

白僵菌酯酶谱稳定性的研究

张永安 陈昌洁

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 通过对球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌体酯酶同工酶分析过程中的五个试验条件研究表明, 该菌体酯酶同工酶谱比较稳定。只要分析材料和相应的保护剂选择得当, 并在一个稳定的试验条件下就可将其作为分类的一种生化指标。

关键词 球孢白僵菌; 酯酶; 聚丙烯酰胺; 凝胶电泳

同工酶是结构差异而性质相同的酶蛋白分子, 是基因的次级表达, 可以作为生理或遗传研究的指标^[1]。目前有关同工酶的研究报道很多, 而同工酶与试验条件的关系研究报道较少。大多数研究结果都是基于个人的研究方法, 因而, 同种材料常常会得出多种结果, 影响了成果的交流和应用。为了促进白僵菌研究工作的发展, 于1988~1989年对白僵菌菌体酯酶同工酶分析过程中的部分条件进行了研究, 现将结果报道于下。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

以法国赠送的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. 第11号菌株为分析材料。

1.2 培养基

选用6种培养基, 其中6号为固体, 1~5号为液体, 比较同状态不同营养和同营养不同状态条件下酯酶谱带变化(表1)。

1.3 提取液

在两种缓冲液的基础上, 分别加入不同的保护物质配成8种提取液(表2), 均置4℃冰箱中保存备用。

1.4 菌体培养与酯酶提取

取制备好的装有定量培养基的三角瓶, 接入一定量的分生孢子, 摇匀置27±1℃恒温箱中静止培养。定时取出菌体, 用蒸馏水冲洗三次, 抽滤或滤纸吸水后称湿重, 按1:1比例加入提取液, -6℃冰箱中过夜。次日取出加入适量石英砂于研钵中, 冰浴条

表1 培养基组成

序号	代 号	组分和含量(100 ml)
1	PDA	马铃薯20g, 葡萄糖2g
2	SDBY	蛋白胨1g, 葡萄糖4g, 酵母膏0.2g
3	SDBYC	蛋白胨1g, 葡萄糖4g, 酵母膏0.2g, 几丁质①0.2g
4	PSPV	马铃薯20g, 蔗糖2g, 磷酸二氢钾0.3g, 硫酸镁0.15g, 维生素B ₁ 1mg
5	DN	牛肉膏0.3g, 胰化胨1g, 葡萄糖1g, 氯化钠0.5g
6	SDAY	蛋白胨1g, 葡萄糖4g, 酵母膏0.2g, 琼脂1.5g

① 上海试剂二厂生产, 研成粉状后使用。

表2 提取液配方

序号	代号	pH6.5磷酸 缓冲液(ml)	pH8.3电极 缓冲液(ml)	α -巯基乙醇 (ml)	蔗糖 (g)	丙三醇 (ml)	EDTA (g)
1	P	20					
2	P α	20		0.1			
3	PSG	20			6	4	
4	P α G	20		0.1		4	
5	P α S	20		0.1	6		
6	P α SG	20		0.1	6	4	
7	P α SGE	20		0.1	6	4	0.15
8	TA α SG		20	0.1	6	4	

件下研磨成浆, 15 000 rpm, 离心15 min(4 °C), 取上清液作为电泳样品。

1.5 酯酶同工酶分析

采用高 pH 不连续聚丙烯酰胺凝胶板状电泳技术^[2,3]。酯酶染色, 将 α -醋酸萘酯 20 mg 溶于 2 ml 丙酮, 加入 0.1 M pH 6.8 磷酸缓冲液 20 ml, 再加 20 mg 固蓝-RR, 过滤后染色。染色结束后水洗, 然后加 1% 冰醋酸固定^[4]。结果分析是根据酶带的 *Ef* 值将酶谱划分为 A 区和 B 区, 并以酶谱总带数、主酶带数和主酶带浓度为依据比较分析^[6]。

2 研究结果

2.1 培养基筛选

在 6 种培养基上的比较研究结果表明(表 3), 液体培养基优于固体培养基; 其中 5 种液体培养基, 由于营养成分不同, 特别是有微量物质存在的培养基, 培养出的菌体酯酶谱差异较明显。

表3 培养基与酯酶谱的关系 (9ml, 5d)

酯酶谱	PDA	SDBY	SDBYC	PSPV	DN	SDAY
总带数	12	12	12	8	9	9
主带数	4	4	4	4	4	3
主带浓度	A: 二强 B: 二中	A: 二强 B: 二强	A: 二强 B: 二强	A: 一弱一中 B: 二弱	A: 二中 B: 一中一强	A: 一强 B: 二强

2.2 培养基用量与酯酶谱的关系

表 4 表明, 同一时间(5 天)终止培养时, 较小量的培养基已不能满足菌体生长需要的营养, 故生长不良, 影响同工酶合成。

表4 SDBY 培养基用量与酯酶谱的关系

酯酶谱	3 ml	4 ml	5 ml	7 ml	9 ml	10 ml
总带数	9	9	10	11	12	12
主带数	4	4	4	4	4	4
主带浓度	A: 二强 B: 一中一强	A: 二强 B: 一强一中	A: 二强 B: 一强一中	A: 二强 B: 二强	A: 二强 B: 二强	A: 二强 B: 二强

