

苏芸金杆菌伴孢晶体的形态及抗原特性

任改新* 冯喜昌 冯维熊

(中国科学院北京动物研究所, 北京)

结合苏芸金杆菌不同品系毒力差异, 对伴孢晶体形态、血清学特性进行了比较研究。对分属于7个血清型的19个株系的伴孢晶体观察表明: 晶体形态以品系而异与分类属性无关; 晶体可归为五个类型: 菱形、嵌合形、球形、立方形、不规则形。发现具有嵌合形多的菌株对鳞翅目幼虫毒力不仅高, 且在有毒力的菌株中嵌合形并不罕见; 不规则形无毒力。对毒力差异大的菌株采用密度梯度离心提纯了其伴孢晶体, 进行双向琼脂糖免疫扩散试验, 证明了晶体形态与其对昆虫的毒力有关。

在调查研究苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的种型分布及其毒力的同时, 发现不同株系的伴孢晶体(简称晶体)形态并非均属菱形、立方形, 而且有不规则形、圆形和伴有多种形态的嵌合形^[1]。关于晶体形态与毒力之间的关系, 自 Evlakhva (1963) 提出不同来源的晶体毒力与形态有关以来一直存在分歧^[8-11]。至于晶体蛋白毒素抗原特性, Cooksey 已作了较全面的论述^[7], 但由于制备抗原、抗体材料方法不同, 其结果也颇为混乱。Krywicznyk 等虽结合毒力对二株菌进行了晶体蛋白的抗原分析, 但却未涉及晶体的形态特征, 迄今结合毒力进行晶体形态及血清学特性的研究尚无报道。本文在以前研究工作的基础上^[2], 报道不同品系晶体形态及其抗原特性的研究结果。

材料与方 法

(一) 菌株

苏芸金杆菌苏芸金亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 007; B-Hm-17)

阿莱亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *alesti* 3a)

库尔斯德亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1; HD-73; 7216)

松毛虫亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *deniro*

limus 7417; 306; L-7601)

蜡螟亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *galliaric* 010; 7214; 140; 7301; 001)

玉米螟亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *ostriniae* 006)

肯尼亚亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *kenyae* 023; 7404; 7501)

以色列亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 1897)

上述19个菌株中, HD-1、HD-73 为美国 Dulmage 博士赠, 1897 为沙糕云同志引自捷克, L-7601 为山东大学生物系赠, B-Hm-17 为东北农学院张霞鸿同志赠, 其余为本组保存^[1]。供试菌株除 006、1897 对鳞翅目幼虫无毒力外, 其余各株各具不同程度的毒力^[2]。

(二) 晶体形态观察

采用 Difco 营养琼脂斜面 30℃ 培养 48—72 小时菌苔, 在相差显微镜下进行活体观察, 用日立 Hu-HA 电镜对比观察并拍照。

(三) 晶体的提纯

将供试菌分别培养在营养琼脂培养基上 30℃ 12 天左右。收集菌苔, 用蒸馏水洗 2 次, 再

本文于 1981 年 4 月 5 日收到。

* 现在工作单位: 天津南开大学生物系。

生物物理研究所电镜室协助拍照; 动物研究所曹守珍同志拍摄免疫扩散照片, 于廷苏同志协助洗印放大, 特此一并致谢。

于加有 0.01% Triton X-100 生理盐水中洗一次, 经冰浴超声 5 分钟, 以泛影葡胺为介质, 在 VAC-25 离心机上, 进行密度梯度离心 (22,000g, 5°C, 1 小时)^[13-15], 取晶体带洗涤后冷冻干燥备用。

(四) 晶体蛋白的制备

称取一定量上述提纯冻干的晶体, 溶于 0.1 N NaOH, 1 小时后取上清液于透析袋中流水透析过夜。用 pH 4.4 醋酸缓冲液调 pH 为 4.6, 置 4°C 冰箱 30 分钟, 离心取沉淀用蒸馏水洗数次, 冰冻干燥备用。

