

用凝胶电泳方法鉴定苏云金芽孢杆菌溶源性菌株

罗权平¹ 刘国生² 赵儒铭^{1*} 沈萍²

(三峡大学化学与生命科学学院 宜昌 443000)¹ (武汉大学生命科学学院 武汉 430072)²

摘要: 根据原噬菌体的可诱导性, 将苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 培养液用丝裂霉素 C (MMC) 诱导, 诱导液经高速离心除菌和 $2.5 \times \text{SDS-EDTA}$ 染料混合液处理后, 琼脂糖凝胶电泳检测有无 DNA 带, 以确定菌株的溶源性。实验证明, 该 DNA 为溶源菌诱导出的噬菌体 DNA, 而非溶源菌以同样方法不能获得 DNA。用此方法, 可作为鉴定 Bt 溶源性菌株的一个手段, 有助于 Bt 工业发酵中噬菌体污染的预防。

关键词: 苏云金芽孢杆菌, 噬菌体, 溶源性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0129-05

Using Gel Electrophoresis to Determine Lysogenic *Bacillus thuringiensis*

LUO Quan-Ping¹ LIU Guo-Sheng² ZHAO Ru-Ming^{1*} SHEN Ping²

(Medical College of Three Gorges University, Yichang 443000)¹

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)²

Abstract: Considering the feasibility that prophages could be induced, we used mitomycin C (MMC) to induce *Bacillus thuringiensis* (commonly referred to as Bt) strains used in this study. Firstly, the strains induced by MMC were centrifuged and the supernatants were treated with 2.5 SDS-EDTA . And then, they were put into the 0.7% agarose-gel electrophoresis to test whether there were DNA bands or not. The results of agarose-gel electrophoresis and double-layer plates indicated that the DNAs were from lysogenic Bts, not from no-lysogenic Bts. By using this method, we could determine lysogenic Bts, and it is important for protecting Bts from phage infection during the process of fermentation.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Phage, Lysogenicity

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一类广泛存在于土壤中的革兰氏阳性菌。它在形成芽孢的同时, 在菌体内的一端或两端可形成一个, 两个或多个菱形、方形或不规则形的杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, ICPs), 对多种昆虫有杀伤作用, 已得到广泛的开发和应用。

鸟瞰国内外该制剂生产中所存在的关键问题之一, 主要是噬菌体的危害。在 Bt 发酵生产中, 噬菌体污染的原因包括: (1) Bt 菌株的溶源性内因^[1]; (2) 生产环境中噬菌体的存在。尤以 (1) 为主。Bt 菌的溶源频率为 83%^[2], 特别值得注意的是许多 Bt 溶源菌的原噬菌体是位于内源质粒上^[3], 而大多数编码杀虫晶体蛋白的基因也是位于质粒上。因此, 在 Bt 发酵生产中经常会遇到溶源性菌株。通常, 溶源性菌株会有两种发育途径: 去溶源化和继续保持溶源状态。寄主细胞究竟遭遇何种命运, 取决于许多细

* 通讯作者 E-mail: zhaoruming@sina.com.cn

收稿日期: 2004-10-11, 修回日期: 2005-01-28

胞内外因素,如寄主与噬菌体的基因型^[4],寄主细胞的生理状态^[5],环境理化因素^[6]。溶源菌自发地或在各种因素诱导下释放噬菌体,致使发酵中噬菌体富集和生产菌遭到裂解,使生产成本剧增,经济损失重大。因此,尽量避免使用溶源菌作为生产菌株,在 Bt 发酵生产中具有重要的意义。

通常鉴定菌株的溶源性基本采用相应的指示菌检测溶源菌产生的噬菌体,或用电镜观察有无噬菌体颗粒。但这两种方法都存在着缺陷:不可能每株溶源菌产生的噬菌体都能找到相应的指示菌,因此指示菌的选取是一个困难;用电镜观察需噬菌体有一定的纯度和浓度,而溶源菌释放的噬菌体量小,不易富集和纯化。因此建立一种既不需指示菌,又不必用电镜鉴别菌株的溶源性的方法十分必要。王家驹等^[7]曾用丝裂霉素 C (MMC) 诱导检测金黄色葡萄球菌菌株的溶源性。本实验拟研究采用丝裂霉素 C (MMC) 作为诱导剂,通过琼脂糖凝胶电泳的方法来鉴定苏云金芽孢杆菌溶源性菌株的可行性,为 Bt 工业发酵中噬菌体污染的预防提供一种快速、简便的方法。

