1 H_2O_2 对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的作用 :在 10 支小离心管中 ,分别加入一定体积的苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的水悬液和过氧化氢溶液 ,使 H_2O_2 终浓度(v/v)依次为 0 ,0.01% 0.05% 0.1% 0.5% 1% 5% 10% 20% 30%。将各管在 37℃ 振摇 5h 后立即离心、水洗 ,反复数次 ,弃去上清液。然后在各管中加入 0.075mol/L Tris-HCl 缓冲液(含 5% 巯基乙醇 ,pH8.4) ,37℃ 下振荡 30min。加入 SDS 和甘油使其终浓度分别为 2% 和 10%。将各管于沸水浴中处理 5min ,离心 ,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.3.2 $\cdot\text{OH}$ 的产生及其对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的作用 : $\cdot\text{OH}$ 的产生体系为 Fd(II) -EDTA- H_2O_2 。取 18 支离心管 ,分为两组 ,每组九支 ,编号均为 2~10 号 ,按表 1 在各管中分别加入以下试剂。

表 1 $\cdot\text{OH}$ 的产生体系及其与苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的作用

Table 1 Treatment of <i>Bacillus thuringiensis</i> parasporal crystals with hydroxyl radicals produced by the system Fd(II) -EDTA- H_2O_2									
编号(No.)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bt PC ^a /μL	200	200	200	200	200	200	200	200	200
去离子水/μL	1800	900	1200	1640	1450	1200	900	600	300
Deionized water									
20mol/L Fd(II) /μL	0	300	0	50	100	150	200	250	300
20mmol/L EDTA/μL	0	600	0	100	200	300	400	500	600
2% H_2O_2 /μL	0	0	600	10	50	150	300	450	600

a :Bt PC 表示苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的水悬液 b :2~10 号管中 H_2O_2 的浓度(v/v)依次为 0 0.0.0.6% 0.01% ,0.05% 0.15% 0.3% 0.45% 0.6% .

a :Bt PC :Suspension of aqueous *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals ;b :Concentration of H_2O_2 is 0 ,0.0.0.6% ,0.01% ,0.05% ,0.15% ,0.3% ,0.45% ,0.6% ,respectively ,in centrifugal tubes from No.2 to No.10.

将上述两组离心管在 37℃ 分别振摇 1.5h 和 3.0h 后取出 ,立即离心、水洗 ,反复数次 ,弃去上清液。然后在各管中加入 0.075mol/L Tris-HCl 缓冲液(含 5% 巯基乙醇、2% SDS、10% 甘油、pH8.4) ,于沸水浴中处理 5min ,离心 ,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.3.3 SDS-PAGE 电泳 :电泳胶片制作参照 Laemmli 方法^[9] ,浓缩胶浓度为 5% ,分离胶浓度为 9% ,用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.4 生物测定

取 4 支离心管 ,编号为 1~4 号。每管中加入苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的水悬液 300μL 3、4 号管中分别加入 300μL 200mmol/L Fd(II) ,再分别加入 600μL 20mmol/L

EDTA。然后在 1~4 号管中分别加入一定体积的去离子水或过氧化氢溶液,使 H₂O₂ 终浓度(v/v)依次为 0、0.30%、0.30%。将各管在 37℃ 振摇 1.5h 后立即离心,收集上清液和沉淀,并将他们分别与一定的饲料混合饲喂棉铃虫的初孵幼虫。每组处理 48 头虫,在 28℃ 下饲喂 48h 后,统计幼虫死亡数,计算校正死亡率和伴孢晶体的残留生物活性。残留生物活性用 OAR% 值表示。

