

大蜡螟抗菌物质的抑菌活性检测及其初步分离

赵晴¹, 李静¹, 陆秀君¹, 李瑞军¹, 董建臻¹, 谢成升^{1,2}

(¹河北农业大学植物保护学院, 河北保定 071001; ²山西省农科院小麦研究所, 山西临汾 041000)

摘要:以大蜡螟末龄幼虫为材料, 诱导后获得免疫血淋巴为抗菌粗提物, 并分为新鲜, 冷冻, 加热3种不同的处理, 进行了对2种常见细菌和16种植物病原真菌的抑菌活性检测, 并进行了Sephadex G-50凝胶过滤分离。结果表明, 大蜡螟抗菌物质对大肠杆菌没有明显的抑制作用, 而对金黄葡萄球菌抑制作用明显, 抑菌活性单位在10左右; 对10种植物病原真菌均有不同的抑菌活性, 其中对苹果树皮腐烂病菌的抑制率达到65%以上; 经过凝胶过滤分离, 及对分离组分的抑菌活性测定, 筛选出较合适的洗脱液为50 mM 乙酸铵, 各分离组分抑菌活性差异明显, 粗提物被分成了两个差异显著的部分。

关键词:大蜡螟; 抗菌物质; 抑菌活性检测; 凝胶过滤

中图分类号: S 476 文献标识码: A

Detection to Antimicrobial Activity and Prefractionation of Antimildew Agent from *Calleria mellonella*

Zhao Qing¹, Li Jing¹, Lu Xiujun¹, Li Ruijun¹, Dong Jianzhen¹, Xie Xiansheng^{1,2}

(¹College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding Hebei 071001;

²Wheat Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Linfen Shanxi 041000)

Abstract: In this study, the antimicrobial crude extract was obtained as immunizing hemolymph from the last stage larvae of *Calleria mellonella* after induction. With three disparate treatments, fresh, frozen and heated, the crudes was carried out detection to two common bacteria and 16 kinds of plant pathogenic fungi, and separation with Sephadex G-50 gel filtration. The results showed that the three disparate treated substances have no visible antibacterial effect to *E. coli*, but a obvious effect to *Staphylococcus aureus* with inhibition of about 10 bacteriostasis units; have dissimilar effects to 10 kinds of fungi among the total kinds, and have a good inhibitory effect to *Cytospora.coccodes* (Wallr.)Hughes with fungistasis rate above 65%. After the gel filtration and activity detection, 50 mM ammonium acetate was screened out as the more suitable eluents, the crudes were separated into strikingly unlike parts with obviously different antimicrobial activity.

Key words: *Calleria mellonella*, antimicrobial substance, antimicrobial activity, gel filtration

0 引言

昆虫是动物界中最大的生物类群, 它们对环境的高度适应性和防御机能与其体内高效的免疫系统密不可分。自1962年Stephen等发现大蜡螟(*Galleria mellonella* L.)幼虫血淋巴中具有一种杀绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的免疫因子起, 迄今为止, 已从昆虫中分离出如凝集素、溶菌酶、抗菌蛋白及抗菌肽等百余种抗菌物质。研究表明, 昆虫在微生物、化学物

质、不良环境条件等刺激下均可产生抗菌物质(主要成分为抗菌肽), 其活性因诱导方法和昆虫种类的不同存在很大差异^[1-6]。

试验以鳞翅目, 螟蛾科的大蜡螟(*C.mellonella* L.)为材料, 经针刺大肠杆菌法诱导, 直接收集血淋巴法提取抗菌物质, 对其进行抗细菌和植物病原真菌抑制效果的测定; 并初步探索了通过Sephadex G-50凝胶过滤对抗菌物质进行分离, 旨在为昆虫抗菌物质的进一步

基金项目: 河北省自然科学基金项目“高活性昆虫抗菌肽的筛选及其对植物致病菌抑菌活性研究”(C200700450)。

第一作者简介: 赵晴, 男, 1983年出生, 河北辛集人, 硕士研究生。通信地址: 071001 河北保定河北农大植保学院, Tel: 0312-7528179。