1 材料与方法

1.1 菌株

均来源于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),见表 1。

表 1 实验用菌株

编号	菌株	相关性状
1	BtAB80-21	HD-1 的衍生菌株
2	BtAB91004	Bt subsp. alesti
3	BtAB91006	Bt subsp. dendrolimus
4	BtAB92041	Bt subsp. mexicanensis
5	BtAB92043	Bt subsp. morrisoni
6	BtAB91023	Bt subsp. galleriae
7	BtAB92029	Bt subsp. toumanoffi
8	BtAB91014	Bt subsp. tolworthi
9	BtAB92039	Bt subsp. noeleconensis
10	BtAB92042	Bt subsp. siloensis
11	Bt087	Bt subsp. Guangzhou

1.2 培养基

本实验所用培养基均为 LB 培养基,其配方为:氯化钠 5g,蛋白胨 10g,酵母粉 5g,定容至 1L,调 PH 至 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30min。上层和下层培养基分别各加琼脂粉 7g 和 15g。

1.3 试剂和药品

DNase, RNase, 鸡蛋清溶菌酶, 均购自华美生物技术有限公司;丝裂霉素 C (MMC) 购自华北制药股份有限公司;SDS 购自武汉天源生物技术有限公司;EDTA, 溴酚兰, 二甲苯青 FF, 蔗糖, 氯化钠购自宜兴市第二化学试剂厂;琼脂粉, 蛋白胨, 酵母粉为日本进口分装。

2.5 × SDS-EDTA 染料混合液配方见《分子克隆实验指南》(第三版) p1583。

1.4 MMC 诱导 Bt 实验步骤

(1) 取纯化培养的待检 Bt 菌液以 1% 的接种量接至装有 5mL LB 培养基的试管中,

每株菌分别接种至两支试管, 28℃, 180r/min, 振荡培养 3h 至对数期。

(2) 向上述每株菌其中一支试管中加入 0.003mol/L MMC 2.5μL (标记为 n), 另一支不加 MMC 作为对照 (标记为 n'), 继续振荡培养 3h。

(3) 取加入 MMC 的 Bt 培养液 100μL, 加入 DNase 和 RNase, 使其终浓度为 1mg/mL, 同时加入溶菌酶, 使其终浓度为 4 mg/mL。室温放置 30min 后, 12,000r/min, 离心 10min。未加 MMC 的 Bt 培养液处理同加 MMC 的。

(4) 各取 20μL 上清液加入 8μL 2.5 × SDS-EDTA 染料混合液, 65℃ 水浴 5min。

(5) 取 (4) 中样品和上样缓冲液混匀后, 加样于已制备好的含 0.5μg/mL 溴化乙锭的 0.7% 琼脂糖凝胶中, 120V 稳压电泳检测。

1.5 MMC 诱导出的噬菌体指示菌的筛选

取诱导后经检测有 DNA 带的培养液 12,000r/min, 离心 10min 后, 上清液分别与试验 Bt 菌株倒双层平板^[8]。28℃ 培养过夜, 检测有无噬菌斑出现。

