

苏芸金杆菌以色列变种 δ -内毒素的分离和鉴定

陈俊标 李武军

(中国科学院上海植物生理研究所分子遗传室)

刘金发 韩罗珍 刘维德

(中国科学院上海昆虫研究所毒理室)

苏芸金杆菌是革兰氏阳性细菌中比较有经济价值的菌株,因为它能产生一种组成为蛋白质的 δ -内毒素。该毒素蛋白对多种鳞翅目昆虫^[1]和某些双翅目昆虫^[2,3]具有明显的毒效,因此目前已成功地发展为商业杀虫剂而大量生产。苏芸金杆菌根据鞭毛蛋白抗原可以分成16种血清型,其中6种尚有亚型,所以共有22种血清型。不同血清型的菌株所产生的 δ -内毒素对不同种昆虫的毒效有显著的区别。其中以以色列变种即 H₁₄-血清型菌株系1977年从以色列土壤中分离获得,它所产生的 δ -内毒素对蚊幼虫具有很强的毒性。蚊幼虫摄入 δ -内毒素后引起中肠麻痹后肠壁破裂而死亡。由于该毒素蛋白存在于伴孢晶体中又是碱溶性蛋白,故分离纯化比较困难。我们现在报道应用等电聚焦凝胶电泳方法分离 δ -内毒素,过程比较简易,并用生物检定,凝胶电泳和免疫学方法鉴定 δ -内毒素的存在。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和培养条件

苏芸金杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) 1897 菌株系由广州中山大学昆虫研究所供给。

细菌在含酵母浸出膏1%,葡萄糖0.1%,硫酸铵0.3%和磷酸氢二钾0.2%的液体培养基上,在28℃振荡培养48小时后在4,000rpm

离心20分钟获得菌体待用。

(二) 等电聚焦凝胶电泳

在4%聚丙烯酰胺凝胶中含pH范围为4—6的两性离子载体1.6%,含pH3.5—10.0的两性离子载体0.4%,阳极放置1M磷酸溶液,阴极放置1M氢氧化钠溶液,在恒功率为6的条件下聚焦6小时,然后用0.5%考马斯亮蓝染色,在37℃染色6小时后用乙酸:乙醇:H₂O=7:25:68的溶液脱色48小时左右。

(三) 蛋白质分子量测定

按照Weber^[4]的方法略加改良,在12%聚丙烯酰胺凝胶中含8M脲素和0.1%SDS。在恒电流为10mA,电泳16小时。标准蛋白为细胞色素C(12,500),天花粉蛋白(24,000),卵清蛋白(45,000)和牛血清白蛋白(68,000)。电泳后用0.5%考马斯亮蓝染色,然后用脱色液脱色。将凝胶用照相保存或用凝胶干燥板在50℃真空干燥后贮存。

(四) 生物检定

以淡色库蚊二龄幼虫作为试验材料,每20条幼虫为一组,加入 δ -内毒素后二小时观察毒效。

(五) 蛋白质测定

按照Lowry^[5]的方法测定。

(六) 抗血清的制备

取纯化的 δ -内毒素1mg与完全佐剂均匀混合后注射于家兔颈部,三周后再注射一次,第四周即有较强的抗 δ -内毒素的抗血清产生。自

耳静脉取血,在 37℃ 放置 3 小时后再在 4℃ 放置 2 小时,然后在 4,000rpm 离心 10 分钟获得抗血清。在 56℃ 保温 20 分钟以除去补体,贮存于 -70℃ 冰箱中备用。

