

注射大肠杆菌诱导 柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质

(简 报)

黄自然

(蚕桑系)

王少颐

(植保系)

昆虫是地球上数量多分布广的动物,它们能适应环境而得以生存和发展,是具有其独特的内在因素的。近年来对昆虫防御机构的研究已引起重视,特别昆虫免疫问题已取得一定的进展。1974、1980年Boman等已作了评述。昆虫虽然不象高等动物那样具有完善的免疫体系,但它们先天免疫及获得性免疫能力却是惊人的。1974年Boman等^[1]用大肠杆菌*Escherichia coli*注射于柞蚕*Samia cynthia*滞育蛹,诱导血淋巴产生抗菌物质,后来,又能诱导天蚕*Hyalophoria cecropia*滞育蛹产生三种抗菌蛋白P7、P9A及P9B^{[2][3]}。1973—1976年Powning等从免疫的蜡螟*Galleria mellonella*及家蚕*Bombyx mori*血淋巴中分离到溶菌酶^{[4][5]}。1979~1980年杉山、大森等又从家蚕免疫血淋巴中分离到若干抗菌物质,其中之一是含有11种氨基酸37个残基的多肽,具有类似多粘菌素Polymyxin B的杀菌作用^{[6][7]}。此外,在蝗虫、蛱蝶及棉象虫的体液中都发现有某些抗菌物质。因此,研究微生物诱导昆虫的免疫作用,昆虫抗菌活性物质的生物合成和调控以及这些抗菌物质的分离、提纯、结构鉴定及人工合成等都是当前受到注意的课题,如进一步探索应用于植物保护和有益昆虫的疾病的预防等将是很有意义的。

1979年我们将大肠杆菌注射于柞蚕*Antheraea pernyi*滞育蛹,每头 $1-5 \times 10^5$ 个活菌体,在25°C保持4—7天,能诱导血淋巴产生抗菌物质。将免疫的柞蚕血淋巴沾于滤纸片上作抑菌试验,观察其抑菌圈的半径,以鉴别其效能。见图1。初步证明柞蚕免疫血淋巴对多种病原菌具有较明显的抑菌作用。它们是:苏芸金杆菌阿莱亚种*Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*、猝倒亚种*Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*、蜡螟亚种*Bacillus thuringiensis* subsp. *galleria* (包括分离于柞蚕的青虫菌)及粘质沙雷氏菌*Serratia marcescens*。此外,对大肠杆菌*Escherichia coli*、枯草杆菌*Bacillus subtilis*、

* 本稿承欧守杼教授审阅,周奇同志参加部份工作,深表谢意。

巨大芽胞杆菌 *Bacillus megatherium*、普通微球菌 *Micrococcus vulgaris*、溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus*、桑青枯病假单胞菌 *Pseudomonas solanacearum*、软腐病欧文氏菌 *Erwinia aroideae*等均有一定的抑菌效应。

用光学显微镜及扫描电镜观察到柞蚕免疫血淋巴中出现较多的吞噬细胞及离解的脂肪体细胞,它们能将体内的大肠杆菌包围、粘附和吞噬。见图2、3。

柞蚕免疫血淋巴经聚丙烯酰胺(7%)凝胶电泳(pH8.6),用氨基黑10B染色,显出9条蛋白带,其中p7及p9具有抑菌作用,对Schiff试剂有弱阳性反应,可能是溶菌酶类的碱性蛋白或多肽。见图4。正在对p7蛋白进行分离提纯工作。

参 考 文 献

- [1] Bomen, H.G., Faye, N.I., Paul, K., Rasmuson, T., 1974, Insect immunity : I.Characteristic of an inducible cell free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. Infection and immunity, 10 (1) 136—145.
- [2] Rasmuson, T., Boman, H.G., 1979, Insect immunity : V.Purification and some properties of immune protein P₄ from hemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae. Insect Biochem. 9 259—264.
- [3] Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G., 1980, Insect immunity.Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*.Eur.J. Biochem., 106, 7—16.
- [4] Powing, R.F., Davison, W.J., 1973, Studies on insect bacteriolytic enzymes. I. Lysozyme in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*.Comp.Biochem. Physiol., 45B, 669—686.
- [5] Powning, R.F., Davidson, W.J., 1976, Studies on insect bacteriolytic enzymes. II. Some physical and enzymic properties of lysozyme from hemolymph of *Galleria mellonella*. Comp.Biochem.Physiol., 55 B, 221—228.
- [6] 大森和则、肥山良之、菊地干雄, 1979, 无脊椎动物の生体防御机构。第3报, 死菌フクチン投与后蚕体液中に产生される抗菌物質の物性及び生物活性。日本细菌学杂志, 34(1)141。
- [7] 杉山孔宏、河合一吉、多田宜文、菊地干雄、山口淳二, 1980, 无脊椎动物が生体防御机构。第7报, 大肠杆菌フクチン投与によりカイコ体液中に产生される抗菌物質。日本细菌学杂志, 35, 286。

SOME INDUCIBLE ANTIBACTERIAL SUBSTANCES
DEVELOPED FROM THE HEMOLYMPH OF OAK
SILKWORM, *Antheraea pernyi*, PUPAE BY
INJECTING WITH *Escherichia coli*

Wong Ze-Kan

Wong Shao-Yi

(Department of Sericulture) (Department of Plant Protection)

ABSTRACT

Some inducible antibacterial substances were developed in the diapause pupae of oak silkworm, *Antheraea pernyi* after primary infection with *Escherichia coli*. The immunized hemolymph can kill and lyse some bacteria species, such as: *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*, *B. t.* subsp. *sotto*, *B. t.* subsp. *galleria*, *B. subtilis*, *B. megaterum*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Mirococcus vulgaris*, *M. lysodeikticus*, *Pseudomonas solanacearum*, and *Erwinia aroideae*.

