

十五株球形芽孢杆菌质粒的检测和质粒电泳图谱的比较

高才昌 张燕娜* 蔡宝立 任改新

(南开大学分子生物学研究所,天津) (南开大学生物系)

蚊虫是使人类感染多种疾病的昆虫媒介者,消灭蚊虫对预防多种传染病有重要意义。长期以来,主要使用化学药物灭蚊,由于蚊虫对多种化学药物产生了抗药性,导致药效降低,而且污染环境,贻害人畜。近年来,国内外都在寻找灭蚊的新方法,新途径。其中之一是使用蚊虫病原菌进行生物防治,灭蚊效果好,并且对人畜无害,是一种很有前途的灭蚊方法^[1]。

最有希望的蚊虫病原菌是从野外分离的一类产芽孢的细菌。Kellen 等 1965 年首次报道了能使蚊子幼虫口服致病的球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)。此后,对蚊虫有致病性的细菌株系累有发现^[1,2]。在这类好氧芽孢菌中,特别是苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)与球形芽孢杆菌在对大量致病蚊虫的控制中可互相补充。

球形芽孢杆菌对蚊虫致病性、种型鉴定及有效成分等已有不少研究^[1,3]。

关于芽孢杆菌中质粒的研究亦已有不少报道,如短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、枯草

芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、苏芸金杆菌和球形芽孢杆菌等^[4,5]都已发现有质粒存在。苏芸金杆菌中的 δ -内毒素的形成与质粒有关^[6],并已通过 DNA 重组技术使质粒上晶体蛋白基因在大肠杆菌中克隆和表达^[7]。但在球形芽孢杆菌中,系统地进行有关质粒与毒性的研究到目前为止尚未见报道。本试验供试菌十五株仅有五株有病原性。因为病原性球形芽孢杆菌中的细胞壁和芽孢壁毒素可能是一种蛋白质或多肽^[8,9]。从苏芸金杆菌的毒素形成与质粒之间的关系得到启示,球形芽孢杆菌的毒素是否亦与质粒有关,因此我们采用修改的 Kado 方法,对球形芽孢杆菌的质粒 DNA 进行检测;对致病性和非致病性球形芽孢杆菌的凝胶电泳图谱作了比较。

本工作得到焦瑞身教授的指导,特此致谢。

* 张燕娜同志是南开大学生物学系 1983 届毕业生,现在天津医学院工作。

材料与方法

(一) 菌种来源

本实验使用的 15 株球形芽孢杆菌 (*Bacillus Sphaericus*), 为南开大学生物系收藏^[3]。

全部供试菌株均保存在营养琼脂斜面上, 4℃保存, 每二月换管一次。

菌体培养: 用营养肉汤摇瓶培养, 28℃ 培养 14 小时。

(二) 质粒的检测

参照 Kado 等的方法^[10], 并经修改如下: 取 $A_{600}=1.6-3.2$ 菌液 3ml, 4000rpm 室温离心 20 分钟, 收集菌体。用 0.2M pH8.0 的磷酸缓

冲液洗菌体一次。将细胞悬浮于含有 2mg/ml 溶菌酶的 1ml 电泳缓冲液 (40mM Tris, 20mM 醋酸, 2mM Na_2EDTA pH8.1) 中, 4℃ 反应 30 分钟。加 2ml 裂解液 (3% SDS, 50mM TrisH, pH12.6), 55℃裂解 20 分钟。加酚-氯仿 (1:1) 6ml, 轻轻摇匀。4000rpm, 室温离心 20 分钟, 上清液用于琼脂糖凝胶电泳检测。

