

# 裂解气液色谱法对苏芸金杆菌晶体蛋白的表征分析

朱湘民 李荣森

(中国科学院武汉病毒研究所, 湖北)

**摘要** 本研究用带有 PYR-2A 管式炉裂解器和 CR2A 计算机的 GC-9A 气相色谱仪, 对 3 种标准蛋白和 8 个变种的 11 株苏芸金杆菌的晶体蛋白进行了表征, 通过指纹图的分析, 表明苏芸金杆菌不同亚种的晶体蛋白, 既有峰群的特异性, 亦有峰高比值的特异性, 揭示了伴孢晶体在分子组成和构象上的多样性。同时, 证明了 PGLC 分析鉴别伴孢晶体的可行性。

**关键词** 裂解气液色谱法; 晶体蛋白; 苏芸金杆菌

裂解气液色谱法 (Pyrolysis Gas Liquid Chromatography, 简称 PGLC) 是在气相色谱基础上发展起来的一门新技术, 它是用化学分类法对物质进行分析鉴定。这种方法具有快速、灵敏、准确和重现性高的特点<sup>[1]</sup>。PGLC 用于微生物鉴定、分析化学结构和组成极为复杂的生物大分子, 国内外已有不少报道<sup>[2-8]</sup>。1967 年 Merritt<sup>[9]</sup> 用它对 10 种蛋白质进行过分析; 1981 年李兆麟<sup>[10]</sup> 对 19 株苏芸金杆菌亚种的菌体进行了鉴定。然而, 对来自细菌的晶体蛋白进行裂解气相色谱分析尚未见报道。已知苏芸金杆菌的蛋白质晶体是一种高效杀虫源毒素, 且有报道指出, 苏芸金杆菌伴孢晶体的形态和超微结构<sup>[11,12]</sup>及蛋白质、多肽与毒力<sup>[13]</sup>之间的密切关系。本文介绍了纯化的晶体蛋白裂解色谱图(亦称指纹图)的绘制方法, 从指纹图上的差异, 反映了苏芸金杆菌晶体蛋白在分子组成和构象<sup>[14]</sup>上的异同, 说明指纹图的差异与形态结构及蛋白质、多肽成分的差异有一定的对应性。

## 材料和方法

### (一) 供试菌株

本研究使用了 11 个菌株: TOL (*Bacillus thuringiensis* subsp. *solworthi*), 140 (*B. t.* subsp. *wuhanensis*), HD-2 (*B. t.* subsp. *thuringiensis*), T<sub>2</sub> (*B. t.* subsp. *t.*), 25 (*B. t.* subsp. *t.*), 8-25 (*B. t.* subsp. *galleriae*), HD-1 (*B. t.* subsp.

*kurstaki*), HD-73 (*B. t.* subsp. *kurstaki*), L-14 (未定亚种), Ky-S (*B. t.* subsp. *kyushuenensis*), 73E-10-2 (*B. t.* subsp. *darmstadiensis*)。

电泳纯蛋白质: 牛清白蛋白, 软蛋白, 溶菌酶。

### (二) 菌体的培养

将菌株接种于斜面或琼脂培养基上。培养基成份(%): 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.3, 葡萄糖 0.5, 琼脂 2, pH 7.0—7.2, 30±1℃ 培养 8—12 天, 菌体充分成熟, 芽孢晶体绝大部分脱落。

### (三) 晶体的提纯

菌体成熟后, 刮取菌苔, 离心洗涤数次, 然后按 Pendleton<sup>[15]</sup> 双相法或蔗糖密度梯度离心法<sup>[16]</sup>分离孢子和晶体, 以制备纯晶体, 各晶体的纯度(%)如下: TOL: 99.5; 140: 99.9; HD-2: 99.5; T<sub>2</sub>: 99.3; 25: 99.9; 8-25: 99.0; HD-1: 99.2; HD-73: 99.5; L-14: 99.1; Ky-S: 100; 73E-10-2: 99.8。各晶体分别加适量无菌蒸馏水, 以匀浆器充分混匀, 制备的悬液供色谱分析用。

