

柞蚕蛹抗菌物质的诱导源的研究*

周奇** 黄自然 卢蕴良

(蚕桑系)

祁国荣 屈贤铭

(中国科学院上海生物化学研究所)

提 要

本文进行了细菌、菌疫苗、某些化学物质、生理盐水及超声波等刺激诱导柞蚕, *Antheraea pernyi* 滞育蛹产生抗菌物质的试验。初步表明, 上述处理都能诱导柞蚕蛹产生一定数量的抗菌物质, 反映了柞蚕抗菌物质的诱导源是非特异性的。应用15%聚丙烯酰胺凝胶平板电泳, 分离和鉴定了血淋巴中诱导产生的三种抗菌蛋白, 分别是p5·p9D及p9E。诱导的蛹血淋巴经葡聚糖G—50柱层析可获得一个溶菌酶的组份。

昆虫免疫和防御机制的研究, 近年来有了很大的进展。曾以蜡螟, *Galleria mellonella*^[10]、天蚕, *Hyalophora cecropia*^{[8][9]}、柞蚕, *Antheraea pernyi*^{[3][4]}、蓖麻蚕, *Samia cynthia ricini*^[10]、家蚕, *Bombyx mori*^[6]及东亚飞蝗, *Locusta migratoria*^[10]等昆虫的幼虫或蛹作材料, 分别注射细菌、菌疫苗、生理盐水均能诱导血淋巴产生某些抗菌蛋白。它们具有较强的杀菌能力而且是广谱性的, 能杀死10种以上的革兰氏阴性或阳性的细菌^{[3][4][7]}。因此, 研究昆虫免疫或防御机制不仅在理论上具有重要意义, 在生物防治、蚕病的预防及抗病品种的选育等方面也有一定的指导作用。本试验着重探讨不同的诱导源对柞蚕滞育蛹血淋巴中抗菌物质的诱导作用。

材 料 及 方 法

(一) 材料

柞蚕滞育蛹。吉林二化性品种小黄皮; 广西一化性品种河三九; 河南一化性品种三三; 细菌。大肠杆菌, *Escherichia coli* 1·973; 大肠杆菌抗链霉素突变株, *E. coli* K—12 D31; 溶壁微球菌, *Micrococcus lysodeikticus* 1·634。

* 本文承华南农学院牧医系教授欧守杼及辽宁省蚕业研究所付所长李广泽审阅, 广西蚕业指导所、河南省蚕业试验场及吉林省蚕业研究所给予支持和帮助, 深表谢意。 ** 本院1982届研究生, 现于中国农业科学院蚕业研究所工作。

(二) 诱导源的制备

1. 3%福尔马林菌苗: 在液体培养基中接种大肠杆菌, 37°C培养24小时后, 加入一定量36%甲醛, 使成为3%福尔马林溶液。在4°C放置24小时, 离心(2500转/分) 15分钟。沉淀的菌体用0.9%氯化钠液洗涤, 离心, 反复3次。所得菌体经培养确认是死菌苗, 置冰箱中贮备用。

2. 紫外线照射菌苗: 按上法获得的大肠杆菌菌体, 置于培养皿内, 在无菌箱中用257.3nm、30瓦紫外线灭菌灯灭菌。距离40厘米, 时间8小时。经培养确认为死菌苗, 置冰箱中贮备用。

3. 大肠杆菌丙酮粉: 按上法获得的大肠杆菌菌体。当处于对数生长末期时离心收集, 每升培养基约得鲜菌体6克。取30克鲜菌体加入等量0.9%氯化钠液稀释, 再加入300毫升预冷的丙酮, 在冰浴中用SD-200型高速捣碎机(8,000~10,000转/分) 处理2分钟, 过滤, 沉淀物在真空干燥器中干燥, 所得的大肠杆菌丙酮粉置冰箱中贮备用。

