

研究报告

紫外线使苏云金芽孢杆菌伴孢晶体失活机理的研究

崔云龙 田明 邵宗泽

(山东农业大学生物农药研究开发实验室, 泰安 271018)

摘要 用电镜、电泳、生物鉴定等方法,研究了紫外线对苏云金芽孢杆菌库斯塔克变种的伴孢晶体的影响。结果表明,紫外线能破坏伴孢晶体的表面结构和形态,降低伴孢晶体在碱性液和蚕胃液中的溶解度,5小时以上的长时间照射,能导致伴孢晶体完全不溶,因而不能降解为具有杀虫活性的毒素蛋白而失活。

关键词 紫外线; 苏云金芽孢杆菌; 伴孢晶体

阳光中的紫外线是降低苏云金芽孢杆菌制剂田间防治效果的首要因素。甘蓝叶上的芽孢经紫外灯照射10分钟,失活率达99%以上^[1]。稻叶上的芽孢经12小时的阳光照射,失活率达88%以上^[2]。伴孢晶体对紫外线的敏感性虽然比芽孢低^[3],但从田间残效期上看,经过2—3天的日光照射,伴孢晶体也基本上失去活性^[1,2,4]。目前,关于伴孢晶体的蛋白组成及基因结构的研究已很详细^[5,6],但关于伴孢晶体被紫外线照射后,其形态结构和理化性质发生了哪些变化?尚未见报道。本文对此进行了研究,现报道如下:

材料和方法

(一) 菌株

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

(二) 培养基

液体培养基配方(g/L)是:细菌胨7.5,葡萄糖1, K_2HPO_4 4.35, KH_2PO_4 3.4, 混合盐溶液(每100 ml 含 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.46g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.28g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g) 5ml; 氯化钙溶液(每100ml 含 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3.66g) 5ml, 蒸馏水990ml。固体培养基为液体培养基中再添加1.7%的琼脂。

(三) 培养及菌体回收

用300ml 摇瓶,每瓶装液量50ml,高温灭菌后,用斜面复壮菌种接种,300r/min,30℃下,培养32小时,用15000r/min 离心回收菌体,悬于适量蒸馏水中,贮于4℃备用。

(四) 毒力测定用昆虫

家蚕(*Bombyx mori*)品种为菁松 X 皓月的一代杂交种。引种自烟台蚕种场。

(五) 紫外线处理

将100 μ l 浓缩菌液混入分别盛9.9ml 和1.9ml 蒸馏水的50ml 烧杯中,置紫外灯盒(30W, 距离33cm)内照射,为使照射均一,经常振摇一下烧杯,在规定的时间内取出烧杯进行生物毒力测定、相差显微镜和电镜观察及电泳分析等各项处理。

(六) 毒力测定

将经紫外线照射处理不同时间的菌液配成各种浓度,与未经处理的对照一同给3龄起蚕添食,每一处理20头,重复2组,24小时后,调查活虫头数,求得 LC_{50} 。

(七) 碱液和蚕胃液溶解观察

蚕胃液的收集,是通过用低电压(20—40V)电击绝食24小时的5龄盛食期蚕获得。将不同照射时间处理后的菌液,离心回收,用含2%巯基乙醇,0.075mol/L Tris-HCl pH10.5的碱性液或蚕胃液进行溶解处理30分钟后,用相差

(八) SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS—PAGE) 分析

将经不同时间照射处理后的菌液，离心回收，进行电泳分析。电泳胶片的制做参照 Laemmli 的方法^[7]。浓缩胶的浓度是3%，分离胶的浓度是7.5%，用考马斯亮蓝染色。

(九) 扫描电镜观察

将经紫外线照射不同时间的样品离心回收后，先用5%的丙酮液洗涤离心2次，再以重蒸水洗涤离心2次后，喷涂铂铱合金，进行观察。电镜型号为日本电子 JEM-1200EX。

结 果

(一) 紫外线对苏云金芽孢杆菌杀虫活性的影响 (表1)

从表1看出，未经紫外线处理的苏云金芽孢杆菌的杀虫活性很强，LC₅₀高达稀释5000倍。照射1小时的活性下降了一半；照射2小时，杀虫活性下降了78%。照射时间超过4小时，基本丧失全部活性。

表1 紫外线对苏云金芽孢杆菌的灭活作用

照射时间 (h)	0	1	2	3	4	5
半致死浓度 (LC ₅₀)*	5000	2500	1100	670	190	<20

* 稀释倍数

(二) 紫外线对伴孢晶体溶解度的影响

相差显微镜的观察结果表明，未经紫外线处理的伴孢晶体极易溶解于碱性液和蚕胃液中，在25℃条件下，经过30分钟，99%的伴孢晶体被溶解。而经紫外线处理后的伴孢晶体，在碱性液和蚕胃液中的溶解度随照射时间的延长而逐渐降低，照射时间超过4小时，在碱性液中不被溶解，但能微溶于蚕的胃液。5小时以上的照射，在碱性液及蚕胃液中都不溶解。