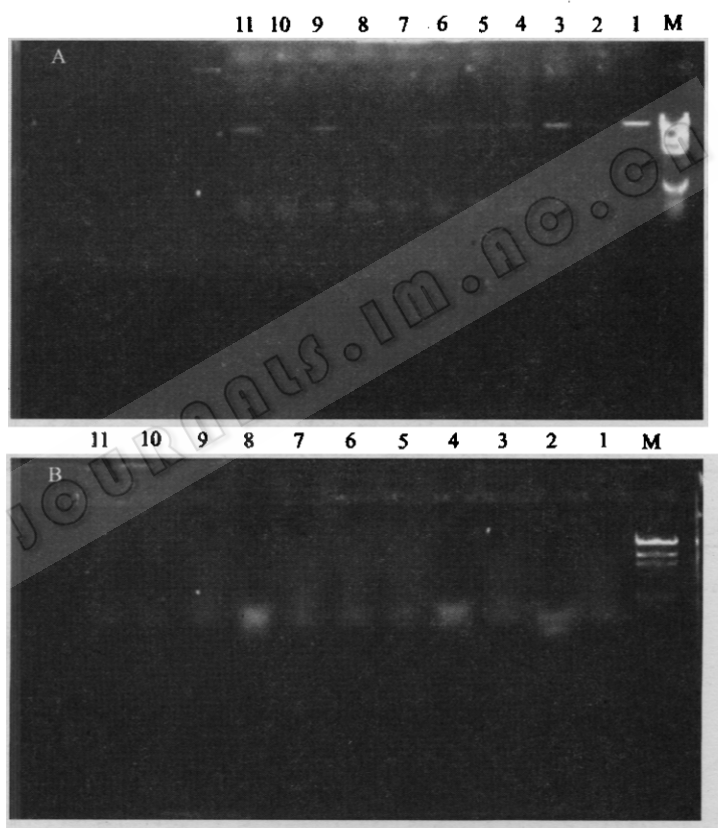


图 1 琼脂糖凝胶电泳

A 用 MMC 诱导检测溶源性菌株的电泳结果 (1 MMC + BtAB80-21, 2 MMC + BtAB91004, 3 MMC + BtAB91006, 4 MMC + BtAB92041, 5 MMC + BtAB92043, 6 MMC + BtAB91023, 7 MMC + BtAB92029, 8 MMC + BtAB91014, 9 MMC + BtAB92039, 10 MMC + BtAB92042, 11 MMC + Bt087, M: λDNA/Hind III)

B 未用 MMC 诱导作为对照的电泳结果 (1 BtAB80-21, 2 BtAB91004, 3 BtAB91006, 4 BtAB92041, 5 BtAB92043, 6 BtAB91023, 7 BtAB92029, 8 BtAB91014, 9 BtAB92039, 10 BtAB92042, 11 Bt087, M: λDNA/Hind III)

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳检测结果

MMC 诱导实验电泳结果显示: 11 株 Bt 菌中共有 8 株检测到噬菌体 DNA (图 1)。MMC 因诱导液经 12,000r/min, 离心 10min, 又经 DNase I, RNase 和溶菌酶消化处理, 所以检测到的 DNA 带可排除为菌染色体或细胞质中核酸物质 (如质粒等), 而经诱导产生的噬菌体因有蛋白质外壳保护, 不受核酸酶和溶菌酶的影响。在 2.5 × SDS-EDTA 染料混合液和 65℃ 水浴作用后, 蛋白质外壳被破坏, 噬菌体 DNA 被释放出来, 同时 DNase I 被灭活, 因此检测到的 DNA 带, 可证明菌株的溶源性。

2.2 平板法的证实

为了进一步证实在琼脂糖凝胶电泳中出现 DNA 带的 Bt 菌株为溶源性菌株, 无 DNA 带的为非溶源性菌株, 我们进一步用双层平板法进行验证。其结果 (表 2) 表明, 8 株具有 DNA 带的菌株裂解液均不能引起自身的感染, 即它们具有免疫性, 平板上无噬菌斑出现, 从而证实这 8 株菌为溶源菌株。此外, 本实验结果还表明, 溶源性菌株 (具有 DNA 带) Bt AB91023, Bt AB92043, Bt AB92039 的裂解液分别对 Bt AB92041 (溶源菌), Bt AB91014 (非溶源菌), Bt AB92042 (非溶源菌), 具有裂解效应 (表 2)。所形成的噬菌斑均为典型的温和噬菌体形成的稍混浊的噬菌斑 (图 2), 说明这 3 种菌可成为相应的指示菌株。

