

类产碱假单胞菌杀虫蛋白的 N 端鉴定及抗体制备*

丁诗华 杨志荣**

(四川大学生物工程研究所 成都 610064)

关键词: 类产碱假单胞菌, 杀虫蛋白, 纯化, N 端序列, 抗体

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 05-0642-04

细菌杀虫毒素蛋白是一类具有专一性杀虫活性的毒素蛋白,在生物防治领域具有潜在的应用价值。目前发现的细菌杀虫毒素蛋白的种类仍十分有限,主要集中于芽孢杆菌属(*Bacillus*),如苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)^[1]、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)^[2]。已从这些细菌菌株中分离或鉴定了多种杀虫毒素蛋白,其中仅在苏云金芽孢杆菌的各种菌株中就已发现上百种杀虫晶体蛋白,其杀虫机制也得广泛而深入的研究^[3]。最近的研究表明,从自然罹病死亡的蝗虫体内分离出一株类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)也存在一种对昆虫有致毒作用的毒素蛋白,利用该菌发酵液进行毒力实验,发现对蝗虫有一定的杀虫活力^[4,5]。进一步研究表明,该杀虫毒素蛋白的分子量较低,为一种外毒素蛋白^[6]。为了阐明这种杀虫蛋白的分子本质和基因序列,进而揭示该杀虫蛋白的杀虫机制,我们从类产碱假单胞菌培养液中分离纯化出杀虫蛋白,并利用纯化杀虫蛋白进行 N 端序列测定及抗体制备,为杀虫蛋白的基因克隆奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

类产碱假单胞菌由本实验室保存,日本大耳白兔购自华西医科大学实验动物中心,细菌培养基成分为牛肉膏 35g、蛋白胨 100g、果糖 35g、NaCl 80g,定容至 1L。

1.2 方法

1.2.1 杀虫蛋白的分离纯化:收集类产碱假单胞菌培养物上清液,采用超滤系统(Millipore Ultrastak DI)进行超滤。收集 10~40kD 的蛋白质,上样于经缓冲液 A(50mmol/L Tris-HCl, pH 7.8)平衡的 DEAE-纤维素-32 柱,用含 0~0.6mol/L NaCl 的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱。收集含活性峰的洗脱液,经透析除盐、PEG20000 浓缩后,再用 Sephadex G-100 柱进行纯化,以缓冲液 A 为洗脱液。

1.2.2 SDS-PAGE:采用 Ausubel 等介绍的方法^[7],分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 4.0%。考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.3 杀虫蛋白的活性鉴定:采用 de Leon 等(1995)的微滴饲喂法进行测定,实验动物为黄脊竹蝗(*Ceracris kiansu*)。用微量注射器取 30 μ L 杀虫蛋白溶液(含 20%蔗糖)饲喂饥饿的 3 龄蝗虫,对照组则饲喂 20%蔗糖溶液。经饲喂的蝗虫再转移至玉米幼苗饲养 5d,观察蝗虫死亡情况,以此鉴定待测样品的杀虫活性。

1.2.4 杀虫蛋白的 N 端分析:纯化杀虫蛋白进行 Tricine-SDS-PAGE 后^[8],按 Matsudaira 的方法^[9]转至 PVDF 膜,采用 Beckman LF3000 蛋白质自动测序仪进行测定。

* 国家自然科学基金项目(39770014)

** 通讯作者

作者简介:丁诗华(1966-),男,四川隆昌人,西南农业大学副教授,博士,现从事生物化学与分子生物学研究。

收稿日期:2001-01-31,修回日期:2001-06-06

1.2.5 抗体制备:细菌培养物上清液经超滤及离子交换层析后,获得杀虫蛋白粗品。按 Ausubel 等方法^[7],加入等体积 $2 \times$ SDS 样品缓冲液,沸水加热 5min,10000r/min 离心 1min,取上清液进行 SDS-PAGE。切取 26kD 处的凝胶条带,置于液氮及 37°C 反复冻融,再用等体积弗氏完全佐剂乳化。取适量乳化抗原对家兔进行皮内多点注射。4 周后再用弗氏不完全佐剂乳化的抗原进行第 1 次加强免疫,2 周后再进行第 2 次加强免疫。若有必要,可按同样的方法进行第 3 次加强免疫,以获得高滴度的抗血清。免疫开始前及每次免疫 1 周后,用耳缘静脉法采血检测。

2 结果

2.1 杀虫蛋白的纯化和鉴定

采用适当孔径的滤膜对细菌培养物上清液进行超滤,可去除分子量在 40kD 以上及 10kD 以下的多肽物质,所获得的 10~40kD 蛋白质样品经检测具有杀虫活性。再用 DEAE-纤维素柱层析对该样品进一步纯化,结果表明杀虫活性峰主要集中于洗脱体积为 88~112mL 之间(图 1A,峰 II)。收集活性部分进行 Sephadex G-100 柱层析,发现杀虫活性峰主要分布在 100~108mL 之间(图 1B,峰 III)。合并该活性部分,经 PEG20000 浓缩后进行 SDS-PAGE,结果如图 2 所示,纯化样品出现一条均一的蛋白质带,分子量约 26kD,提示样品达到电泳纯。各纯化步骤的杀虫活性鉴定结果见表 1。