(五) 晶体蛋白抗血清的制备

取晶体蛋白溶于 0.5ml NaOH (0.01N) 中, 置室温下 1 小时后, 对家兔进行免疫注射, 每只 2kg 雄兔注射总剂量 15mg 左右, 共注射 5 次前两次加等体积的完全福氏佐剂; 第三次加等体积的生

理盐水, 注射部位为背部、鼠蹊部、脚垫皮下多点注射; 后两次加等体积生理盐水于耳静脉注射, 最后一次注射后一周, 颈动脉放血, 离心收集血清, 加入 1/万硫柳汞, 装入安瓶, 低温冰箱保存。

(六) 双向琼脂糖免疫扩散

用磷酸缓冲液生理盐水配制 1% 琼脂糖, 于沸水浴中溶化并加入 1/万硫柳汞。溶化后趁热倒入洁净的玻璃板上, 使之分布均匀, 厚度为 1 mm。凝固后的琼脂板打孔, 孔内径为 3mm, 孔距为 5mm, 中央孔加抗血清, 外围孔加晶体抗原 (纯晶体 1mg 溶于 0.05N 的 NaOH 0.5ml 中, 置室温下 1 小时)。将加好样的琼脂板在室温下扩散 2 天, 置生理盐水中浸洗 2—3 天, 37°C 温箱中干燥过夜, 用 0.1% 氨基黑染色 10 分钟, 再用 1M 醋酸脱色, 直至背景清晰。

表 1 不同菌株伴孢晶体的形态及对昆虫的毒性

Table 1 Shapes and insecticidal activities of the parasporal crystals of various isolates of *Bacillus thuringiensis*

血清型 Serotype	菌株 Isolates	伴孢晶体形态* Shapes of the parasporal crystals					对鳞翅目 昆虫毒性** Toxicity to Lipidoptera larvae	对子孑毒性 Toxicity to mosquito larvae
		菱形 Bipyramidal	方形 Square	嵌合形 Embedded	圆形 Sphaeroid	不规则形 Irregular		
H ₁	007 B-Hm-17	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	— —	✓ ✓	++ ++	— —
H _{3a}	3a	✓	—	—	—	—	+	—
H _{3a-b}	HD-1 HD-73 7216	✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓	— — —	✓ ✓ —	+++ +++ ++	+ / /
H _{4a-b}	† 7601 7417 306	✓ ✓ ✓	✓ — —	— — —	— — —	— — —	+ + ++	— / —
H _{4b-c}	7501 7404 023	✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓	— ✓ ✓	✓ — —	— ✓ —	+ +++ ++	+ + /
H _{5a-b}	001 010 140 7414 7301	✓ ✓ ✓ ✓ ✓	— ✓ ± — —	— ✓ ± — —	— — — — —	✓ ✓ — — —	++ ++ ++ ++ ++	+ / / / /
H _{5a-c}	006	—	—	—	✓	✓	—	—
H ₁₄	1897	—	—	—	✓	—	—	+++

* ✓: 示有 indicate positive; —: 示无 indicate negative;

±: 结果不一致 indicate variable

** 致死率 mortality: + = 15—49%, ++ = 50—75%, +++ = 75—100%, / = not determined

结 果

(一) 晶体形态观察

19 株菌的晶体形态观察表明:

1. 晶体形态不限于众所周知的菱形、立方形, 而且嵌合形、球形也并不罕见, 还有我们于 1975 年报道的球形(现已放大证明为不规则形), 可初步归纳为五个类型, 即菱形、嵌合形、球形、立方形、不规则形体。通常易见的为菱形(图版 I-1—4, 图版 II-1—2, 表 1)。

2. 电镜观察证实相差显微镜的观察结果, 如相差镜下 006 菌的晶体为球形, 电镜下为不规则形体(图版 I-4)。又如相差镜下为一边膨大的不对称的纺锤形(图版 II-4, 5), 电镜下则为不同形体镶嵌的嵌合体(有方菱嵌合、有菱形与菱形、菱形与不规则形嵌合)(图版 I-1—2, 图版 II-3)。