4. 大肠杆菌核酸及脱氧核糖核酸: 以大肠杆菌丙酮粉中提取。参照Horchkiss的方法^[12]。

5. 其他诱导源均为国内的商品。

(三) 柞蚕蛹的诱导方法

1. 大肠杆菌诱导: 在琼脂培养基上生长24小时的大肠杆菌, 稀释在昆虫生理盐水(氯化钾40份; 氯化镁18份; 氯化钠4份; 氯化钙3份。均系0.15M水溶液)内, 每0.1毫升含大肠杆菌 6.5×10^8 , 每蛹注射50微升。以微量注射器自蛹体背部节间膜处注入。处理后的蛹置于25°C, 相对湿度60~80%条件下保护。

2. 3%福尔马林菌苗及紫外线照射菌苗的诱导方法同上。

3. 化学物质诱导: 一定量的大肠杆菌丙酮粉; 大肠杆菌核酸、脱氧核糖核酸, 鼠肝RNA, 酵母RNA, 三磷酸尿嘧啶核苷, 尿嘧啶核苷, 尿嘧啶; 牛血清白蛋白, L-亮氨酸, 生理盐水及葡聚糖粒子等, 除葡聚糖粒子在室温下用昆虫生理盐水浸泡24小时外, 余均用昆虫生理盐水配成一定浓度的溶液, 如上法注射和保护。

4. 超声波诱导: 用频率20千赫兹, 功率150瓦的超声波发生器处理柞蚕蛹。详见祁国荣等报道的方法^[1]。

(四) 抗菌活性的测定

1. 杀菌活性的测定: 用比浊法测定。以大肠杆菌作底物, 经0.15M磷酸盐缓冲液(pH 6.47)调整到570nm的光密度(E)为0.3~0.5, 加入1%体积的诱导蛹血淋巴; 对照区则加入相同体积的未经任何处理的滞育蛹血淋巴或磷酸盐缓冲液。在37°C水浴中培育30分钟, 取出后置冰浴中, 测定570nm光密度读数。一个单位的杀菌活性值U, 是指与对照区相比较在570nm的光密值减少50%为准。按Hultmark等^[9]的公式计算。

$$U_E = \sqrt[5]{\frac{A_0 - A}{A_0}}$$

A_0 为对照区570nm光密度读数; A 为处理区570nm光密度读数。

2. 溶菌活性的测定: 用同上的比浊法。以溶壁微球菌作底物。在37°C水浴中培育

5 分钟或适宜的时间。测定570nm光密度读数。溶菌活性单位 $U_m = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A_0}}$ 。符号同上。

(五) 聚丙烯酰胺凝胶平板电泳：按Hultmark等的方法〔9〕。以瑞典Pharmacia公司的平板电泳仪作电泳。每孔加入蛹血淋巴20微升(其中另加入10微升 1 M醋酸,10微升20%蔗糖)，在酸性条件下，200伏，电泳 2 小时。

(六) 葡聚糖G—50柱层析：参照常规方法进行。层析柱为100×2.5厘米，全部提纯过程在4℃下进行。

结 果

(一) 大肠杆菌、菌苗对柞蚕蛹的诱导作用

滞育的柞蚕蛹注射活的大肠杆菌或具有细胞结构而无生命活力的大肠杆菌菌苗，均能诱导血淋巴中产生抗菌物质。其活性列于表 1

表 1 大肠杆菌及菌苗诱导柞蚕蛹产生的抗菌物质的活性*

诱 导 源	杀 菌 活 性 ($U_E/\mu\text{l}$ 血淋巴)	溶 菌 活 性 ($U_m/\mu\text{l}$ 血淋巴)
大肠杆菌活菌体	0.55	1.07
3 %福尔马林菌苗	0.61	1.18
紫外线照射菌苗	0.38	0.92

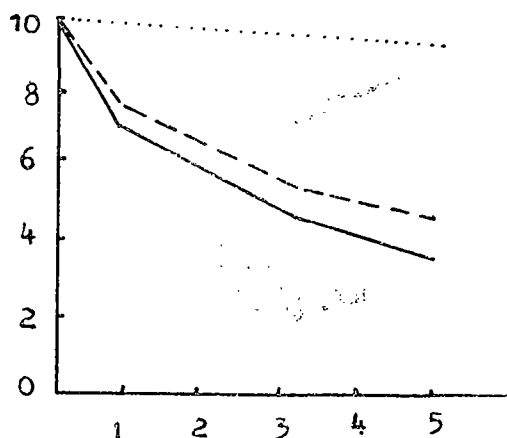
* 品种：小黄皮；注射剂量：50 μl /蛹；诱导时间：96小时；每处理重复 3 次。