2.3 不同培养时间酯酶谱的变化

1~10天菌体生长过程中酯酶谱的变化情况见表5。24 h的培养物(离心),量小而未检测出酯酶。2~4天酶带数逐渐增加,5~6天达到高峰,从7天开始酶带数减少,而且变化主要在A区。

表5 酶谱与生长时间的关系 (SDBY, 9 ml)

酯酶谱	24 h	48 h	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
总带数	0	7	8	11	12	12	10	10	10	9
主带数	0	2	2	4	4	4	4	3	3	3
主带浓度	0	A: 0 B: 二弱	A: 0 B: 二弱	A: 二弱 B: 二强	A: 二强 B: 二强	A: 二强 B: 二强	A: 一弱一强 B: 二强	A: 一强 B: 二强	A: 一强 B: 二强	A: 一强 B: 二中

2.4 接种量对酯酶谱的影响

试验表明接种量对酯酶谱影响不大,但在多菌株比较时应尽可能要接近。供试母液含分生孢子 9.5×10^8 个/ml。结果见表6。

表6 接种量对酶谱的影响 (SDBY, 9 ml, 5d)

酯酶谱	母液	稀释2倍	稀释8倍	稀释20倍	稀释200倍
总带数	10	10	12	12	12
主带数	4	4	4	4	4
主带浓度	A: 二强 B: 二中	A: 二强 B: 二中	A: 二强 B: 二强	A: 二强 B: 二强	A: 二弱 B: 二强

2.5 提取液对酯酶谱的影响

8种提取液提取出的酯酶,电泳分析结果差异显著。两种不同pH缓冲液之间没有明显差异,而酯酶谱差异较大的是那些加入了不同保护剂的提取液(表7)。其中P和Pα提取液是提取出酯酶后,在酶液中加入蔗糖和丙三醇。菌体取自同一培养基(SDBY),同一三角瓶。

3 结论与讨论

(1) 本项研究认为,虽然酯酶同工酶受较多因素影响,但只要严格控制试验条件,排除人为因素干扰,酯酶同工酶仍是一种理想的生化指标。由于试验条件涉及较多,本文只提供在10 ml SDBY培养基(50 ml三角瓶)上培养5天的菌体(27±1℃)经过用PaSG提取液冰浴研磨提取出的酶液电泳酯酶图谱,见图1。

(2) 一特定酶的基因,在生物体内的特定空间和时间是否表达或表达量多少,并不决定于酶结构信息本身,而决定于基因表达的调控体系,这一体系是以内因为依据,外因为条件而作用的^[1,6]。同时同工酶也可能由于物理或化学方法的改变而引起变化。所以在白僵菌酯酶同工酶分析中,既要

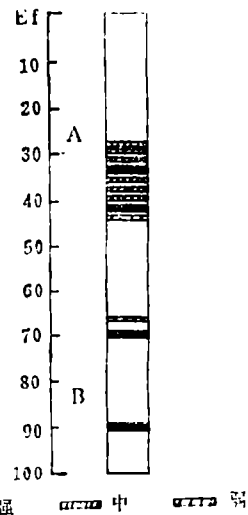


图1 最佳试验条件下11号白僵菌酯酶谱示意 (A: Ef 0~60 B: Ef 60~100)

表7 提取液对酯谱的影响

(SDBY, 9 ml, 5b)

酯酶谱	P	P α	PSG	P α G	P α S	P α SG	P α SGE	TA α SG
总带数	13	12	13	12	12	12	10	12
主带数	3	4	3	4	4	4	3	4
主带浓度	A: 二强 B: 一中	A: 二强 B: 二中	A: 二强 B: 一中	A: 二强 B: 二中	A: 二强 B: 一中一弱	A: 二强 B: 二强	A: 二强 B: 一中	A: 二强 B: 二强

保持材料的一致和环境条件的稳定, 又要避免处理方法所带来的不利影响。

参 考 文 献

- [1] 周光宇, 1983, 有关同工酶分析的几个问题, 植物生理学通讯, (1): 1~4。
 [2] 莽克强等, 1975, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社。
 [3] 徐大雅等, 1982, 疫霉蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳, 真菌学报, 1(1): 40~47。
 [4] 徐卫明等, 1985, 小鼠胚胎组织、成体组织和胚胎癌细胞酯酶同工酶谱的比较研究, 实验生物学报, 18(1): 99~104。
 [5] 张永安等, 1987, 白僵菌酯酶型及其与毒力关系的初步研究, 林业科技通讯, (12): 14~16。
 [6] 梅慧生, 1981, 植物同工酶研究的某些进展, 植物生理学通讯, (3): 1~7。

*Influence of Testing Conditions on the Appearance
of the Hyphostroma-Isoesterase Electrophoretogram
of Beauveria bassiana*

Zhang Yongan Chen Changjie

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract A study on the testing conditions of the hyphostroma-esterase electrophoretic pattern of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. was conducted. The experimental results showed that the esterase electrophoretic pattern was mainly effected by five testing factors: constituents of culture medium, amount of culture medium used, cultural period for hyphostroma, amount of conidia inoculated and different solutions of extracting esterase. The total numbers and shade of the colour of the esterase-bands were changed under different conditions. On the other hand, some side effect caused by EDTA was observed. Therefore, we may make a conclusion that a stable esterase electrophoretic pattern used as a classification criterion for strains of *Beauveria bassiana* can be obtained under the suitable conditions.

Key words *Beauveria bassiana*; esterase; polyacrylamide; gel electrophoresis