

# 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白与 DNA 分子的相互作用\*

夏立秋<sup>1,2</sup> 孙运军<sup>1</sup> 莫湘涛<sup>1</sup> 丁学知<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 湖南师范大学生命科学学院微生物学系 长沙 410081)

(<sup>2</sup> 华中农业大学微生物科学技术系 武汉 430070)

## Interaction Between Insecticidal Crystal Proteins and DNA Molecule from *Bacillus thuringiensis* \*

Xia Liqiu<sup>1,2</sup> Sun Yunjun<sup>1</sup> Mo Xiangtao<sup>1</sup> Ding Xuezhi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Microbiology, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

(<sup>2</sup> Department of Microbial Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

关键词 苏云金芽孢杆菌,  $\delta$ -内毒素, DNA-毒素复合物

中图分类号: Q939.124 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)01-0127-05

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)在形成芽孢的同时能够产生伴孢晶体,其中含有一种或几种杀虫晶体蛋白(ICPs, Insecticidal Crystal Proteins),即  $\delta$ -内毒素<sup>[1]</sup>。伴孢晶体进入敏感昆虫的消化道后发生溶解并释放出 27~140kD 的原毒素。在中肠蛋白酶的作用下,原毒素被激活为 23~70kD 的毒性多肽<sup>[2-4]</sup>。随后毒素与中肠刷状缘膜泡(BBMV, Brush Border Membrane Vesicle)上的特异受体发生结合并且在细胞膜上形成孔道,破坏细胞的渗透平衡,引起细胞裂解,最终导致幼虫的死亡<sup>[2]</sup>。目前苏云金芽孢杆菌制剂及转杀虫晶体蛋白基因植物已成为对害虫进行生物防治的重要手段,在农产品安全性和保护农业生态环境上具有重要意义。人们在研究伴孢晶体的溶解和激活过程时,在溶解的晶体蛋白中检测到 DNA 片段<sup>[5,6]</sup>。这一令人兴奋的发现吸引人们对晶体中 DNA 分子的来源和功能进行广泛的研究,以利于进一步深化对 Bt 制剂杀虫机理的认识,探索提高其杀虫活性的有效途径。

### 1 苏云金芽孢杆菌蛋白晶体的形成和原毒素的分子结构

原毒素合成后通过形成晶体来抗胞内蛋白酶的降解,不同的杀虫晶体蛋白形成包涵体的途径不同<sup>[7]</sup>。130~140kD 的 Cry1 类原毒素能够自发形成晶体。普遍认为 Cry1 类原毒素分子能够通过富含 Cys 残基的 C 端区域与相邻分子形成对称的链间二硫键,而且这些二硫键处于晶体的表面,这种排列方式有助于不溶性晶体在鳞翅目昆虫中肠道的碱性环境中发生溶解<sup>[8,9]</sup>。73kD 的 Cry3A 原毒素没有富含 Cys 残基的 C 端区域,对 Cry3A 毒素的三维结构进行分析表明,在三个相邻的原毒素分子间存在 4 个分子间的盐桥(Asp142-Arg165, Asp224-Arg562, Asp590-Arg178, Glu223-Lys293),这些盐桥可能参与了晶体包涵体的形成<sup>[2]</sup>。Cry2A(71kD)和 Cyt1A(27kD)形成晶体时需要 P19、P20、ORF1 和 ORF2 等辅助蛋白的参与<sup>[10]</sup>。促使晶体形成的作用力既要能够有效地防止菌体细胞中蛋白酶对晶体的降解,又要保证晶体在昆虫中肠

\* 国家自然科学基金(30270037)、湖南省中青年科技基金项目(96-32-09)、湖南省计委重大项目(2000-862-1-5)和华中农业大学农业部农业微生物重点开放实验室项目(02-05-01)资助

作者简介:夏立秋(1955-),男,湖南省安乡人,湖南师范大学生命科学院微生物学系教授,主要从事杀虫微生物分子生物学研究。

收稿日期:2002-01-29,修回日期:2002-06-14

道的极端 pH 环境中快速有效地溶解。研究表明,晶体的稳定性和溶解性依赖于原毒素的分子结构、二硫键的键能以及其它特异性因子。研究发现,与原毒素相互结合的 DNA 分子不仅能够促进晶体的形成,而且在毒素的产生过程中起着重要的作用<sup>[5]</sup>。

