

苏云金芽孢杆菌工程菌伴孢晶体的形态发生*

邵宗泽^{1,3} 郭延奎² 喻子牛³

(¹ 国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)(² 山东农业大学生命科学院 泰安 271018)

(³ 华中农业大学生命科学与技术学院 武汉 430070)

摘 要 苏云金芽孢杆菌在有帮助蛋白存在的情况下杀虫晶体蛋白获得了超量表达。通过透射电镜观察了 Cry1Ac 超量表达工程菌伴孢晶体的形态发生以及不同芽孢发育时期的晶体形态变化。结果表明,该工程菌的伴孢晶体在细胞不对称分裂的隔膜形成前就已出现,而且晶体发生的部位与芽孢无关。但晶体在形成初期往往靠近母细胞膜。观察结果还表明,大量表达的晶体蛋白不能马上参与到晶体合成,晶体形成的最佳时期是芽孢皮层形成期。母细胞大量液泡的产生与消失可能与晶体形成有关。此外,在超量表达工程菌中,Cry1Ac 蛋白能在一个细胞内形成多个伴孢晶体,这在天然菌株中是罕见的。

关键词: 苏云金芽孢杆菌, 工程菌, 伴孢晶体, 形态发生

中图分类号: Q932 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)05-0555-06

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是目前最为重要的一种杀虫细菌,它的主要杀虫成分是由杀虫晶体蛋白构成的伴孢晶体(parasporal crystals)^[1]。晶体发生是 Bt 制剂生产中尤为关注的问题,晶体能否形成也是目前人们在开发 Bt 工程菌中关心的问题之一^[2,3]。而目前人们关于晶体发生知识主要来自于野生菌株。在前人的研究中发现,库斯塔克亚种(*kurstaki*)的野生型菌株的伴孢晶体是在前芽孢内卷时在靠近前芽孢外膜处形成,而以色列亚种(*israelensis*)的伴孢晶体发生在前芽孢隔膜形成之前,比库斯塔克早 2 ~ 3h^[4]。

在以前的实验中,我们将来自以色列亚种的帮助蛋白基因 *p20* 与来自库斯塔克亚种的 *cry1Ac* 重组于一个菌株中,获得了一株 Cry1Ac 超量表达的工程菌^[5]。本实验通过电镜观察了工程菌中伴孢晶体的整个形态发生过程,比较分析了工程菌在不同发育时期晶体与细胞形态结构特点。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

本实验所用菌株为两株苏云金芽孢杆菌工程菌 pBMB201Ac/BMB171 和 pBMB1Ac304/BMB171^[5]。前者所含的重组质粒携带有 *cry1Ac10* 和帮助蛋白基因 *p20*。基因 *cry1Ac10* 克

* 国家“863”计划资助项目(101-03-01-01)

作者简介:邵宗泽(1964-),男,山东省昌邑县人,国家海洋局第三海洋研究所副研究员,博士,主要从事农业微生物和环境微生物学研究。E-mail: shaozz@163.com

收稿日期:2001-10-29,修回日期:2002-03-20

隆自库斯塔克亚种 YBT-1520 菌株, *p20* 克隆自以色列亚种^[6]。工程菌 pBMB201Ac/BMB171 的 *Cry1Ac* 原毒素表达量比 pBMB1Ac304/BMB171 高一倍以上, 且能形成较大的晶体^[5]。在对照菌株 pBMB1Ac304/BMB171 中, 重组质粒含 *cry1Ac10*, 但不含 *p20* 基因。两菌株的受体菌都为 BMB171, 是质粒消除了的 Bt 天然菌株^[7]。

1.2 细菌培养

所用液体培养基含 25 μg/mL 红霉素、0.5% 蛋白胨、0.3% 牛肉膏、0.5% 葡萄糖、0.05% MgSO₄、0.05% KH₂PO₄, 于 28℃ 恒温摇床、200r/min 培养。从第 12h 起每隔 3h 取样一次, 直至晶体完全长成。取样后离心并迅速将菌体固定于 3% 戊二醛中, 以备电镜制样。

1.3 透射电镜样品制备与观察

以上样品再用 1% 锇酸进行二次固定, 然后用 40% 无水乙醇梯度脱水、Epon812 树脂浸透、包埋, 超薄切片。后经醋酸双氧铀、柠檬酸铅双重染色, JEM-1200EX 透射电镜观察、拍照。