### (四) 裂解色谱分析条件

根据晶体溶液的浓度, 用微量进样器取 5—10 μl, 注入裂解器的铂舟中, 置热风炉中吹干 10 分钟, 裂解炉温度稳定在 770℃, 进样前样品舟先在裂解炉进口处停留 2 分钟, 裂解时间 18 秒, PIPE 置 4.5 处, 进样口温度为 250℃。色谱柱: 长 2.1 m, 内径 3.2 mm, 内填涂 3% PEG-20M 的 Gas Chrom Q(80—100 目)。程

序升温: 开始 50℃, 保持 3 分钟后, 先以 7℃/min 上升至 116℃, 保持 2 分钟, 再以 6℃/min 上升至 170℃, 直至分析完毕。载气 (氮气): 50 ml/min, 氢气: 55 ml/min, 空气: 500 ml/min。双氢火焰离子化检测器, 灵敏度  $10^2 \times 2$ , 按上述参数编好程序, 每个样品至少重复分析 3 次。

## 结果与讨论

在菌体培养、晶体提纯和色谱条件都恒定的条件下, 经多次实验表明, 分析同一晶体样品, 在保留时间 3.5 分钟后的部分均可得到稳定和重现性良好的指纹图, 从每个样品的三张重复指纹图中选出一张, 并将图的基线用三条直线连接, 以校正基线 (图 1—4), 选出特征峰以数字标明, 用指纹图的峰群特征, 按归一化的峰高值, 以峰群总高比总峰高、峰高比总峰高值来分析彼此间的异同, 按上述条件, 11 种晶体蛋白均可得到 38—39 个色谱峰, 除 HD-73,

L-14 外, 都具有四组峰群 (第一组: 7、9、11, 第二组: 17、18、19、20, 第三组: 27、29、30, 第四组: 36、37) 并都有与标准蛋白轮廓相似的裂解色谱图, 各晶体蛋白的指纹图, 不仅有峰群 (峰群峰总高/总峰高) 的特异性, 亦有峰高比值 (同一指纹图中不同峰号的峰高比值与另一指纹图中相应峰号的峰高比值相比较) 的特异性。综其特点, 可将绘制的指纹图分为七类。

第一类是 TOL (图 1) 和 140, 整个图型的第 7、18、29 号峰高相差不大, 呈凸形。它们的共同特征是:  $(7+9+11)/\Sigma = 0.28$  ( $\Sigma$  表示总峰高, 下同);  $9/\Sigma = 0.085$ ;  $29/\Sigma = 0.12$ 。第三组的 29 号峰虽都高于 27 号峰, 但两者的 29/30 比值 (同一指纹图中, 不同峰的峰高比值和样品的性质有关, 不取决于进样量) 相差甚远。另外, 从其他峰高比值项 (表 1) 的不同, 亦可区分 TOL 和 140 是两个不同的晶体蛋白, 这与它们经 SDS-PAGE 分析结果相符<sup>[3]</sup>。TOL 和 140 有相同的主要蛋白质带和不同的次要蛋

