



王 瑛 冯喜昌 温 洁

(中国科学院动物研究所, 北京)

1977年, Goldberg 等^[1]分离出对蚊幼虫有极高毒性的苏芸金杆菌以色列变种 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, 经室内外实验, 发现对分属于6个属的16个种以上蚊幼虫均有较高毒效。目前许多国家正对这个菌株进行试验。为深入研究以色列变种的灭蚊作用, 我们对灭蚊的以色列变种、九州变种^[2]和本实验用尖音库蚊 (*Culex pipiens* var. *pallens*) 筛选出的七株灭蚊菌株的晶体蛋白毒素同一些对蚊无毒而对鳞翅目幼虫有毒菌株的晶体蛋白毒素进行了比较, 探讨了晶体蛋白组成与灭蚊毒性的关系。

材料与方 法

一、灭蚊菌株的筛选对象

被筛选的菌株均为苏芸金杆菌, 共13个血清型, 其中包括苏芸金变种 (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*) 14株, 阿莱变种 (*B. thuringiensis* var. *alesti*) 1株, 猝倒变种 (*B. thuringiensis* var. *sotto*) 2株, 松蠹变种 (*B. thuringiensis* var. *dendrolimus*) 4株, 肯尼亚变种 (*B. thuringiensis* var. *kenyae*) 3株, 蜡螟变种 (*B. thuringiensis* var. *galleriae*) 25株, 加拿大变种 (*B. thuringiensis* var. *canadensis*) 1株, 杀虫变种 (*B. thuringiensis* var. *entomocidus*) 1株, 亚毒变种 (*B. thuringiensis* var. *subtoxicus*) 1株, 鲈泽变种 (*B. thuringiensis* var. *aizawai*) 1株, 莫里逊变种 (*B. thuringiensis* var. *morrisoni*) 1株, 玉米螟变种 (*B. thuringiensis* var. *ostrinae*) 1株, 多窝变种 (*B. thuringiensis* var. *to lworthi*) 1株, 丹穆斯达变种 (*B. thuringiensis* var. *darmstadiensis*)

1株, 杜曼变种 (*B. thuringiensis* var. *toumancffi*) 1株, 汤普生变种 (*B. thuringiensis* var. *thompsoni*) 1株, 戈尔斯德变种 (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) 8株, 巴基斯坦变种 (*B. thuringiensis* var. *pakistani*) 1株和未定变种名称的苏芸金杆菌30株, 共97株。

二、灭蚊性能的测定

(一) 初筛

将被试菌株转接到牛肉膏、蛋白胨琼脂斜面上, 30℃培养至芽孢、晶体游离。自每个斜面取一环菌苔, 加少量蒸馏水, 研开, 并用超声波处理, 使芽孢晶体均匀分散, 放到玻璃罐中, 加入放置3天以上的自来水至100毫升。每罐放入尖音库蚊(淡色亚种)3龄幼虫25头, 于室温30℃, 加饲料^[3], 饲养48小时, 观察结果。

对照组为3龄幼虫50头(两组), 仅加入放置3天以上的自来水及饲料。

(二) 灭蚊菌株晶体的制备

用液体双相法及等密度离心法制备晶体制剂^[4]。

(三) 灭蚊菌株晶体制剂的灭蚊性能测定

称取定量的晶体用于饲养实验, 步骤与初筛相同。

三、S. D. S. 聚丙烯酰胺凝胶板状电泳

下电极缓冲液: 40 mM Tris-HCl (pH7.4) 含20 mM 乙酸钠; 2 mM EDTA-二钠。上电极缓冲液: 0.1% S. D. S. 用下电极缓冲液配制。凝胶配方: T = 75%, C = 2.7%, 用上

* 照片由中国科学院生物物理研究所电镜室及本所于廷芬同志摄制, 蚊卵由军事医学科学院提供, 特此一并致谢。

电极缓冲液配制。解离液为 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 含 2% S. D. S.、10% 葡萄糖、2mM EDTA-二钠、5% 巯基乙醇、适量派洛宁 G。

晶体样品 1mg 加入 0.1N NaOH 0.1 ml, 室温放置 2 小时 (中间用超声波处理一次), 然后加入等体积的解离液, 在 100°C 水浴中煮 3—4 分钟。