2 结果

2.1 伴孢晶体形态发生的时期

在晶体出现之前, 母细胞内已充满大小液泡, 它们与晶体形成的关系并不明确。当菌培养到第 15h, 即进入稳定期, 菌体由对称分裂转为不对称分裂, 原生质膜从四周开始内陷, 但隔膜尚未完全形成(图版 I-A)。此时, 在 pBMB201Ac/BMB171 菌的母细胞中明显的菱盐晶体已出现(图版 I-A), 说明晶体的出现时间应在此之前。而对照菌 pBMB1Ac304/BMB171, 只有在隔膜形成并开始内卷的细胞中才有晶体可见(图版 I-A1), 在某些菌体中即使游离芽孢已完全形成也见不到晶体(图版 I-B1 中右上角的两个菌体)。这可能是晶体太小的缘故。

2.2 伴孢晶体形态发生的位置

工程菌 pBMB201Ac/BMB171 伴孢晶体在母细胞中出现的位置与芽孢无关, 它可出现于母细胞内的中部、靠近或远离芽孢的一端。然而, 晶体在形成初期往往有一侧靠近细胞膜(图版 I-A、B、C、D)。工程菌 pBMB1Ac304/BMB171 的晶体多位于靠近芽孢的一侧, 但并不一定与芽孢有接触, 如图版中图 A1、B1(前芽孢内卷时期), 其晶体位于母细胞的芽孢近端, 但与前芽孢隔膜不接触; 图版中 C1、D1 是芽孢衣和皮层合成期的芽孢囊, 其伴孢晶体都与芽孢的孢外壁密切接触。另外, 它们与细胞膜也多有接触, 但不与 pBMB201Ac/BMB171 的伴孢晶体那样通过晶体的侧面靠近膜, 而是多以晶体的顶端接触膜(图版 A1、B1、D1)。

2.3 伴孢晶体的形态与结构

两工程菌在晶体形成初期晶体或呈典型的菱形(图版 A、B1)或呈不规则形, 如近圆形(图版 I-B; 图版 I-A1)。到芽孢衣及皮层合成时期, 晶体棱角分明, 两种工程菌的晶体都呈典型的菱形, 而且其它细胞结构也较清楚(图版 I-D、C1)。随着芽孢的逐渐发育, 晶体体积进一步长大, 而且电子密度增大(图版 I-F、E1)。在晶体的成长过程中, 始终有一层电子密度比晶体深的颗粒状物质包绕着晶体, 这可能是 *Cry1Ac* 原毒素形成的二聚体或多聚体, 这一现象在皮层形成期的细胞更为明显(图版 I-F)。到芽孢发育成熟, 晶体占据

了母细胞的绝大部分空间,细胞质浓缩,电子染色较深,晶体仍然被包埋其中(图版 I-F、E1)。芽孢游离后,工程菌 pBMB1Ac304/BMB171 的晶体在光镜下呈规则的棱角分明的菱形,而 pBMB201Ac/BMB171 的菱形晶体显得较宽、棱角不如前者分明(结果未出示),电镜下可见有的晶体呈团块状,见图 1-A~C 和图 2-B~C 中的某些晶体。

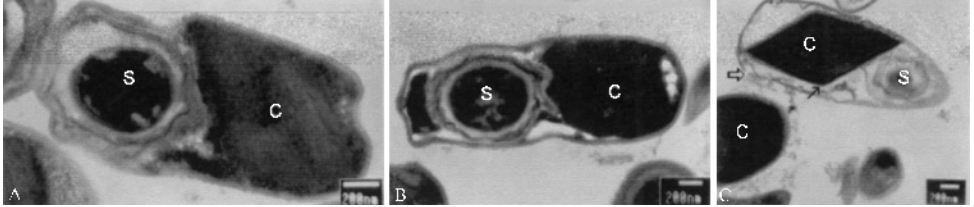


图 1 芽孢发育后期工程菌 pBMB201Ac/BMB171 伴孢晶体的形态观察

Fig. 1 The crystal morphology of the engineered strain pBMB201Ac/BMB171 in late spore development phase

A. Showing the large size crystal and the metamorphosis of sporangium; B. irregular crystal in shape of blunt round; C. Sporangium in lysis, the plasma disappeared and the cell wall is broken (\diamond). Now the crystal had a clear appearance, and the dents in its surface were visible (\uparrow). C, crystal; S, spore.