通讯作者: 董建臻, 男, 1959年出生, 河北博野人, 教授, 主要从事害虫生物防治和系统发育方面的研究, E-mail: djz116@sina.com。

收稿日期: 2009-03-09, 修回日期: 2009-04-28。

开发利用提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大蜡螟(*C. mellonella* L.) 由河北农业大学植物保护学院昆虫实验室饲养提供。

1.1.2 供试菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*):河北省疾病预防控制中心提供;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*):河北农业大学动科院提供。

植物病原真菌 16 种:黄瓜灰霉病菌(*Sclerotinia fuckeliana* Fuckel);玉米大斑病菌(*Helminthosporium turcicum*(pass.) Leonard&Suggs);小麦根腐病菌(*Cochliobolus sativus* Drechsl);玉米茎基腐病菌(*Pythium aphanidermatum* (Eds.)Fitzp);葱紫斑病菌(*Alternaria porri* Ciferri);白菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae* (Berk.)Sacc.);西瓜炭疽(*Colletotrichum orbiculare*);苹果树皮腐烂病菌(*Cytospora coccodes* (Wallr.)Hughes);苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola* Nose);辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici* (Syd.) Bulter);番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers.);梨黑斑病菌(*Alternaria kikuchiana* Tanaka);苹果黑斑病菌(*Alternaria alternata*);芦笋拟茎点病菌(*Phomopsis asparagi*(Sacc.)Bubak);立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*);小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Schw.)来源于河北农业大学植物病害流行与综合防治实验室。

1.2 方法

1.2.1 抗菌物质的诱导 将大肠杆菌的菌液放入LB液体培养基中(1%)放在摇床上过夜(37℃ 200~230 r/min),使其处于对数期。血球计数板镜检,配制 1.0×10^8 大肠杆菌菌液。取饲养至末龄的大蜡螟幼虫,用3号昆虫针沾取大肠杆菌细菌液针刺虫体腹部,继续培养24 h。

1.2.2 免疫血淋巴制备 挑取诱导后存活的幼虫,以3号昆虫针轻刺幼虫腹部,将血淋巴收集在盛有200 μl超纯水的灭菌的1.5 ml离心管中,该超纯水中含有30 μg/ml的PMSF(苯甲基磺酰氟),20 μg/ml的PTU(苯基硫脲)^[7],备用。

1.2.3 抗菌物质提取及样品处理 将上述抗菌提取物加超纯水1:1稀释后,分3种方式进行处理:12 000 r/min 4℃离心10 min,取上清作为提取物样品,为处理A;置于-20℃冰箱中冷冻后,取出冰上化冻,12 000 r/min 4℃离心10 min,取上清作为冷冻的样品,为处理B;100℃沸水浴1 min,12 000 r/min 4℃离心10 min,取上清作为加热后的提取物样品,为处理C。

1.2.4 抗细菌活性的检测 采用琼脂孔穴扩散法^[8]:将

化好的LB固体培养基晾至50℃左右,加入500 μl已摇好的细菌菌液,倒皿,每皿约12.5 ml。加菌培养基凝固后,在培养基上打孔,直径为0.5 cm,孔中加样20 μl。以洗脱液为阴性对照,10 μl 0.1万单位链霉素为阳性对照。在37℃生化培养箱中培养12 h后,测量抑菌圈直径。

抑菌活性单位=[抑菌圈直径(mm)-5]×10^[9]

1.2.5 抗植物病原真菌活性的检测 采用菌碟法^[10]:在PDA培养基中央放置滤纸片(直径为0.5 cm,4~6层)。滤纸片四周接病原菌菌饼,菌饼距滤纸片1 cm左右。滤纸片中加入20 μl样品,以洗脱缓冲液为对照。在26℃生化培养箱中培养后测量抑菌率。