琼脂糖 (Serva 进口分装) 浓度为 0.7%, 用电泳缓冲液配制。凝胶板为 $10 \times 15 \times 0.3cm$ 。取样品 26 μ l, 加示踪染料 (0.25% 溴甲酚紫, 50% 甘油, 50mM Tris-醋酸, pH8.1) 14 μ l, 混匀后加入琼脂糖凝胶的点样孔中, 用卧式电泳槽电泳 3—4 小时, 电压梯度 4V/cm, 电流 40—50mA。电泳后, 用 0.5 μ g/ml 溴化乙锭染色 1 小时, 在紫外光 (254nm) 下观察, 然后加红色滤光

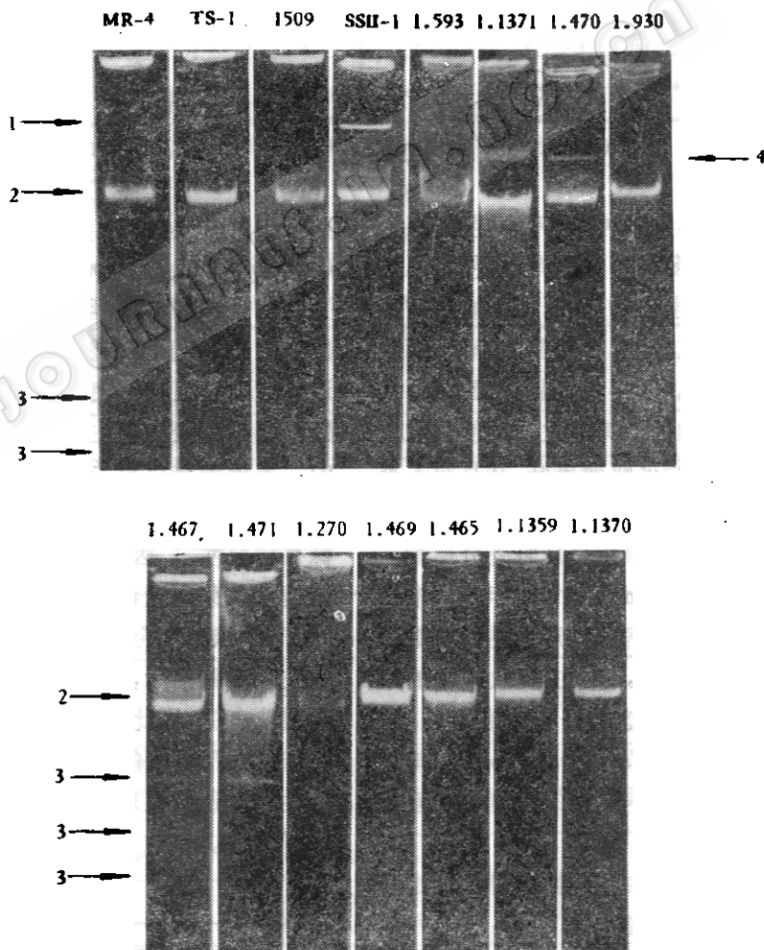


图 1 15 株球形芽孢杆菌中的质粒图谱

1.大质粒 2.染色体 DNA 片段 3.小质粒 4.较小的质粒

片照像。

结果与讨论

按修改的 Kado 等人的方法检测供试的 15 株球形芽孢杆菌, 经琼脂糖凝胶电泳得到的质粒图谱示于图 1。其中, 球形芽孢杆菌 Ts-1、1509、SSII-1、MR-4、1.593、1.1371、1.470、1.930、1.471、1.467 和 1.270 均检测到质粒 DNA。球形芽孢杆菌 1.469、1.465、1.1359、1.1370 中未检测到质粒 DNA。

球形芽孢杆菌中质粒的分离和检测报道很少^[9], 过去用于芽孢杆菌中质粒检测的方法都比较繁杂, 费时很多, 我们曾将多种检测质粒的方法用于球形芽孢杆菌, 结果均不理想。Kado 等人的方法简便、省时, 适用范围广。但用于球形芽孢杆菌中的质粒检测结果并不好。因此我们作了一些修改, 适当增加了菌体浓度, 必要时用 0.2M 中性磷酸缓冲液洗涤菌体一次, 用溶菌酶处理半小时, 其余按 Kado 等人的操作, 则对球形芽孢杆菌质粒检测得到清晰的图谱, 并且重现性好。

