

苏芸金杆菌五个菌株的晶体蛋白研究

冯 维 熊

(中国科学院动物研究所, 北京)

六十年代以来, 国外在利用电泳方法研究苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 不同菌株的致病机理方面, 做了许多工作。Lecadet^[1] 曾用含尿素的凝胶电泳和纸电泳研究了血清型 I 的 *B. t.* 芽孢和晶体。Somerville 等^[2] 以 *Alesti* 为材料, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行研究。Cooksey^[3] 以 *Galleriac*、*Sotto*、*Morris*、*Tolworthi* 为材料, 用圆盘电泳法研究了提取毒蛋白(芽孢、晶体混合物)、晶体蛋白毒素和晶体蛋白溶解物。Glation^[4] 以 *B. T. Berliner* 为材料, 用 Davis 与 SDS 电泳法进行研究。本文主要报道了用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳研究的苏芸金杆菌不同菌株晶体蛋白的图谱。

材料与 方法

一、细菌培养

1. 菌株: 属于血清型 H_{3ab} (*B. Thuringiensis* var. *kurstaki*) 的 HD-1 和 7216, 属于血清型 H_{4ac} (*B. Thuringiensis* var. *kenyae*) 的 7404 和 7501, 属于血清型 H_{8ac} (*B. Thuringiensis* var. *ostriniac*) 的 006 等五个菌株。

2. 将斜面菌种接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基, 置 30℃ 培养 24 小时后, 转接到克氏瓶中的固体培养基上(液体培养基加入 2% 琼脂), 培养 14 天。

二、晶体制备

用蒸馏水洗下培养物, 混匀后, 在 10000g 下离心 20 分钟, 弃上清, 将沉淀(晶体、芽孢混合物)重复洗涤离心一次后, 再用生理盐水洗涤离心二次, 所收集沉淀物, 经液体双相分离法与等密度离心法^[5] 处理后, 再经冰冻干燥使成粉状, 即成五个菌株的待测样品, 置冰箱保存备用。

三、电泳样品制备

1. 在粉状样品中, 加入 0.04N NaOH, 在

30℃ 恒温水浴下处理 60 分钟, 间歇摇动使晶体溶解。经超声波 (330 mA, 频率 40) 处理 5 分钟后, 加入 1N 冰乙酸, 调节 pH 至 4.4, 在 12500 × g 下离心 15 分钟, 弃上清。沉淀物用 3ml 0.05M Na₂CO₃-NaHCO₃ 洗下, 使样品含晶量为 3 mg/ml。

2. 取电泳样品 0.1 ml, 配制成 50 μg/ml 浓度的悬液, 用 Folin-酚试剂显色法^[6] 于 721 分光光度计 680nm 下测定蛋白含量。

四、电泳

1. 按 Davis 修改法^[7] 制备分离胶、隔离胶和样品胶。

2. 胶柱制备过程: 在 8 × 0.35 cm 玻管中, 注入 0.7 ml 分离胶, 置 32℃ 恒温下 1 小时, 凝聚后再加入 0.07ml 隔离胶, 于 20W 日光灯下聚合 30 分钟, 最后加入样品胶 0.07ml (样品: 胶 = 0.5:1), 再次灯下聚合, 制好胶柱置 16—18℃ 下, 经 3 小时待用。

用 JDY-75 型中压电泳仪

加样品量: 0.035 ml/管

控制温度: 4℃

缓冲液: Tris-Glycine 10% 稀释液, pH 8.6—8.8, 上、下槽各放 600 ml。

3. 染色与脱色: 1% 考马斯亮蓝液 20 倍稀释, 染色 1 小时, 用 12.5% 的三氯乙酸脱色。

4. 蛋白质测定: 脱色后的胶柱, 置 DQS-1 型电泳光密度扫描仪上绘制蛋白质浓度色带图形及位置, 并用积分法求其相对含量。

结果与 讨论

1. 蛋白含量: 五个菌株的晶体蛋白制备物, 经 Folin-酚法显色后, 在分光光度计下测得

电泳照片由动物研究所于延芬、曹守珍同志拍摄, 特此致谢。

蛋白含量,其平均值见表1。

表1 五个菌株晶体蛋白制备物的蛋白含量

菌 株	O. D.	蛋白含量 (μg/ml)
HD-1	0.2825	80
7404	0.2905	83
7216	0.3010	87.5
7501	0.3625	110
006	0.1830	44.5

表1结果显示:不同菌株 O. D. 值不同,蛋白含量也不同。五个菌株中,以7501最高,006最低。

2. 电泳图象: 提纯的晶体蛋白,在电泳图象上反应出,各菌株间存在某种相关性,并有一定差异性:属于H_{3a3b}的HD-1、7216与属于H_{4a4c}的7404、7501相似,区带最多时均可见7条带集中于胶柱上半部,而且各条区带间等距。有时又出现一条较宽的蛋白带。同属于H₃的HD-1有5条主要蛋白带,7216仅出现3条带。而7216的主要蛋白带数目又与属于H₄的7404相一致。属于H_{3a3c}的006则与上述4个菌株显然不同,它只有两条宽带,分别分布于胶柱上下部,而且间距较大(图1)。蛋白带数目的一致或不同,是否是由于双硫键和氢键所连结的肽链不同而反应出蛋白区带的差异?尚待进一步研究。