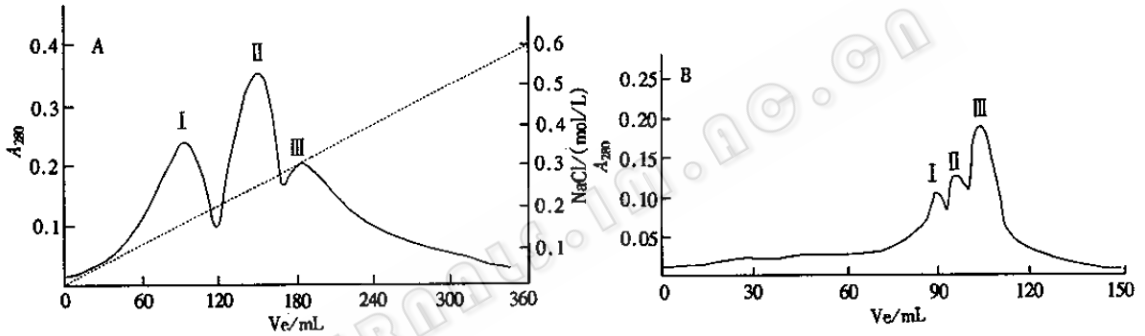


图 1 DEAE-纤维素-32 柱层析(A)和 Sephadex G-100 凝胶过滤(B)
—— A_{280} ;NaCl 浓度。

表 1 各纯化步骤的杀虫活性鉴定结果

纯化步骤	蛋白样品用量 ($\mu\text{g}/\text{head}$)	供试虫数/头	死亡率/%
细菌培养物上清液	180	25	36
超滤	32	30	30
DEAE-纤维素柱层析	5.3	20	40
Sephadex G-100 柱层析	1.0	19	37
对照	0	76	4

2.2 杀虫蛋白的 N 端分析

蛋白质 N 端序列测定可用于目标蛋白基因的引物设计、寡聚核苷酸探针制备以及目标基因的确证。为了提高杀虫蛋白 N 端测序的准确性,将纯化杀虫蛋白进行 Tricine-SDS-PAGE 后,转移至 PVDF 膜。该 PVDF 膜经 10 个循环的测定后,获得杀虫蛋白 N 端

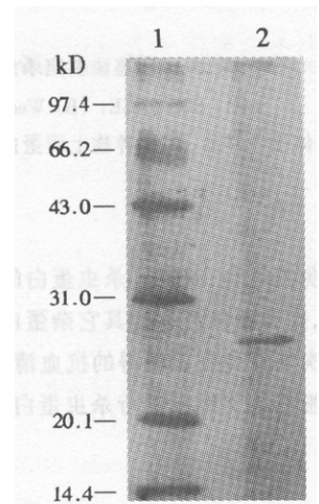


图 2 SDS-PAGE 检测纯化杀虫蛋白
1. Marker; 2. 纯化的杀虫蛋白。

10个氨基酸残基的排列顺序: Gly Val Trp Gln His Gln Ser His Ala Ala。据此可合成杀虫蛋白基因的寡聚核苷酸探针,从而为杀虫蛋白基因阳性克隆的筛选提供条件。

2.3 杀虫蛋白的抗体制备

采用 SDS-PAGE 法纯化粗杀虫蛋白,电泳结束后纵切凝胶中含分子量标准的边缘部分,经考马斯亮蓝 G-250 染色后,获得清晰的蛋白质带。根据染色结果,确定并切取凝胶中 26kD 的蛋白质带,经弗氏佐剂充分乳化后用于免疫家兔。采集家兔血清,用免疫双扩散法检测抗体滴度,结果表明,第 2 次加强免疫后获得的抗血清在稀释 16 倍时仍与粗杀虫蛋白形成沉淀线,而第 3 次加强免疫后获得的抗血清滴度则高达 1:64,提示用杀虫蛋白凝胶条带制备的乳化抗原经适当免疫程序后可产生相应的抗体。

2.4 杀虫蛋白抗体的鉴定

第 3 次加强免疫后,获得较高滴度的抗血清。为了准确鉴定该抗血清的反应性,采用间接 ELISA 法进一步测定。抗体稀释度分别为 1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200,以阴性血清为对照,于 405nm 处测定光吸收值。当稀释抗体 A_{405} 与对照血清 A_{405} 的比值大于 2.1 时,即判定为阳性。测定结果表明,在上述稀释条件下,该比值依次为 11.2、9.7、7.6、5.5、3.8、2.3、1.4、1.1。可见,在本实验条件下,杀虫蛋白抗体出现阳性反应的最大稀释度为 1:12800。

为了鉴定杀虫蛋白抗血清的特异性,将菌体蛋白、培养物上清液蛋白及超滤后获得的样品进行 SDS-PAGE,转至硝酸纤维滤膜后进行 Western 印迹分析。所得结果如图 3 所示,只有 26kD 蛋白质出现明显的免疫亲和反应,说明制备的杀虫蛋白抗血清能专一性识别杀虫蛋白。