试验结果

(一) δ -内毒素的分离和纯化

苏芸金杆菌 H₁₄-血清型菌株接入含葡萄糖和酵母膏的液体培养基上,在 28℃ 振荡培养 48 小时后用 2N HCl 调节 pH 值至 7.0 左右以防止晶体蛋白溶解,然后在 4,000rpm 离心 20 分钟收集菌体。用振荡法从菌体中分离晶体。然后将晶体悬浮于 20mM NaOH 中抽提过夜,离心去除沉淀,上清液用 2N HCl 调节 pH 至 6.8,离心去除沉淀,在上清液中加入固体硫酸铵至 0.2 饱和度,离心,沉淀用 20mM NaOH 溶液溶解,对 pH 9.0 的 0.03M Tris-HCl 缓冲液透析过夜。将经透析过的毒素蛋白应用等电聚焦凝胶电泳方法进行分离。在靠近阳极一端发白量多的蛋白沉淀带即为 δ -内毒素,切下该蛋

白带用 pH 9.0 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液抽提即得纯化的 δ -内毒素(图 1)。

(二) δ -内毒素的检定

1. 生物检定: 从等电聚焦凝胶带上洗脱下来的毒素蛋白以每毫升含在 280nm 处吸收的光密度为 0.036 相当于含蛋白质 39.6 μ g/ml 的溶液饲喂蚊幼虫,在一小时内死亡率为 80%,说明该蛋白质即为 δ -内毒素。

2. 电泳鉴定: 将聚焦后的蛋白质洗脱液,再进行凝胶电泳。在聚丙烯酰胺凝胶中含 8M 脲素和 0.1% SDS。电泳结果仅呈现一条蛋白带(图 2)。说明经过这样的纯化过程 δ -内毒素已达到电泳纯。

3. 免疫检定: 应用免疫扩散的方法,以纯化的 δ -内毒素作为抗原与抗 δ -内毒素的抗血清进行扩散反应,在 8℃ 放置 24 小时后产生一条沉淀带,说明有交叉反应物质的存在。而初步纯化的 δ -内毒素则有二条沉淀带(图 3)。另一条带很可能是原毒素。

(三) δ -内毒素的分子量测定

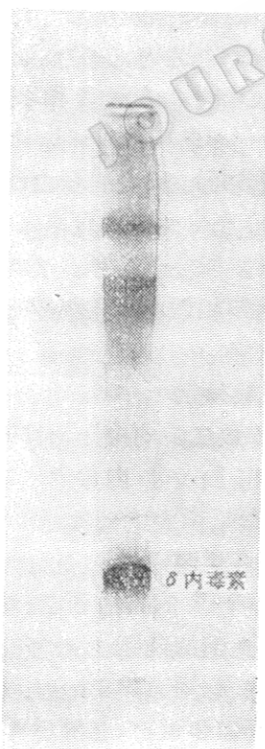


图 1 等电聚焦电泳分离 δ -内毒素

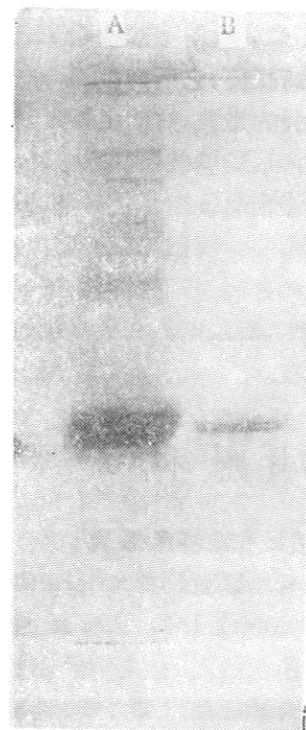


图 2 粗抽提液和纯化的 δ -内毒素的电泳图谱
A. 粗抽提液。 B. 纯化的 δ -内毒素

纯化了的 δ -内毒素经用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,它的分子量为 23,000 道尔顿(图 4)。

