

研究报告

三种杀虫菌超氧化物歧化酶电泳图型和同源性

蔡全信 郑滔 刘娥英 袁志明 张用梅*

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要 本文报道了球形芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和森田芽孢杆菌三种昆虫病原菌的超氧化物歧化酶(SOD)的电泳图型及其同源性。实验证明 B.s 和 B.t SOD 分别具有 Ef 25~30、56.8 和 52.9 特征酶带, B.m SOD 也具有与 B.t 相同的特征酶带;免疫琼脂双扩散实验证明 B.s SOD 与 B.t 和 B.m SOD 无同源性, B.t SOD 抗血清与 B.s SOD 抗原无沉淀反应,但与 B.m SOD 抗原产生沉淀反应,证明 B.s 与 B.t 和 B.m 的亲缘关系远, B.t 和 B.m 的亲缘关系近。

关键词 苏云金芽孢杆菌, 球形芽孢杆菌, 森田芽孢杆菌, 超氧化物歧化酶, 同源性

分类号 Q939.124

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase 简称 SOD)广泛分布于动物、植物和微生物中,它是清除负氧离子对生物的损伤、维持生物正常生长和发育的一种重要的酶类^[1]。国内外对动物和植物的 SOD 的研究较多,对微生物 SOD 的研究较少。

不同来源 Mn-SOD、Cu / Zn-SOD 和 Fe-SOD 均具有较高的同源性和物化性质相似^[2]。因而可以利用这种酶进化上的保守性和相同的物化特征,作为研究和确定不同物种之间的亲缘关系的一种指标^[3]。我们在研究苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* 简称 B.t)、球形芽孢杆菌(*B. sphaericus* 简称 B.s) SOD 酶产生条件及其特性的基础上,本文重点比较 B.t、B.s 和森田芽孢杆菌(*B. moritai* 简称 B.m) SOD 的电泳图型,并采用免疫双扩散实验研究三种昆虫病原细菌 SOD 同源性,以探讨这三种细菌的亲缘关系。

1 材料和方法

1.1 菌株:见表 1

1.2 培养基

酵母膏 0.3%, 蛋白胨 1%, 琼脂 2%, pH7.2.

1.3 缓冲液

0.1mol / L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , pH7.2.

1.4 菌体的培养和收集

斜面菌种活化 8h, 加少许无菌水洗下菌苔, 菌悬液涂布平皿上, 30℃ 培养 22h, 收集菌苔, 用无菌水洗洗涤和离心 (4000r / min, 15min) 两次, 菌泥置冰箱保存。

1.5 SOD 酶的提取

按菌泥湿重: 二氧化硅 = 1:5 的比例, 于碾钵中冰浴碾磨破碎细胞, 以菌泥湿重: 缓冲液 (含 0.01% 巯基乙醇) = 1:5 于 4℃ 下抽提 2h, 10,000r / min 离心 20min, 上清液为粗酶液。

1.6 酶的纯化

粗酶液加硫酸铵至 45%, 4℃ 处理 1h, 离心 (10000r / min, 20min), 上清液再加硫酸铵至 80%, 重复上述操作, 沉淀溶于缓冲液, 用同种缓冲液透析, 上 DEAE-32 柱, 用含 0~0.2mol / L NaCl 的缓冲液洗脱 (24ml / h), 收集活性峰, 浓缩, 上 Sephadex G-100 柱, 平衡, 洗脱, 收集活性峰并浓缩。

1.7 SOD 抗血清的制备

* 通讯作者

本研究得到中国科学院区系分类特别支持项目资助
1997-10-31 收稿

采用参考文献 [4] 方法。

表1 实验菌株及其来源

血清型	菌株号	毒性	来源
<i>B. sphaericus</i>			
H1	KQ	+	本室保存
H2	SSH-1	+	本室保存
H5a5b	BS-10,2362	+++	本室保存
H6	C3	+++	本室保存
H9	COK31	++	本室保存
H25	2297	+++	本室保存
H26	2173	++	本室保存
H48	IAB-872	+	本室保存
H5a5b	C3-41	++++	本室分离
H6	47-6b, 124-3	+++	本室保存
H5a5b	401,601,803,804	+++	本室保存
ND	1,1677,1.1680, 1.1682,1.1359, 1.467,1.459,1.1687	-	本室保存
H5a5b	L5	++	本室诱变
<i>B. thuringiensis</i>			
无鞭毛	140	+++	本室保存
H3a3b3c	HD-1	+++	本室保存
H6	HD-109	+++	本室保存
H8	974	+++	本室保存
H3	113,9460	++++	本室分离
H5a5b	29	+++	本室分离
H7	9165	++++	本室分离
H12	542,9026,501	+++	本室分离
ND	972	-	本室分离
H1	9042	+++	本室分离
H3	9011	+++	本室分离
H14	9035,9034,187	+++	本室分离
自凝	678	-	本室分离
<i>B. moritai</i>			
ND	Bm	+	本室保存