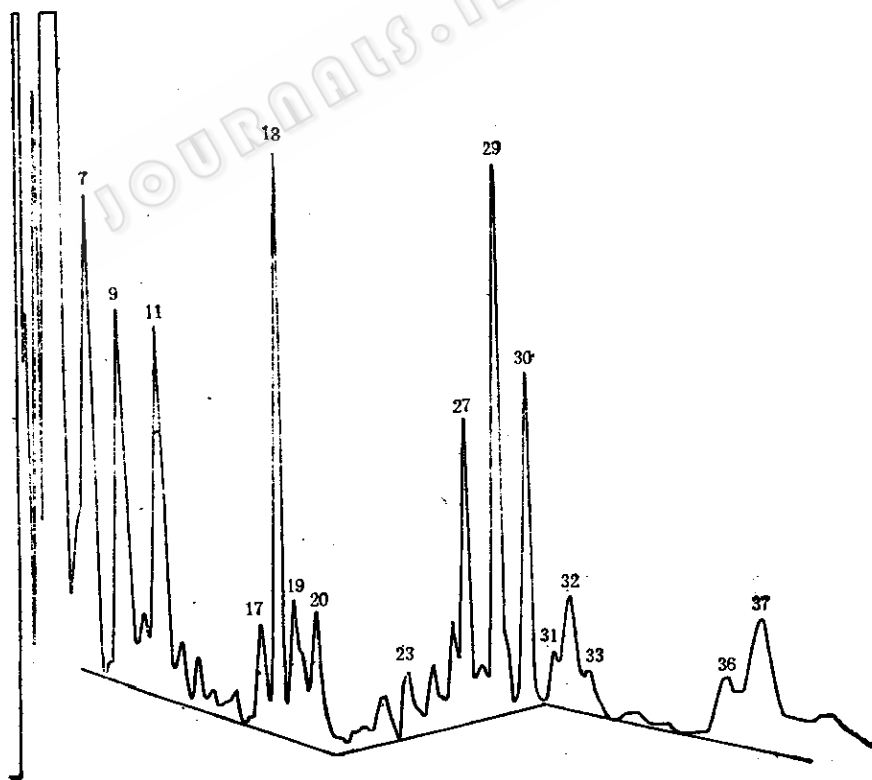


图 1 TOL 裂解色谱图

表 1 归一化色谱峰高数据比较

样品	峰 高 (cm)													峰 高 比 值 (%)						
	7	9	11	17	18	19	20	23	27	29	30	其他各峰	( $\Sigma$ )总峰	9/ $\Sigma$	7+9+11/ $\Sigma$	17+19+20/ $\Sigma$	17+18+19+20/ $\Sigma$	23/ $\Sigma$	29/ $\Sigma$	29/ $\Sigma$
TOL	9.1	7.1	7.1	1.2	11.1	12.2	2.6	1.2	5.8	10.5	6.4	18.3	83.4	8.5	28	61	21		164	12
140	8.4	6.2	6.2	1.5	11.2	2.2	2.9	0.8	5.4	8.6	3.4	16.3	72.9	8.5	28	57	24		253	12
HD-2	7.3	6.6	5.8	1.6	9.1	2.3	1.8	1.2	4.5	9.3	4.5	15.4	69.4	9.5	28	63	21.3		206	13.4
T <sub>1</sub>	9.1	2.6	5.6	2	10.9	2.4	2.6	0.7	6.3	10.1	4.9	17	74.2	3.5	23	64	24		206	13.6
25	7.2	5.6	5.1	1.1	7.7	1.6	2.2	0.4	3.6	5.2	2.4	12.2	54.4	10	32	64	21.8		216	9.5
8-25	6.6	4	4.9	1.3	7.3	1.9	1.6	1.1	4.3	6.1	3.5	12.7	55.3	7	28	65	21		174	11
HD-1	7.2	2.6	4.9	1.2	7.4	1.5	1.6	0.4	4.8	8.8	3.8	10.8	55	4.7	27	58	21		231	16
HD-73	4.9	8.8	4.3	2.6	10.4	6.9	2.1	9.1	3.2	5.2	1.2	33.5	92.2	9.5	19.5	111	23	9	433	5.6
L-14	3.9	6.7	3.5	2.5	9.4	4.8	1.9	12.2	3.0	5	2.3	17.3	72.5	9	19.4	97	25	16.8	217	6.8
Ky-S	8	7.1	5.2	1.5	9.9	2.1	2.1	2.3	6.2	5.8	2.2	17.2	69.6	10	29	57	22	3	263	8.3
73E-10-2	8.5	5.1	5.8	1.5	7.6	1.8	2.0	0.8	5.6	5.3	2.7	14.3	61	8	31	69	21		196	8.6

