

苏芸金杆菌晶体与芽孢分离的研究

王 瑛 白 成 温 浩

(中国科学院动物研究所,北京)

用泛影葡胺 (Urografin) 等密度离心法与液体双相法共分离了苏芸金杆菌九个菌株 (分属六个变种) 的晶体与芽孢。两种方法分离的晶体纯度最高均可达 99% 以上。后一方法有时在有的晶体制剂中尚混杂一些营养体或孢子囊的膜。将两种方法进行了比较。

苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 产生数种毒素, 其中研究最多、应用最广的是晶体蛋白质毒素, 也称为 δ -内毒素。为了深入研究 δ -内毒素对昆虫致病的作用原理, 需将此菌产生的晶体与芽孢、营养体和碎片等分离开, 以获得纯晶体。所用方法主要是依据晶体与芽孢两者相对密度、表面特性、溶解度不同, 以及芽孢的萌发性等特点, 将晶体与芽孢分离开。自五十至六十年代相继建立了许多晶体与芽孢的分离技术以来, 较普遍使用的是液体双相分离法^[1-4], 近年来又报道了新的改进方法^[5]。碘化密度梯度介质新技术在生物学中广泛应用, 为这项分离工作, 提供了有利条件。

我们用国产泛影葡胺作密度梯度介质, 代替 Renografin^[6,7] 的等密度离心法和液体双相法进行苏芸金杆菌晶体与芽孢的分离, 同时摸索了分离条件, 并将这两种方法进行了比较。

材料与方法

(一) 等密度离心法

1. 菌的培养与洗涤

将菌接种在牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 培养至芽孢、晶体游离, 然后用蒸馏水将培养物洗下, 纱布过滤, 超声波处理, 使芽孢、晶体等在蒸

馏水中均匀分散。在 $12,500 \times g$ 离心 15 分钟, 去上清液, 将沉淀 (芽孢、晶体混合物) 再用蒸馏水与生理盐水各洗一次, 每次洗涤后均经离心, 收集沉淀物。将洗好的芽孢、晶体等用含 0.01% Triton X-100 的生理盐水, 配成每毫升含菌 200 毫克 (湿重) 的悬液, 置 4°C 冰箱备用。

2. 等密度离心与样品收集

用蒸馏水将泛影葡胺配成 50%、73% 两种浓度 (以原液 76% 为 100%, 用阿贝折射仪核对)。用梯度形成器在离心管内铺成连续的直线梯度, 置 4°C 数小时或过夜。将上述处理过的菌悬液用超声波处理, 直到芽孢、晶体等完全散开, 取此液 1 毫升铺在梯度介质的表面, 然后用 Omega 70 离心机水平转头 (离心管 6×12 毫升), 在 $28,000 \times g$ 4°C 离心 40 分钟。晶体、芽孢与营养体碎片等由于本身密度不同, 各自停留在梯度中相应的密度部位。分别用弯头注射针沿管壁插入, 收集各带样品, 测定每个样品带的折射指数。每个样品均用重蒸馏水洗 3 次 (中间用超声波处理), 冰冻干燥。

3. 纯度鉴定

① 将所得的晶体制剂与芽孢制剂在冰冻干燥前取数个样品, 加定量蒸馏水稀释, 用高倍相差显微镜观察计数。

② 用电子显微镜镜检, 计数。

本文于 1979 年 3 月 5 日收到。

本文承钦俊德先生指导; 照片为中国科学院生物物理研究所电镜室、本所扫描电镜室及暗室拍摄冲洗, 特此致谢。

(二) 液体双相分离法

利用互不混溶的两种液体对晶体和芽孢的亲合力不同(即晶体、芽孢表面特性不同)达到分离目的。通常用的液体是盐水与有机溶剂。我们参考 Pendleton 和 Morrison^[4] 的方法, 结合本实验室条件又进行了改进。