晶体中的 DNA 片段主要是同原毒素发生紧密结合,因此原毒素分子结构的阐明将有助于研究其结合的 DNA 分子的功能。通过比较原毒素的氨基酸序列,发现大多数原毒素的毒性片段在一级结构上都含有 5 个保守区<sup>[7]</sup>。一些分子量大的原毒素(130~140 kD)在 C 端非毒性区还含有 3 个保守区,这些原毒素在 C 端含有丰富的 Cys 残基,在溶液中疏基暴露在分子表面,使得原毒素很容易受蛋白酶的作用而激活。研究表明,Bt 杀虫晶体蛋白的毒性多肽由三个典型的结构域组成。结构域 I 位于肽链的 N 端,为一组由 7 个两亲性的  $\alpha$ -螺旋围绕一个疏水的  $\alpha$ -螺旋形成的  $\alpha$ -螺旋束,主要参与在中肠上皮细胞形成孔道;结构域 II 位于肽链的中间,为三组以“希腊钥匙”拓扑结构连接在一起的反向平行的  $\beta$  折叠片层,其顶端的突环参与了毒素与受体蛋白的结合;位于 C 端的结构域 III 是由两组反向平行的  $\beta$  折叠片层组成的夹心结构,以  $\beta$  果酱卷”拓扑结构排列,它能够防止蛋白酶对毒素分子的过度降解。毒素的结构域与其保守区具有一定的对应关系。保守区-1 内含有结构域 I 中  $\alpha 5$  螺旋。保守区-2 含有结构域 I 的  $\alpha 7$  螺旋和结构域 II 中的第一条  $\beta$  链,它们构成了两个结构域之间的连接。保守区-3 是跨于结构域 II 和 III 的一条  $\beta$  链。保守区-4 含有结构域 III 中的一条  $\beta$  链。保守区-5 含有肽链的 C 端,包埋于结构域 III 的  $\beta$  链中<sup>[7,11]</sup>。

## 2 伴孢晶体和原毒素中存在 DNA 分子的依据

早在 1927 年,Mattes 就提出了 DNA 分子参与晶体形成的实验证据。他在对 Bt 的生活周期进行了详细的研究后发现,在细胞形成晶体的区域存在染色质。当时对 DNA 进行染色使用的是吉姆萨染液。目前已经对来自 Bt 库斯塔克亚种(*Bt subsp. kurstaki*)HD-73 菌株的 Cry1Ac 原毒素及其晶体与 DNA 之间的相互作用进行了深入的研究。在将要产生芽孢的 Bt 培养物中加入 EB,可以看到核酸物质在细胞中的分布情况发生明显的变化。在即将形成芽孢之前,核酸聚集在芽孢形成区域,芽孢形成之后,荧光在这一区域消失并转移到形成伴孢晶体的区域。从 Bt 细胞中提纯晶体并将其溶解,然后分别进行 SDS-PAGE 和琼脂糖凝胶电泳,发现了 130kD 的蛋白带和 20kb 的核酸带。除了 Bt 库斯塔克亚种 HD-73 菌株外,库斯塔克亚种 HD-1 菌株、阿莱亚种(*Bt subsp. alesti*)、杀虫亚种(*Bt subsp. entomocidus*)、多窝亚种(*Bt subsp. tolvorthi*)、蜡螟亚种(*Bt subsp. galleria*)以及分别含有 *cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac* 基因的大肠杆菌(*Escherichia coli*)产生的晶体及原毒素中都发现具有 20 kb 的核酸片段<sup>[5]</sup>。Chaturvedi R 等人的研究也表明含有 *cry1Ac* 基因的大肠杆菌产生的原毒素与 25 kb 的核酸片段发生相互结合<sup>[12]</sup>。