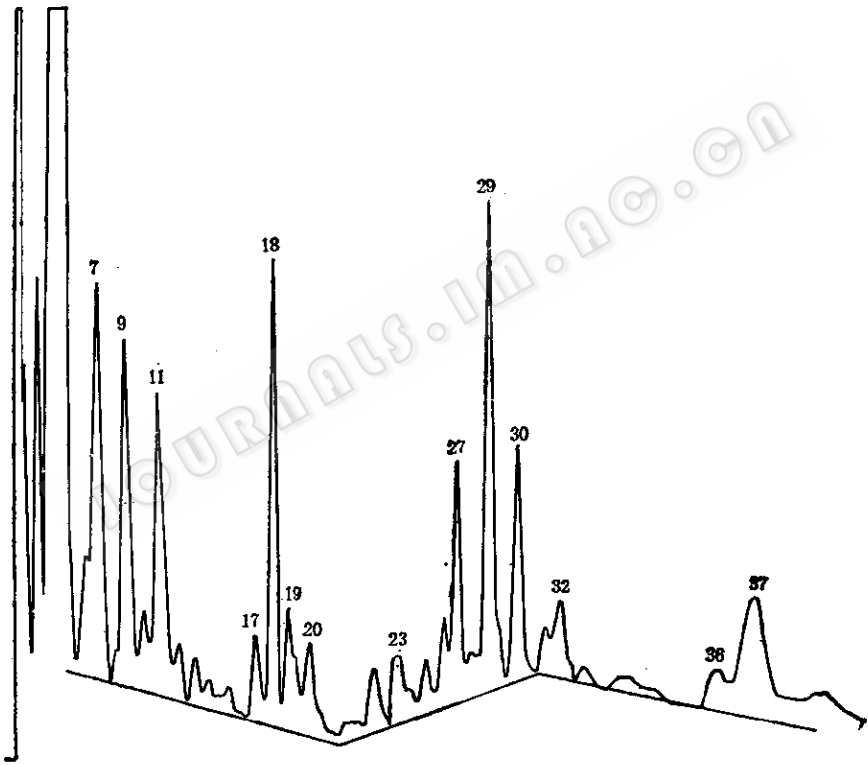


图 2 HD-2 裂解色谱图

白质带。

第二类为 HD-2 (图 2), T<sub>2</sub> 和 25, 它们的共同特征是: 整个图型的第 7、18、29 号峰高的顶点在同一条直线上, 25 稍有偏转,  $(17+19+20)/18 \approx 0.64$ 。如果从  $(17+18+19+20)/\Sigma$  的比值看, HD-2 (0.213) 和 25 (0.218) 很为相近, 若从 29/30 比值 [HD-2 (2.06), T<sub>2</sub> (2.06)]

和 29/ $\Sigma$  的比值 [HD-2 (0.134), T<sub>2</sub> (0.136)] 看, HD-2 与 T<sub>2</sub> 更为接近。指纹图分析结果表明 HD-2, T<sub>2</sub> 和 25 是在分子组成和构象上极为相似的三种晶体蛋白。据 SDS-PAGE 分析, 也证明它们是几乎完全相同的三种蛋白质晶体<sup>[13]</sup>。

第三类是 8-25 和 HD-1, 第一组的第 7、

9、11 号峰高呈高低高形(见表 1), $(17+18+19+20)/\Sigma = 0.21$ 。 $(7+9+11)/\Sigma [8-25 \times (0.28), \text{HD-1}(0.27)]$  和  $27/30 [8-25(1.23), \text{HD-1}(1.26)]$  的比值相近。其他峰高比值项不甚相同,这些表明 8-25 和 HD-1 是两个既有相同点又有差别的晶体蛋白。HD-1 具有大而规则的菱形晶体,这一点它又与 140 相同<sup>[1]</sup>,从色谱峰高数据(表 1)的  $(7+9+11)/\Sigma$ ,  $(17+19+20)/18$  和  $29/30$  项的比值接近也反映了这种相同点。三者经 SDS-PAGE 分析结果表明<sup>[13]</sup>,8-25 和 140 具有更多的相似性;HD-1 和 8-25 具有相同的主要蛋白质带,但低分子量蛋白带不同。

第四类是 HD-73, 指纹图明显的分为五组峰群,第一组有明显 7、9、10、11 四个峰(以上只有三个峰),第二组的第 19 号峰高分别是第 17、20 号峰的 2.6 倍和 3 倍,第三组的第 23 号峰与其周围小峰,形成了新的峰群,它的峰高占总峰高的 9.8%,第四组峰为 27、28、29、31、32

号峰,有明显的第 28 号峰,以上特征表明 HD-73 的晶体蛋白具有其本身的特性。

第五类是 L-14 (图 3), 指纹图也可分为五组峰群, $(7+9+11)/\Sigma$  有与 HD-73 相同的比值。但第 9、18、23 号峰高依次递增(表 1),第三组的第 23 号峰高占总峰高的 16.8%,这些差异亦可区别 L-14 和 HD-73 不同。