$$OAR\% = \frac{\text{处理后的校正死亡率}\%}{\text{处理前的校正死亡率}\%} \times 100$$

2 结 果

2.1 H₂O₂ 对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的作用

HD-1 菌株的伴孢晶体在含还原剂的碱性缓冲液中可溶解释放出 135 和 65kD 两种原毒素蛋白,在鳞翅目昆虫中肠内可降解为小分子毒性多肽,毒性多肽作用于昆虫中肠上皮细胞使中肠麻痹或通过中肠进入血腔,最终使昆虫死亡^[10]。H₂O₂ 是一种氧化剂,具有杀菌作用。它对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体具有一定程度的损伤作用。图 1 是经不同浓度 H₂O₂ 处理后的伴孢晶体的 SDS-PAGE 电泳图谱。从图谱可以看出,随 H₂O₂ 浓度从 0 增加到 30%,伴孢晶体在含巯基乙醇的 Tris-HCl 缓冲液中溶解得到的 135 和 65kD 两种原毒素蛋白的电泳谱带逐渐变模糊,最终基本消失。这表明 H₂O₂ 对伴孢晶体具有损伤作用,使伴孢晶体的溶解性能发生变化。表 2 的生物测定结果也证明了这一点。1 号样品为未经活性氧处理的正常的伴孢晶体,其沉淀物对棉铃虫初孵幼虫的生物活性很高,校正死亡率达 93.5%,以其残留生物活性为 100% 计,其上清液没有杀虫活性。2 号样品为经 0.3% H₂O₂ 处理后的伴孢晶体,其沉淀物的生物活性相对较低,校正死亡率为 51.9%,与正常的伴孢晶体相比,残留生物活性下降了 44.5%;其上清液亦没有杀虫活性。1、2 号样品的上清液均无杀虫活性表明 H₂O 和 H₂O₂ 均不能使伴孢晶体溶解释放出原毒素蛋白,2 号样品生物活性的降低表明 H₂O₂ 对伴孢晶体具有一定程度的损伤作用。

2.2 ·OH 对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的作用

·OH 是氧化性最强、杀伤力最大的自由基,它可引起蛋白质(特别是膜蛋白)的交联,导致蛋白质溶液性能下降,

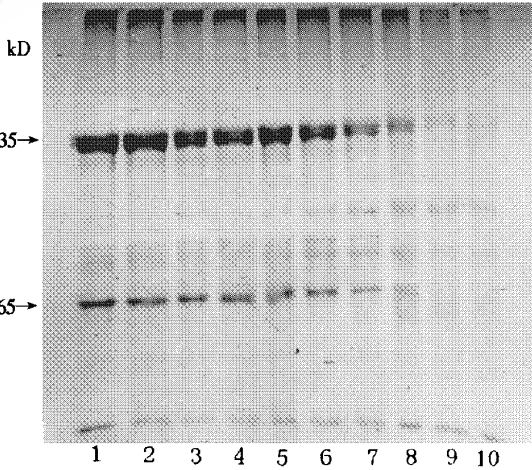


图 1 Bt 伴孢晶体受 H₂O₂ 作用后的 SDS-PAGE 图谱 (37℃ 作用 5h)

Fig.1 SDS-PAGE of Bt parasporal crystals injured by hydrogen peroxide(37℃ for 5h)

- 1.对照(control);2. 0.01% H₂O₂;3. 0.05% H₂O₂;
- 4. 0.1% H₂O₂;5. 0.5% H₂O₂;6. 1% H₂O₂;7. 5% H₂O₂;
- 8. 10% H₂O₂;9. 20% H₂O₂;10. 30% H₂O₂.

表 2 活性氧对 Bt 伴孢晶体生物活性的影响

Table 2 Effect of reactive oxidants on Bt parasporal crystals in activity

处理 Treatment	1 Bt PC		2 Bt PC + 0.3% H ₂ O ₂		3 Bt PC + Fd(Ⅱ) + EDTA		4 Bt PC + Fd(Ⅱ) + EDTA + 0.05% H ₂ O ₂	
	沉淀	上清液	沉淀	上清液	沉淀	上清液	沉淀	上清液
	Precipitate	Supernatant	Precipitate	Supernatant	Precipitate	Supernatant	Precipitate	Supernatant
校正死亡率/% Adjusted mortality	93.5	0.0	51.9	6.0	89.3	1.9	13.9	1.9
残留生物活性 OAR/%	100	\	55.5	\	95.5	\	14.8	\

a :OAR/% 表示伴孢晶体的残留生物活性 ,以未经活性氧处理的伴孢晶体(1 号)的残留生物活性为 100% 计。
a :OAR/% ——Percentage of original activity remaining ,based upon 100% activity for No. 1.

功能丧失^[2]。·OH 对苏云金芽孢杆菌的伴孢晶体有极其明显的损伤作用。图 2 是伴孢晶体经·OH 及其产生体系 Fd(Ⅱ)-EDTA-H₂O₂ 中不同因子作用后的 SDS-PAGE 电泳图谱。从图 2 可以看出 ,Fd(Ⅱ)和 EDTA 对伴孢晶体没有影响 ,低浓度的 H₂O₂ 对伴孢晶体的损伤作用也不显著(图 1)。然而 ,在 Fd(Ⅱ)和 EDTA 存在下 ,0.01% H₂O₂ 产生的·OH 对伴孢晶体的损伤作用十分显著 ,当体系中 H₂O₂ 浓度达到 0.15% 时 ,伴孢晶体溶解产生

