

类产碱假单胞菌杀虫物质的分离纯化和鉴定*

张 文 杨志荣 朱 文 侯太平 刘世贵**

(四川联合大学草原生防工程国家专业实验室 成都 610064)

摘 要 类产碱假单胞菌是一株昆虫病原菌, 该菌对草地蝗虫、竹蝗等具有良好的致死作用, 经鉴定, 该菌对蝗虫具有毒杀作用的物质为其代谢分泌到胞外的一种蛋白质。类产碱假单胞菌培养物经硫酸铵沉淀, Sephadex G-100 凝胶过滤及 DEAE-Sephadex A-50 阴离子交换柱层析, 纯化获得的杀虫蛋白只含一种亚基, 分子量 25 100, 等电点 5.16, 含 17 种氨基酸, 其中谷氨酸含量最高, 胱氨酸含量最低, 最大吸收峰为 278.3nm。

关键词 类产碱假单胞菌, 杀虫蛋白, 分离纯化, 黄脊竹蝗

分类号 Q936

1991 年, 刘世贵等人从重庆歌乐山林场自然罹病死亡的黄脊竹蝗 (*Ceracris kiangsu*) 体内分离到一种病原菌, 经鉴定属类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)^[1]。经室内外的感染试验证明, 该菌株对草地优势种蝗虫、竹蝗和稻蝗等均具有较强的感染致死作用, 类产碱假单胞菌是刘世贵等人近期研制成功的细菌灭蝗剂的主要成分^[2]。经用竹蝗作毒杀试验的结果表明, 类产碱假单胞菌对蝗虫具有毒杀作用的物质为一种胞外蛋白质, 存在于该菌的培养液中。作者就存在于培养液中杀虫物质的鉴定、分离纯化和理化特性作了深入研究, 现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

类产碱假单胞菌由本室提供。

1.2 供试虫

黄脊竹蝗采自四川江安县竹海, 虫龄为 2~4 龄, 试验前观察饲养 5~7d。

1.3 培养制备

将类产碱假单胞菌接种于肉汤培养基^[3], 培养基组分 (g / L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, pH7.2。35℃ 培养 12h 后, 再转接种于同样的培养基中, 35℃, 120r / min, 振荡培养 36h, 备用。

1.4 杀虫物质的鉴定

* 国家自然科学基金资助项目。

** 联系工作者

参加本研究工作的还有侯若彤。

收稿日期: 1996-03-24

培养物经 4000r/min 离心 30min 后取上清液,在培养物上清液中加入 100mg/ml 蛋白酶 K 进行完全反应,用经蛋白酶 K 处理和未经处理的培养物上清液分别用微量注射器喂食竹蝗,每组 20 只,每个样品重复 3 次,每只竹蝗喂食 30 μ l,每天观察竹蝗的死亡情况,观察 5d,以确证杀虫物质是蛋白质还是培养液中其他物质。

1.5 杀虫蛋白的分离纯化

1.5.1 硫酸铵分级盐析:在细菌培养物上清液中加入硫酸铵至 35% 的饱和度,4℃ 静置 4h,10 000r/min 离心 30min,弃沉淀。于上清液中再加入硫酸铵至 85% 的饱和度,4℃ 静置 4h,10 000r/min 离心 30min,沉淀溶于 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液中,对相同缓冲液透析过夜,即为粗提杀虫蛋白。

1.5.2 Sephadex G-100 凝胶过滤和杀虫蛋白的鉴定:将浓缩后的粗提蛋白上 Sephadex G-100 柱 (Pharmacia 产品,1.6 \times 60cm,平衡液及洗脱液均为 50mmol/L Tris-HCl,pH7.8),流速每小时为 13ml/cm²。分段收集洗脱液,用竹蝗分别测定各段洗脱液的生物活性,收集含有杀虫活性部分洗脱液并浓缩。

1.5.3 DEAE-Sephadex A-50 线性梯度洗脱:将含有杀虫物质的洗脱液浓缩后上 DEAE-Sephadex A-50 柱 (Pharmacia 产品,1.6 \times 30cm,经 50mmol/L Tris-HCl,pH7.8 的缓冲液平衡),用含 50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)的 0~500mmol/L 梯度的 NaCl 溶液洗脱,流速为每小时 8ml/cm²,每管收集 4ml,用紫外检测仪 (日本 Shimadzu UV-120)280nm 进行检测,收集含杀虫活性部分,浓缩、透析后即为纯品。用 10% PAGE 电泳,检测蛋白纯度。

1.6 杀虫蛋白分子量的测定

SDS-PAGE 垂直板型电泳测定分子量:参照 Laemmli^[6]方法进行。标准蛋白为上海东风生化试剂厂产品:磷酸化酶 b94 000;牛血清白蛋白 67 000;肌动蛋白 43 000;碳酸酐酶 30 000;烟草花叶病毒外壳蛋白 17 500。

电泳条件:浓缩胶 5%,含 0.1% 的 SDS,分离胶 12.5%,含 0.1% 的 SDS,凝胶板厚度 1mm,电极缓冲液为 0.1% SDS 的 Tris-Gly,pH8.3,电压 100V,电流强度 20mA。

1.7 等电点测定

用 PAGIEF 法在 Pharmacia Multiphor II 电泳仪上测定,5%PAG,2% pH3.5~10 两性电解质,标样蛋白为 Pharmacia 产品,pH3.5~10。电压 1 500V,电流强度 50mA,时间 2h,冷却温度 16℃。

1.8 氨基酸组成分析

杀虫蛋白经酸 (6mol/L HCl) 水解 24h 后,在日立 835-50 型高速氨基酸分析仪上测定氨基酸组成。

1.9 杀虫蛋白的紫外吸收光谱分析

在日本 Shimadzu UV-120 紫外-可见光分光光度计上,测定 200~350nm 波长杀虫蛋白的紫外吸收光谱。

2 结果和讨论

2.1 致病物质的鉴定

细菌培养液加蛋白酶 K 处理后,经电泳检查,所有蛋白质均被降解,进行活性测定。

杀虫物质的鉴定试验结果见表 1。

表1 杀虫物质的鉴定结果
Table 1 The identification result of insecticidal material

样品种类 Samples	供试虫数	累计死虫数			$\sum x$	\bar{X}	死亡率 Mortality rate (%)
	No. of	Total dead insects					
	experimental						
	insects						
	(只/组) (head/cage)	I	II	III			
加蛋白酶K处理的培养液 Culture of adding proteinase K	20	1	0	1	2	0.7	3.5
未加蛋白酶K的培养液 Culture of not adding proteinase K	20	11	10	12	33	11	55
对照 CK	20	0	1	2	3	1	5

从表 1 可以看出,具有杀虫作用的成分是类产碱假单胞菌产生的胞外蛋白,而不是其他物质。

2.2 杀虫蛋白质的分离鉴定和纯化

2.2.1 Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱层析:经硫酸铵沉淀后的粗提杀虫蛋白经 Sephadex G-100柱层析,结果见图 1。

从图 1 可以看出,经硫酸铵沉淀后的粗提纯杀虫蛋白,上 Sephadex G-100柱层析洗脱,形成两个吸收峰,经用两个峰的洗脱液饲喂蝗虫测毒表明,峰 I 洗脱液对蝗虫具有毒杀

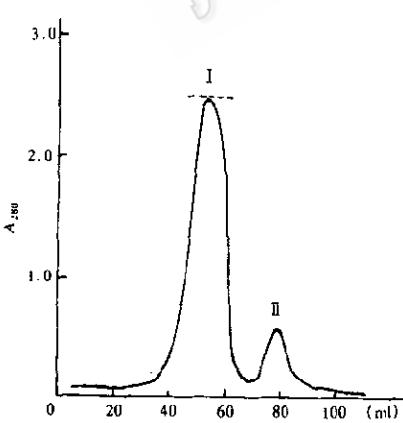


图 1 杀虫蛋白粗提纯物的 Sephadex G-100 洗脱曲线
Fig. 1 Elution profile of insecticidal protein on sephadex G-100

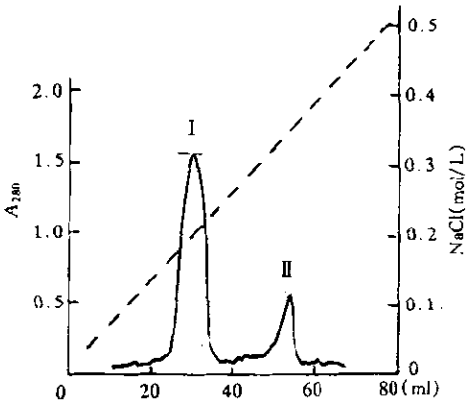


图 2 杀虫蛋白粗提物的 DEAE-Sephadex A-50 层析

Fig. 2 Anion-exchange chromatography of insecticidal protein on DEAE-Sephadex A-50 column

作用。此结果表明峰 I 洗脱液中含有杀虫蛋白。

2.2.2 DEAE-Sephadex A-50线性梯度洗脱: 将经 Sephadex G-100层析的洗脱液峰 I 浓缩后, 上 DEAE-Sephadex A-50阴离子交换凝胶柱, 用 NaCl 线性梯度洗脱。洗脱结果如图 2 所示, 形成两个主峰, 分别收集, 再用蝗虫作毒性测定, 结果表明只有峰 I 才具有毒杀作用。

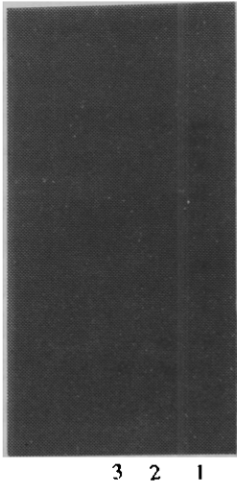


图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(胶浓度 10%)

Fig. 3 PAGE profile (10% gel)

1. 硫酸铵沉淀后的蛋白质 Crude proteins; 2. Sephadex G-100 柱层析后的蛋白质 Purified protein on sephadex G-100; 3. DEAE-Sephadex A-50 柱层析后的杀虫蛋白 Purified insecticidal protein on DEAE-Sephadex A-50.

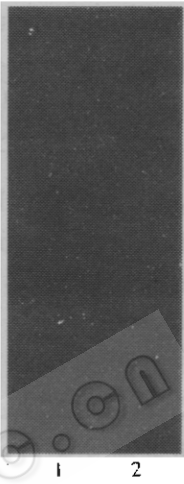


图 4 SDS-PAGE 图谱(胶浓度 12.5%)

Fig. 4 SDS-PAGE profile (12.5% gel)

1. 标准蛋白质 Molecular weight standard proteins; 2. 纯化的杀虫蛋白 Purified insecticidal protein.

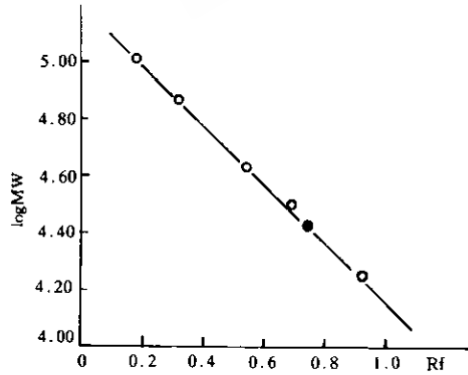


图 5 蛋白质分子量对数与迁移距离作图

Fig. 5 The logarithmic value of standard protein and mobility distance

- 标准蛋白 Standard proteins; ●杀虫蛋白 Insecticidal protein.

2.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析: 从图 3 可以看出硫酸铵沉淀后的培养液经 PAGE 分析, 显示出 14 条蛋白带; Sephadex G-100 柱层析后的洗脱经 PAGE 分析, 显示出两条蛋白带; 经 DEAE-Sephadex A-50 柱层析后的洗脱液经 PAGE 分析, 显示为一条蛋白带, 此即为纯的杀虫蛋白。紫外分光光度计测定该蛋白的紫外吸收曲线, 在 280nm 处有一明显吸收峰, 此结果说明纯化后的杀虫蛋白为电泳纯, 溶液中的蛋白含量为 6.5mg / ml。

2.3 杀虫蛋白的分子量测定

纯化的杀虫蛋白经 SDS-PAGE 鉴定为单一带(图 4)。依据标准蛋白分子量对数与同样电泳条件下迁移率的关系曲线(图 5), 求出杀虫蛋白的分子量为 25 100。该杀虫蛋白只有

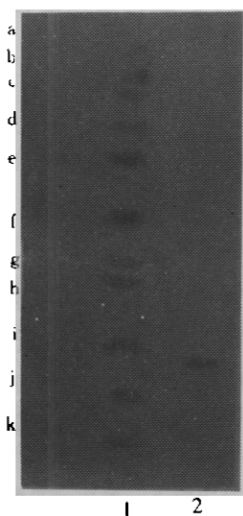


图 6 等电聚焦图谱(胶浓度 5%)

Fig. 6 PAGIEF Profile(5% gel)

1. 标准蛋白 Standard protein: a. 胰蛋白酶原(等电点 9.30) Trypsinogen(pI-9.30); b. 扁豆外源凝集素碱性带(等电点 8.65) Lentil lectin-basic band(pI-8.65); c. 扁豆外源凝集素中性带(等电点 8.45) Lentil lectin-middle band(pI-8.45); d. 扁豆外源凝集素酸性带(等电点 8.15) Lentil lectin-acidic band(pI-8.15); e. 肌红蛋白中性带(等电点 7.35) Myoglobinbasic band(pI-7.35); f. 肌红蛋白酸性带(等电点 7.35) Myoglobinacidic band(pI-6.85); g. 人碳酸酐酶 B(等电点 6.55) Human carbonic anhydrase B(pI-6.55); h. 牛碳酸酐酶 B(等电点 5.85) Bovine carbonic anhydrase B(pI-5.85); i. β -乳球蛋白 A(等电点 5.20) β -lactoglobulin A(pI-5.20); j. 大豆胰蛋白酶抑制剂(等电点 4.55) Soybean trypsin inhibitor(pI-4.55); k. 淀粉糖化酶(等电点 3.50) Amyloglucosidase (pI-3.50); 2. 杀虫蛋白 Insecticidal protein.

一种亚基。

2.4 杀虫蛋白的等电点测定

等电聚焦测定结果如图 6 所示。由标准蛋白质的等电点对其距离阴极的值作图(图 7)。根据杀虫蛋白泳动的距离,从图 7 中求出其等电点(PI)为 5.16,该杀虫蛋白为一种酸性蛋白。

2.5 氨基酸组成分析

杀虫蛋白氨基酸组成分析结果表明,该种杀虫蛋白富含谷氨酸和甘氨酸,酪氨酸和

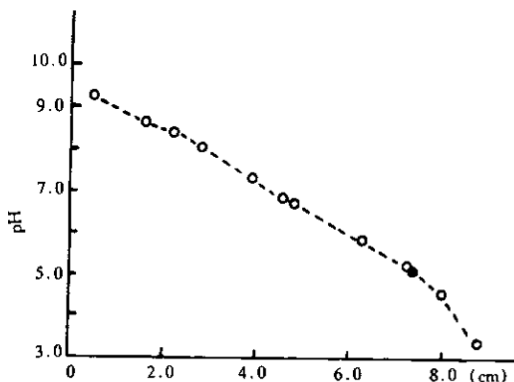


图 7 蛋白质等电点与泳动距离作图

Fig.7 The isoelectric point of standard protein and mobility distance from cathode

● 杀虫蛋白 Insecticidal protein; ○ 标准蛋白 Standard proteins.

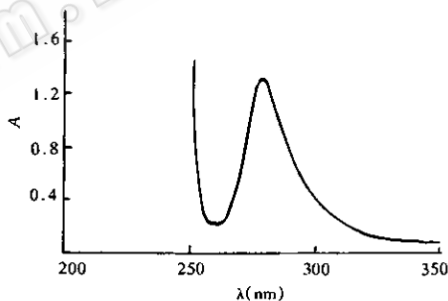


图 8 杀虫蛋白的紫外吸收光谱

Fig. 8 Absorption spectrum of insecticidal protein

缓冲液 Buffer 50mmol/L Tris; 蛋白质浓度 Protein conc.: 1.338mg/ml.

胱氨酸含量极低,不含蛋氨酸。该蛋白的酸性氨基酸占 23.43%,碱性氨基酸仅占 8.93%,故再次证明该杀虫蛋白为一种酸性蛋白质。

2.6 杀虫蛋白的紫外吸收光谱

结果见图 8。从图 8 中可以看出,该杀虫蛋白在 200~350nm 之间只有一个吸收峰,最大吸收波长为 $\lambda_{\max} = 278.3\text{nm}$

3 讨论

目前国内外对类产碱假单胞菌的研究报道较少。我们以类产碱假单胞菌作为一种具有杀虫作用的病原菌来研究,并发现和分离出该菌产生的具杀虫作用的蛋白质,经文献检索表明,国内外均未见报道,这种杀虫蛋白是否为一种新蛋白质,将作进一步的研究。作者对类产碱假单胞菌致病物质的分离纯化及其基本性质研究,为类产碱假单胞菌作为灭蝗剂的应用提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 刘世贵,朱文,杨志荣,等.微生物学报,1995,35(2):90~96.
- [2] 杨志荣,朱文,刘世贵,等.中国生物防治,1996,12(2):55~57.
- [3] 周德庆.微生物学实验手册,上海:上海科技出版社,1985.
- [4] 张龙翔,张庭芳,李令媛,等.生化实验方法和技术.北京:人民教育出版社,1981.
- [5] 赵永芳.生物化学技术原理及其应用.武汉:武汉大学出版社,1988.
- [6] Laemmli, U K. *Natur(London)*, 1970, 227: 680~685.
- [7] 张龙翔,张庭芳,李令媛,等.高级生物化学实验选编.北京:高等教育出版社,1989.
- [8] 菲克强.聚丙烯酰胺凝胶电泳.北京:科学出版社,1975.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A INSECTICIDAL PROTEIN FROM *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

Zhang Wen Yang Zhirong Zhu Wen Hou Taipen Liu Shigui

(National Laboratory for Grassland Biological Control of Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract A insecticidal protein was purified by gel-filtration chromatography on Sephadex G-100 and anion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 from the suspension of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* culture. Certain biophysical and biochemical properties were also studied. The molecular weight of the subunit of the insecticidal protein is 25100 and pI is 5.16. Amino acid composition analysis showed that it is an acidic protein.

Key words *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, Insecticidal protein, Isolation and purification, *Ceracris kiangsu*