

苏云金杆菌 4.0718 菌株杀虫晶体性质的研究

邹先琼, 夏立秋, 孙运军, 陈宇

(湖南师范大学 生命科学学院 微生物学系, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 研究了苏云金杆菌 4.0718 菌株晶体的分离及其在电镜下的形态结构, 并通过 SDS-PAGE 对其杀虫晶体蛋白进行了分析, 证明了 4.0718 菌株晶体有立方体型和双金字塔型两种, 分别由原毒素 Cry I 及 Cry II 组成, 该菌对鳞翅目和双翅目昆虫均有毒杀作用。

关键词: 苏云金杆菌; 杀虫晶体; 原毒素

中图分类号: Q939.96

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2001)03-0242-04

Studies on the Properties of Insecticidal Crystals from *Bacillus thuringiensis* Strain 4.0718

ZOU Xian-qiong, XIA Li-qiu, SUN Yun-jun, CHEN Yu

(Department of Microbiology, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: The separation of crystals from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 and its morphology under electronmicroscope were studied, and its insecticidal crystal proteins were analyzed by SDS-PAGE. The shape of two kinds of crystals from strain 4.0718 are cubic and bipyramidal, and the crystal is proved to be made up of Cry I and Cry II protoxin. The strain is toxic to insects of Lepidoptera and Diptera.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; insecticidal crystals; protoxin

(*Life Science Research*, 2001, 5(3): 242~245)

从实际应用的观点看, 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 令人感兴趣的是它在芽孢形成期间, 在营养体另一端形成由一种或几种杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs) 组成的伴孢晶体, 即杀虫晶体 (insecticidal crystals)。敏感昆虫吞食后, 在昆虫肠道碱性环境条件下, 打开二硫键, 形成原毒素 (protoxin), 然后在肠道蛋白酶的作用下, 激活为抗蛋白酶的毒素 (toxin), 破坏昆虫肠道上皮细胞, 导致昆虫死亡^[1]。

为深入研究 ICPs 对昆虫致病作用机理, 首先需要将该菌的晶体与芽孢、营养体及其碎片分离开, 获得纯晶体。常用的晶体分离的方法有液体双相法、密度梯度离心法等^[2]。此外, 由不同原毒素组成的晶体有不同的形态结构和杀虫谱^[3], 晶体内蛋白的组成和降解特性也非常复杂^[4~6]。我们新选育的苏云金杆菌 4.0718 菌株在应用中表现出高效、快速的杀虫特点^[7, 8], 本文进一步对该菌的杀虫晶体进行研究, 期望了解晶体的结构、杀虫谱及其杀虫晶体蛋白的组成和特性。

收稿日期: 2001-02-25; 修回日期: 2001-06-20

基金项目: 湖南省青年科技基金资助项目 (96-32-09); 湖南省农业重大攻关项目 (99-1004-08)

作者简介: 邹先琼 (1976-), 男, 湖北公安人, 硕士研究生, 从事苏云金杆菌分子生物学等研究; 夏立秋 (1955-), 男, 湖南安乡人, 湖南师范大学教授, 硕士生导师, 主要从事微生物分子生物学和酶工程研究, E-mail: xialiqiu@263.net, 通讯联系人; 孙运军 (1975-), 男, 湖南石门人, 硕士研究生, 从事应用微生物研究; 陈宇 (1972-), 女, 贵州安顺人, 湖南师范大学讲师, 硕士, 从事微生物分子生物学等研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株与培养

1.1.1 供试菌株

苏云金杆菌 4.0718 菌株由本室选育获得和保藏, 菌种保藏号: CCTCC No. 200016.

1.1.2 培养基组成

牛肉膏 0.5%, NaCl 0.2%, $MnSO_4 \cdot 0.005\%$, 蛋白胨 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7 \cdot H_2O$ 0.03%, 葡萄糖 0.3%, K_2PO_4 0.03%, 琼脂 1.8%, pH 7.3.

1.1.3 菌体的培养

固体斜面活化, 茄瓶内划线接种, 37℃ 固体培养 4 d.

