

野生 Bc 菌株产黑色素的研究*

张建萍 蔡峻 邓音乐 陈月华** 任改新

(南开大学生命科学学院微生物学系 天津市微生物功能基因组学重点实验室 天津 300071)

摘要: Bc58 是一株野生蜡状芽孢杆菌菌株, 经 L-酪氨酸诱导后可产生红棕色色素。通过红外光谱及各种化学测定证明该色素与 Sigma 公司标准黑色素 (Melanin) 的性质相似。生测结果显示添加 Bc58 黑色素的 Bt 制剂经紫外照射 5 h 后的 LC_{50} 为 $16.1 \mu\text{g}/\text{mL}$, 与未经紫外照射的 Bt 制剂的 LC_{50} $15.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 基本相同, 而比未添加黑色素的 Bt 制剂经紫外照射后的杀虫毒力高出近 1 倍。经 SDS-PAGE 检测表明该黑色素可保护苏云金杆菌晶体蛋白在紫外光下基本不降解, 表明 Bc58 黑色素是一种优良的紫外保护剂。

关键词: 蜡状芽孢杆菌, 黑色素, 紫外保护

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0042-04

Characterization of Melanin Produced by a Wild-type Strain of *Bacillus cereus**

ZHANG Jian-Ping CAI Jun DENG Yin-Yue CHEN Yue-Hua** REN Gai-Xin

(Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, Tianjin 300071)

Abstract: Bc58 is a UV resistant wild type strain that has an ability to produce a sorrel pigment induced by L-tyrosine. The FT-IR spectra and chemical tests of its pigment are similar to that of the standard melanin (Sigma). By bioassay shows that the LC_{50} of a Bt formulation added with the melanin of Bc58 and exposed to UV for 5 h is $16.1 \mu\text{g}/\text{mL}$, which is similar to that of Bt formulation without treated with UV, however, it is almost double higher than that of Bt formulation exposed to UV without the melanin of Bc58. The result of SDS-PAGE indicates that the melanin of Bc58 can protect the insecticidal crystal proteins from degradation. It suggests that an excellent UV protective agent to the insecticidal crystal proteins of Bt formulation.

Key words: *Bacillus cereus*, Melanin, UV protection

黑色素是广泛存在于动物、植物和微生物中的一种棕色到黑色的色素。这种色素并非对生物的生长和发育必不可少, 但却能够提高生物的生存和竞争能力^[1]。研究表明黑色素是一种结构较为复杂的酚类聚合物, 它是生物体为抵抗紫外线和电离辐射等因素的伤害, 逐渐进化而成的, 可以被看成是生物体用来保护自己的一道屏障^[2]。

黑色素的应用潜力巨大, 在抗紫外线和清除自由基方面报道很多。已有研究证明了链霉菌所产黑色素对苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 简称 Bt) 以色列亚种杀虫活性的光保护作用。国外学者对 Bt 库斯塔克亚种进行连续的紫外诱变, 得到了能产黑色素的 Bt 突变株^[3]。目前已经报道了多种微生物可产生黑色素, Aronson 曾报道一株产类似黑色素的蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* 简称 Bc), 但没有对色素进行研究^[4]。

* 天津市自然科学基金资助项目 (No. 05YFJMJC00900)
南开大学南开创新基金资助项目

** 通讯作者 E-mail: yhchen@nankai.edu.cn

收稿日期: 2005-03-31, 修回日期: 2005-08-15

某些 Bc 可作为菌肥而广泛用于农业生产, 被称为增产菌。由于 Bc 和 Bt 亲缘关系很近, 因此将 Bt 的 *cry* 基因导入 Bc 并表达杀虫晶体蛋白在一些文献中已有报道^[5,6]。本文首次对蜡状芽孢杆菌 Bc58 野生菌株所产黑色素进行了鉴定, 同时研究了其对杀虫晶体蛋白的紫外保护作用, 作为进一步构建多功能 Bc 菌株的研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基和试虫