ND: 未确定

1.8 PAGE

按参考文献 [4] 方法进行。电泳后凝胶进行活性染色,并计算不同酶带 Ef 值^[6]。

1.9 SOD 酶活性染色

按文献 [5] 方法进行。

2 结果

2.1 B.s、B.t 和 B.m SOD 的电泳图型

2.1.1 B.s SOD 的电泳图型: 11 株 B.s 有毒菌株的 SOD 粗酶经电泳后,其酶带经酶活性染色,均具有与提纯的 B.s C3-41 SOD 相同的活性酶带谱,其中 10 个菌株均具有一条 Ef 值为 56.8 的酶带,只有 IAB-872 菌株的 SOD 酶带 Ef 值为 60.1;此外这 11 株菌的 SOD 还有一组难以分开的 Ef 值为 25~30 的酶带(图 1)。对蚊幼虫无毒的 7 个菌株也具有有毒菌株相同的 SOD 电泳图型。

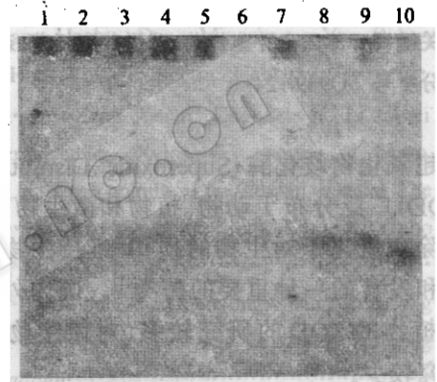


图1 B.s SOD 的电泳图型

1. KQ 2. SSH-1 3. BS-10 4. 2362 5. 47-6b
6. C3 7. COK31 8. 2297 9. 2173 10. IAB-872

2.1.2 B.t 和 B.m SOD 的电泳图型: 6 株 B.t 有毒株和 2 株 B.t 无毒株的 SOD 电泳图型显示,

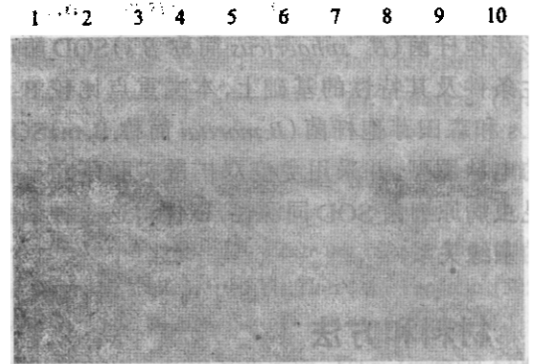


图2 B.t 和 B.m SOD 的电泳图型

1. 29 2. 113 3. 542 4. B.s C3-41 5. 972 6. 9460
7. 678 8. 9165 9. 140 10. B.m

所有菌株均具有一条 Ef 值为 52.9 的特征酶带, 但 9165 菌株具有两条酶带, 140 则具有三条酶带; B.m 也有 Ef 值为 52.9 的特征酶带和与 B.t140 菌株相同的另两条带(图 2)。

2.2 免疫双扩散实验

2.2.1 B.t 9165 SOD 抗血清与不同菌株 SOD 免疫双扩散结果: 以 B.t 9165 的 SOD 抗血清注入琼脂板中心孔, 周边孔中分别加入 B.t、B.s 和 B.m SOD 做抗原, 经琼脂双扩散实验, 结果表明, 属于 B.t 8 个血清型、1 个自凝型、1 个无鞭毛型和 2 个无毒菌株共 18 个菌株的 SOD 均与 9165 SOD 抗血清发生沉淀反应, 而且沉淀线呈吻合的弧形或圆形, 证明所有参与实验的 B.t SOD 具有完全的同源性。但属 3 个血清型的有毒菌株和未定型的无毒株及 1 个寡芽孢突变株 L5 共 10 个 B.s 菌株的 SOD, 均不与 B.t 9165 SOD 抗血清发生沉淀反应, 证明 B.s SOD 与 B.t SOD 不同源。而 B.m 的 SOD 与 B.t 9165 SOD 抗血清发生沉淀反应, 其沉淀线与 B.t SOD 沉淀线呈吻合的弧线, 证明 B.m 的 SOD 与

B.t 的 SOD 完全同源。

2.2.2 B.s C3-41 SOD 抗血清与不同菌株 SOD 的免疫双扩散实验: 采用同样的方法测定了 B.s、B.t 和 B.m 的 SOD 抗原与 B.s C3-41 SOD 抗血清的免疫反应。结果表明 B.s KQ、SSII-1、C3-41、BS-10、47-6b、C3、COK31、2297 和 IAB-872 等 7 个血清型的有毒菌株和 1.1671、1.1681、1.1682、1.467、1.1359、1.1677 等 6 个无毒株的 SOD 抗原与 B.s C3-41 SOD 抗血清产生沉淀反应, 而 B.t 29、9460、113、9165、542、678、972 和 140 SOD 的抗原与 B.s C3-41 SOD 抗血清不产生沉淀反应, 同样 B.m 的 SOD 抗原也无沉淀反应。上述结果证明, 在 B.s 菌种内的不同菌株的 SOD 具有同源性, 而 B.t 和 B.m 的 SOD 与 B.s SOD 无同源性(图 3)。