1.2 晶体的提纯

参考王瑛等^[9]的四氯化碳-硫酸钠双相体系分离晶体, 并进行了改进. 菌体成熟后, 涂片镜检. 向茄瓶内加入适量无菌水将菌苔刮下, 倒入灭菌的装有玻璃珠的三角瓶中, 摇动使菌苔分散, 二层纱布过滤. 滤液经 10 000 g 离心 10 min, 收集沉淀, 加入生理盐水, 搅匀, 超声波 400 W 处理, 每次处理 30 s, 间歇 30 s, 共处理 10 次. 采用上述离心条件离心, 生理盐水洗涤, 再离心, 收集沉淀. 然后按 70 mg 沉淀每毫升蒸馏水制成悬液, 反复搅拌, 去除泡沫. 然后转入分液漏斗, 加入 1% Na_2SO_4 溶液及 CCl_4 晶体悬液, 1% Na_2SO_4 和 CCl_4 三者的体积比为 7:6:7, 振荡约 10 min, 静置约 10 min, 将水相吸出, 离心. 再用双蒸水洗一次, 离心, 收集沉淀物. 如第一次提纯的晶体纯度不够, 可重复分离, 直到符合要求. 将沉淀物真空冷冻干燥后保存备用.

涂片镜检, 采用革兰氏染色法或芽孢染色法, 计算出晶体的纯度.

1.3 电镜观察

1.3.1 扫描电镜样品的制备

将提纯的晶体, 以 5% 的丙酮洗涤离心 3 次, 再用双蒸水洗涤离心 3 次, 将样品悬液滴在玻片上, 自然干燥. 将干燥好的样品在解剖镜下粘在铜台上, 喷金镀膜, 在日立 S-570 扫描电镜下观察并拍照记录.

1.3.2 透射电镜样品的制备

样品的前期处理与扫描电镜样品制备相同, 将晶体悬液滴加在具膜铜网上, 静置 30 s 后用滤纸片吸去多余液体. 样品用 1% 醋酸双氧铀染色 1 min, 空气干燥后, 在日立 H-600 透射电镜下观

察并拍照记录.

1.4 杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

样品用不同溶液溶解, 37℃ 处理 1 h, 10 000 g 离心 5 min, 得上清、沉淀. 电泳参照 Laemmli^[10]的方法进行, 上样前离心, 取上清点样. 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 8%, 用考马斯亮蓝 R-250 染色.

2 结果与分析

2.1 分离晶体的纯度

提纯的晶体染色镜检, 选择 10 个视野, 计算平均值. 采用一次双相分离, 晶体纯度可达 95% 左右; 二次双相分离, 晶体纯度可达 99% 以上. 此外, 用此方法获得的晶体制剂产量约为分离前的 15%. 这说明, 液体双相法对于 4.0718 菌株晶体的提纯有较好的效果. 我室还采用液体双相法对本室保藏的其他苏云金杆菌菌株的晶体进行了提纯, 也收到了较好的效果.

2.2 晶体形态特征

电镜下显示, 4.0718 菌株晶体有两种(图 1 A、B), 即立方体型和双金字塔型两种. 晶体大小不均一, 双金字塔型晶体大小长轴平均 1.2 μm , 短轴平均 0.5 μm , 立方体型晶体边长平均 5.5 μm . 且立方体型晶体较多(图 1 A). 双金字塔型晶体由 130 ~ 140 kD($I D = 1 u = 1.6605402 \times 10^{-27}$ kg)的原毒素 Cry₁ 组成, 对鳞翅目昆虫具有特异毒杀作用. 立方体型晶体由约 65 kD 的原毒素 Cry₂ 组成, 对鳞翅目和双翅目昆虫有毒杀效果. 由此可知, 该菌在生产上对鳞翅目和双翅目害虫均具有防治作用.

