

聚丙烯酰胺凝胶电泳对几个苏芸金杆菌变种 营养细胞酯酶图型的分析

张用梅 杨一平 陈宗胜*

(湖北省微生物研究所, 武汉)

Norris^[1] 曾提出用淀粉凝胶电泳分析营养细胞酯酶类型作为苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 *B. t.*) 分类鉴定的方法之一。并将 *B. t.* 血清型 1—9 中的 12 个变种定为 10 个酯酶型。他的这一方法后来为大家所承

认^[2,3]。我国也曾用此方法对 *B. t.* 进行过鉴定^[4,5]。我们采用淀粉凝胶电泳时^[4], 由于淀粉水解过程烦琐, 凝胶性能不易控制而影响了实

* 方慈琪同志对此工作曾给予热情指导; 蔡宜权同志给予多方面帮助; 本文照片为我所电镜组拍摄。

验的重复性。为了克服这些缺点,我们改用聚丙烯酰胺凝胶电泳,重点对 *B. t.* 血清 3 型的 3 个菌株的酯酶图型进行了分析。实验结果证明“7216”与 *B. t. var. Kurstaki* 具有相同的酯酶图型,而与同一个血清型中的另一个变种 *B. t. var. alesti* 的酯酶图型有明显区别。我们认为聚丙烯酰胺凝胶电泳具有快速、重复性高等优点,可为 *B. t.* 的分类鉴定提供一种快速方法。本文以鉴定“7216”为目的,同时试图探讨建立快速检定 *B. t.* 酯酶图型的方法。

材料和方法

- 1. 电泳仪: Dyy-III 电泳仪一套(北京科学仪器修配厂),电泳管长 90 毫米,内径 4.4 毫米。
- 2. 试验菌: “7216”(湖北省天门县微生物试验站分离); *B. t. var. Kurstaki*(系中国科学院动物研究所由日本引进); *B. t. var. alesti*, *B. t. var. aizawai*, *B. t. var. galleriae* (以上 3 株系武汉大学生物系由英国引进)。
- 3. 试剂: 凝胶缓冲液为 0.05 M Tris-0.004 MEDTA, pH8.8;以 0.025M 硼砂溶液(pH9.0)作电极槽缓冲液^[6]。染色液^[7,8]按下述比例配制: 0.1M Tris-顺丁烯二酸缓冲液 50 毫升, pH 6.4; 1% α -醋酸萘酚酯(溶于 50% 丙酮中)2 毫升;固蓝 B 盐 50 毫克。
- 4. 酯酶液制备: 经活化的斜面菌种转接于肉膏蛋白胨平皿中,在 30—32℃ 下培养 15—17 小时。收集菌苔于研钵中,加 800 号磨粉碾磨。当镜检破碎细胞达 95% 以上时,加入少量蒸馏水,洗下破碎物,4,000 转/分离心 30 分钟,收获上清酶液。
- 5. 凝胶制备与加样: 按常规方法制备聚丙烯酰胺凝胶。样品液由一份酶液加一份 25% 蔗糖液,再加 1 滴 0.004% 溴酚兰组成。待凝胶聚合完全,用滤纸条吸去凝胶表面水层后,即加入上述样品液 0.05—0.1 毫升。并小心地加入上下槽电极缓冲液。

6. 电泳: 上槽接负极,下槽接正极。开始以 1 毫安/管进行电泳,待样品进入凝胶后,调至 2—3 毫安/管,一般取 2 毫安/管。电泳时间

- 1 小时左右。
- 7. 染色与记录: 电泳毕取出凝胶,在小试管中分别染色。在室温下染 0.5—1 小时,酯带呈红色。倾去染液加入 7% 醋酸(需多次更换)洗脱和固定。
- 电泳完毕后,按常规的方法记录和计算酯酶区带的相对泳动率(Rm)^[9]。根据各菌株酯酶区带的数目、强弱带分布特征及区带的相对泳动率,比较各菌株酯酶图型的异同。

实验结果

我们采用 7.5% 浓度的凝胶进行电泳,并以 7.0%、8.0% 和 9.0% 的浓度进行比较,现将数十次电泳结果归纳如下:

1. “7216”和 *B. t. var. Kurstaki*(HD-1)的酯酶图型: 两株菌的酯酶均为 5 条区带(图 1)而且各区带的 Rm 值极为相近(表 1)。

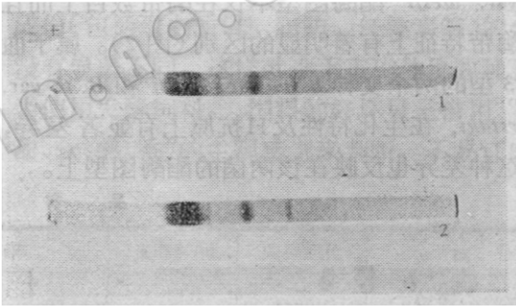


图 1 “7216”(1) 和 *B. t. var. Kurstaki* (2) 的酯酶图型

表 1 “7216”和 HD-1 在 7.5% 凝胶中酯酶区带的 Rm 值

酶 样	区 带 的 Rm 值				
“7216” A* HD-1 A	0.577	0.667	0.71	0.77	1.00
	0.586	0.658	0.706	0.718	0.945
“7216” B HD-1 B	0.596	0.645	0.67	0.77	0.947
	0.555	0.645	0.71	0.774	0.967
“7216” C HD-1 C	0.525	0.625	0.70	0.736	0.936
	0.495	0.58	0.665	0.75	0.955

* A、B、C 为不同批所提取的酶样。

在不同浓度的凝胶中(表 2),两菌的酯酶区带数相同,其图型也一样。但各区带的相对泳动率略有变化。除了走在最前面的一小分子

组份外, 各区带的泳动率随凝胶浓度的增高而降低。

表 2 在不同浓度的凝胶中“7216”和 HD-1 的酯酶区带和 R_m 值的变化

凝胶浓度(%)	酶样	各区带的 R _m 值					
7.0	“7216”	0.635	0.70	0.76	0.81	0.95	
	HD-1	0.62	0.67	0.76	0.82	0.95	
7.5	“7216”	0.557	0.667	0.719	0.77	1.00	
	HD-1	0.586	0.658	0.706	0.778	0.945	
8.0	“7216”	0.416	0.497	0.605	0.713	0.94	
	HD-1	0.421	0.503	0.611	0.693	0.925	
9.0*	“7216”	0.457	0.479	0.558	0.775	0.942	
	HD-1	0.476	0.514	0.579	0.771	0.941	

* 以 3 毫安/管电流进行电泳, 其它电泳电流为 2 毫安/管。

2. *B. t. var. alesti* 的酯酶图型: 该菌酯酶区带 4 条。与 Norris 用淀粉凝胶电泳分离的图型相同。“7216”及 HD-1 的酯酶图型与 *B. t. var. alesti* 酯酶图型不仅在酶带数目上而且在酶带特征上有着明显的区别(图 2)。属于血清 3 型的两个变种 *B. t. var. alesti* 和 *B. t. var. Kurstaki*, 在生化特性及 H 抗原上有显著差异, 而这种差异也反映在该两菌的酯酶图型上。

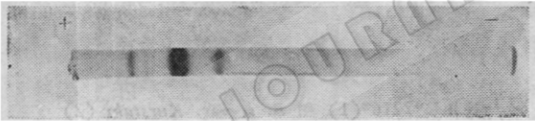


图 2 *B. t. var. alesti* 的酯酶图型

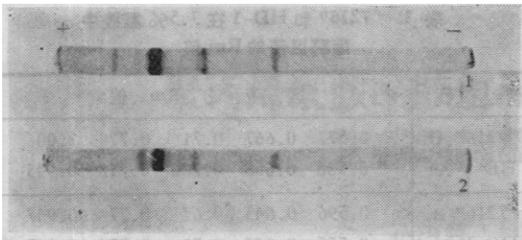


图 3 *B. t. var. galleriae* (1) 和 *B. t. var. aizawai* (2) 的酯酶图型

3. *B. t. var. galleriae* 和 *B. t. var. aizawai* 的酯酶图型: 这两个变种在 Norris 的实验中表现为同一个酯酶型(*galleriae* 型), 但在盘状电泳中, 我们发现两株菌的酯酶图型不相同(图 3)。*B. t. var. galleriae* 靠阳极端有一条泳动