1. 菌的培养、洗涤(同前法)。

2. 纯芽孢制剂的制备

将洗好的芽孢、晶体等重新悬浮到蒸馏水中, 使成为每毫升含菌 0.07 克(湿重)的悬液。用电动搅拌机搅拌悬浮液, 此时液面上产生很多泡沫, 泡沫里含有大量芽孢与较少的晶体及营养体碎片。将泡沫取出, 再继续搅拌, 重复数次, 直至泡沫减少为止。将取出的泡沫用大量蒸馏水漂洗, 洗掉沾在泡沫上的晶体与营养体碎片, 然后将此泡沫取出, 冰冻干燥, 即得到纯芽孢制剂。

3. 双相分离与纯晶体制剂的收集

把上述去掉泡沫的悬浮液倒入分液漏斗中, 然后加入 1% 硫酸钠水溶液与四氯化碳(体积比为 7:6:7) 振荡 10 分钟左右, 静置 15 分钟, 此时有机相与水相分开。晶体与很少的芽孢进入水相。将水相吸出, 离心(转速同上), 去上清液。将沉淀用重蒸馏水洗一次, 离心, 再将沉淀物冰冻干燥, 即得到晶体制剂。

4. 纯度鉴定(同前法)。

结 果

(一) 等密度离心法

我们共试验了分属于苏芸金杆菌 5 个变种的 6 个菌株, 即: 7216、HD-1 (均属 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*), 7404 (*B. thuringiensis* var. *kenyae*), R₀-32 (*B. thuringiensis* var. *galleriae*), E-012 (*B. thuringiensis* var. *morrisoni*), E-013 (*B. thuringiensis* var. *tolworthi*)。

上述菌株的芽孢、晶体悬浮液离心后, 均得到三个清晰的带(图版 I-1, 从上至下: 营养体碎片带, 晶体带, 芽孢带)。晶体带在介质浓度 58—61% 之间, 平均浮力密度为 1.26 克/厘米³, 芽孢带在介质浓度

66—71% 之间, 平均浮力密度为 1.31 克/厘米³。7216、HD-1、E-012、E-013 菌株的晶体制剂中, 晶体纯度一般达 98—99%, 另外还有 1—2% 的芽孢, 晶体纯度最高可达 99.5% 以上。R₀-32 晶体纯度为 95—97%。加样品量均为 200 毫克菌(湿重), 离心后所得晶体制剂最多为 4.5 毫克。(见图版 I-2, 3)

7404 菌株的芽孢晶体悬浮液离心后虽也能得到清晰的带, 但晶体带多为絮状, 芽孢易与晶体结块。

(二) 液体双相法

我们共试验了 3 个变种的 6 个菌株, 即: 007 (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*), 7216、HD-1 (均属 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*), 75025、75023 (均属血清型 III, 未定具体变种名), 7404 (*B. thuringiensis* var. *kenyae*)。

用液体双相法分离所得的晶体制剂(图版 I-4, 5), 其晶体纯度最高可达 99% 以上, 此外还有不到 1% 的芽孢。在芽孢制剂中(图版 I-6), 芽孢纯度可达 99—100%。但在有的菌株的晶体制剂中, 有时混有部分孢子囊的膜或营养体, 不同菌株情况也不完全相同。7404 菌株混有的营养体或孢子囊的膜多达 3.5—15%。用此方法获得的晶体制剂最高产量约为分离前芽孢、晶体重量的 25%。

将 007、7216、HD-1、7404 菌株的纯晶体与纯芽孢分别对粘虫进行生物测定。试验结果表明, 晶体可使粘虫致死, 而芽孢对粘虫则无杀虫效果^[8]。

讨 论

应用等密度离心法进行苏芸金杆菌晶体与芽孢的分离, 就是根据芽孢与晶体密度不同, 将二者分开。因此, 首先要根据所需密度来选择介质。目前, 最常用的介质

有蔗糖、人工聚合蔗糖 (Ficoll)、碱金属盐 (如氯化铯), 以及碘化密度梯度介质 (如 Renografin, Metrizamide) 等。蔗糖溶解在水中最大密度为 1.3 克/厘米³, Ficoll 的最大密度为 1.23 克/厘米³, 而苏芸金杆菌芽孢平均密度约为 1.31 克/厘米³。因此, 上述两种介质不适用于芽孢、晶体的分离。曾有人用氯化铯分离芽孢、晶体^[9], 它的密度最高达 1.7 克/厘米³, 但氯化铯价格昂贵, 分离效果也不很理想^[6]。碘化密度梯度介质则具有许多优点, 不仅它的密度可以达到 1.4 克/厘米³, 而且渗透压、粘度都很低, 不损害被分离的物质。我们所选用的碘化密度梯度介质是医用的 X-射线造影剂——泛影葡胺。