2.3 杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

在晶体内, 杀虫晶体蛋白肽链间存在氢键, 分子间存在二硫键. 因此, 一般需在碱性条件下或表面活性剂如 SDS 等作用下破坏氢键, 同时辅之以还原剂如巯基乙醇、二硫苏糖醇等来溶解晶体, 释放出杀虫晶体蛋白. 此外, 由于晶体内蛋白酶等因素的影响, 晶体的降解特性也很复杂. 4.0718 菌株晶体中加入蒸馏水, 按电泳上样缓冲液处理后, 可释放出约 130 kD 和 65 kD 两种条带, 130 kD 条带为 Cry₁ 原毒素, 65 kD 条带为 Cry₂ 原毒素, 此结果与电镜观察分析的结论相一致. 这说明 Laemmli 缓冲液(含 SDS 和 β -巯基乙醇)能溶解晶体, 将两类原毒素释放出来. 晶体经 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.4) + 1% SDS + 5% β -硫

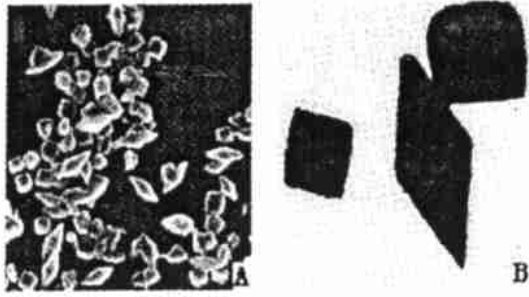


图 1 扫描电镜和透射电镜下苏云金杆菌 4.071.8 菌株杀虫晶体

A: 扫描电镜下 ($\times 10\ 000$); B: 透射电镜下 ($\times 60\ 000$).

Fig. 1 Insecticidal crystals from *Bacillus thuringiensis* strain 4.071.8 by scanning electron microscope and transmission electron microscope

A: Under scanning electron microscope ($\times 10\ 000$);

B: Under transmission electron microscope ($\times 60\ 000$).

基乙醇处理, 上清中有少量 130 kD 和 65 kD 条带, 说明在该条件下也能溶解晶体, 将这两类原毒素释放出来. 沉淀中的 130 kD 和 65 kD 条带为未解离晶体按上样缓冲液处理后释放出来所致. 晶体经 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) + 5% β -巯基乙醇处理, 可释放出 130 kD 原毒素, 部分 130 kD 原毒素降解为 60 ~ 85 kD 蛋白. 130 kD 原毒素降解可能是由于高 pH 或晶体内酶的作用所致. 立方体型晶体不溶于此类溶液, 但按上样缓冲液处理后释可放出 65 kD 蛋白. 在 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) + 5% β -巯基乙醇 + 胰蛋白酶 (10 g/L) 的条件下处理后, 出现约 57 kD 条带. 立方体型晶体仍不溶解, 按上样缓冲液处理后释放出 65 kD 原毒素. 晶体经 NaOH (pH 10.2) + 5% β -巯基乙醇处理, 不能释放出 130 kD 原毒素, 沉淀按上样缓冲液处理后可将 130 kD、65 kD 两类原毒素释放出来, 此结果与有关文献^[4]报道有所差异, 这可能是菌株的差异或处理条件不同引起的.

3 讨 论

采用密度梯度离心法分离晶体, 能获得纯度较高的晶体. 但该方法实验条件要求较高, 所用试剂特殊, 一般实验室很难采用. 液体双相法常用的双相体系有二氟三氯乙烷-硫酸钠、四氯化碳-硫酸钠等^[2], 四氯化碳-硫酸钠双相体系分离晶体使用仪器较为简单, 试剂价格低廉, 产量高, 具

有突出的优点. 本文对双相法超声波处理、离心等条件进行了改进, 并通过重复分离, 提高了晶体分离的纯度. 我们注意到, 通过液体摇瓶培养获得的孢晶混合物较难通过该法达到高纯度, 而经固体培养获得的孢晶混合物较易纯化. 此外, 由于菌种不同其晶体类型的差异, 或者同一菌种产生两种以上类型晶体的特殊性. 因此, 对不同菌种晶体的分离需采用针对性的适宜方法, 才能达到最佳分离效果.