率高的区带, 而 *B. t. var. aizawai* 则无此区带。

讨 论

1. 实验表明, “7216”具有同 *B. t. var. Kurstaki* 相同的酯酶图型, 而与 *B. t. var. alesti* 的酯酶图型有明显区别, 在亲缘关系上, 证明“7216”和 *B. t. var. Kurstaki* 具有同源性。这为结合生化及血清学反应结果确定“7216”的分类地位提供了依据。

2. 通过对标准菌种 *B. t. var. alesti*, *B. t. var. Kurstaki*, *B. t. var. galleriae* 及 *B. t. var. aizawai* 的对比实验, 发现采用本试验方法可以分离出清晰的酯酶区带, 其数目不少于淀粉凝胶电泳分离的区带数。而且分别用不同浓度的凝胶进行电泳, HD-1 和“7216”的酯酶图型是稳定的。这表明用聚丙烯酰胺凝胶电泳代替淀粉凝胶电泳对 *B. t.* 营养细胞酯酶进行分析, 也能得到很好的分离效果。同时, 与淀粉凝胶电泳相比, 还具有如下优点: 凝胶制备方便, 重复性好, 分辨率高, 电泳时间短, 操作简便, 便于观察结果等。我们认为这一方法可为 *B. t.* 的分类提供一个快速鉴定的途径。

3. *B. t. var. galleriae* 和 *B. t. var. aizawai* 在淀粉凝胶电泳中具有相同的酯酶型, 从我们初步工作看, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 这两株菌的酯酶图型不同。这可能为聚丙烯酰胺凝胶电泳比淀粉凝胶电泳分辨率更高所引起。

4. “7216”和 HD-1 在不同浓度的凝胶中 R_m 值有些变化。除了靠近阳极端泳动至最前面的一细带外, 各区带的 R_m 值随凝胶浓度的增大而降低。这表明在 7—9% 凝胶浓度范围内, 凝胶对其大多数组份具有较好的分子筛效应; 而靠近阳极端的一区带, 其 R_m 值不受凝胶浓度变化的影响, 表明该组份分子较小, 在此浓度范围内所形成的凝胶孔径, 对其分子筛效应极微。

在 9% 浓度凝胶中 R_m 值偏高, 是由于该浓度下的电泳电流为 3 毫安/管, 比其它浓度下的电泳电流(2毫安/管)略高, R_m 值偏高为电场强度增强所致。

5. “7216”和 *B. t. var. kurstaki* 的酯酶图型相同,但作为比较菌株的 *B. t. var. Kurstaki*, 国内外目前尚未报道其营养细胞酯酶图型,因此,要决定这两株菌在分类上属于哪一种酯酶型,有待于用聚丙烯酰胺凝胶电泳全面考察 *B. t.* 各变种的酯酶型后才能定论。

参 考 文 献

- [1] Norris, J. R.: *Appl. Bact.*, 27: 439—447, 1964.
[2] De Barjac, H. and A. Bomefoi: *Entomophaga*,

18(1): 5—17, 1973.

- [3] 站沢启夫ウ: 化学と生物, 14 (4): 214—221, 1976.
[4] 湖北省微生物研究所虫菌组: 微生物学报, 16 (1): 12—16, 1976.
[5] 武汉大学生物系微生物专业 70 级工农兵学员杀虫菌鉴定小组: 微生物学报, 15 (1): 5—14, 1975.
[6] 兰州生物制品研究所生化组: 生物化学与生物物理进展, 1978 年第 4 期, 45—48 页。
[7] Norris, J. R. and H. D. Burges: *J. Insect Pathol.*, 5: 460—472, 1963.
[8] Baillie, A. and J. R. Norris: *J. Appl. Bact.*, 26(1): 102—106, 1963.
[9] 莽克强等: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 北京, 1975。