将溶解的 Cry1Ac 晶体蛋白与碘乙酰胺反应即可制得羧甲基化的原毒素(CAM 原毒素),用阴离子交换柱对 CAM 原毒素进行 HPLC 分析,发现  $OD_{260}$  大于  $OD_{280}$ ,这表明在 CAM 原毒素中存在核酸物质。用苯酚/氯仿将核酸从 CAM 原毒素中抽提出来后,发现它对 DNase 敏感而对 RNase 不敏感,这说明 CAM 原毒素中的核酸为 DNA。抽提出来的 20 kb DNA 片段能够被 *Eco* R I 和 *Bam* H I 消化成小的片段,而且这些片段能够被克隆到质粒载体中,这充分说明了 20 kb DNA 具有双链结构<sup>[5]</sup>。与原毒素相结合的 DNA 片段在大小上相对均一,主要是 20 kb DNA。用 *Eco* R I 和 *Bam* H I 消化 DNA 片段后在琼脂糖凝胶上呈现出清晰的成片电泳条带,由此可见不同原毒素结合的 DNA 片段是不同的<sup>[6]</sup>。

在晶体及原毒素中发现的 DNA 分子并非来源于它们对 DNA 分子的非特异性吸附,原毒素与 DNA 分子之间具有特异的相互作用。在离子交换层析和凝胶过滤层析中均观察到 DNA 与原毒素的共纯化。原毒素中的 DNA 在用苯酚/氯仿处理时需要 pH10.5、65℃ 的剧烈条件才能将其抽提出来。同时发现晶体与原毒素中的 DNA 由于蛋白质的保护而能够抗 DNase 的降解。使用 1.5 mol/L NaCl 溶液也不能使原毒素与 DNA 发生解离。与之相比,1.2 mol/L NaCl 溶液就能使同染色体特异结合的组蛋白从染色体中解离出来。这些实验结果充分证明了 DNA 与原毒素之间具有特异性的相互作用。Bulla 通过二苯胺反应

在晶体蛋白中没有检测到 DNA 分子<sup>[13]</sup>。这是因为在其实验中使用三氯乙酸沉淀蛋白质,当时认为 DNA 将留在上清液中。实际上, DNA 能够同晶体蛋白发生紧密结合而很难发生解离。因此 Bulla 在上清液中没有检测到 DNA 的原因是因为 DNA 与蛋白质发生了共沉淀。

为了能够在温和条件下使原毒素与 DNA 分子发生有效的分离, Chaturvedi R 提出了一种可行的方法<sup>[12]</sup>。将 DNA-原毒素复合物通过琼脂糖凝胶柱进行疏水作用层析。在用 2 mol/L KCl 溶液进行洗脱时, DNA 分子被洗脱下来, 而原毒素仍然结合在基质上。然后用浓度依次降低的 KCl 溶液进行分段洗脱, 可以得到不含 DNA 分子的原毒素。用同样的方法也可以除去毒素中的 DNA 分子。研究者用季铵碱型阴离子交换柱层析分离牛胰蛋白酶处理 Cry1Ac 产生的毒素, 然后用 NaCl 溶液进行梯度洗脱并测定流出液的  $OD_{280}$  值, 发现在洗脱曲线上有 2 个吸收峰, 与之相应的洗脱液浓度为 0.3 mol/L 和 0.9 mol/L, 流出液中的成分分别是 T1 和 T2 组分。T2 组分在进行琼脂糖凝胶电泳时发现 20 kb DNA 条带, 而 T1 不能产生。在对 T1 和 T2 用 350 ~ 220nm 的波长进行扫描时发现, T2 在 260nm 有较强的吸收峰, 而 T1 不具有。由此可知, T1 组分是不含 DNA 的毒素, T2 组分是含有 DNA 的毒素。T2 用 DNase 处理后能够转变为 T1。T1 与 T2 之间的比例依赖于胰蛋白酶的来源、使用量的多少以及处理时间的长短。用 5% (W/W) 胰蛋白酶隔夜处理晶体蛋白主要产生 T1 组分, 而短时间处理则主要产生 T2 组分。产生这种结果的原因是通常使用的牛胰蛋白酶中具有一定的 DNase 活性, 若处理时间过长, 其中的 DNA 分子将被完全降解, 而只剩下抗蛋白酶解的毒性多肽。对两种组分进行 SDS-PAGE 分析时, 由于电泳时使用的变性条件容易使 DNA 分子从毒素中解离出来, 因此 T1 和 T2 组分均产生特征性的 67 kD 毒素蛋白带<sup>[5]</sup>。