3 讨论

(1) B.s 不同血清型的有毒菌株、无毒菌株及寡芽孢突变株均具有大致相同 SOD 的电泳图型, 并且各菌株的 SOD 同源。同样地, B.t 各血清型、无鞭毛型、自凝型的有毒菌株和无毒菌株也具有相同的特征 SOD 带(Ef52.9)。各菌株的 SOD 具有完全的同源性。B.s 和 B.t 之间的 SOD 无同源性, 这表明 SOD 的特异性是菌种的属性之一。因此可以利用 SOD 的电泳图型和 SOD 免疫双扩散实验作为鉴别这两种昆虫病原细菌的一种补充方法。

(2) B.m SOD 与 B.s 的 SOD 不同源, 但与 B.t 的 SOD 具有相同的特征带(Ef 52.9)和同源性。表明 B.m 在进化上与 B.t 亲缘关系近, 在我们以往的研究中, 发现 B.t 和 B.cereus 是近缘种, 两者之间具有包括鞭毛抗原在内的许多相同特性^[6]。那么, B.m 是否与 B.t 一样也起源于 B.cereus? 有待进一步研究。

(3) B.s IAB-872 菌株的 SOD 除具有一条 Ef 为 25~30 的酶带外, 还有一条 Ef 值为 60.1 的酶带, 双扩散实验中, 虽然可与 B.s C3-41 SOD 抗血清产生沉淀带, 但沉淀带接合处呈矛头状短矩, 证明此菌 SOD 与 B.s C3-41 的 SOD 抗血清部分同源, 即表明此菌与 C3-41 亲缘关

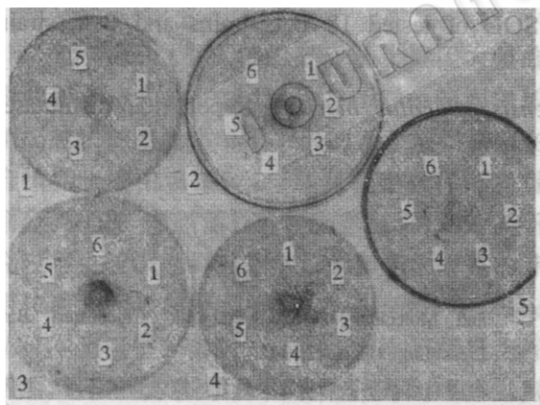


图 3 免疫琼脂双扩散实验

3-1: 1. B.t 187; 2. B.t 501; 3. B.t 542; 4. B.t 113; 5. B.t 9165 3-2: 1. B.t 9034; 2. B.t 9035; 3. B.t 9011; 4. B.t 974; 5. B.t HD-12; 6. B.t 9026 3-3: 1. B.t HD-109; 2. B.s KQ; 3. B.s C3-41; 4. B.t 9460; 5. B.s 47-6b; 6. B.t 972 3-4: 1. B.s 601; 2. B.t 29; 3. B.t 9042; 4. B.s 401; 5. B.s L5; 6. B.s 803 3-5: 1. B.s 1.1359; 2. B.s 804; 3. B.s 124-3; 4. B.t 140; 5. B.t HD-1; 6. B.m;

中心孔: B.t 9165 抗血清

系较远。关于 1AB-872 菌株的特性有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] 张博润, 谭华荣. 微生物学通报, 1992, 19(6): 352~357.
- [2] Parker M V V. J Mol Biol, 1988, 199(4): 649~661.
- [3] 黄秀琴. 微生物学通报, 1992, 19(1): 45~46.
- [4] 周志宏, 张用梅, 刘娥英. 微生物学报, 1993, 33(5): 354~359.
- [5] 张爱群, 沈文梅. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(2): 161~162.
- [6] 张用梅, 陈宗胜, 库竹等. 华中农学院学报, 1983, 2(4): 42~47.

PAGE PATTERNS AND HOMOGENY OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN THREE INSECT PATHOGENIC BACTERIA

Cai Quanxin Zheng Tao Liu E-ying Yuan Zhiming Zhang Yongmei

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences. Wuhan 430071)

Abstract The PAGE patterns and homogeny of Superoxide dismutase (SOD) of *Bacillus sphaericus* (B.s), *Bacillus thuringiensis* (B.t) and *Bacillus moritai* (B.m) were reported in this paper. It was found out that SOD of B.s and B.t were possessed of special PAGE bands of Ef 25~30, Ef 56.8 and Ef 52.9 respectively. The special bands of SOD of B.m were the same as that of B.t. The results of immunodiffusion showed that SOD between the toxic strains and non-toxic strains of B.s were homogenous, and however those between B.s and B.t were not homogenous. The experiments also showed all SOD of tested 18 B.t strains and B.m strain were possessed of homogenies.

Key words *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus moritai*, Superoxide dismutase, Homogeny