3. 在一个菌株中, 有的晶体为单纯的菱形(图版 II-1), 有的为单纯的不规则形(图版 I-4)。而绝大多数毒力强的菌株都具有多种形体的嵌合体(如 7404、HD-1、7216、007)(图版 I-1—3, 图版 II-4, 5)。它们不仅具有大小不同优势的菱形、方形、嵌合形, 而且往往也伴有大小不一的球形、不规则形。晶体形态与该菌分类属性没有相关性。

4. 凡具有多形晶体的菌株, 如 HD-1, 经常可以在相差镜下看到其孢子囊中有双晶体, 甚至 3 个大小不同的晶体存在(图版 II-5 箭头所示)。

结合我们已报道过的不同品系苏芸金杆菌毒力比较结果^[2]及进一步的毒力试验(表 1), 发现具有不规则球形晶体的 006 菌株, 对鳞翅目及双翅目害虫(蚊幼虫)均无毒力。7414 的纯菱形晶体对蚕明显低毒, 但对松毛虫则具高毒力。而具有多形晶体

的菌株, 尤其是含嵌合形多的菌株, 不仅对鳞翅目毒力高, 且对蚊子幼虫也有一定毒力(表 1)。我国野生菌系肯尼亚亚种(7404)对粘虫、棉铃虫、松毛虫、家蚕、玉米螟等具有高毒力^[2], 其晶体形态多样, 大小不一(其嵌合形照片见文献[1]), 而与 7404 属同一血清型的 7501, 其晶体则以球形为主兼有极少菱形、方形(图版 II-7), 其毒力则很低^[2]。尤其是以色列亚种(1897), 其晶体为球形, 对鳞翅目幼虫无毒力, 但对蚊幼虫则具有高毒力。

(二) 晶体蛋白抗原特性的研究

结合上述晶体形态不同而毒力差异显著的肯尼亚亚种(7404、7501)、库尔斯德亚种(7216、HD-1)及无毒力的玉米螟亚种(006)的形态观察, 对此五株晶形上有代表性的菌株进行了晶体蛋白抗原、抗体双向免疫扩散试验, 结果表明:

1. 五株菌晶体蛋白抗原与相应抗血清之间明显呈现两条沉淀线(图 1-a—d)。

2. 无毒力的 006 与有毒力的 HD-1、7404、7501、7216 晶体蛋白抗原、抗体之间不呈现沉淀线, 表明它们之间缺少共同的抗原成分(图 1-d)。

3. 具有毒力的 7404、HD-1、7501、7216 抗原抗体相互作用至少呈现一条沉淀线, 说明它们的晶体蛋白至少部分同源。

4. 从属于同一血清型的 HD-1 和 7216 相互作用结果看出: 同源抗原抗体作用各有两条沉淀线, 但二者相互交叉双扩散则各自与对方仅有一条沉淀线, 故 HD-1 及 7216 晶体蛋白仅部分同源, 各有对方所不具备的特异性抗原成分(图 1-b—c)。HD-1 毒力高于 7216, 含嵌合形晶体和不规则形体也比 7216 多, 而晶体蛋白抗原各具有特异性, 因此, HD-1 与 7216 虽属同一血清型^[20], 其对昆虫的活性物质并不完全相同。