After an injection of *E. coli* in the pupae, the phagocytes and fat body cells in the hemolymph increased in number rapidly. The observations with light microscope and scanning electron microscope showed that both of the two kinds of cells possessed the properties of adhesion and phagocytosis.

The electrophoresis of the immune hemolymph was carried out by using 7% polyacrylamide gel under pH 8.6, and found to localize bands of p7, p9 with antibacterial activity similar to those of some lysozymes.

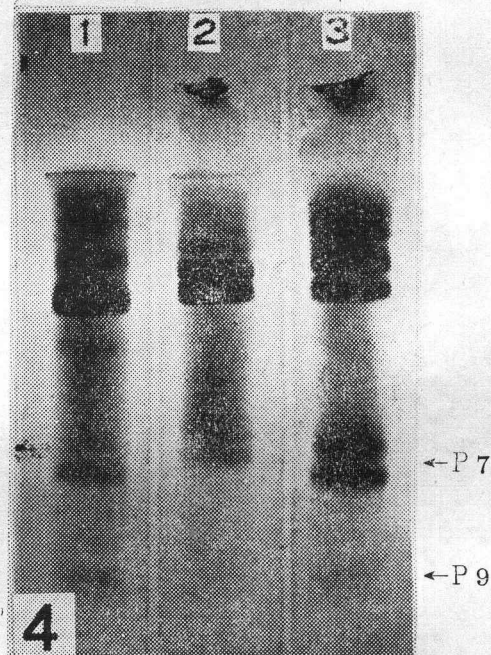
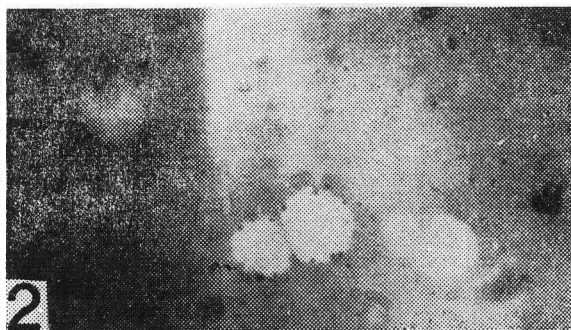
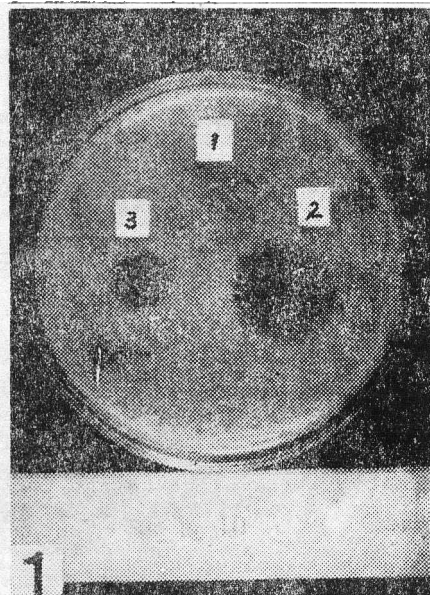


图1 柞蚕蛹免疫血淋巴的抑菌效应

注射大肠杆菌于滞育柞蚕蛹中,经7天后将免疫血淋巴沾于5mm ϕ 滤纸上,作抑菌试验。供试细菌为苏芸金杆菌阿莱亚种 *Bacillus thuringiensis* subsp. *a.esti* 30 $^{\circ}$ C,培养18小时的结果: 1.对照区血淋巴; 2.注射

5×10^6 活菌体免疫的血淋巴; 3.注射 5×10^5 活菌体免疫的血淋巴。(黄振邦同志协助拍摄)

图2 柞蚕蛹免疫血淋巴中游离脂肪体细胞吞噬大肠杆菌的现象

注射大肠杆菌后4天,血淋巴中游离脂肪体细胞粘附和吞噬大肠杆菌。Giemsa,染色。1200 $\times$ 。(梁承愈同志协助拍摄)

图3 柞蚕蛹免疫血淋巴中血细胞的吞噬现象。扫描电镜图示:血细胞中央的凹孔为吞噬大肠杆菌而形成的吞噬腔。10,000 $\times$ 。(孔宪扬同志协助拍摄)

图4 柞蚕蛹免疫血淋巴的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。7%分离胶,2—2.5mA,200Volt, pH8.6,电泳2小时, p7、p9是由于注射大肠杆菌而诱导形成的蛋白带。

1.注射 5×10^5 活菌体的免疫血淋巴电泳图谱; 2.对照区血淋巴; 3.注射 5×10^6 活菌体的免疫血淋巴图谱。(黄振邦同志协助拍摄)。