晶体的大小和个数在两种菌中明显不同。工程菌 pBMB201Ac/BMB171 的晶体比 pBMB1Ac304/BMB171 的晶体大,而且常见多晶现象。工程菌 pBMB201Ac/BMB171 的大型晶体有时使母细胞变形、鼓起(图 1-A),但该晶体菱形因母细胞体积所限形状不十分规则,长宽比例不标准,其长约 $1.2\mu\text{m}$ 、宽约 $0.7\mu\text{m}$,长/宽为 1.7:1,而正常菱形晶体的长宽比约为 2.5:1(长约 $1.44\mu\text{m}$ 、宽 $0.58\mu\text{m}$) (图版 I-F)。多晶现象在 pBMB201Ac/BMB171 较常见(图 2-A、B、C):同一个细胞内含一个大菱形和一个小方形晶体(可能实际为双金字塔的横切面)(图 2-A),或含两个等大的标准菱形晶体(图 2-B 上方的菌体)或含三个较小的菱形晶体(图 2-C)。在对照菌 pBMB1Ac304/BMB171 未发现多晶现象(图版 I-A1~E1),而且晶体较小,图版 I-E1 中的伴孢晶体长度不足 $1\mu\text{m}$ 。

在菌体破裂释放出芽孢与晶体之前,母细胞中围绕晶体的原生质颗粒消失,晶体轮廓显现,表面沟纹明显(图 1-C),此时晶体体积最大,长 $1.74\mu\text{m}$ 、宽 $0.85\mu\text{m}$ (图 1-C)。

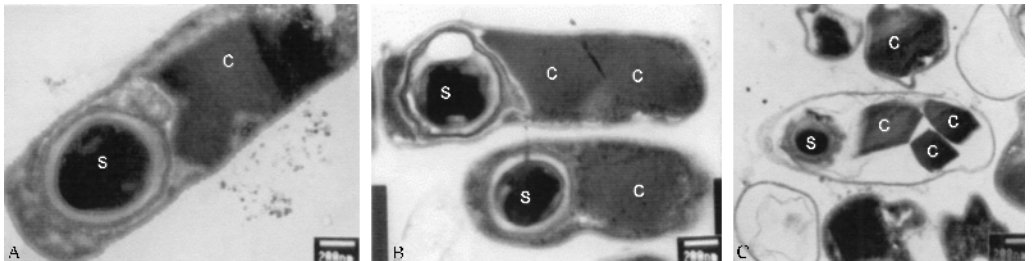


图 2 工程菌 pBMB201Ac/BMB171 的一胞多晶现象

Fig. 2 The occurrence of multiple crystals in one sporangium of pBMB201Ac/BMB171

A. Two crystals in one sporangium, one is big bipyramid and the other is little cubic; B. Twin crystals of medium size in bipyramid shape occurred in one cell; C. Sporangium in lysis, three crystals in one sporangium. In this figure: C, crystal; S, spore.

2.4 母细胞的形态结构变化

在菌体营养生长过后,光镜下菌体中部出现石炭酸-复红染色不着色的圆状区域,电镜下发现这些结构为大液泡,此外母细胞质内还充满许多小液泡(图版 I-B、C;A1~C1),

而到晶体基本长成后大小液泡均消失(图版 I-E, D1)。另外,整个芽孢囊形态也随着晶体的生长而变化,在晶体出现初期,菌体最长(图版 I-B, A1),而后逐渐变短,到晶体长成、液泡消失后菌体最短,长度大约缩小了 1/3(图版 I-E, D1)。

3 讨论

Cry1Ac 蛋白为 133kD 原毒素,整个分子由 N-端的毒性区和 C-端非毒性区构成。原毒素分子的 C-端区内富含半胱氨酸,可以通过形成分子间二硫键而使原毒素自动组装成伴孢晶体^[8]。对于那些缺少与晶体形成有关的 C-端的小分子毒素,如 Cry2Ac (71kD) \ Cyt1A (27kD),其晶体的形成必须有辅助蛋白的参与^[9]。来自以色列亚种的帮助蛋白 P20 即是多种辅助蛋白中的一种,Cyt1A 晶体的形成必须有它的参与。在以前的实验中我们通过 SDS-PAGE 证实了 P20 能够防止 Cry1Ac 初生肽的降解而最终提高了原毒素的产量^[5]。本实验观察了工程菌晶体的形态发生过程,一方面进一步证实了 P20 在 Cry1Ac 原毒素表达中的作用;另一方面揭示了工程菌晶体形成的一些特点。