加样后通电, 电流 40 mA, 直到前沿染料 (派洛宁 G) 移至板的下方前沿, 取出。固定后染色、脱色。

标准蛋白亚基: 肌球蛋白 (亚基分子量 22 万道尔顿)、磷酸化酶 b (亚基分子量 9.4 万道尔顿)、牛血清蛋白 (亚基分子量 6.8 万道尔顿), 重链 γ -球蛋白 (亚基分子量 5.0 万道尔顿), 轻链 γ -球蛋白 (亚基分子量 2.35 万道尔顿), 醛缩酶 (亚基分子量 4.0 万道尔顿), 核糖核酸酶 (亚基分子量 1.37 万道尔顿)。

四、免疫扩散

(一) 晶体蛋白的制备

称取一定重量的晶体, 加 0.1N NaOH 至 1% (W/V) 浓度。超声波处理后, 置室温 1 小时, 用 MSE 40 离心机 60,000 g 离心 1 小时, 取上清液对蒸馏水透析 24 小时, 当样品 pH 与蒸馏水 pH 近似时将样品取出, 用醋酸盐缓冲液调至 pH 4.6, 放 4°C 冰箱 30 分钟。离心, 收集沉淀, 水洗后再离心, 冰冻干燥。

(二) 抗体制备

称取定量晶体蛋白, 加 0.1N NaOH (每 mg 蛋白加 0.1 ml NaOH), 超声波处理后放室温 1 小时, 加入等体积完全福氏佐剂充分混匀, 其它方法同文献[5]。注射剂量各次分别为 2、4、5、5、5 mg。

(三) 双向免疫扩散

方法略^[6]。中心孔分别加入不灭蚊菌株肯尼亚变种 7404、HD-1、7216、玉米螟变种 006 及灭蚊菌株以色列变种 1897 晶体蛋白抗血清 10 μ l, 周围孔分别加入灭蚊菌株碱溶晶体抗原 6 μ l, 置室温 25°C 进行反应, 24 小时后记录结果, 用 0.1% 氨基黑染色。

五、电镜观察灭蚊菌株晶体的形态

将晶体水悬液滴在附有福尔蒙瓦尔膜的网版上, 干后用日立 HUIIA 电镜观察菌体形态。

结 果

一、灭蚊苏芸金杆菌菌株的筛选结果

从 97 个苏芸金杆菌菌株中筛选 20 株灭蚊菌株, 其中使蚊幼虫死亡率达 80% 以上者 7 株, 它们是戈尔斯德变种的 781、78、烟 II 和蜡螟变种 P-A5、174、001 及未定变种名称的 503 菌株。其余被筛选菌株对蚊幼虫均无毒效。结果见表 1。

表 1 对尖音库蚊淡色亚种 3 龄幼虫有毒效的菌株

致死率在 80% 以上菌株		致死率低于 80% 的菌株	
变种	菌株号	变种	菌株号
戈尔斯德	781, 78, 烟 II	蜡 螟	R _{62-111, 73-7, A₆, 39, H-B, P-A₂}
蜡 螟	P-A ₂ , 174, 001	苏芸金	457
未定变种名称	503	未定变种名称	5 株

二、灭蚊菌株的晶体蛋白制剂对蚊幼虫的毒性

将筛选出的对蚊幼虫毒力较高的菌株 781、78、P-A₅、174、001、烟 II 503 及已知灭蚊菌株以色列变种 1897、九州变种分别制备了纯晶体制剂 (纯度达 98—99.9%), 灭蚊幼虫毒力测定表明以色列变种 1897 菌株晶体毒力最高, LC₅₀ 为 0.023 μ g/ml, 其次是 174 菌株, LC₅₀ 为 0.8

表 2 灭蚊菌株晶体蛋白制剂对尖音库蚊淡色亚种 3 龄幼虫的毒性

变种	菌株	LC ₅₀ (μ g/ml)
以色列	1897	0.023
蜡 螟	174	0.8
蜡 螟	P-A ₂	1
戈尔斯德	781	1.4
蜡 螟	001	2.4
戈尔斯德	78	2.5
戈尔斯德	烟 II	2.5
九州	九州	2.8
未定变种名称	503	2.8

$\mu\text{g}/\text{ml}$, 毒力最差的是九州变种及 503 菌株, LC_{50} 均为 $2.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。结果见表 2。