3. 菌株蛋白质相对含量与毒力的关系: 积分法所得各条区带的蛋白相对含量有差异,006菌株的蛋白含量虽然最高,但它对已试虫种的毒力却最低^[6],即蛋白相对含量高,并不意味着对昆虫的毒力也高,晶体作为前毒素的论点虽已

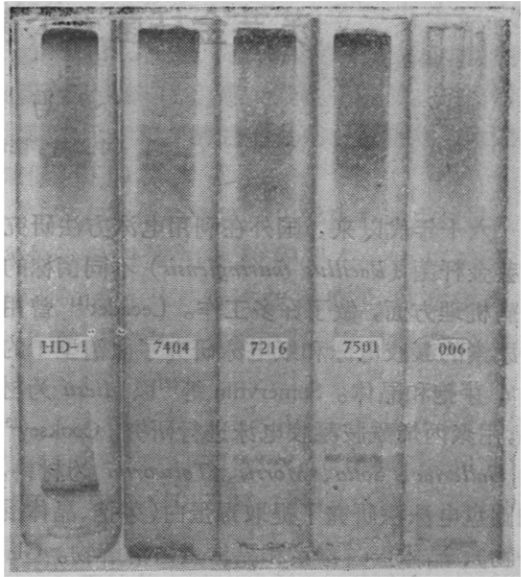


图1 五株菌的晶体蛋白制备物的聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳图象

被证实^[9],而组成晶体的各个亚单位的蛋白质数量显然不能左右其毒力,是否与组成晶体蛋白的肽链数目有关还需研究。5个菌株的晶体蛋白相对含量见表2。

4. 光密度扫描谱: 五个菌株的电泳样品光密度扫描显示出,电泳谱曲线有差异,如同一血清型的菌株HD-1与7216不同,7404与7501也不同。006则另具一格。而HD-1与7404倒有某些相似处(见图2)。

试验结果表明,菌株的晶体形状不同,所显示电泳图象亦不同。近圆形晶体的006菌株,仅有两条距离较远的宽带,晶体呈菱形的HD-1、7216、7404、7501则呈现出较为密集的7条带。上述结果与Burger^[9]的论点:菌株间各种

表2 五个菌株的晶体蛋白相对含量

相对含量% \ 蛋白带号	1	2	3	4	5	6	7
菌 株							
HD-1 ^a	11.90	10.74	9.08	10.14	9.06	11.94	33.71
7404 ^b	9.46	9.74	7.14	13.68	6.44	14.97	38.55
7216 ^c	13.04	10.14	11.59	10.14	7.25	18.84	28.99
7501 ^d	12.07	9.62	9.00	10.81	13.22	18.16	27.10
006 ^e	33.30	66.69	—	—	—	—	—

注: a. 系2次平均数 b. 系3次平均数 c. 系1次计数 d. e. 系5次平均数

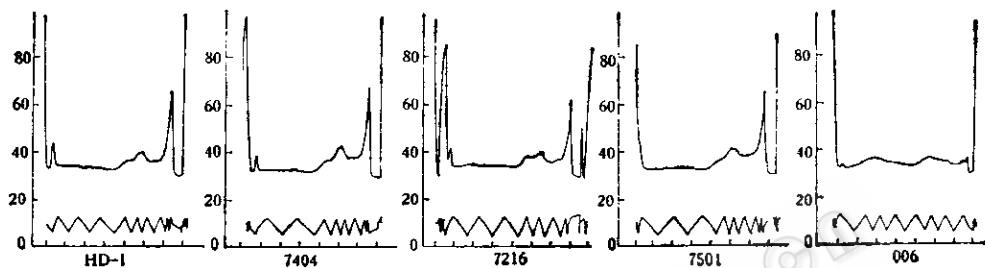


图2 五株菌电泳样品光密度扫描谱

氨基酸含量存在差异的解释是相吻合的。

不同菌株晶体蛋白带的位置,数量与毒力的相关性如何?而毒力与组成晶体蛋白的肽链数目相关性如何?电泳图象中的哪一部分或哪几部分是具有致病性的毒蛋白成份?均待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Lecadet, M. M. and R. Dedender: *J. Invert. path.* 9(3): 310, 1967.
- [2] Somerville, H. J. et al.: *J. Bact.* 96 (3): 721,

1968.

- [3] Cookey, K. E.: *Biochem. J.* 106: 445, 1968.
- [4] Glatien, M. F.: *Eur. J. Biochem.* 30 (2): 330, 1972.
- [5] 王瑛等: *微生物学报*, 20(3): 285 1980.
- [6] 潘家秀等: *蛋白质化学研究技术*, 科学出版社, 北京, 28页, 1973.
- [7] 电气泳动学会: *電気泳動实验法(第五版)*, 文光堂, 東京, 1976, chap. 8: 202.
- [8] 中国科学院动物研究所苏芸金杆菌研究组: *微生物学报*, 18(4): 352, 1978.
- [9] H. D. Burges, & N. W. Hussey. 昆虫和螨类的微生物防治, 广东农林学院林学系, 中国科学院北京动物研究所昆虫病理组, 辽宁省林业土壤研究所生物杀虫剂组合译, 科学出版社, 北京, 1977, 173页。