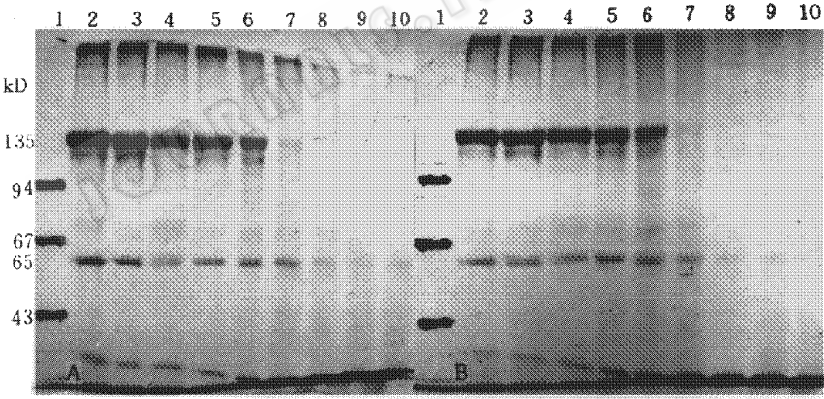


图 2 Bt 伴孢晶体受不同因子作用后的 SDS-PAGE 图谱

A 37℃作用 1.5h B 37℃作用 3.0h.

Fig. 2 SDS-PAGE of Bt parasporal crystals injured by various factors.

A :37℃ for 1.5h and B :3.0h.

1. 标准分子量蛋白(Molecular weight markers of standard protein);2. 对照(Control);3. 3.0mmol/L Fd(Ⅱ)6.0mmol/L EDTA;4. 0.6% H₂O₂;5. 5.0mmol/L Fd(Ⅱ)-1.0mmol/L EDTA-0.01% H₂O₂;6. 1.0mmol/L Fd(Ⅱ)2.0mmol/L EDTA-0.3% H₂O₂;7. 1.5mmol/L Fd(Ⅱ)-3.0mmol/L EDTA-0.15% H₂O₂;8. 2.0mmol/L Fd(Ⅱ)4.0mmol/L EDTA-0.3% H₂O₂;9. 2.5mmol/L Fd(Ⅱ)-5.0mmol/L EDTA-0.45% H₂O₂;10. 3.0mmol/L Fd(Ⅱ)6.0mmol/L EDTA-0.6% H₂O₂.

的 135 和 65kD 两种原毒素蛋白的电泳谱带基本消失。 $\cdot\text{OH}$ 的这种损伤作用随 $\cdot\text{OH}$ 产生体系中 H_2O_2 、 $\text{Fe}(\text{II})$ 和 EDTA 浓度的增加而显著增强,与作用时间关系不明显(这可能是因为 $\cdot\text{OH}$ 产生体系在短时间内即可完成反应,反应生成的具有高反应活性的 $\cdot\text{OH}$ 瞬间即可与伴孢晶体或其它物质发生反应而消失)。 $\cdot\text{OH}$ 对伴孢晶体生物活性的影响见表 2。3 号样品代表经 $\text{Fe}(\text{II})$ 和 EDTA 处理后的伴孢晶体,其沉淀物对棉铃虫初孵幼虫的生物活性很高,校正死亡率为 89.3%,而上清液亦无杀虫活性,这与正常的伴孢晶体基本一致。这表明 $\text{Fe}(\text{II})$ 和 EDTA 对伴孢晶体没有影响。4 号样品表示 $\text{Fe}(\text{II})$ 和 EDTA 存在时,由 0.3% 产生的 $\cdot\text{OH}$ 对伴孢晶体生物活性的影响。可以看出,样品离心得到的上清液无杀虫活性,而沉淀物具有一定的杀虫活性。其对棉铃虫初孵幼虫的校正死亡率为 13.9%,与正常的伴孢晶体相比,它们的残留生物活性下降了 85.2%。这表明 $\cdot\text{OH}$ 及其产生体系本身也不能使伴孢晶体溶解释放出原毒素蛋白,但是 $\cdot\text{OH}$ 使伴孢晶体的生物活性显著下降或丧失,证明 $\cdot\text{OH}$ 对伴孢晶体有很强的损伤作用。

3 讨 论

阳光中的紫外线能迅速钝化以苏云金芽孢杆菌为代表的病原微生物使其杀虫活性下降或丧失,这是造成微生物农药田间防效差的最主要原因之一^[5]。但是关于紫外线使病原微生物钝化的详细机理目前还不清楚,仅存在两种假设:一种假设认为阳光中的紫外线诱导病毒的 DNA 链发生有害的交联,断裂或形成易变位点,结果使病毒失去致病力;另一种假设认为阳光中的紫外线诱导产生的高反应活性的自由基(H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、单线态氧等)使病原微生物的致病力下降或丧失^[7]。