球形芽孢杆菌 Ts-1、1509、SSII-1、MR-4 和 1.593 为蚊虫致病菌, 具有杀虫活性; 而其余的 10 株菌不具有杀虫活性^[3]。将 15 株球形芽孢杆菌的质粒数目、相对大小和菌株对蚊虫的毒性列于表 1。对蚊虫有致病性的 5 株球形芽孢杆菌 Ts-1、1509、SSII-1、MR-4 和 1.593 中都有一个分子量相近的大质粒; 而对蚊虫没有致病性的菌株 1.1371、1.470、1.930、1.471、1.270、1.467、1.469、1.465、1.1370 和 1.1359 中只有较小的质粒或没有检测到质粒带, 亦均没有与 5 株病原菌中相同的大质粒。此结果与球形芽孢杆菌的 H 抗原分型相一致^[3]。这 5 株使蚊虫致病的球形芽孢杆菌中的大质粒是否与菌株对蚊虫的病原性有关, 有待进一步研究。

在 5 株蚊虫病原菌中, SSII-1 毒性很弱, 而 1.593、Ts-1、1.509 和 MR-4 菌株的灭蚊毒性强。在灭蚊毒性强的四株菌中, 1.593 有 2 种质粒, MR-4 有 3 种质粒。Ts-1 和 1.509 是我国

表 1 球形芽孢杆菌的质粒计数, 相对大小和它们对蚊虫毒性的关系

菌 株	质粒的数目	质粒的相对大小	对淡色库蚊幼虫的毒性 [▲]
<i>B. Sphearicus</i>			
1509	1	大	+++
Ts-1	1	大	+++
SSII-1	1	大	+
MR-4	3	一大二小	+++
1593	2	一大一较小	+++
1.1371	1	较小	—
1.470	1	较小	—
1.930	1	较小	—
1.467	2	小	—
1.471	1	小	—
1.270	1	小	—
1.469	0		—
1.1370	0		—
1.465	0		—
1.1359	0		—

▲ 百分死亡率: 0—25=+, 25—50=++, 50—75=+++ , 75—100=++++。

自己分离筛选和保藏的菌株, 其对蚊虫的毒性与引进的高效毒株 1.593 相当, 此外 Ts-1 和 1509 与 1.593H 抗原同源但却只有一个大质粒有别于 1.593。这对进一步研究该菌质粒与种下分型以及质粒的功能有一定意义, 不仅便于质粒的分离和纯化, 而且便于进行质粒的改建。因此, 从应用和研究的角度看, Ts-1 和 1509 都比引进菌株有更大的潜力。

对蚊虫病原菌球形芽孢杆菌中质粒与种下分型以及致病性的关系, 质粒与合成毒素的关系, 都有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Singer, S.: *Biotech. Bioengin.*, **22**: 1335—1355, 1980.
- [2] 任改新等: 昆虫学报, **25**(3): 349—350, 1982.
- [3] 任改新等: “中美昆虫生物防治讨论会论文集”(英文版) 1984 年出版。
- [4] Faust, R. M. et al.: *Plasmid*, **9**: 98—103, 1983.
- [5] 徐婉学、范云六: 微生物学报, **23**(2): 120—122, 1983.
- [6] Gonzalez, T. M., Jr., et al.: *Plasmid*, **5**: 351—365, 1981.
- [7] Schnepf, H. E. and H. R. Whitely, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **78**: 2893—2897, 1981.

- [8] Myers, P. and A. A. Yousten,: *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 1205—1211, 1980.
- [9] Davidson, E. W.: *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 6—9, 1982.
- [10] Kado, C. I. and Liu S. T.: *J. Bacteriol.*, 145: 1365—1373, 1981.