(二) 化学物质对柞蚕蛹的诱导作用

滞育柞蚕蛹注射某些可溶性化学物质或不溶解的葡聚糖 G—50 粒子，甚至是昆虫生理盐水，都能诱导血淋巴产生一定数量的抗菌物质。其结果列于表 2。

(三) 超声波对柞蚕蛹的诱导

滞育柞蚕蛹经超声波处理后，由于声波能量的作用，同样能诱导产生抗菌物质。用比浊法测定其诱导后96小时的血淋巴中溶菌活性为0.91单位/ μl 血淋巴，即每分钟能溶解 0.8×10^5 个溶壁微球菌，接近于大肠杆菌活菌体诱导的溶菌活性水平。见图 1。



……对照区血淋巴；——，超声波诱导后96小时血淋巴；——，大肠杆菌注射诱导后96小时血淋巴
图 1 超声波诱导柞蚕蛹产生抗菌物质的活性

表2 化学物质、粒子诱导作蚕蛹产生抗菌物质的活性*

诱 导 源	剂 量 ($\mu\text{g}/50\text{ul}$)	诱导时间 (小 时)	杀菌活性 ($\text{UE}/\mu\text{l}/$)	溶菌活性 ($\text{Um}/\mu\text{l}/$)
大肠杆菌丙酮粉	1.5	68	0.23	0.90
大肠杆菌核酸	11.0	40	0.21	0.72
大肠杆菌脱氧核糖核酸	30.0	40	0.17	0.65
鼠肝RNA	125.0	48	0.17	1.56
酵母RNA	125.0	48	0.24	0.81
三磷酸尿苷 (UTP)	125.0	48	0.24	0.57
尿嘧啶核苷	125.0	48	0.30	0.60
尿嘧啶	125.0	48	0.24	0.40
牛血清清白蛋白	125.0	48	0.21	0.80
L-亮氨酸	125.0	48	0.28	0.66
昆虫生理盐水	/	48	0.12	0.38
葡聚糖G—50粒子	125.0	72	0.41	0.62

* 品种：●●小黄皮雌蛹；其余为三三品种。

(四) 柞蚕蛹血淋巴中诱导产生的抗菌物质的分离及鉴定

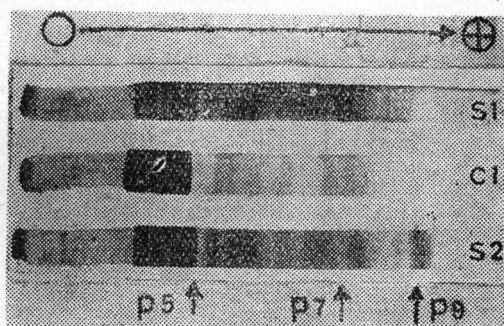
经诱导后的柞蚕蛹血淋巴用7.5%聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳后,用考马氏蓝R—250染色,发现诱导淋巴较对照区增加几条新的蛋白区带。见图2。与Boman等^[7]及黄自然等^[3]报道的结果相似。初步认为这些新增加的蛋白区带为p5、p7和p9。其中p7是溶菌酶, p9是抗菌蛋白, p5可能是前驱物。

进一步将大肠杆菌及超声波诱导的柞蚕蛹血淋巴作15%聚丙烯酰胺凝胶平板电泳,在酸性条件下分离到3种抗菌蛋白。见图3。图中的抑菌斑是显示对大肠杆菌抗链霉素突变株, E·coli K—12 D31的