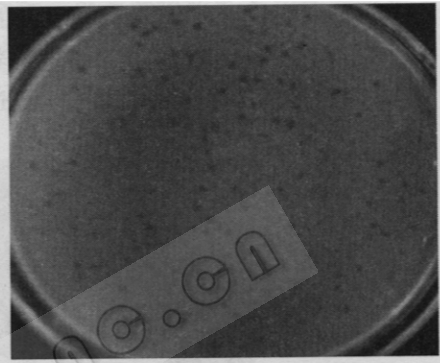


图 2 双层平板上出现的混浊噬菌斑

表 2 双层平板法检测结果

试验菌株	溶源菌株							
	BtAB80-21	BtAB91004	BtAB91006	BtAB92041	BtAB92043	BtAB91023	BtAB92039	Bt087
BtAB80-21	-	-	-	-	-	-	-	-
BtAB91004	-	-	-	-	-	-	-	-
BtAB91006	-	-	-	-	-	-	-	-
BtAB92041	-	-	-	-	-	+	-	-
BtAB92043	-	-	-	-	-	-	-	-
BtAB91023	-	-	-	-	-	-	-	-
BtAB92029	-	-	-	-	-	-	-	-
BtAB91014	-	-	-	-	+	-	-	-
BtAB92039	-	-	-	-	-	-	-	-
BtAB92042	-	-	-	-	-	-	+	-
Bt 087	-	-	-	-	-	-	-	-

+ 表示有噬菌斑形成, - 表示无噬菌斑形成

根据以上结果分析, 用 MMC 诱导法检测菌株的溶源性为 Bt 发酵生产中严把菌种关提供了一个快速, 简便可行的方法。

3 讨论

由于噬菌体对 Bt 发酵工业造成的危害, 国内从 70 年代就对噬菌体的感染开始研究。为了有效控制噬菌体的感染和发展, 根据噬菌体感染特性, 应建立一套以噬菌体检测为依据, 以净化环境为中心的综合防治措施, 即对发酵过程的每个环节及周围空间进行定点的噬菌体检测, 重点是种子罐及环境的检测。种子感染了噬菌体, 必然导致发酵失败。因此, 确保种子不带噬菌体, 将会大大提高发酵的成功率。

通过 MMC 诱导法鉴定后, 我们可以针对溶源性菌株采用相应的对策。例如我们可调整发酵温度。温度是影响细菌溶源效率的物理因素之一, 也是生产上较易控制的一个指标。杨水云等^[9]发现: 高温可抑制裂解反应发生, 有利于溶源化。温度对溶源效率的影响就是温度影响了噬菌体阻遏蛋白的活性, 溶源效率与阻遏蛋白活性成正相关。因此, 在工业生产中, 寻找溶源菌保持溶源状态的最适温度是非常必要的。此外, 我们还可通过改变发酵培养基 pH 值^[10]的方法来预防或治理溶源性生产菌株的自身裂解问题。总之, 通过检测生产菌株的溶源性, 有利于我们防患于未然, 确保苏云金芽孢杆菌发酵生产的安全。

参考文献

- [1] 喻子牛, 董平, 万南安. 病毒学通报, 1985, 1: 273 ~ 277.
- [2] 司稚东主编. 噬菌体学. 北京: 科学出版社, 1996. 64.
- [3] Kanda K, Tan Y, Aizawa K. General Microbiology, 1989, 135: 3035 ~ 3041.
- [4] Chols H E. Ann Rev Genetics, 1972, 16: 157 ~ 168.
- [5] Hong J S, Bertani E R. Proc Natl Acad Sci USA, 1971, 68 (9): 2258 ~ 2264.
- [6] 吴继星, 陈在珥, 张汉珍. 中国生物防治, 1998, 14 (3): 101 ~ 104.
- [7] 王家驹, 朱素娟, 戈宝榛, 等. 微生物学报, 1985, 25 (3): 250 ~ 254.
- [8] 沈萍, 范秀容, 李广武主编. 微生物实验. 北京: 高等教育出版社, 1999. 143 ~ 145.
- [9] 杨水云, 席丹. 西安交通大学学报, 1997, 31 (10): 123 ~ 126.
- [10] 杨水云, 易全成, 赵文明. 西北大学学报 (自然科学版), 1998, 28 (4): 358 ~ 361.