抑菌率=(外侧菌丝生长半径-内侧菌丝生长半径)/外侧菌丝生长半径×100%

1.2.6 抗菌物质初步分离 采用1×40(φ×L, cm)的凝胶柱, Sephadex G-50凝胶。上样量450 μl,洗脱液流速0.4 ml/min。

3种洗脱缓冲液:灭菌蒸馏水^[11], 0.0175 mM、pH6.7PBS^[12], 50 mM乙酸铵^[13]。根据分离效果,筛选出最适合凝胶过滤的洗脱缓冲液,并通过各分离组分的抑菌效果,检测分离效果。

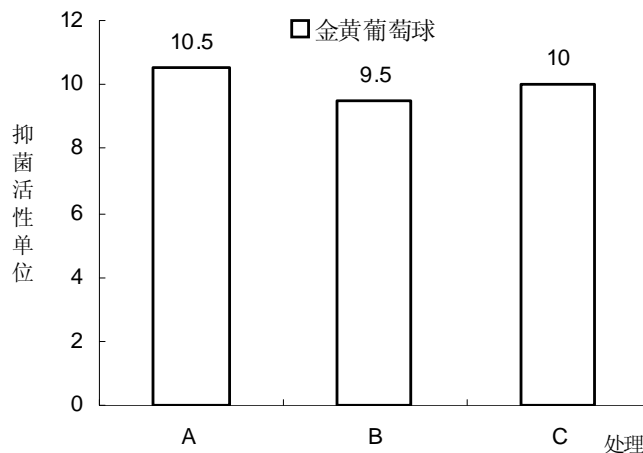


图1 3种处理的粗提取物对细菌的抑制效果

2 结果与分析

2.1 抑细菌活性检测

检测结果表明,抗菌提取物对大肠杆菌没有的抑菌作用,而对金黄色葡萄球菌有明显的抑菌作用(图1)。由图1可见,3种不同处理的粗提取物对金黄色葡萄球菌的均有较强的抑菌活力,处理A、处理B和处理C的抑菌单位分别为10.5、9.5、10,显示出大蜡螟抗菌物质对高温和冰冻有较高的抗性。

2.2 抑植物病原真菌活性检测

如表1所示,大蜡螟抗菌提取物对16种植物病原

真菌中的10种均具有抑菌活性,其中对苹果树皮腐烂病菌的效果最好,抑菌率达65.1%以上;对芦笋拟茎点、小麦根腐、黄瓜灰霉及苹果轮纹病菌的抑制率达40%以上;对玉米大斑、辣椒炭疽、西瓜炭疽、苹果黑斑及白菜黑斑病菌抑制率在21.5%~36.0%之间;对梨黑

斑、番茄灰霉、玉米茎基腐烂、葱紫斑、立枯丝核菌及小麦赤霉病菌抑制率为10%以下。抗菌提取物3种处理对同一种供试菌的抑菌活力表现一致,处理间差异不明显,说明加热和冰冻处理对大蜡螟抗菌物质抑制植物病原真菌活性没有影响。

表1 大蜡螟抗菌提取物对16种供试植物病原真菌抑菌活性(平均值±SE)

供试菌	平均抑菌率/%			抑菌活性
	A	B	C	
苹果树皮腐烂(<i>C. coccoodes</i>)	65.5±0.025a	65.1±0.025a	66.9±0.021a	++++
芦笋拟茎点(<i>P. asparagi</i>)	52.0±0.000b	51.7±0.027b	52.5±0.030b	+++
黄瓜灰霉(<i>B. cinerea</i>)	45.5±0.045b	45.7±0.072b	45.9±0.045b	+++
小麦根腐(<i>C. sativus</i>)	44.5±0.020b	44.4±0.020b	45.0±0.020b	+++
苹果轮纹(<i>M. Kawatsukai</i>)	44.5±0.015bc	44.3±0.015bc	44.5±0.015bc	+++
玉米大斑(<i>E. turcicum</i>)	34.5±0.035cd	34.5±0.035cd	34.5±0.035cd	++
辣椒炭疽(<i>C. capsici</i>)	36.0±0.035d	36.4±0.035d	36.2±0.035d	++
西瓜炭疽(<i>C. orbiculare</i>)	28.5±0.030d	28.0±0.030d	28.3±0.030d	++
苹果黑斑(<i>A. alternata</i>)	27.0±0.020de	26.9±0.021de	27.7±0.034de	++
白菜黑斑(<i>A. brassicae</i>)	21.5±0.010de	21.1±0.010de	21.1±0.010de	++
梨黑斑(<i>A. kikuchiana</i> Tanaka)	9.2±0.021e	9.5±0.021e	9.1±0.021e	-
番茄灰霉(<i>B. cinerea</i> Pers.)	9.0±0.016e	9.1±0.016e	9.3±0.016e	-
玉米茎基腐(<i>P. aphanidermatum</i> (Eds.))	5.7±0.023f	5.6±0.023f	5.7±0.023f	-
葱紫斑病菌(<i>A. porri</i> Ciferri)	3.2±0.035f	2.9±0.014f	3.2±0.033f	-
立枯丝核菌(<i>R. solani</i>)	0	0	0	-
小麦赤霉病菌(<i>F. graminearum</i> Schw.)	0	0	0	-