第六类是 Ky-S (图 4), 指纹图分为四组,但第三组的峰群明显地不同于前五类,第 27、29 号峰高接近(表 1),在第 29 号峰与第 30 号峰之间,又出现一新的窄峰(不同时间的五张重复指纹图中都有)。另外,在第 18 号峰到第 29 号峰之间有明显的 7 个小峰,这些特征说明 Ky-S 的晶体蛋白在分子组成和构象上有其自身的特异性。

第七类是 73 E-10-2, 它不同于前六类的特征是第 7、18、27 号峰高呈直线型下降,第 27、29 号峰几乎相等。从其他峰高比值项看,73E-10-2 也应归为另一类型。

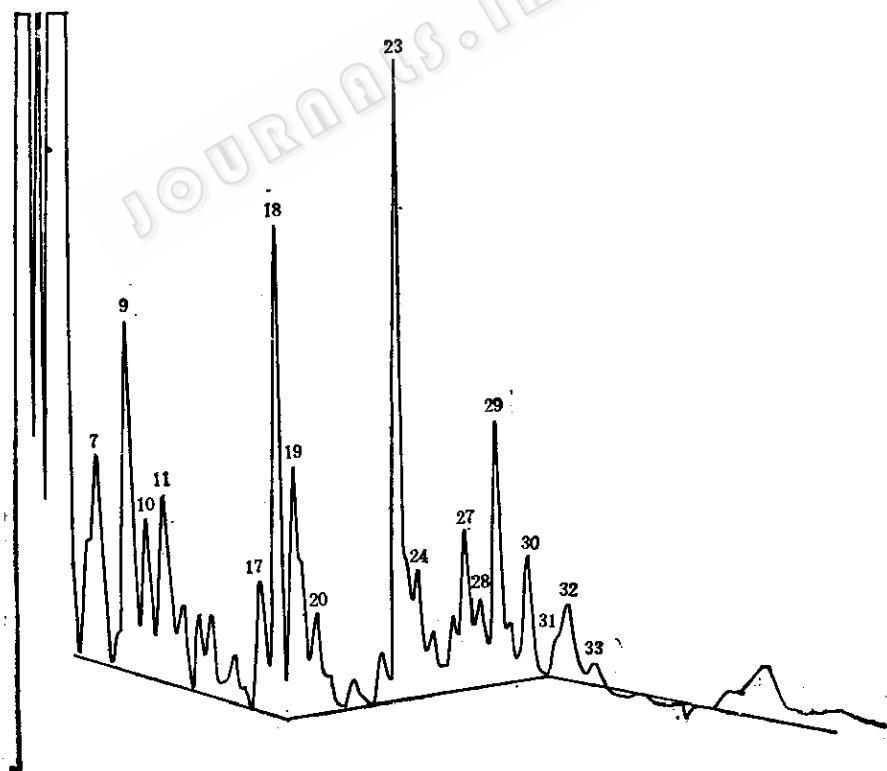


图 3 L-14 裂解色谱图

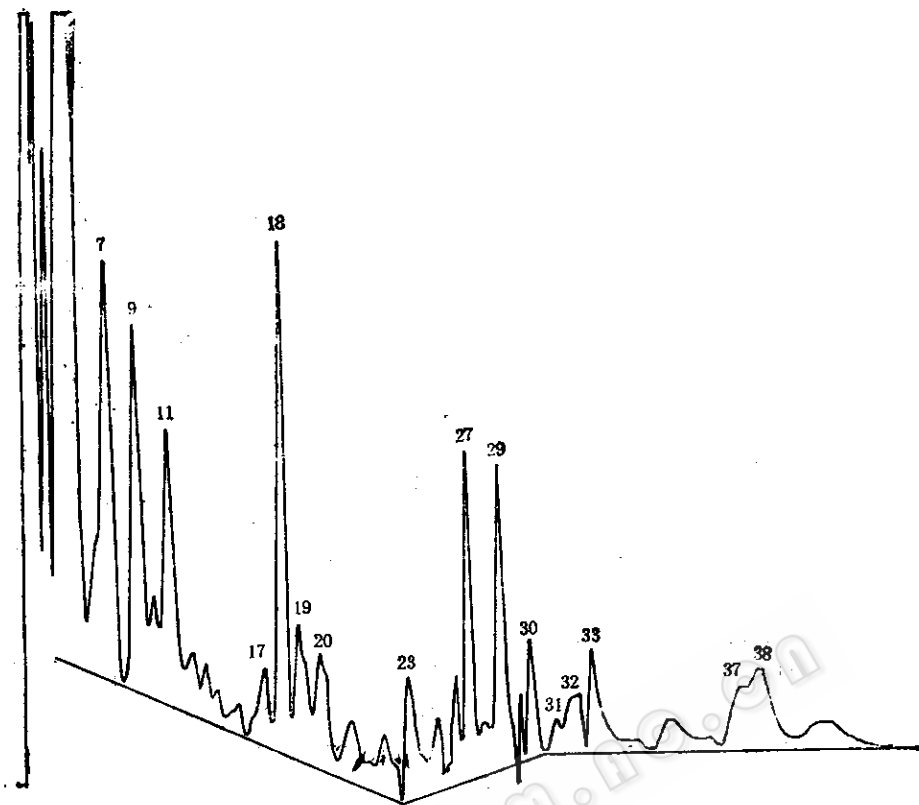


图4 Ky-S 裂解色谱图

在进行指纹图的差异性分析时,对样品数较多(20个以上)或彼此间的特异性不明显的指纹图,宜用统计学方法分析。

用 PGLC 分析生物大分子,据文献报道<sup>[1]</sup>,多采用极性柱。为了改善对高沸点化合物的分离能力,选用了低配比的固定相<sup>[2]</sup>。裂解色谱会受到各种色谱条件和裂解条件的影响,在对色谱条件逐个实验的基础上,我们发现裂解色谱对蛋白质特征峰的表征决定于固定相的选择。而裂解温度、时间、进样量和载气流速在一定范围内对绘制的指纹图影响不大。

本研究用 PGLC 法对来自 11 株苏芸金杆菌亚种的晶体蛋白进行了化学模式表征,指纹图分类结果和特征,能与电镜观察结果、毒力效应和 SDS-PAGE 蛋白质、多肽图谱基本相符。证明 PGLC 法表征、鉴别晶体蛋白的可行性。指纹图上的差异,揭示了晶体蛋白在组成和构象上的多样性。

PGLC 以化学分类法间接地表征晶体蛋白在整体组成和构象上的差别,可为鉴定完全相同或不同的蛋白质提供佐证,如能将这种代表蛋白质信息特征的色谱峰数据输入计算机储存,有可能为自动鉴定、检索蛋白质提供灵敏、准确、快速的新方法。

#### 参 考 文 献

- [1] 周方,朱厚础译:气相色谱法在微生物学和医学中的应用,科学出版社,1984。