工程菌 pBMB201Ac/BMB171 的晶体形态发生时间是在隔膜形成之前。在转录水平上,两种菌中 Cry1Ac 蛋白的表达都受启动子 Btl 的控制,即在对数生长期结束之后的 2-4 小时内起作用^[5, 10]。晶体形态发生可能就在 Cry1Ac 蛋白积累到一定浓度后开始。电镜观察结果表明,pBMB201Ac/BMB171 的晶体出现是在隔膜形成之前,但 pBMB1Ac304/BMB171 晶体出现较晚。这与光镜观察结果有些不符,光镜观察发现 pBMB1Ac304/BMB171 菌体裂解与晶体游离早于 pBMB201Ac/BMB171^[5]。这可能因为 pBMB1Ac304/BMB171 菌体的原毒素在表达过程中不断降解(缺少 P20 的保护)或是因为晶体较小而不易在超薄切片中切到的缘故。在 P20 未发现之前,人们已通过电镜观察到以色列亚种野生菌株伴孢晶体的出现也在隔膜形成之前,早于库斯塔克亚种 2~3h,该亚种在芽孢内卷时形成晶体^[4]。再结合我们的研究结果,这能否说明是 P20 提高了晶体蛋白的表达量而使晶体的形态发生早于不含 p20 基因的菌株呢?

本实验结果表明,原毒素的合成与晶体形成并非同步。以前的实验发现,当菌体培养到大约 16~19h 时两种工程菌中 Cry1Ac 原毒素的表达量达到最大,之后浓度却逐渐降低^[5]。电镜观察表明,此时前芽孢正在形成,晶体已出现但生长缓慢(图版 I-A~C; A1~B1),此时并不是晶体形成的最佳期。晶体体积增大最快的时期是在芽孢皮层形成期(图版 I-E, D1)。这说明晶体蛋白获得超量表达之后还不能马上参与到晶体合成,而需等数小时之后。这段等待时间可能是导致原毒素受蛋白酶水解而浓度降低的主要原因。晶体形成的机制也是一个很有趣的问题,当原毒素大量表达时母细胞原生质环境可能不适于 Cry1Ac 蛋白结晶,到芽孢皮层形成时,菌内环境才可能有利于原毒素分子间二硫键的形成,故晶体生长迅速。此外,从图版 I-A~F 和 A1~E1 中还可以看出,在皮层形成之前,菌体内充满大量小液泡及数个大气泡,菌体较长(图版 I-B, A1),而到晶体基本长成后液泡消失、菌体变短(图版 I-E, D1)。由此推测,这些液泡可能参与了原毒素合成过程中物质的转化、储存或细胞渗透压的调节。

观察结果还表明,两种工程菌晶体的发生与芽孢在空间上无直接关系,即在发生之初不与隔膜或前芽孢膜结合,但多发生于母细胞膜上,其中 pBMB201Ac/BMB171 的晶体多以

侧面与膜紧密接触 而 pBMB1Ac304/BMB171 晶体多以其顶端与膜接触。而前人发现野生的库斯塔克亚种晶体靠近前芽孢外膜发生^[4]。

总之,本实验观察结果表明,有帮助蛋白 P20 的工程菌晶体发生较早、体积较大,而且有多晶现象。此外,晶体发生部位与芽孢无关。

参 考 文 献

- [1] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Microbio Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 775 ~ 806.
- [2] Park H W, Bideshi D K, Federici B A. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 4449 ~ 4455.
- [3] Ge B X, Bideshi D, Moar W J, et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **165**: 35 ~ 41.
- [4] 陈 涛. 伴孢晶体的生物合成和形态结构. 见: 喻子牛主编. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990. 187 ~ 214.
- [5] Shao Z Z, Liu Z D, Yu Z N. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(12): 5362 ~ 5369.
- [6] Dervyn E, Poncet S, Klier A, et al. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 2283 ~ 2291.
- [7] 李 林, 扬 超, 刘子铎, 等. 微生物学报, 2000, **40**: 85 ~ 90.
- [8] 邵宗泽, 喻子牛. 生命科学, 2000, **12**(4): 173 ~ 176.
- [9] 邵宗泽, 喻子牛. 微生物学通报, 2001, **12**(1): 173 ~ 176.
- [10] Baum J A, Malvar T. *Mol Microbiol*, 1995, **18**: 1 ~ 12.