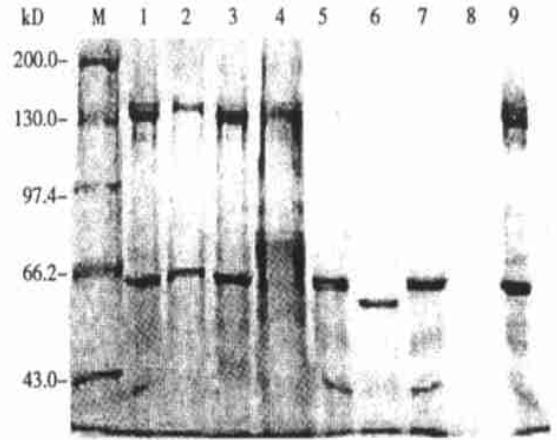


图 2 SDS-PAGE 分析

1: 晶体加入蒸馏水; 2、4、6、8: 分别为晶体经 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.4) + 1% SDS + 5% β -巯基乙醇、50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) + 5% β -巯基乙醇、50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) + 5% β -巯基乙醇 + 胰蛋白酶 (10 g/L)、NaOH (pH10.2) + 5% β -巯基乙醇处理后离心上清; 3、5、7、9: 分别为相应的沉淀; M: 标准蛋白.

Fig. 2 Analysis of protein in 8% SDS-PAGE

1: crystals added distilled water; 2, 4, 6, 8: supernatant from crystals handled by 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.4) added 1% SDS and 5% β -mercaptoethanol, 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) added 5% β -mercaptoethanol, 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) added 5% β -mercaptoethanol and 10 g/L trypsin, NaOH (pH10.2) added 5% β -mercaptoethanol; 3, 5, 7, 9: corresponding Pellet; M: Marker.

在碱性条件下溶解晶体, 然后通过 SDS-PAGE 分析苏云金杆菌杀虫晶体蛋白的性质, 已有一些研究^[4]. 最近有用昆虫肠道酶液溶解晶体的报道^[5, 6]. 在本研究中, 值得注意的是, 立方体型晶体在 SDS 及 β -巯基乙醇的共同作用下, 可以将 65 kD 的 Cry 原毒素释放出来, 而不溶于碱

性如 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) 及 β -巯基乙醇的溶液中, 这说明表面活性剂 SDS 比碱性条件 (pH10.2) 对 Cry 原毒素间氢键的破坏有较强作用。此外, 晶体经 NaOH (pH10.2) + 5% β -巯基乙醇及 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) + 5% β -巯基乙醇两种不同条件处理, pH 值相同, 但产物不同, 这可能是 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) 具有缓冲作用, NaOH (pH10.2) 无缓冲作用, 处理晶体时 pH 发生变化, 导致了产物不同。对于产生抗胰蛋白酶 Cry 原毒素毒性核心片段的条件, 不同文献报道有所差异。晶体在 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH10.2) + 5% β -巯基乙醇+ 胰蛋白酶 (10 g/L) 的条件下处理后, 产生了 57 kD 条带, 根据文献[4]的观点, 57 kD 条带为抗胰蛋白酶的毒性核心片段。为深入研究 57 kD 毒性核心片段的性质, 通过延长胰蛋白酶作用时间, 或待 130 kD 原毒素产生后, 再加入胰蛋白酶较长时间作用可得到大量抗胰蛋白酶毒性核心片段, 便于进一步的纯化和分析(待发表)。苏云金杆菌 4.071 8 菌株系本实验室选育的高效杀虫菌株, 经室内毒力生物测定试验和田间试验, 其对小菜蛾、棉铃虫等鳞翅目害虫具有很高毒性^[7, 8]。本室通过对 4.071 8 菌株质粒上杀虫晶体蛋白基因的 PCR 分析, 证明了在 4.071 8 菌株三种不同质粒上均含有 cry I 基因, 一种质粒上含有 cry 基因(待发表)。本研究通过对其晶体超微结构的观察及不同条件下杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析, 根据文献[3]的观点, 证明了 4.071 8 菌株晶体内含有 Cry 、Cry 两类原毒素, 其对鳞翅目、双翅目害虫均具毒杀作用, 这对于深入阐述其杀虫谱及其在生产上的应用提供了重要的依据。至于 4.071 8 菌株晶体内 Cry 、Cry 原毒素性质如何, 还有待于进一步研究。综上所述, 本研究为进一步纯化 4.071 8 菌株杀虫晶体蛋白及 Cry 原毒素毒性核心片段, 研究其性质和构建多效杀虫工程菌奠定了基础。