讨 论

由于苏芸金杆菌所产生的毒素蛋白存在于伴孢晶体中,而且又是一种碱性蛋白,所以提取比较困难。目前报道的提取方法,都是以对鳞翅目昆虫具有毒效的苏芸金杆菌库斯达基变种的 HD-1 菌株作为材料的^[6],孢子和晶体的分离,一般应用蔗糖梯度离心,氯化铯梯度离心,近年来又用葡影泛胺梯度离心,但都需超速离心机,然后从晶体中分离毒素蛋白再通过 DEAE-biogel 层析柱,获得分子量为 68,000 道尔顿的 δ -内毒素,过程比较复杂。我们以苏芸金杆菌以色列变种为材料,所用的方法比较简易。用这个方法提纯的 δ -内毒素经检定纯度已达到电泳纯和免疫纯。在聚丙烯酰胺凝胶上进行等电聚焦,测定 δ -内毒素的 $pI \cong 5.0$ 左右,它的分子量为 23,000 道尔顿。而对鳞翅目具有毒效的 δ -内毒素的 $pI \cong 7.0$ 左右,而它的分子量为 68,000 道尔顿。因此可以认为苏芸金杆菌中不同血清型菌株所产生的 δ -内毒素由于结构上的不同而表现出对不同寄主昆虫具有不同的毒效。如果适当改变 δ -内毒素的结构将有可能扩大寄主昆虫的范围,这将是一个有趣的问题。

参 考 文 献

- [1] Bulla, L. A. Jr., Bechtel, D. B., Kramer, K. J., Shethna, Y. I., Aronson, A. I. and Fitz-James, P. C.: *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 8: 147—204, 1980.
- [2] Goldberg, L. J. and J. Margalit.: *Mosq. News* 37: 355—358, 1977.
- [3] de Barjac, H. and J. Coz.: *Bull. W. H. O.* 57: 139—141, 1979.
- [4] Weber, K. and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.* 244: 4406—4412, 1969.
- [5] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* 193: 265—275, 1951.
- [6] Bulla, L. A. Jr., KRAMER, J., Cox, D. J., Jones B. L., Daridson, L. I. and Lookhart, G. L.: *J. Biol. Chem.* 256: 3000—3004, 1981.

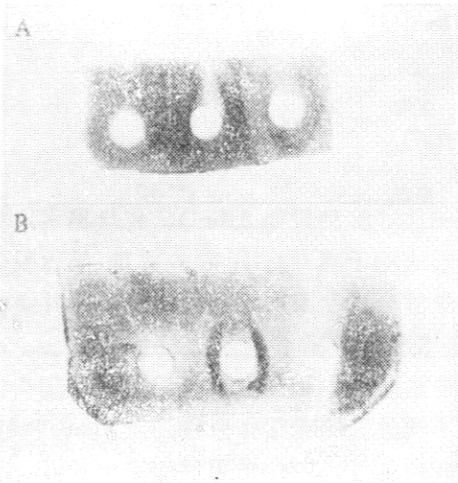


图 3 免疫扩散法检定 δ -内毒素

- A. 初步纯化的 δ -内毒素
- B. 纯化的 δ -内毒素

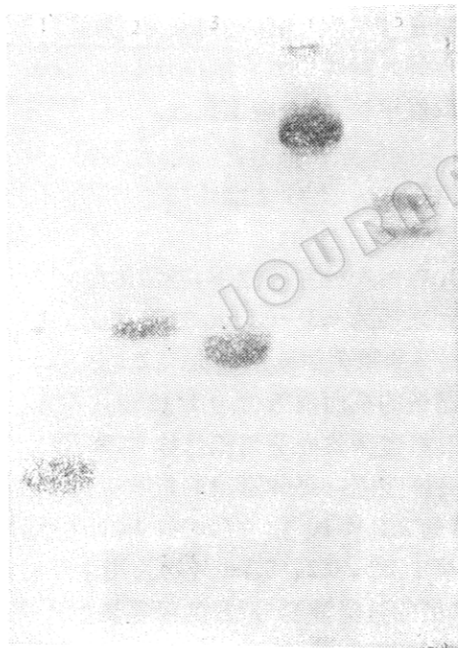


图 4 δ -内毒素的分子量测定

1. 细胞色素 C(12,500)
2. 天花粉蛋白(24,000)
3. δ -内毒素
4. 牛血清白蛋白(65,000)
5. 卵清蛋白(45,000)