The Morphological Development of Parasporal Crystals of An Engineered Strain of *Bacillus thuringiensis**

Shao Zongze¹ Guo Yankui² Yu Ziniu³

(¹ The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

(² Life Science College, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

(³ College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Transmission electron microscope was used to observe the morphological development of parasporal crystals of an engineered *Bacillus thuringiensis* strain of high Cry1Ac productivity with the presence of helper protein P20, in control with the P20 absent strain. Our results showed that in P20 present strain Cry1Ac crystallization occurred in the plasma of mother cells before septum formation and crystal location in mother cell has no definite relation with spore. However, they usually attached to the plasma membrane of the mother cells by one side. Moreover, the phase of cortex formation proved to be the best time to crystal growing, which was several hours later after Cry1Ac protoxin reached the highest concentration in plasma. In addition, vacuoles in mother cells of both strains might have some relations with crystal development, which appearing in stationary phase and disappearing with crystal growth. Relative to the P20 absent control, crystals were much larger and multiple crystals of Cry1Ac were usually observed in one cell of the P20 present strain. This is rarely reported in wild type strains with the expression of single Cry protein.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Engineered strain, Crystal development

图版说明

Explanation of plate

Bt 工程菌伴孢晶体的形态发生的电镜观察

A ~ F : 工程菌 pBMB201Ac/BMB171 伴孢晶体的形态发生

A. 隔膜形成期, 晶体发生于靠近芽孢的母细胞膜上, 轮廓不太明显, 箭头示形成过程中的隔膜 B. 前芽孢内卷时期, 晶体位于远离芽孢的一侧, 同样靠近母细胞膜, 箭头示伴孢晶体 C. 游离芽孢已形成, 晶体远离芽孢, 轮廓明显, 周围有黑色颗粒包围 D. 芽孢衣形成期, 晶体体积增大, 标准菱形 E. 皮层形成期, 晶体体积显著增大, 母细胞中大小液泡消失、菌体变短, 原生质浓缩并充满黑色颗粒, 黑色颗粒密集于晶体周围(箭头) F. 芽孢进一步成熟, 晶体继续长大并占据几乎所有母细胞空间。图版中, M-母细胞, S-芽孢, C-晶体, V-液泡

A1 ~ E1 工程菌 pBMB1Ac304/BMB171 伴孢晶体的形态发生

A1. 前芽孢内卷时期(箭头示内卷芽孢)晶体发生于靠近前芽孢的母细胞一侧, 呈圆形, 与细胞膜接触面较小 B1. 游离芽孢期 两个游离芽孢期的菌体中无晶体, 左下方菌体中有小的菱形晶体, 以顶端与细胞膜接触(该菌体仍处于前芽孢内卷期) C1. 芽孢衣形成期 晶体轮廓明显, 菱形, 与细胞膜及芽孢有接触 D1. 皮层形成期 晶体小、呈方形, 与芽孢外壁及细胞膜有接触, 母细胞内大小液泡消失, 菌体变短 E1. 芽孢发育后期 细胞质进一步浓缩, 晶体包埋其中, 体积没有增大。图版中, C-伴孢晶体, V-液泡, M-母细胞, S-芽孢

Plate Crystal morphogenesis of engineered Bt strains

A ~ F : Strain pBMB201Ac/BMB171

A. Phase of septum formation, a crystal occurred on the mother cell membrane near the septum, its contour is not clear-cut. The arrow head points to the septum. B. Phase of prespore rounding-up, the crystal is at the distal end to the spore and also near the mother cell membrane. The arrow head points to the crystal. C. The phase of free spore formation, the crystal is also distal to the spore, clear edges surrounded with black particles. D. The phase of spore coat formation, the crystal growing bigger, in typical shape of bipyramid. E. The phase of cortex formation, the crystal size became strikingly bigger, vacuoles in mother cell plasma disappeared, the mother cell became shorter, the plasma condensed and filled with black particles which aggregated around the crystal (indicated by the arrow head). F. The phase of full development of spore, the crystal grew much bigger, and occupied almost all the space of the mother cell. In the whole plate: M another cell; S, spore; C, crystal; V, vacuole.

A1 ~ E1 Strain pBMB1Ac304/BMB171

A1. The phase of forespore rounding-up (arrow head), a small crystal occurred at the side of mother cell near the spore. B1. The phase of free spore formation, no crystal was observed in the two sporulated cells with free spores, while a small crystal appeared in the third cell of septum rounding-up phase. C1. The phase of spore coat formation, the crystal appeared as a typical bipyramid, and contacted with spore and mother cell membrane. D1. The phase of cortex formation, the crystal is still very small and in shape of cubic, contact with spore and mother cell. Vacuoles disappeared from the plasma and the sporangium shrank. E1. The last stage of spore development, the plasma was further condensed, in which the crystal was embedded, and no obvious increase in crystal size. In the whole plate: C, crystal; V, vacuole; S, spore