参考文献 (References):

[1] 喻子牛, 孙明, 刘子铎, 等. 苏云金芽孢杆菌分类及生物活性蛋白基因[J]. 中国生物防治 (YU Zi-niu, SUN Ming, LIU Zi-duo, et al. The classification of *Bacillus thuringiensis* and their biological active protein genes[J]. Chinese Journal of Biological Control), 1996, 12(2): 85-89.

[2] 李萍, 丰茂. 苏云金杆菌晶体毒素的分离与纯化[J]. 农药

(LI Ping, LIU Feng-mao. Isolation and purification of the toxic protein crystal from *Bacillus thuringiensis* [J]. Pesticides), 1996, 35(12): 13-16.

- [3] 郭三堆. 植物 Bt 抗虫基因工程研究进展[J]. 中国农业科学 (GUO San-dui. Engineering of insect-resistant plant with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes [J]. Science Agricultura Sinica), 1995, 28(5): 8-13.
- [4] 邵宗泽, 喻子牛. 粘虫幼虫对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体低度敏感的机理探讨[J]. 中国生物防治 (SHAO Zong-ze, YU Zi-niu. Mechanism of low sensitivity of *Mythimna separata* larvae to parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* [J]. Chinese Journal of Biological Control), 1999, 15(2): 66-69.
- [5] 王文军, 钱传范, 申继忠, 等. 活性氧对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的损伤作用[J]. 微生物学报 (WANG Wen-jun, QIAN Chuan-fan, SHEN Ji-zhong, et al. The effects of reactive oxidants on *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals [J]. Acta Microbiologica Sinica), 1999, 39(5): 469-474.
- [6] 邵宗泽, 崔云龙. 两种鳞翅目幼虫对 Bt 敏感性的差异及其机理探讨[J]. 中国生物防治 (SHAO Zong-ze, CUI Yun-long. The mechanism of differential sensitivities of *Bombyx mori* and *Pieris rapae* to *Bacillus thuringiensis* [J]. Chinese Journal of Biological Control), 1995, 11(2): 75-79.
- [7] 夏立秋, 丁学知. 苏云金杆菌高效速效杀虫新菌种的研究 [A]. 迎接 21 世纪微生物学研讨会论文集摘要集 [C]. 北京: 中国微生物学会 (XIA Li-qiu, DING Xue-zhi. Researches on new *Bacillus thuringiensis* strain with high and rapid effectiveness [A]. Abstracts of Papers in Welcoming 21th Century Seminar of Microbiology, Beijing: China Society for Microbiology [C]. 2000. 156-158.
- [8] 丁学知, 夏立秋. 苏云金杆菌高毒力菌株 4.071 8 的快速选育 [A]. 全国生物防治暨第八届杀虫微生物学研讨会论文集 [C]. 北京: 中国农业科学院生物防治研究所 (DING Xue-zhi, XIA Li-qiu. Fast selection for high toxic strain 4.071 8 of *Bacillus thuringiensis* [A]. Papers in Biological Control Throughout the Country and Eighth Seminar for Insecticidal Microbiology [C]. Beijing: Research Institute of Biological Control in Agricultural Academy of Sciences in China), 2000. 251-256.
- [9] 王瑛, 白成, 温洁. 苏云金杆菌晶体与芽孢分离的研究 [J]. 微生物学报 (WANG Ying, BAI Cheng, WEN jie. Study on the separation of crystals from spores of *Bacillus thuringiensis* [J]. Acta Microbiologica Sinica), 1980, 20(3): 285-288.
- [10] LEAMMLIU K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [11] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. USA: Cold Spring Harbour Laboratory, 1989.