(三) 电泳结果

HD-1菌株的伴孢晶体，在碱性缓冲液中，

能降解为135和65道尔顿两种毒素蛋白 (图版 I-g)，这两种毒素蛋白在自身或者外来酶的作用下，进一步降解为低分子量的毒素蛋白^[8]。从图版 I 可以看出，标准分子量蛋白 (图版 I-a) 为对照。经紫外线处理后的伴孢晶体 (图版 I-b、c、d、e、f) 与正常的 (图版 I-g) 相比较，电泳图谱明显发生了变化。135和65道尔顿两种毒素蛋白的区带，随处理时间的延长，而迅速减少消失。处理4小时以上，区带完全消失 (图版 I-e、f)。

(四) 电镜观察的结果

正常的伴孢晶体 (图版 I-1) 具有完整的棱形结构，每个面上都有排列规则的条纹。经紫外线分别处理1、2、3、4、5小时的伴孢晶体 (图版 I-2、3、4、5、6) 与正常的伴孢晶体相比较，紫外线照射1小时的伴孢晶体，已发生了变化，表面上出现了轻微的被灼烧后的样子，照射2—3小时的伴孢晶体，除灼烧程度加深外，两端的棱角已出现断失，电镜下观察到约占晶体总数的5—10%的伴孢晶体的棱角出现断失。照射4小时以上的伴孢晶体的表面已变得凹凸不平，残缺不全，60—80%的晶体的棱角断失。

讨 论

苏云金芽孢杆菌制剂中起主要杀虫作用的是伴孢晶体，正常的伴孢晶体被昆虫食下后，在碱性胃液和蛋白酶的作用下，降解为具有杀虫活性的毒素蛋白，作用于中肠细胞，引起细胞崩坏、脱落、致死^[9]。生物鉴定结果表明，伴孢晶体被紫外线照射处理一定时间后，杀虫活性降低，甚致完全丧失。说明紫外线能破坏晶体蛋白的立体结构，使之失活。相差显微镜的观察结果表明，伴孢晶体被紫外线处理后溶解度降低，降低的程度与杀虫活性的下降趋势相一致，当降低到完全不溶时，杀虫活性也完全丧失。电泳的结果进一步表明，与杀虫活性密切相关的两种毒素蛋白，随照射处理时间的延长和溶解度的降低而减少，照射时间超过5小时，则毒素蛋白完全消失。说明紫外线能影响伴孢晶体蛋白的

能导致伴孢晶体的表面结构和形态发生变化,失去表面原有的条纹结构,而变得粗糙或凹凸不平。大量的晶体失去原有的棱角,可能是由于紫外线照射导致晶体蛋白变脆,在离心、洗涤等过程中较正常的晶体易破碎而造成的。但关于紫外线能导致晶体蛋白发生这些变化的机理,还不很清楚。但综合生物鉴定、相差显微镜、扫描电镜及电泳的检测结果,我们初步认为,伴孢晶体被紫外线照射后失活的机理,主要是由于长时间的紫外线照射,破坏了伴孢晶体的表面结构和形态,破坏了伴孢晶体蛋白的一级结构和立体结构,使之变性、变脆,难溶于昆虫的胃液,不能降解为具有杀虫活性的毒素蛋白,而失去杀虫活力。

参 考 文 献

1. 黄冠辉等: 微生物学通报, 8 (1): 5-6, 1981。
2. 湖南省微生物研究所药效药理组: 微生物学通报, 8 (4): 157-159, 1981。
3. Burges, H. D. et al; *J. Invert. Pathol.*, 25: 5-9, 1981。
4. 张益等: 微生物学通报, 11 (2): 49-50, 1984。
5. 崔云龙等: 山东农业大学学报, 23(2): 166-189, 1992。
6. Höfte H et al.; *Microbiol. Rev.*, 53 (2): 242-255, 1989。
7. Laemmli U K; *Nature*, 227: 680-685, 1970。
8. 山本敬司等: 蛋白质·核酸·酵素, 29 (6): 444-453, 1981。
9. 姬野道夫: バイオサイエンスとインダストリー, 47 (7): 695-703, 1989。

(1992-10-19收稿)

EFFECT OF ULTRAVIOLET RAYS ON THE ACTIVITY OF PARASPORAL CRYSTAL OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Cui Yunlong Tian Ming Shao Zongze

(Research and Development Laboratory for Biotic Pesticides,

Shandong Agricultural University, Tai an 271018)

The effect of Ultraviolet (UV) rays on the activity of parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*, var. *Kurstaki* HD-1 strain was studied by SEM, SDS-PAGE, bioassay and other methods. It was found that the morphology and surface structure of PC were damaged, and its solubility in alkaline solution or silkworm gut juice was decreased after being irradiated by UV, the solubility was lost completely after a long time irradiation over 5 hours, so the processed PC could not be degraded into protoxin with insecticidal activity and was denatured.

Key words Ultraviolet rays; *Bacillus thuringiensis*; Parasporal crystal