目前不仅在 Cry1A 原毒素中发现了 DNA 分子, 在 CytA 蛋白中也检测到了 DNA 分子。Bt 以色列亚种 (*Bt subsp. israelensis*) 产生的 27 kD 的 CytA 原毒素能够被蛋白酶水解成 25 kD 的毒性片段。对 25 kD 蛋白用阴离子交换柱作进一步纯化时, 可以分离到三种组分 M1、M2 和 M3。M1 和 M2 为 25 kD 蛋白, 而 M3 则为 25 kD 蛋白与 DNA 分子形成的复合物。体外实验也表明 25 kD 蛋白具有结合染色体 DNA 的能力<sup>[14]</sup>。

### 3 DNA 分子在激活原毒素中的作用

Cry1A 原毒素能够与 20 kb DNA 发生紧密结合。当 DNA 同原毒素发生解离或者用不具有 DNase 活性的胰蛋白酶将原毒素水解成毒素后, 20 kb DNA 由于失去蛋白质的保护而恢复对 DNase 的敏感性。研究还发现原毒素在激活过程中, 胰蛋白酶从 C 末端开始对原毒素进行依次剪切直到产生 20 kb DNA-毒素复合物。根据以上现象, Claimont F R 等提出了 20 kb DNA 与原毒素之间的结合模型, 如图 1 所示<sup>[6]</sup>。椭圆形的原毒素分子通过 N 端毒性部分与双链 DNA 分子相互作用, 其比例为每个原毒素分子结合 3 个碱基对。原毒素的 C 端远离 DNA 核心向外延伸。原毒素分子在 DNA 核心外围形成了一个抗 DNase 作用的蛋白质保护层。晶体在溶解时, 原毒素分子之间在 C 端区域形成的链间二硫键被切割, 溶解的原毒素的 C 端区域被胰蛋白酶通过顺序剪切而除去, 留下含 20 kb DNA 的毒素。DNA 分子能够维持原毒素分子的结构完整性, 除去了 DNA 分子的原毒素用胰蛋白酶处理时全部被降解为小的肽段, 不能产生抗胰蛋白酶的毒性片段。

为了解释原毒素与 DNA 分子之间的作用力的来源, Bietlot H P 等人指出原毒素通过富含 Lys 残基的 C 端与带负电荷的 DNA 分子之间发生静电相互作用, 并由此提出了另外一种结合模型<sup>[5]</sup>。DNA 分子同原毒素的 C 端区域相互作用, 在形成毒素的过程中, 对 DNA 及原毒素同时进行核酸水解和蛋白酶解能够导致原毒素 C 端区域的依次降解。但是研究发现, 使用不具有 DNase 活性的胰蛋白酶处理原毒素也能产生含 20 kb DNA 的毒素, 若使用具有 DNase 活性的胰蛋白酶处理原毒素能够产生不含 20 kb DNA 的毒素 (T1) 以及含有 DNA 分子的毒素 (T2)。这两个实验结果都是 Bietlot H P 的结合模型所不能解释的, 而 Claimont F R 提出的结合模型却能够对此作出很好的解释。因此, 原毒素不是通过 C 端而是通过 N 端与 DNA 分子发生结合<sup>[6]</sup>。

Chaturvedi R 在研究中发现<sup>[12]</sup> 抗胰蛋白酶的 Cry1A 类毒素在与溶剂接触的表面具有正电势<sup>[15]</sup> ,能够同 DNA 分子发生静电作用 ,从而使毒素与 DNA 分子紧密结合。将 DNA-毒素复合物通过琼脂糖凝胶柱进行疏水作用层析 ,在用高盐缓冲液进行洗脱时 ,DNA 分子与毒素之间的电荷作用被破坏 ,同时毒素分子疏水性的结构域与层析柱中基质发生的疏水相互作用促进了 DNA 分子与毒素之间的解离。通过琼脂糖凝胶电泳在洗脱液中能够检测到完整的 DNA 片段。当洗脱液的盐浓度降低时 ,毒素开始与基质解离。采用疏水作用层析不仅可以使 DNA 与毒素发生解离 ,而且能够使原毒素与 DNA 分子发生有效的分离。这一研究结果进一步验证了 Clairmont F R 提出的结合模型的合理性。