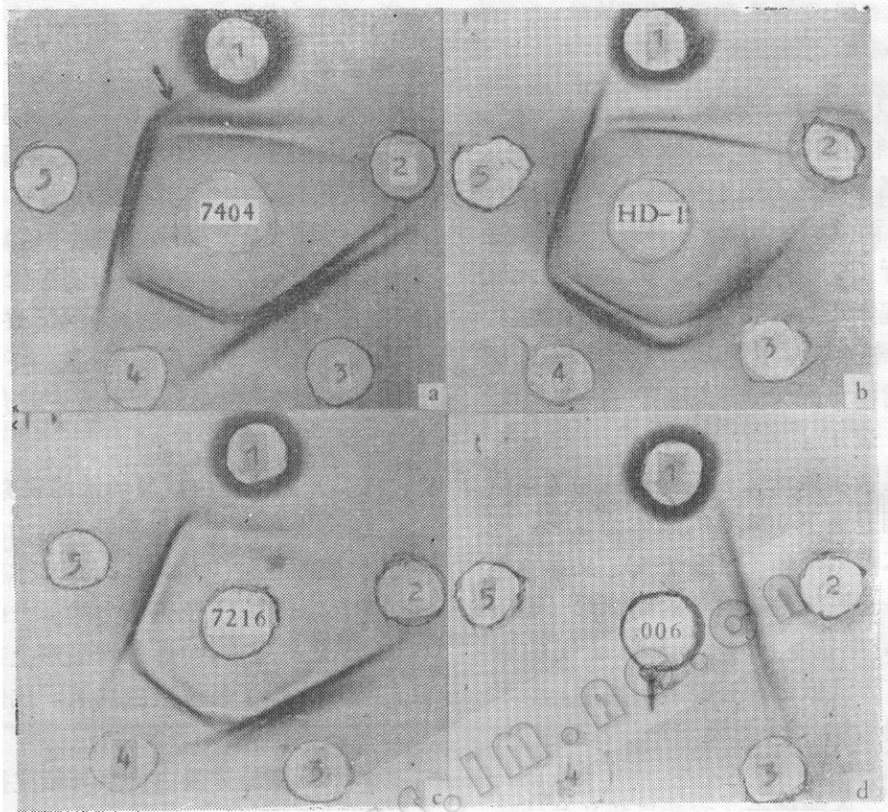


图 1 5个菌株晶体蛋白双向琼脂糖免疫扩散图

Fig. 1 Using agarose double diffusion patterns to show that the crystal proteins produced by five closely related varieties of *Bacillus thuringiensis* are actually different in some respects.

中心孔为7404, HD-1, 7216, 006 的抗血清, 周围孔分别为: 1: 7404, 2: 006, 3: 7216, 4: HD-1, 5: 7501 晶体抗原

The center well contained antiserum against crystal protein of *Bacillus thuringiensis* 7404, HD-1, 7216, 006, respectively, the peripheral wells contained crystal antigens of various varieties of *B. thuringiensis* (1: 7404, 2: 006, 3: 7216, 4: HD-1, 5: 7501)

讨 论

根据供试菌株的毒力结合形态观察可以看出, 晶体形态不同毒力有异(表 1)。如 1897 菌株对鳞翅目幼虫无毒力, 但对蚊子幼虫剧毒^[3-5]; 具有不规则球形体的 006 菌株经多种昆虫测定无毒力; 而具有高毒力的 HD-1、HD-73、7404 等菌株则往往具有合成多种晶体的能力, 它们不仅具有常见的菱形、方形, 而且含有球形、不规则形、嵌合形。Sharpe 等对 HD-1 所具有的嵌合形作为新发现作了详细的报道^[14], 而我们

从 1975 年发表了 7404 菌的嵌合形图版后, 相继在不少菌株中观察到各种类型的嵌合形——方菱镶嵌、菱菱镶嵌、不规则球形和菱形镶嵌, 而且在具有嵌合形多的菌株中经常可以看到带有缺刻的菱形体(图版 I-1)、方形、不规则形以及大小不等的各种形体并存(图版 I-1—3, 箭头所示)、菱菱镶嵌(图版 II-3)。故嵌合形晶体不是 HD-1 独有, 它在毒力高的菌株中广泛存在, 只是量的多寡以及电镜制片中查到的机会不同而已。如 7216 菌株一般主要含有典型菱形晶体, 但偶尔也可看到嵌合形。