抑菌效果。其中p9D最明显, p5次之, p9E最小。超声波诱导的抗菌蛋白与大肠杆菌诱导的基本相同。而对照区则不存在以上三种抗菌蛋白。

(五) 柞蚕蛹血淋巴中溶菌酶的分离

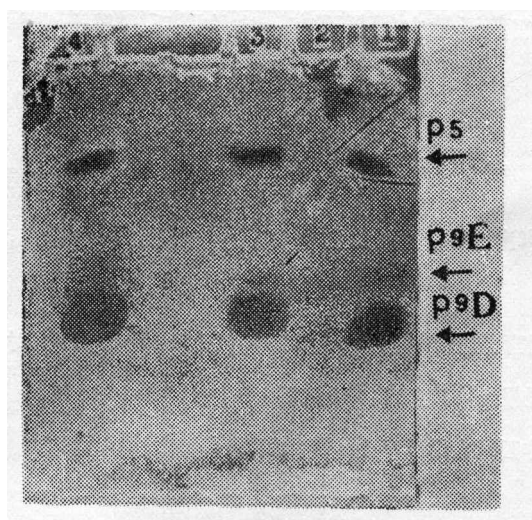
以葡聚糖G—50柱层析法进行。取10毫升经大肠杆菌诱导后的血淋巴,加入等量0.9%氯化钠溶液稀释,离心弃去沉淀作为样本。层析后,用含0.15M氯化钠的0.01M磷酸盐缓冲液(pH7.2)冲洗、收集洗脱液,经测定在130~160毫升的分部出现一个溶菌酶的活性峰。其溶菌活性与分部中的蛋白质含量相吻合。见图4。分离得到的溶菌酶粗品,测知其最适pH为5.7,最适反应温度为55℃。



S₁大肠杆菌注射诱导后48小时;

S₂大肠杆菌注射诱导后96小时; C₁对照

图2 柞蚕蛹血淋巴聚丙烯酰胺电泳图谱



1. 大肠杆菌诱导96小时； 2. 对照区
3. 超声波诱导后72小时； 4. 同上诱导后96小时；图中所示为对大肠杆菌的抑菌斑。
图3 柞蚕蛹血淋巴抗菌物质的分离和鉴定

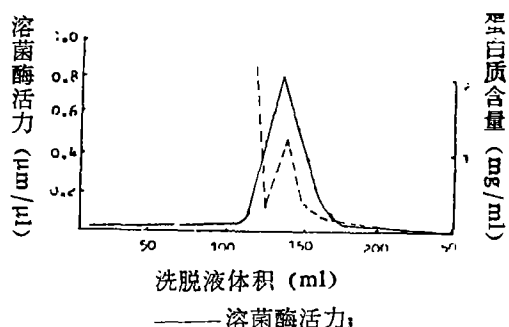


图4 葡聚糖G—50柱层析分离柞蚕蛹血淋巴中诱导产生的溶菌酶

讨 论

由于外源性的诱导物的作用，使昆虫产生一系列抗菌物质已经一再被证实^{〔5〕〔8〕}，但昆虫体内不存在专一的抗体、补体和备解素等体系，因而不同于脊椎动物的免疫体系^{〔8〕}。本试验初步证明柞蚕蛹的诱导源是非专一性的、广谱的。包括注射细菌，菌苗，某些化学物质，生理盐水及超声波均能诱导其血淋巴中产生抗菌物质。不同的诱导源诱导产生的抗菌物质的种类是基本一致的，但诱导的抗菌活性则有一定差异。如大肠杆菌菌苗达到了大肠杆菌活菌体的诱导水平，超声波处理亦接近大肠杆菌的水平。各种化学物质和生理盐水的诱导活性较低。联系到国内外报道放线菌素D和放线菌酮等转录和翻译抑制剂能阻歇细菌或超声波对天蚕蛹、蜡螟、家蚕及柞蚕蛹抗菌物质的形成这一事实（见大森等^{〔8〕}、Hultmark等^{〔9〕}、Hoffmann等^{〔10〕〔11〕}及祁国荣等^{〔12〕}）。我们认为昆虫的抗菌物质基因在正常滞育状态下可能封闭的，当遭受到各种异物的入侵或刺激后，基因被触发而启动、转录成mRNA，再翻译成抗菌蛋白以抵御外来的“侵犯”。各种不同的诱导源对柞蚕蛹的基因的诱导效应可能是不尽相同，因而合成的抗菌物质在数量上（活性上）有一定差异。由此看来柞蚕蛹体的抗菌物质诱导应答体系将是一种独特的低级的免疫体系。它的最大特点是缺乏特异性。昆虫的这种非特异性的免疫体系反映了生物进化过程中由低级向高级的演变历程。1982年钟文彪等^{〔2〕}应用聚肌胞核苷酸(Poly I:C)注射或添食于家蚕能诱导对家蚕细胞质多角体病毒的抑制作用。最近屈贤铭等（待发表材料）注射Poly I:C能诱导家蚕血淋巴产生一种新的抗菌活性物质，现正在分离提纯之中。Poly I:C能诱导家蚕产生抗病毒活性及抗细菌

