

# 板状电泳在苏芸金芽孢杆菌亚种鉴定上的应用

戴莲韵 王学聘

(中国林业科学研究院林业研究所)

**摘要** 作者用聚丙烯酰胺凝胶板状电泳技术,对1986年以前发表的苏芸金杆菌22个血清型29个亚种进行了酯酶分析,获得了较圆盘电泳更为准确、迅速、易区分的酯酶分析结果。其中 $H_1-H_{14}$ 的20个亚种与圆盘电泳的结果相同<sup>[1]</sup>。本文报道了1978—1986年间所发表的苏芸金杆菌9个亚种板状电泳的酯酶分析和生化测定的结果。从而确立了以酯酶型为主结合生化特性对苏芸金杆菌未知菌株进行鉴定的可行方法。

**关键词** 酯酶型 (Esterase type); 亚种 (Subspecies); 九州 (Kynshue); 达可达 (Dakora); 印第安 (Indiana); 东北 (Tohokue); 熊本 (Kumamotoe); 肋木 (Tochigie); 云南 (Yunnanc); 珂玛利 (Colmeri); 山东 (Shandongie)

目前,苏芸金芽孢杆菌的分类是根据鞭毛抗原(H)与生化反应特性相结合的方法<sup>[2]</sup>,至1986年止,已知苏芸金芽孢杆菌被分为22个血清型共29个亚种<sup>[3]</sup>。Norris用淀粉凝胶电泳技术对分属于9个血清型的11个亚种进行了酯酶分析<sup>[4]</sup>。国内也曾报道了苏芸金芽孢杆菌一些亚种圆盘电泳的酯酶分析结果<sup>[1,5]</sup>。

我们曾用圆盘电泳技术对1978年以前发表的14个血清型 $[H_1-H_{14}]$ 的20个亚种的标准菌株进行了酯酶分析和生化特性测定,并对20株未知菌进行了鉴定<sup>[1]</sup>。由于圆盘电泳在样品比较中因所用器具与胶柱操作而引起谱带移动率有误差,因此本项研究改用板状电泳技术。除对上述20个亚种进行板状电泳酯酶谱带的比较外,着重对1978—1986年发表的苏芸金杆菌9个亚种的标准菌株进行了酯酶分析和生化特性的测定。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌种及来源

苏芸金芽孢杆菌九州亚种、达可达亚种、印第安亚种、东北亚种、熊本亚种、肋木亚种和珂玛利亚种均由南开大学任改新同志提供。苏芸金芽孢杆菌云南亚种和山东亚种均由中科院动物研究所王瑛、沙槎云两位同志提供。

### (二) 酯酶分析

1. 样品制备: 见文献[1]。

2. 电泳条件: 采用7.5%浓度聚丙烯酰胺凝胶板状电泳(板面积:  $20 \times 20 \text{cm}$ ) 高pH不连续系统,每板12个样品,每个板柱加样品20  $\mu\text{l}$ ,每板电流24mA。具体操作见“聚丙烯酰胺凝胶电泳”一书<sup>[6]</sup>。

3. 染色: 电泳完毕,将胶板脱于白瓷盘中进行染色。具体方法见文献[1]。

### (三) 生化特性的测定

按照“一般细菌常用鉴定方法”一书进行<sup>[7]</sup>。

本文经李季伦教授审阅,任改新、沙槎云和王瑛同志提供标准菌株,一并致谢。

# 试验结果

## (一) 酯酶谱分析(图版 I-A、B)

在同一凝胶板上显示的酯酶谱表明: 9 个亚种都具有各自独特的酯酶谱型, 分别定名为以下的酯酶型:

九州 (Kynshue); 达可达 (Dakota); 印第

安 (Indiana); 东北 (Tobokue); 熊本 (Kumamotoe); 肋本 (Tochigie); 云南 (Yunnane); 珂玛利 (Colmeri); 山东 (Shandongie)。

## (二) 生化特性

除菌株  $H_{16}$  和菌株  $H_{18}$  各项生化反应一致外, 其余各亚种均不相同(见表 1)。

表 1 生化反应

菌名	血清型	生化反应										
		V-P 反应	卵磷酯酶	水杨苷	水解蛋白	色素	蔗糖	脲酶	七叶灵	甘露糖	水解淀粉	纤维二糖
苏云金芽孢杆菌九州亚种 <i>B. t. subsp. kyushuensis</i>	$H_{11a, 11c}$	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
苏云金芽孢杆菌达可达亚种 <i>B. t. subsp. dakota</i>	$H_{15}$	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
苏云金芽孢杆菌印第安亚种 <i>B. t. subsp. indiana</i>	$H_{16}$	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
苏云金芽孢杆菌东北亚种 <i>B. t. subsp. tohokuensis</i>	$H_{17}$	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
苏云金芽孢杆菌熊本亚种 <i>B. t. subsp. kumamotoensis</i>	$H_{18}$	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
苏云金芽孢杆菌肋本亚种 <i>B. t. subsp. tochigiensis</i>	$H_{19}$	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
苏云金芽孢杆菌云南亚种 <i>B. t. subsp. yunnanensis</i>	$H_{20}$	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
苏云金芽孢杆菌珂玛利亚种 <i>B. t. subsp. colmeri</i>	$H_{21}$	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
苏云金芽孢杆菌山东亚种 <i>B. t. subsp. shandongensis</i>	$H_{22}$	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+

## 讨论

1. 用板状电泳分析 9 个亚种的结果表明: 每个亚种都具有特定的酯酶谱, 谱带稳定, 差异显著, 重复性强。克服了圆盘电泳由于所用器具及胶柱操作中所引起的谱带泳动率的误差, 从而更有利于各亚种谱带泳动率的比较, 操作更为简便、易行。

2. 印第安亚种与熊本亚种在生化反应上虽具有一致性, 但酯酶带仍显示出一定的差异, 前者为 3 条酯酶带, 后者为 5 条酯酶带, 因而可依据酯酶型区分。

3. 在生化反应测定中, 水杨苷水解一项是 Fluka 进口分装的 D(-)-Salicin, 因而在  $H_{11a, 11c}$ ,  $H_{16}$ ,  $H_{17}$  中所得结果与原报道不同, 为便于应用和比较均按本试验室结果为准。

4. 1978 年以前发表的 20 个苏芸金杆菌亚

种标准菌株进行的板状电泳酯酶分析结果与圆盘电泳结果<sup>[1]</sup>一致。

5. 根据苏芸金杆菌 22 个血清型 29 个亚种的酯酶型分析结果, 提出以酯酶型为主结合生化特性对苏芸金杆菌未知亚种进行鉴定的方法是可行的。

## 参考文献

- [1] 李兆麟等: 中国科学院林业土壤研究所集刊, 第六集, 169—178, 科学出版社, 1983。
- [2] Barjac, H: In "Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970—1980" (ed. by H. D. Burges) Academic press, London, 35—43, 1981。
- [3] 王 瑛等: 微生物学报, 26(1): 1—6, 1986。
- [4] Norris J. R: J. Appl. Bact. 27(1): 439—447, 1964。
- [5] 黄健屏: 微生物学通报, 11(3): 97—99, 1984。
- [6] 莽克强等: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 1975。
- [7] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 1978。