注:同一列数据后的字母不同表示差异显著($P<0.5$),-为10%以下,+为10%~20%,++为20.0%~40.0%,+++为40.0%~60.0%;++++为60.0%~80.0%

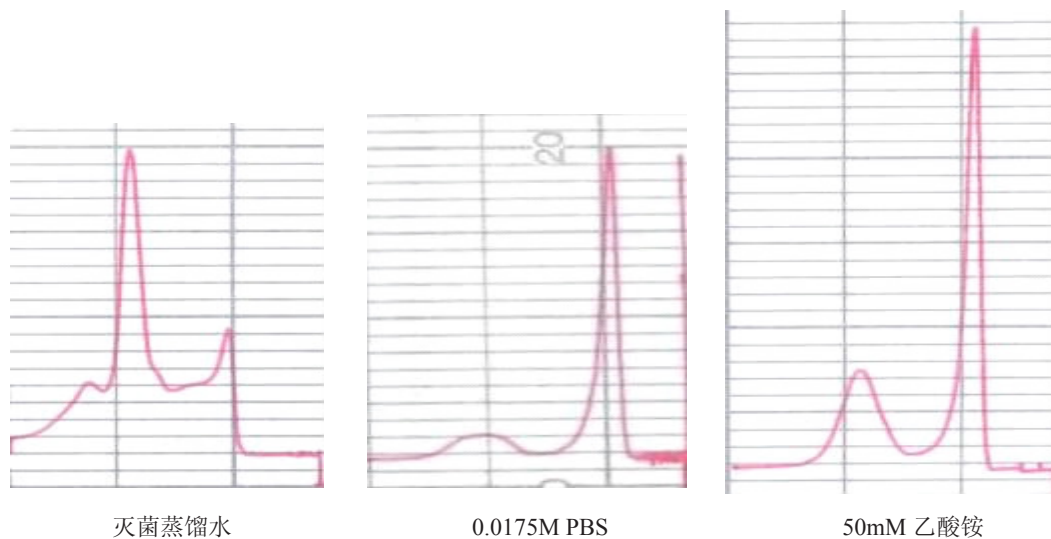


图2 凝胶过滤的不同洗脱液的分离效果

2.3 不同洗脱液对凝胶过滤分离效果的影响

如图2所示,由3个波形图可以看出,以灭菌蒸馏水作为洗脱缓冲液,各吸收峰峰形不整齐;以0.0175 M 磷酸盐缓冲液作为洗脱缓冲液,第2个吸收峰

峰形比较低矮,而且拖尾现象严重;以50 mM 乙酸铵作为洗脱缓冲液,波形图上两个吸收峰峰形比较整齐,分离完全,第2个吸收峰没有太多的拖尾现象。由此可见,50 mM 乙酸铵对凝胶过滤分离的影响较小,适

合作为大蜡螟抗菌物质分离的洗脱缓冲液。

2.4 50 mM 乙酸铵 Sephadex G-50 分离效果检测

以 50 mM 乙酸铵为洗脱液对大蜡螟 3 种处理抗菌提取物样品的进行凝胶过滤,结果如图 3 所示,处理 A、B 经过 50 mM 乙酸铵洗脱后,波形图均为 2 个吸收