三、S. D. S. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

对表 2 中所列九个灭蚊菌株的晶体蛋白进行电泳, 得到了清晰的电泳图谱 (图版 I-1)。发现大部分菌株的晶体蛋白主要由一种大分子亚基组成, 分子量为 14 万道尔顿。而以色列变种 1897 和九州变种的亚基成分与其它不同, 特别是以色列变种 1897 主要由一种分子量很小的亚基构成, 分子量为 2.3—2.4 万道尔顿。九州变种除与大多数菌株的晶体蛋白有相似亚基外, 本身还有一个分子量为 2.4 万道尔顿的亚基。

四、双向免疫扩散

实验结果表明以色列变种 1897 晶体蛋白抗体与自身晶体蛋白抗原作用, 产生 3 条清晰的沉淀线。而以色列变种 1897 晶体蛋白抗体与其它灭蚊菌株 (174、P-A₅、001、78、781、烟 II、503、九州变种) 的晶体蛋白抗原没有沉淀反应, 说明以色列变种 1897 晶体蛋白与其它具有灭蚊活性菌株的晶体蛋白在抗原性上根本不同。

一些不灭蚊菌株 (戈尔斯德变种 HD-1、7216、肯尼亚变种 7404) 晶体蛋白抗体能与灭蚊菌株 001、174、P-A₅、78、781、烟 II、503 的晶体蛋白抗原产生 2—3 条沉淀线, 说明它们的晶体蛋白有一定的共同成分。但上述这些不灭蚊菌株的晶体蛋白抗体与灭蚊的以色列变种 1897 和九州变种的晶体蛋白抗原无反应。

不灭蚊的 006 菌株晶体蛋白抗体与除以色列变种 1897 外的其它菌株晶体蛋白抗原都有一条弱的沉淀线。全部结果见图版 I-2。

五、灭蚊菌株晶体形态的电镜观察

电镜观察结果表明, 各灭蚊菌株的晶体形态是不同的。以色列变种 1897 和九州变种的晶体是不规则形或近于圆形, 001、78、781、烟 II 晶体是菱形, 而 P-A₅、174、503 晶体虽是菱

形, 但多是几个镶嵌在一起 (图版 I-3)。

讨 论

本实验发现, 虽然杀蚊的苏芸金杆菌其杀蚊毒素都是 δ -内毒素, 但其蛋白组成, 各菌株并不相同。免疫扩散实验证明, 以色列变种 1897 菌株的晶体蛋白与其它菌株的晶体蛋白无共同抗原结构。电泳分析也表明以色列变种 1897 晶体蛋白的电泳行为也与其它菌株有较大差异, 晶体蛋白主要由 2.3—2.4 万道尔顿的小亚基组成, 这同一般菌株都由 14 万道尔顿的大亚基组成是有显著区别的。因此认为, 以色列变种 1897 之所以有很高的灭蚊毒性, 可能与其所具有的独特的晶体蛋白结构有关系。

但是, 除以色列变种 1897 和九州变种外, 其它灭蚊菌株的晶体蛋白抗原与不灭蚊菌株 HD-1、7216、肯尼亚变种 7404 的晶体蛋白抗体在免疫扩散时均产生 2—3 条沉淀线, 表明它们的晶体蛋白有一定的共同成分。显然这部分成分相同的蛋白质是与灭蚊无关的。这样便提出一个问题: 是否某些菌株的 δ -内毒素对不同昆虫有不同的杀虫活性单位呢?

曾有人报道^[7], 形状不同的晶体对鳞翅目的幼虫有不同的毒力。而我们看到晶体形状对蚊是否有毒并无关系。但最近发现杀蚊毒力高的苏芸金杆菌如以色列变种 1897 及 73-E-102, 73-E-10-16 菌株的晶体形状多为不规则形或圆形^[8]。

参 考 文 献

- [1] Goldberg, L. J. and J. Margalit: *Mosquito News*, **37**: 355, 1977.
- [2] Oliba, M. and K. Aizawa: *J. Invert. Path.*, **33**(3): 387, 1979.
- [3] 王瑛等: 昆虫学报, **24** (1): 42, 1981.
- [4] 王瑛等: 微生物学报, **20** (3): 285, 1980.
- [5] Delafield, F. P. et al.: *J. Bacteriology*, **96** (3): 713, 1968.
- [6] 徐宜为编: 实验免疫学技术, 科学出版社, 北京, 1979.
- [7] 蒲益龙: 害虫生物防治的原理和方法, 科学出版社, 北京, 1978.
- [8] Padua, L. E. et al.: *J. Invert. Path.*, **36** (2): 180, 1980.