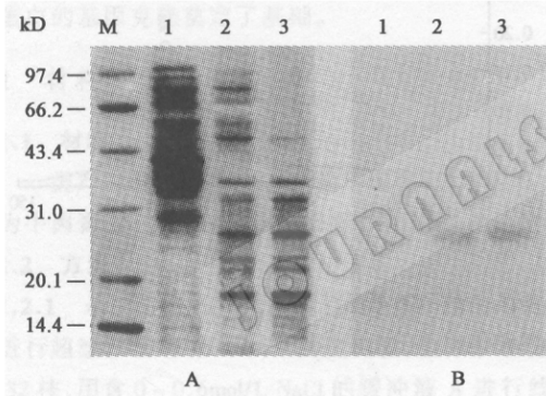


图 3 Western 印迹法鉴定杀虫蛋白抗血清

(A) SDS-PAGE; (B) Western blot.

1. 菌体蛋白样品; 2. 培养物上清蛋白样品; 3. 超滤蛋白样品。

抗原免疫家兔,获得了杀虫蛋白的抗血清。Western 印迹分析显示,该抗血清可专一性识别 26kD 的杀虫蛋白,而与菌体产生的其它杂蛋白不发生交叉反应,提示该抗血清具有高度特异性。ELISA 法检测表明,第 3 次加强免疫后获得的抗血清在稀释度达 1:12800 时仍呈阳性反应,说明该抗血清具有很高的反应活性。根据本文结果进行杀虫蛋白基因克隆和表达调控的研究仍在继续中。

3 讨论

昆虫病原性类产碱假单胞菌可分泌一种杀虫毒素蛋白,对多种蝗虫有致毒作用。至今对该病原菌的研究仅局限于杀虫蛋白和代谢关键酶的理化性质^[6,10-12],尚未对杀虫蛋白的基因克隆和表达调控机制进行研究。本实验进行杀虫蛋白的 N 端序列鉴定和抗体制备研究,可为杀虫蛋白的基因克隆和表达调控研究奠定基础。实验结果表明,采用超滤、离子交换层析及凝胶过滤等步骤,可从类产碱假单胞菌培养液中分离纯化出电泳纯的杀虫蛋白。通过测序分析,获得了杀虫蛋白 N 端 10 个氨基酸残基的排列顺序。

本实验在制备杀虫蛋白的特异性抗体时,采用 SDS-PAGE 法纯化杀虫蛋白,省去了繁琐的层析步骤。将杀虫蛋白凝胶条带用免疫佐剂乳化后,作为

参 考 文 献

- [1] Knowles B H. *Adv Insect Physiol*, 1994, 24: 275 ~ 307.
- [2] Charles J F, Nielson-LeRoux C, Delecluse A. *Ann Rev Entomol*, 1996, 41: 389 ~ 410.
- [3] Feitelson J S, Payne J. *Bio/Technology*, 1992, 10: 271 ~ 275.

- [4] 杨志荣,朱文,葛绍荣,等. 中国生物防治,1996,12:55~57.
- [5] 刘世贵,朱文,杨志荣,等. 微生物学报,1995,35:90~96.
- [6] 张文,杨志荣,朱文,等. 微生物学报,1998,38:57~62.
- [7] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Current Protocols in Molecular Biology. USA: John Wiley & Sons, Inc. 1997.
- [8] Schagger H, von Jagow G. *Anal Biochem*, 1987, 166:368~379.
- [9] Matsudaira P. *J Biol chem*, 1987, 262:10035~10038.
- [10] 丁诗华,杨志荣,唐亚雄,等. 微生物学报,1999,39:475~477.
- [11] 丁诗华,杨志荣,唐亚雄,等. 四川大学学报(自然科学版),1999,36:354~358.
- [12] 丁诗华,杨志荣,唐亚雄,等. 中国生物化学与分子生物学报,1999,15:911~916.

N-TERMINAL ANALYSIS AND ANTIBODY PREPARATION OF INSECTICIDAL PROTEIN FROM *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES* *

Ding Shihua Yang Zhirong**

(Institute of Bioengineering, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: The insecticidal protein from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* was an exotoxin which had toxicity on locusts. In order to elucidate its molecular properties an amino acid sequence, the insecticidal protein was purified from the culture supernatant by ultrafiltration, ion-exchange chromatography and gel filtration, and showed a single band on SDS-PAGE. Analysis of the purified insecticidal protein identified N-terminal sequence of ten amino acid residues. Its polyclonal antibody was also obtained by immunizing rabbit with the insecticidal protein recovered from SDS-PAGE gel. The antibody titer determined by ELISA method was 1:12800, indicating that it had high reactivity. Western blot analysis revealed that the antibody was specific to 26kD insecticidal protein, and did not cross-react with other proteins produced by the bacterium, suggesting that a specific antibody with high titer was obtained and could be used for further investigations of the gene cloning and expression of insecticidal protein.

Key words: *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, insecticidal protein, purification, N-terminal sequence, antibody.

* Project of Chinese National Natural Science Fund (39770014)

** Corresponding author