峰,峰形整齐,2 个吸收峰没有交叉,分离完全;处理的 C 因加热离心后除去了部分杂蛋白,导致吸收峰 I 吸光度值变小,使其峰高度降低,但仍表现峰形整齐,分离完全。因此,50 mM 乙酸铵适合于大蜡螟抗菌提取物样品分离。

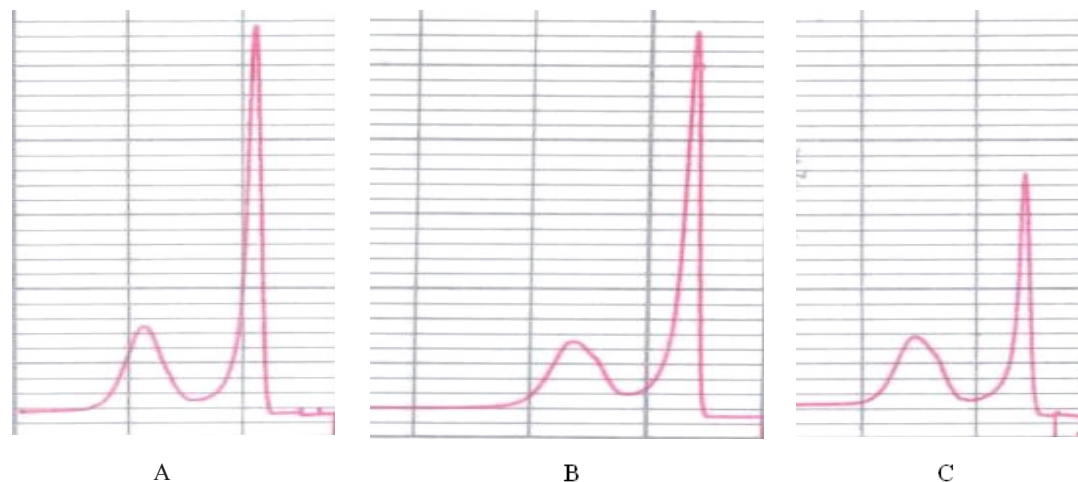


图 3 50 mM 乙酸铵 Sephadex G-50 凝胶过滤分离 A、B、C 的效果图

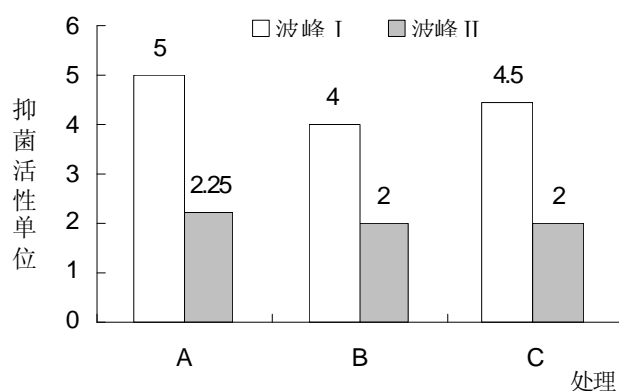


图 4 大蜡螟抗菌提取物各分离组分抑制金黄色葡萄球菌效果

表 2 大蜡螟抗菌提取物各分离组分对苹果树皮腐烂菌的平均抑菌率(平均值±SE)

	A	B	C
波峰 I	47.75%±0.0122 bc	47.08%±0.0105 c	45.79%±0.0438 c
波峰 II	49.73%±0.0467 b	50.75%±0.0282 b	51.75%±0.0282 b

2.5 分离各组分抑细菌活性检测

收集每种样品的吸收峰 I 和吸收峰 II,进行抑细菌活性的测试,结果如图 4 所示,各分离组分对大肠杆菌没有明显的抑制作用;而对金黄色葡萄球菌具有一定的抑制效果。3 种处理分离各组分的波峰 I 和波峰 II 的对金黄色葡萄球菌抑菌单位分别为 4~5 和 2~2.25,两者差异显著,说明不同处理的提取物,被分成了两个不同的部分,对金黄色葡萄球菌具有较显著抑制作用的部分主要集中在波峰 I。