本文的实验结果证明 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 对苏云金芽孢杆菌的伴孢晶体有一定程度的破坏作用。SDS-PAGE 电泳分析和生物测定结果表明, H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 均改变了伴孢晶体的溶解性能,并导致伴孢晶体生物活性下降或丧失。此外,它们对伴孢晶体的作用程度与其浓度呈正相关; $\cdot\text{OH}$ 对伴孢晶体的损伤作用明显强于 H_2O_2 。 $\cdot\text{OH}$ 作用较强, H_2O_2 作用较弱,可能是因为 H_2O_2 氧化性较弱,反应活性较低,需转化为 $\cdot\text{OH}$ 等活性氧后破坏伴孢晶体。在没有金属离子和络合剂或缺乏光照的条件下,这种转化较慢。在 $\text{Fe}(\text{II})$ 和 EDTA 存在时, H_2O_2 可迅速转化为氧化性极强和反应活性极高的 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OH}$ 的形程十分短,自产生部位起只能运行 15 埃^[2]。因此,由 $\text{Fe}(\text{II})$ -EDTA- H_2O_2 体系生成的大量的 $\cdot\text{OH}$ 产生后可能随即作用于周围的伴孢晶体,造成对伴孢晶体的明显损伤。

HD-1 菌株产生的伴孢晶体大而呈规则菱形,表面显示明显的条纹(长宽均为几千埃以上),内部有晶格,晶体的表面有一层包膜,这层包膜可用稀碱洗涤除去或用超声波处理除去^[10]。对于这种水不溶且体积较大规则的伴孢晶体而言, $\cdot\text{OH}$ 究竟如何与之作用,并引起结构改变,最终导致其溶解性能的改变和生物活性的下降或丧失,有待进一步研究。依据本实验结果和 HD-1 菌株伴孢晶体的形态结构及 $\cdot\text{OH}$ 的化学性质,初步认为 $\cdot\text{OH}$ 可能作用于伴孢晶体表面的包膜组织,引起膜蛋白的交联,从而导致膜溶解性能下降,结果使膜在含还原剂的碱性溶液或昆虫中肠内不能正常溶解,导致包膜内的伴孢晶体无法暴露出来,不能被溶解或降解为原毒素蛋白或毒性多肽,最终导致伴孢晶体生物活性下降或

丧失。

阳光中的紫外线、X-射线、 γ -射线均可产生 $\cdot\text{OH}$ 及其它活性氧自由基,因此,阳光对苏云金芽孢杆菌等病原微生物的损伤,可能除了这些射线本身对病原微生物的直接作用外,很大程度上可能还与 $\cdot\text{OH}$ 及其它活性氧自由基的作用有关。

参 考 文 献

- [1] 莫 简. 生物化学及其生物物理进展, 1983, 38(2) 23~29.
- [2] 林克椿, 吴本阶. 医学生物物理学. 北京 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996.
- [3] 李培峰, 方允中. 生命化学, 1994, 14(6) : 1~2.
- [4] 刘时中. 生理科学进展, 1983, 14(2) : 147~152.
- [5] Ignoffo C M, Hostetter D L, Sikorowski P P *et al.* *Environ Entomol*, 1977, 6(3) : 411~414.
- [6] Ignoffo C M, Garcia C. *Environ Entomol*, 1978, 7(2) : 270~272.
- [7] Ignoffo C M, Garcia C. *Environ Entomol*, 1994, 23(4) : 1025~1029.
- [8] Pendleton I R, Morris R B. *Nature*, 1966, 12 : 728~729
- [9] Laemmli U K. *Nature*, 1970, 227 : 680~685.
- [10] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌. 北京 科学出版社, 1990.

THE EFFECTS OF REACTIVE OXIDANTS ON *BACILLUS THURINGIENSIS* PARASPORAL CRYSTALS

Wang Wenjun Qian Chuanfan Shen Jizhong Yang Shaosong

(Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract The effects of hydrogen peroxides(H_2O_2) and hydroxyl radicals($\cdot\text{OH}$) on the purified parasporal crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-1 were studied by SDS-PAGE and bioassay. The results showed that to some extent H_2O_2 and $\cdot\text{OH}$ produced a direct and deleterious effect. Hydroxyl radicals from the system $\text{Fe(II)-EDTA-H}_2\text{O}_2$ indicated more serious damage than hydrogen peroxides. There was a 44.5% loss in activity against 12-h-old larvae of *Heliothis armigera* when parasporal crystals were treated with 0.3% H_2O_2 only. However, 85.2% activity lost when parasporal crystals were treated with 0.3% H_2O_2 in the presence of iron(II) and EDTA.

Key words Hydrogen peroxide, Hydroxyl radical, *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal