

②
179-181
酯酶同工酶技术在选育 Bt 新菌株中的应用

陈五岭 景建洲 张芳琳 孙连魁 Q939.103

(西北大学生物学系, 710069, 西安; 第一作者 41 岁, 男, 副教授)

摘要 研究了苏云金杆菌亲本菌株及通过原生质体融合而获得的融合子的酯酶同工酶谱, 通过比较分析, 融合子的酯酶同工酶谱较之亲本菌株有显著变化, 表明酯酶同工酶在原生质体融合中可作为鉴定融合子的遗传标记。

关键词 酯酶同工酶; 苏云金杆菌; 原生质体融合
分类号 Q343.15

选育

同工酶是指具有相同的催化功能但其蛋白质分子结构又不相同的一类酶, 其主要指在同一种属中由不同基因位点或等位基因编码的多肽链的单体、纯聚体或杂聚体, 其理化性质不同而能催化相同反应的酶。无论动物、植物还是微生物, 在同一物种的不同个体、同一个体的不同器官及细胞或同一细胞的不同部位, 如细胞膜、细胞质、各种细胞器以及生长发育的不同时期和不同代谢条件下, 都有不同的同工酶分布。

同工酶的生物学意义在于通过对同工酶谱的分析, 能够识别基因的存在和表达。这是因为酶是基因的产物, 是基因表达的结果。酶在结构上的差异是由于酶的结构基因的差异引起的。按照中心法则, DNA 产生 mRNA, mRNA 产生酶蛋白, 而酶蛋白控制代谢类型, 最后表现为性状或功能的差异, 也就是说, 酶的不同可以反映出基因的不同, 因而同工酶可以作为遗传的标记物, 在原生质体融合中作为鉴定融合子的遗传指标之一。

有关酯酶同工酶作为苏云金杆菌(简称 Bt)分类鉴定指标的报道较多^[1~4], 但在原生质体融合选育 Bt 新菌株的工作中利用酯酶同工酶作为遗传标记鉴定融合子的报道甚少。为此我们做了此方面的研究, 实验结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 电泳装置

电泳仪用 DYY-Ⅱ 型稳压稳流电泳仪, 电泳玻璃管内径 4.5 mm, 管长 90 mm。

1.2 供试菌株

本实验室保藏出发菌株 1[#], 2[#] 及融合子 3[#], 5[#]。

1.3 酯酶的提取

用 0.3% 牛肉膏, 1% 蛋白胨, 0.1% KH₂PO₄, 2% 琼脂(pH7.0~7.2)的固体培养基活化菌种, 再转接于相同的液体培养基中, 30℃ 振荡培养至对数期, 收集菌体加石英砂研磨, 然后加少许 1/15M 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液, 于 0℃ 下 5 000 rpm 离心 30 min, 收集上清液置冰箱备用。

1.4 电 泳

凝胶及电泳槽采用文献 4, 5 中的系统, 凝胶浓度为 10%, 点样后电泳。开始 20 min 以 1 mA/管电流

强度进行电泳,然后加至 2 mA/管,直至电泳完毕,历时 1 h 左右。

1.5 酶带检定

电泳完毕,取出凝胶,按文献 6 介绍的方法进行染色,最后倾去染色液以 7%醋酸固定和洗脱。

1.6 结果计算

记录酯酶区带的迁移距离和溴酚蓝迁移距离后,按下列公式计算出区带的 R_f 值,即:

$$\text{区带的 } R_f \text{ 值} = \frac{\text{区带迁移距离}}{\text{溴酚蓝迁移距离}}$$

为准确考察其酯酶图型,每个菌株的酶样制备 3~4 次,电泳重复次数一般达 10 管次以上,最后在岛津 CS-930 双波长薄层扫描仪中进行扫描,记录酶带的情况。

2 结果分析

经过电泳我们将其扫描结果记录如下,如图 1,2,3,4。

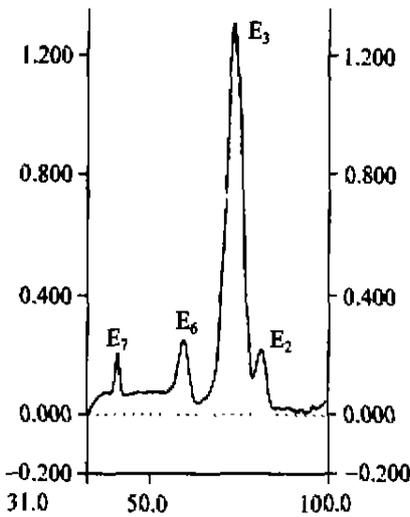


图 1 1* 菌株酯酶同工酶扫描图谱

Fig. 1 Strain 1* Esterase Isoenzyme Scanning Figure

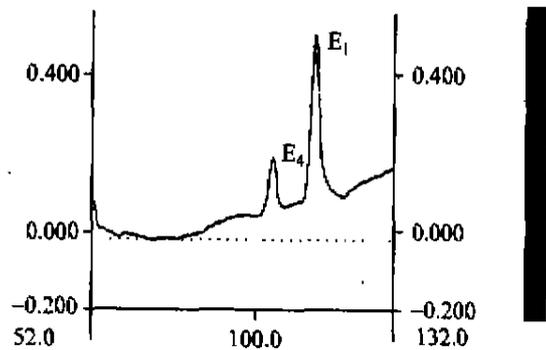


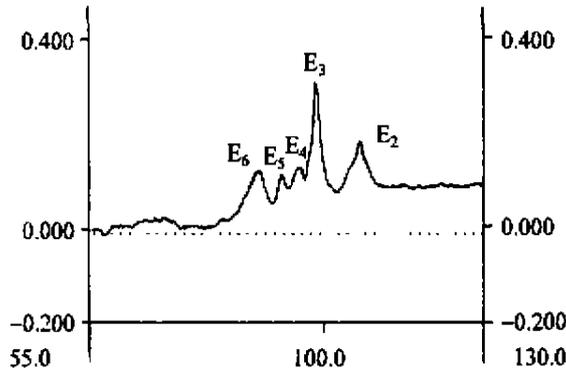
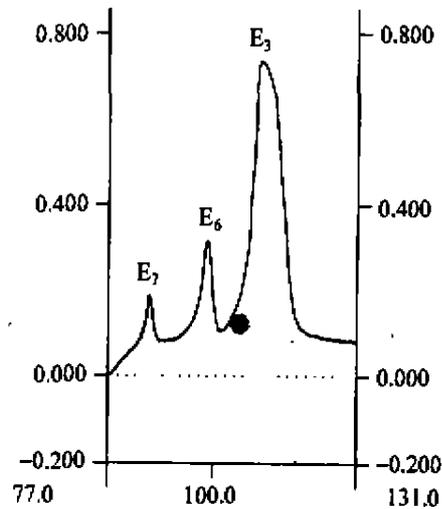
图 2 2* 菌株酯酶同工酶扫描图谱

Fig. 2 Strain 2* Esterase Isoenzyme Scanning Figure

以上是四株菌的酯酶同工酶扫描图谱,现具体分析如下:1* 菌株有 4 条主酶带,即 E_2, E_3, E_6, E_7 ,其相对迁移率分别为 0.72, 0.61, 0.44, 0.17, 其中 E_3 酶带染色最深,活性较高;而 2* 菌株仅有两条主酶带 E_1 和 E_4 ,相对迁移率分别是 0.78 与 0.58,且两者酶活性均较低;3* 菌株的酯酶同工酶谱则有 5 条主酶带,即 E_2, E_3, E_4, E_5, E_6 ,相对迁移率分别为 0.71, 0.62, 0.59, 0.52, 0.42,且酶活性均很低,它不仅具有 1* 菌株的 E_2, E_3 和 E_6 酶带,而且还具有 2* 菌株的酶带 E_4 ,此外 E_5 酶带是 1*, 2* 菌株所没有的 1 条新酶带,5* 菌株具有 E_3, E_6, E_7 3 条主酶带,相对迁移率分别为 0.62, 0.43, 0.18,与 1* 菌株的酶谱相似,但缺失了 E_2 酶带。

3 讨论

4 个菌株的酯酶同工酶的酶带数量、 R_f 值和酶带颜色深浅表现出明显差异,表明菌株间各自遗传特性在基因表达形式上存在着显著差异。3*, 5* 菌株的同工酶谱与亲本菌株 1*, 2* 的同工酶谱相比发生了显著变化,估计是在融合过程中编码酯酶同工酶的结构基因发生重组、连锁交换的结果,新酶带的出

图3 3[#]菌株酯酶同工酶扫描图谱Fig. 3 Strain 3[#] Esterase Isoenzyme Scanning Figure图4 5[#]菌株酯酶同工酶扫描图谱Fig. 4 Strain 5[#] Esterase Isoenzyme Scanning Figure

现可能是某些基因位点上发生了变异,从而使融合子表现出新的遗传特性,而缺失酶带则可能是结构基因染色体在连锁或交换时将编码某些酯酶同工酶的结构基因丢失或破坏的结果。由以上分析可看出,融合子 3[#], 5[#] 菌株的酯酶同工酶谱与亲本菌株有着显著差异,它不仅可以进一步证明它们确是杂交种,还说明酯酶同工酶在原生质体融合过程中作为遗传标记的可靠性。

参 考 文 献

- 1 张用梅,陈宗胜. 苏云金杆菌酯酶分析. 微生物学报, 1981, 21(2): 197~203
- 2 张用梅,陈宗胜. 聚丙烯酰胺凝胶电泳对几个苏云金杆菌变种营养细胞酯酶图型的分析. 微生物学通报, 1979, 6(1): 6~9
- 3 兰州生物制品研究所生化组. 区带电泳技术(四). 生物化学与生物物理进展, 1978(4): 45~48
- 4 Richard H Baltz. Protoplast fusion in *Streptomyces*. J. Gen. Microbiol., 1978, 107: 93~102
- 5 管萍,景建洲,孙连魁. 同工酶技术在金霉素链霉菌鉴别中的应用. 西北大学学报(自然科学版), 1996, 26(6): 533~536
- 6 李继耕,杨太兴,曾孟潜. 同工酶与玉米杂种优势研究(I). 遗传, 1979, 1(3): 8~11

责任编辑 徐象平

The Application of Esterase Isoenzyme Technique on the Bt Breeding

Chen Wuling Jing Jianzhou Zhang Fanglin Sun Liankui

(Department of Biology Northwest University, 710069, Xi'an)

Abstract The esterase isoenzyme patterns of the parental strains of Bt and the fusants obtained by protoplast fusion have been studied. Compared with parental strains, the esterase isoenzyme patterns of fusants changed much more obviously, showing that esterase isoenzyme can act as the genetic marker to assess fusants.

Key words esterase isoenzyme; bacillus thuringiensis; protoplast fusion