Cry1A 类原毒素在柞色卷蛾 (*Choristoneura fumiferana*) 幼虫中肠道内的激活过程如图 2 所示<sup>[6]</sup>。柞色卷蛾中肠液内含有拟胰蛋白酶 (trypsin-like protease) 和 DNase。目前已经在柞色卷蛾的消化道中分离到了一种新的 DNase。与其它 DNase 不同 ,它的最适 pH 值为 10.5 至 11 ,这一 pH 范围能够保证它在敏感昆虫中肠道的碱性环境中发挥作用。它是一种核酸内切酶 ,需要二价碱金属离子作为激活剂 ,能够水解单链和双链 DNA。这种 DNase 与蛋白酶协同作用 ,将与 DNA 分子相结合的原毒素激活为不含 DNA 分子的毒素。蛋白晶体在中肠道的碱性环境中溶解并释放出含 20 kb DNA 的原毒素 ,它在拟胰蛋白酶的作用下很快降解为 20 kb DNA-毒素复合物 ,其中的 DNA 分子由于失去原毒素的保护作用 ,很快地被 DNase 降解成为 100 bp 左右的 DNA 片段 ,形成含 100 bp DNA 的毒素 ,DNase 对 100 bp DNA-毒素复合物中 DNA 分子的降解速率很慢 ,这表明存在一个 DNA 与毒素发生强烈作用的核心结构。这一核心结构不仅能够保护其中的 DNA 分子 ,更重要的是它可能有助于毒素抗蛋白酶的水解作用。Coux F 等人报道 ,中肠道内除胰蛋白酶以外的其它蛋白酶对毒素具有一定的破坏作用。Cry1Aa 晶体蛋白产生的毒素通过结构域 I 和 II 之间的 4 个盐桥 (Asp222-Arg281 ,Arg233-Glu288 ,Arg234-Glu274 ,Asp242-Arg265) 紧密地折叠在一起 ,可以防止蛋白酶对毒素的破坏<sup>[17]</sup>。100 bp DNA-毒素复合物中 DNA 分子的降解速率很慢 ,能够保证毒素在同受体结合前不被中肠道内的各种蛋白酶所水解。因此 100 bp DNA 可能和结构域之间的盐桥一样 ,具有保护毒素免受蛋白酶降解的作用<sup>[6]</sup>。

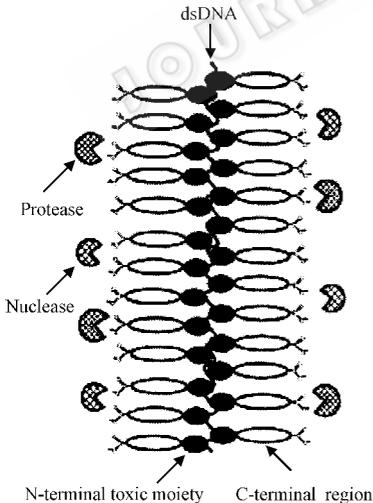


图 1 DNA-原毒素复合物的结构模型

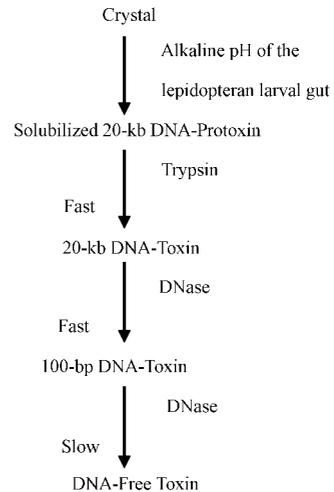


图 2 晶体蛋白在幼虫中肠内的激活过程

使用不含 DNA 的毒素与分离得到的 20 kb DNA 不能重新组合成 20 kb DNA 毒素复合物 ,这可能是因为没有提供合适的重组条件 ,或者是因为毒素在失去 DNA 分子后构象发生了变化而不能重新与 DNA 分子发生作用。