27 株蜡状芽孢杆菌, 分别编号为 Bc 46 ~ 49、51 ~ 55、58、59、61、63、67、69、71 ~ 73、77 ~ 79、89、9509、9633、63303-3、63304、63304-2。Bt15A3 为苏云金芽孢杆菌科默尔亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*)。所有菌种均为本实验室保藏。供试虫为初孵棉铃虫。

酪素培养基: 蛋白胨 10g, 葡萄糖 1g, NaCl 5g, 酪素 4g, CaCl₂ 0.1g, L-酪氨酸 1g, 蒸馏水定容至 1,000mL, pH 7.2, 固体培养基加 15g 琼脂。LB 培养基按常规方法配制。

1.2 筛选产黑色素的 Bc 菌株

将 27 株保藏的 Bc 菌株划线接种于酪素固体培养基上, 30℃ 培养观察黑色素的产生。

1.3 黑色素粗品的制备方法

收集酪素培养基中的细菌培养物, 6,000 r/min 离心 15 min。取上清, 用 10mol/L NaOH 调 pH 至 13.0, 再用 5 mol/L HCl 调 pH 至 2.0, 12,000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用 10mol/L NaOH 溶解, 加 1/5 体积氯仿混匀, 12,000 r/min 离心 10 min, 上清用 5 mol/L HCl 调 pH 至 2.0, 12,000 r/min 离心 10 min, 用 1/10 体积的无水甲醇洗沉淀, 最后用 70% 乙醇洗一次后风干, 得到黑色素粗品。

1.4 黑色素的特性鉴定

将黑色素样品与 KBr 按 1:3 混合制片。测量红外吸收光谱 (4,000 ~ 500 cm⁻¹)。同时将 Sigma 公司的标准黑色素作为对照。

将 0.1 mg/mL 的样品和标准黑色素溶液分别与 30% 的 H₂O₂ 和 NaClO 溶液按 1:1 混合。观察溶液颜色的变化。向黑色素溶液中加入 FeCl₃ 溶液, 观察反应现象。

1.5 黑色素对 Bt 制剂紫外保护的生物测定

首先制备浓度为 1 g/mL 的 Bt 原粉稀释液, 按 1:9 分别与 Bc 58 发酵上清液 (含黑色素) 和生测缓冲液混合, 置于 254 nm 紫外灯下 30 cm 处照射 5 h。同时, 取 Bt 制剂稀释液 (0.1 g/mL) 和 Bc58 发酵上清液作为对照, 同时进行生物测定^[7]。

1.6 Bt 晶体蛋白的制备

按本室常规方法制备 Bt15A3 菌株的晶体蛋白, -70℃ 保存备用。

1.7 黑色素对晶体蛋白紫外保护作用的 SDS-PAGE 检测

取制备好的 Bt15A3 晶体蛋白两份, 分别加等体积的 Bc58 黑色素溶液和生测缓冲液置于 254 nm 紫外灯下 30 cm 处照射 5 h 后, 按常规法进行 SDS-PAGE 检测。同时用未照射的晶体蛋白作对照。

2 实验结果

2.1 产黑色素的 Bc 菌株

27 株 Bc 菌株中共有 4 株菌在培养 24 ~ 72 h 内产生色素，分别是 Bc 48、55、58 和 69。其中 Bc58 产色素最深，为红棕色色素。Bc58 和 48 均在培养 24h 内产生色素，Bc55 培养 36h 后产生色素，Bc69 色素则在 60h 左右产生。