用泛影葡胺作等密度离心与 Milne 等报道的用 Renografin 作等密度离心^[6], 所得结果基本一致。除获得三个清晰的带外, 晶体与芽孢的平均浮力密度值 (ρ)^[10] 与 Sharpe 等所报道的近似^[7]。Milne 等与 Sharpe 等所分离的菌株, 都是用液体培养基培养的, 而我们是使用固体培养基培养的, 同样获得较好的分离效果。Sharpe 等^[7]所述, 培养在固体培养基上的 *B. thuringiensis* var. *galleriae* 的晶体、芽孢分离较困难, 在梯度介质中晶体易与芽孢结块。在我们试验的几株菌中, R₀-32 分离后的晶体纯度比其它菌株的要差, 而 7404 最差。因此, 我们认为, 不同菌株的分离效果是不完全一样的。可试将培养基的成份进行改变, 看能否得到较好的分离效果。

我们所用的液体双相法与其他液体双相法比较, 优点在于在菌悬液与有机相混合之前, 先用漂浮法将菌悬液中的部分芽孢分出, 以利进一步纯化晶体, 并可兼得晶体与芽孢。此外, 所用的有机溶剂比其他

液体双相法也更为经济。

由上述两种方法比较可以看出, 等密度离心法获得的晶体纯度高, 但产量低, 所用试剂比较特殊, 试验条件要求更严格, 对个别菌株分离效果较差。液体双相法的产量较高, 所用药品价格低廉, 使用的仪器也较简单, 但晶体纯度有时不如等密度离心法的高, 特别是在有的菌株晶体制剂中, 有较多的营养体与孢子囊膜不易除去。一般可先用液体双相法进行分离, 如果不理想, 再改用等密度离心法, 或将两种方法联合使用。两种方法联合使用可以取长补短, 如用液体双相法所得晶体制剂中有较多营养体, 可再通过等密度离心法将营养体等分离出, 得到较理想的晶体制剂。由于每个菌株的最适分离方法不完全相同^[11], 因此必须针对具体菌株选择分离方法。

参 考 文 献

- [1] Angus, T. A.: *J. Insect Bath.*, **1**:97, 1959.
- [2] Bateson, J. B.: *Nature*, **205**: 622, 1965.
- [3] Delafield, F. P. et al.: *J. Bact.*, **96**: 713, 1968.
- [4] Pendleton, I. R. and R. B. Morrison: *Nature*, **212**: 728, 1966.
- [5] Barbara, J. A. and K. W. Nickerson: *Applied and Environmental Microbiology*, **36**: 625, 1978.
- [6] Milne, R. et al.: *J. Invert. Path.*, **29**: 230, 1977.
- [7] Sharpe, E. S. et al.: *Applied Microbiology*, **30**: 1052, 1975.
- [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] Fast, P. G.: *J. Invert. Path.*, **20**: 139, 1972.
- [10] Rickwood, D.: *Biological Separations in Iodinated Density Gradient Media*, Information Retrieval Limited, London and Washington, 1976, pp. 1—14.
- [11] Cooksey, K. E.: *Microbial Control of Insects and Mites*, ed by Burges, H. D. and Hossey, N. W., 1971. p. 248.

STUDY ON THE SEPARATION OF CRYSTALS FROM SPORES OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Wang Ying Bai Cheng Wen Jie

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing*)

By using the isopycnic centrifugation in a Urografin gradient and the fluid diphasic systems, we have purified crystals from nine strains of *Bacillus thuringiensis* (belonging to six varieties). The highest purity of all these crystal pre-

parations separated with both procedures was over 99%, but in the latter method the crystal preparations are sometimes contaminated with some vegetative rods or sporangium membranes. The results obtained by both methods were compared.