菌活性的现象与本文的不同诱导源诱导的抗菌活性之间是否有一定的联系,是十分令人感兴趣的事情。

参 考 文 献

- [1] 祁国荣、周奇、屈贤铭、黄自然, 1983, 超声波诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质的研究, 《科学通报》, 28 (10): 622—624
- [2] 钟文彪、黄自然、卢蕴良、刘新垣, 1982, 聚肌胞核苷酸及 2', 5'-寡腺苷酸诱导家蚕对细胞质多角体病毒抑制作用的研究, 《科学通报》, 27(12):761—763
- [3] 黄自然、王少颐, 1981, 注射大肠杆菌诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质, 《华南农学院学报》, 2 (1): 65—68
- [4] 黄自然、周奇、卢蕴良、祁国荣, 1982, 注射大肠杆菌诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质的某些特性, 《蚕业科学》, 8 (4): 227—229
- [5] 琼斯, J.C., (蒋书楠译), 1977, 昆虫循环系统。上海科技出版社 (1981)。
- [6] 大森和则等, 1978, 无脊椎动物的生体防御机构, 第2报, 死菌疫苗注射与蚕体血淋巴中出现的抗菌活性物质, 《日本细菌学杂志》, 33 (1): 235
- [7] Boman, H. G., Hultmark, D., 1981, Cell-free immunity in insect. Trend in Biochemical Sciences, 6(11):306—9.
- [8] Boman, H. G., Steiner, H., 1981, Humoral immunity in *Cecropia* pupae. Current Topic in Microbiology and Immunology, 94/95: 75—89.
- [9] 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.
- [10] Hoffmann, D., 1980, Induction of antibacterial activity in the blood of the migratory locust, *Locusta migratoria* L., J. Insect Physiol., 26 (8): 539—50.
- [11] Hoffmann, D., Hultmark, D., Bomann, H. G., 1981, Insect immunity: *Galleria mellonella* and other *Lepidoptera* have cecropia-P9-like factors active against Gram negative bacteria. Insect Biochem., 11(5): 537—48.
- [12] Horchiss, R., 1937, Methods in Enzymology, 692.

STUDIES ON THE INDUCERS INDUCED ANTIBACTERIAL
SUBSTANCES FROM THE HAEMOLYMPH OF OAK
SILKWORM, *ANTHERAEA PERNYI* PUPAE

Zhou Qi Wong Zeran Lu Yunliang

(Department of Sericulture)

Qi Guorong Qu Xianming

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

In this experiment, the antibacterial substances were produced by inducing the diapausing pupae of oak silkworm, *Antheraea pernyi* by injecting with *Escherichia coli*, *E. coli* vaccine, some chemical substances, Sephadex G-50 particles and sterile salt solution or by ultrasonic waves treatment. This case indicated that the inducers were nonspecific and extensive for pupae producing antibacterial substances.

Three antibacterial substances were produced by inducing in the haemolymph of the pupae, and they have been isolated by using 15% polyacryamide gel electrophoresis. They are P5, P9D and P9E, judged from the graph of electrophoresis. A peak of lysozyme appeared on the Sephadex G-50 column chromatograph of induced haemolymph, there were no differences between that induced by ultrasonic treatment or by *E. coli* injection.