2.6 分离各组分对苹果树皮腐烂病菌抑菌活性的检测

对分离各组分进行苹果树皮腐烂病菌抑菌活性检测结果如表 2,由表 2 可见,经凝胶过滤所分离到各组分的波峰 I、波峰 II,对苹果树皮腐烂病菌均具有较高的活性,其抑菌率分别为 45.79%~47.75% 和 49.73%~51.75%。说明经过 50 mM 乙酸铵的分离出的波峰 I 和波峰 II 保留了高活性的抑菌成分。

3 结论

综合上述结果可见,大蜡螟幼虫抗菌物质提取物对大肠杆菌没有的抑制作用,对金黄色葡萄球菌抑制作用明显;对 16 种植物病原真菌中的 10 种均具有抑菌活性,其中对苹果树皮腐烂病菌的效果最好,抑菌率达 65.1% 以上;50 mM 乙酸铵最适于进行分离大蜡螟抗菌物质。以 50 mM 乙酸铵为洗脱缓冲液进行 Sephadex G-50 凝胶过滤,可以较好的分离大蜡螟抗菌物质,所分离组分具有高活性的抑菌活性。

迄今为止,已从昆虫中分离出如凝集素、溶菌酶及抗菌肽等多种抗菌物质。已有试验表明抗菌肽具有比较高的抗逆性。此研究对大蜡螟免疫血淋巴进行了加热、冷冻处理,处理后的抗菌物质仍具有很高的抑菌活性,表明经诱导后的昆虫体内抗菌物质主要成分为抗菌肽类。后续工作应对所分离组分进行定性研究。

参考文献

- [1] 梁士德,张士瑾.抗菌肽和抗菌肽基因[J].海洋科学,1994(6):30-31.
- [2] 赵瑞君,刘成芳,董建臻,等.家蝇抗菌肽的诱导提取[J].热带医学杂

- 志,2005,5(2):193-194.
- [3] 韩润林,孙庆林,额尔敦夫,等.黄粉虫幼虫中抗菌肽的诱导及抑菌活性的初步研究[J].内蒙古农牧学院学报,1998,19(3):114-117.
- [4] 蓝江林,吴珍泉.美洲大蠊抗菌物质的诱导和提取[J].福建农林大学学报,2004,33(1):30-33.
- [5] 黄文,王芙蓉,刘彬,等.黄粉甲幼虫抗菌物质的诱导及其抗菌活性[J].昆虫学报,2005,(8):7-12.
- [6] 周义文.家蝇抗菌肽分离纯化抗菌活性及分子结构研究[D].重庆:重庆医科大学,2004.
- [7] 刘建涛,苏志坚,王方海,等.斜纹夜蛾抗菌物质的诱导及其理化特性[J].中国生物防治,2006,22(3):211-215.
- [8] 黄蓬亮,赵亚华,许少鹏.人 β 防御素4在大肠杆菌中可溶性表达及其生物活性的鉴定[J].生命科学研究,2005,(02),129-133.
- [9] 刘红珍.兔肠源抗菌蛋白的分离纯化及其生物活性研究[D].泰安:山东农业大学,2007.
- [10] 索相敏.三种昆虫抗菌物质的诱导及抑菌活性研究[D].保定:河北农业大学,2006.
- [11] 渠晖,郝友进,荆迎军,等.家蝇幼虫体内一种抗菌蛋白的分离纯化[J].中国生物工程杂志,2007,27(9):74-80.
- [12] 韩立军.蚯蚓组织提取物的抗菌、抗肿瘤及免疫增强活性研究[D].保定:河北农业大学,2007.
- [13] 安春菊,李德森,赵素然,等.凝胶过滤层析参数对家蝇蛋白粗提液分离效果的影响[J].昆虫学报,2005,48(1):139-142.