- [2] Reiner, E.: *Nature*, 206: 1272—1274, 1965.
- [3] Reiner, E.: *J. Gas chromatogr.* 5: 65, 1967.
- [4] Reiner, E. et al.: *Am. Rev. Respir. Dis.* 99: 750, 1969.
- [5] Emswiler, B. S. and Kotula, A. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 35(1): 97, 1978.
- [6] Reiner, E. and F. L. Bayer, J.: *Chromatogr. Sci.* 16: 623, 1978.
- [7] 周方等:科学通报,29(22): 1394, 1984。
- [8] 朱湘民等:微生物学报,28(1): 62, 1988。
- [9] Merritt, C. et al.: *J. Gas chromatogr.*, 5: 96, 1967.
- [10] 李兆麟等:微生物学报,21(4): 457, 1981。

[11] 李荣森,陈涛: 微生物学报, 21(3): 311,1981。

[12] 李荣森等: 微生物学报, 23(4): 343, 1983。

[13] 李荣森: Society for invertebrate pathology program and abstract, SIP XX Annual Meeting, University of Florida, Gainesville, Florida U. S. A. July 20—24, 1987. pp. 92—93.

[14] 鲁子苕: 蛋白质化学,科学出版社,1982。

[15] Pendleton, I. R. and R. B. Morrison: *Nature*, 212: 728, 1966.

[16] Thomas, W. E. and D. J. Ellar,: *J. Cell Sci.* 60: 181, 1983.