2.2 黑色素的特性

Bc58 胞外分泌的色素为红棕色，难溶于水，也不溶于一般的酸和有机溶剂如盐酸、醋酸、乙醚、乙醇、氯仿等。化学反应分析证明，该色素易溶于碱性溶液如 NaOH、Na₂CO₃ 溶液中。它与强氧化剂如 NaClO 和 H₂O₂ 发生氧化反应而褪色，在色素溶液中加入 FeCl₃ 会生成红棕色沉淀，这些化学反应与标准黑色素相同。另外黑色素的红外图谱因为 -OH 和 -NH₂ 会在 3,000 nm (3,333 cm⁻¹) 附近处有一吸收峰，羰基的聚集会使其在 6,000 nm (1,667 cm⁻¹) 附近处有一吸收峰 (图 1)。由图 1 可见：Sigma 公司标准黑色素的这两个标志峰分别位于 3,405 cm⁻¹ 和 1,625 cm⁻¹ 处，Bc58 色素的这两个标志吸收峰分别位于 3,439 cm⁻¹ 和 1,634 cm⁻¹ 处，证明该色素与标准黑色素红外图谱极为相似。但是由于 Bc58 色素仅为粗品未经进一步分离纯化，使其红外图谱中出现几个杂峰。

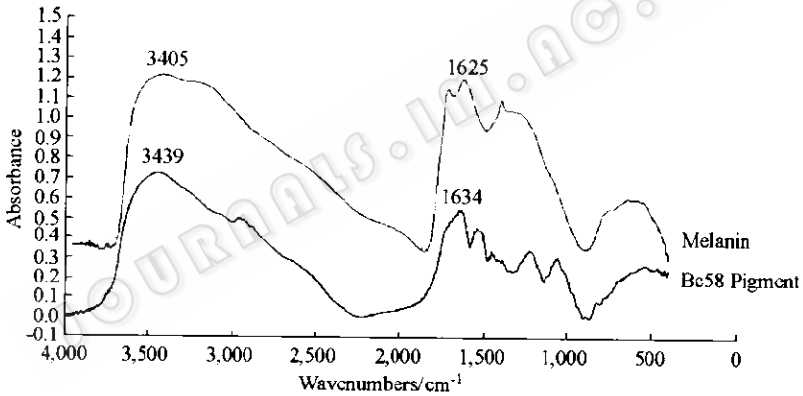


图 1 Bc58 黑色素和标准黑色素的红外吸收谱图

2.3 黑色素对 Bt 制剂杀虫活性的紫外保护

Bc58 黑色素本身对棉铃虫无毒力，添加 Bc58 黑色素的 Bt 制剂经紫外照射 5 h 后的半致死浓度 (LC₅₀) 为 16.1 μg/mL，与未经紫外照射的 Bt 原粉的 LC₅₀ 15.2 μg/mL 基本相同，比未添加黑色素的 Bt 制剂经紫外照射后的杀虫毒力高出近 1 倍 (见表 1)。由此可见 Bc58 黑色素对 Bt 制剂是一种很好的紫外保护剂。

表 1 添加和不添加 Bc58 黑色素的 Bt 制剂经紫外照射 5h 后对棉铃虫的半致死剂量*

样品	LC ₅₀ (μg/mL)	r
Bc58 黑色素	无毒力	-
Bt 制剂原粉	15.2 ± 2.6	0.9939 ± 0.0031
Bt 制剂原粉 uv 照射 5 h	32.7 ± 6.4	0.9851 ± 0.0080
Bt 制剂原粉 + Bc58 黑色素 uv 照射 5 h	16.1 ± 2.3	0.9787 ± 0.0141

* 表中数据为 $\bar{X} \pm S.E.$ ，是 4 次生物测定的统计结果

2.4 Bc58 黑色素对晶体蛋白的紫外保护作用的 SDS-PAGE 检测

由图 2 SDS-PAGE 检测结果显示, 添加黑色素的晶体蛋白经紫外光照射后, 与未照射的蛋白相比, 虽然各种蛋白均被少量降解, 但仍保存有大量的 130kD 的原毒素蛋白; 而未加黑色素的晶体蛋白经紫外照射后, 绝大多数的蛋白均受到不同程度的降解, 但其中分子量最大、起主要杀虫作用的 130 kD 的原毒素蛋白降解最为明显。结果证明 Bc58 黑色素对杀虫晶体蛋白确有明显的紫外保护作用。