综上所述 ,Bt 在形成芽孢期间 ,DNA 分子将在其产生伴孢晶体的区域发生聚集。晶体发生溶解后 ,

能够释放出含有 20 kb DNA 分子的原毒素。DNA 分子的存在已经通过对 DNA 具有特异性的染液和琼脂糖凝胶电泳得到检验。原毒素分子的结构完整性依赖于其中的 DNA 片段,失去了 DNA 分子的原毒素用胰蛋白酶处理时将发生过度降解而不能产生毒性多肽,因此 DNA 分子对于原毒素的杀虫活性也是非常重要的。目前对于 20 kb DNA 片段的来源以及其序列和特异性的结构,还没有明确的认识。此外,人们还希望更清楚地阐明 20 kb DNA 片段在晶体的形成和原毒素的激活中所起的作用。目前进行的有关 20 kb DNA 片段的结构和功能的研究,对于彻底阐明 Bt 杀虫晶体蛋白的作用机理以及探索提高其杀虫活性的途径,都具有十分重要的指导作用。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Hofte H,Whiteley H R. *Microbiol Rev* ,1989 **53** :242 ~ 255.
- [ 2 ] Li J ,Carroll J ,Ellar D J. *Nature* ,1991 **353** ( 31 ) :815 ~ 821.
- [ 3 ] Grochulski P ,Masson L ,Borisova S. *J Mol Biol* ,1995 **254** ( 3 ) :447 ~ 464.
- [ 4 ] Li J ,Koni P A ,Ellar D J. *J Mol Biol* ,1996 **257** ( 1 ) :129 ~ 152.
- [ 5 ] Bietlot H P ,Schemthaner J P ,Milne R E ,et al. *J Biol Chem* ,1993 **268** ( 11 ) :8240 ~ 8245.
- [ 6 ] Clairmont F R ,Milne R E ,Pham V T ,et al. *J Biol Chem* ,1998 **273** ( 15 ) :9292 ~ 9296.
- [ 7 ] Schnepf E ,Crickmore N ,Rie J V ,et al. *Microbiol Mol Biol Rev* ,1998 **62** ( 3 ) :775 ~ 806.
- [ 8 ] Bietlot H P ,Vishnubhatla I ,Carey P R ,et al. *Biochem J* ,1990 **267** :309 ~ 315.
- [ 9 ] Couche G A ,Pfannenstiel M A ,Nickerson K W. *J Bacteriol* ,1987 **169** ( 7 ) :3281 ~ 3288.
- [ 10 ] Baum J A ,Malvar T. *Mol Microbiol* ,1995 **18** :1 ~ 12.
- [ 11 ] 邵宗泽 ,刘子铎 ,喻子牛. *生物化学与生物物理进展* ,2000 **27** ( 5 ) :476 ~ 480.
- [ 12 ] Chaturvedi R ,Bhakuni V ,Tuli R. *Protein Express Purif* ,2000 **20** ( 1 ) :21 ~ 26.
- [ 13 ] Bulla L A ,Kramer K J ,Davidson L I. *J Bacteriol* ,1977 **130** :375 ~ 383.
- [ 14 ] Yokoyama Y ,Kohda K ,Okamoto M. *Biol Pharm Bull* ,1998 **21** ( 12 ) :1263 ~ 1266.
- [ 15 ] Grochulski P ,Masson L ,Borisova S ,et al. *J Mol Biol* ,1995 **254** ( 3 ) :447 ~ 464.
- [ 16 ] Schemthaner J P ,Milne R E ,Kaplan H. *Insect Biochem Mol Biol* ,2002 **33** ( 3 ) :255 ~ 263.
- [ 17 ] Coux F ,Vachon V ,Rang C ,et al. *J Biol Chem* ,2001 **276** ( 38 ) :35546 ~ 35551.

## 《微生物学报》入选“中国科技期刊方阵”

近期,中国科学技术部公布了我国期刊进入“中国期刊方阵”的名单。全国共有 716 种期刊进入了“中国期刊方阵”,其中“双高”期刊 40 种;“双奖”期刊 58 种,“双百”期刊 122 种;“双效”期刊 496 种。《微生物学报》入选“双百”期刊方阵。

“中国期刊方阵”的建设是现阶段我国期刊出版事业发展的需要,是推进新世纪我国期刊发展的战略性举措,它将促进我国期刊“精品战略”的实施。

《微生物学报》编委会感谢各级领导的关心,感谢广大作者、读者对本刊办刊工作的大力支持。我们将更好地贯彻国家有关办刊工作的各项政策、法规和法令,进一步提高刊物质量,为我国的经济建设服务,为使期刊尽快走向世界做出积极贡献。