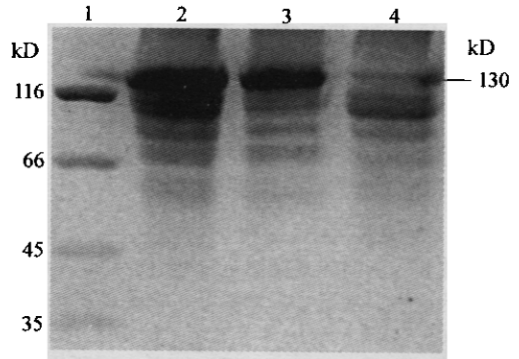


图 2 晶体蛋白经紫外照射 5 h 后的 SDS-PAGE 检测

1 蛋白分子量 Marker, 2 未经照射的晶体蛋白对照, 3 加黑色素照射的晶体蛋白, 4 未加黑色素照射的晶体蛋白

3 讨论

苏云金芽孢杆菌制剂在田间使用时, 紫外线和电离辐射使杀虫晶体蛋白降低或丧失毒力。这些辐射可以使细胞中水和其他物质电离, 形成活性氧, 其中最重要的就是羟自由基^[8]。羟自由基可以和细胞里的大分子物质如杀虫晶体蛋白反应而使其失活。Grossweiner^[9]发现, 经过日光照射后, Bt 晶体蛋白中有大约 20% 左右的组氨酸遭到破坏, 而组氨酸和色氨酸是组成晶体蛋白核心结构的主要成分, 核心结构发生改变, 则影响晶体蛋白与靶昆虫中肠受体的结合, 使杀虫活性降低。本研究利用 SDS-PAGE 方法, 发现添加 Bc58 黑色素的 Bt 晶体蛋白经紫外照射后, 130 kD 原毒素带与未经照射的原毒素带基本相同, 而未加黑色素的样品照射后原毒素带降解最明显。推测由于该蛋白分子量最大且数量最多, 可能最易受到紫外线的攻击。确切的原因有待进一步探索。

对于解决 Bt 杀虫剂的野外失活问题, 国外学者提出的使用紫外吸收剂的方法, 确实有很好的保护作用, 但是这些紫外吸收剂均为化学物质, 对环境有一定的负作用。而构建多功能工程菌株是另一条途径。Bc 被许多学者认为就是不产晶体的 Bt, 亲缘关系很近。本实验室将带有 Bt *cry* 基因的质粒 pHT-1C 转化一株增产蜡状芽孢杆菌 Bc9509, 并表达出大量的 Bt 晶体蛋白, 从而使 Bc 获得杀甜菜夜蛾的活性^[6]。因此 Bc 可以作为表达 Bt *cry* 基因的良好受体。本室前期研究发现, Bc58 不产肠毒素和溶血素, 对哺乳动物是安全的, 因而非常适合作为构建多功能工程菌株的受体。

参考文献

- [1] Alois A, Michael H W. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24: 411 ~ 451.
- [2] Sama T, Menon I A, Sealy R C. Photochemistry and Photobiology, 1984, 39: 805 ~ 809.
- [3] Deepak S, Eitan B D, Robert M. Current Microbiology, 2002, 44: 25 ~ 30.
- [4] Aronson J N, Wermus G R. Journal of Bacteriology, 1965, 90: 38 ~ 46.
- [5] 孙良武, 梁平彦, 田颖川, 等. 生物工程学报, 1994, 10 (1): 1 ~ 6.
- [6] 陈月华, 李红秀, 王津红, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (1): 65 ~ 68.
- [7] 钟连胜, 谢天健, 吴继星, 等. 生物防治通, 1990, 增刊: 1 ~ 5.
- [8] 王文军, 钱传范, 申继忠, 等. 微生物学报, 1999, 39 (5): 469 ~ 474.
- [9] Grossweiner L. Current Topics in Radiation Research Quarterly, 1976, 11: 141 ~ 199.