此外, Sharpe 在文章角注中提到 Fast 曾在个人通讯中提及提纯的方形晶体无毒力, 但 Bucher^[16] 的试验却证明以方形晶体为主的 562-5A 品系却比典型的血清型 1 (菱形晶体) 毒力高 30—70 倍。我们认为既然球形、不规则球形对鳞翅目无毒力, 而以菱形晶体占绝对优势的 7414 菌株毒力又弱, 那么, 可以推论具有多种晶形混合的菌株中嵌合形的存在可能是毒力高的主要因素。嵌合形是否易为寄主肠道酶降解? 菌株中晶形多样化是否由各类嵌合形裂解而成? 尚待深入研究。

我们对晶体血清学特性的研究是结合晶体形态及菌株毒力进行的。琼脂糖双向免疫扩散结果进一步证实了晶体形态与毒力有关这一结论。本文结果与 Bucher^[16]、Cooksey^[17]、Krywiencyk^[18] 的观点相同, 而有别于 Pendleton^[19] 和 Junko Nishiitsutsuji-Uwo 等的结果^[11]。因此, 对属于同一血清型库尔斯德亚种(HD-1)和天门亚种^[20], 由于它们晶体蛋白抗原成分不完全相同且各具有对方所缺的特异性抗原, 建议 HD-1、7216 菌株可在库尔斯德亚种下给以不同生物型的地位。同样, 我们分离的血清型 4a-4c 中的肯尼亚变种 7404、7501 也可同样处理。因此, 晶体蛋白血清学的研究不仅对阐明晶体形态与功能的关系是重要的手段, 而且对苏芸金杆菌分型也有一定的参考价值。从这个角度讲, 我们同意 Krywiencyk、Dulmage 和 Fast^[12,18] 对于苏芸金杆菌三级分类(形态生理、血清、毒力)的观点。

参 考 文 献

- [1] 任改新等: 微生物学报, 15 (4): 292—301, 1975。
- [2] 中国科学院动物研究所苏芸金杆菌组: 微生物学报, 18: 352—354, 1978。
- [3] H. de Barjac: *Entomophaga*, 23: 309—319, 1978
- [4] de Pierre Guillet and H. de Barjac: *C. R. Acad. Sc. Paris, T. 289, sevse D-549*, 1979.
- [5] 喻子牛等: 微生物学通报, 7(5):198, 1980。
- [6] Norris, J. R.: In "Microbial Control of Insects and Mites" (ed. by H. D. Burges and N. W. Hussey), Academic Press, London N. Y., 1971, pp. 229—246.
- [7] Cooksey, K. E.: *ibid.* pp. 247—273.
- [8] Evlakhva, A. A. and O. I. Schvetzova: In *Microbiologicheskie Metody Vrednyimi Nasekomymi*, AN SSSR, 24—34, 1963.
- [9] Grigorova, I. M. et al.: *J. Invert. Pathol.*, 9: 503—509, 1967.
- [10] Pendleton, I. R.: *J. Invert. Pathol.*, 13: 423—428, 1969.
- [11] Junko Nishiitsutsuji-Uwo et al.: *J. Invert. Pathol.*, 25: 355—361, 1975.
- [12] Krywiencyk, H. T. et al.: *J. Invert. Pathol.*, 31: 372—373, 1978.
- [13] Milne, R. et al.: *J. Invert. Pathol.*: 29: 230—231, 1977.
- [14] Shape, E. S. and F. L. Baker: *J. Invert. Pathol.*, 34: 320—322, 1979.
- [15] 王瑛等: 微生物学报, 23 (3): 285—288, 1980。
- [16] Bucher, G. E. et al.: *J. Invert. Pathol.*, 8: 485—491, 1966.
- [17] Cooksey, K. E.: *Biochem. J.*, 106: 445, 1968.
- [18] Krywiencyk, J. and H. T. Dulmage: International Colloquium on Invertebrate Pathology XI th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Sept. 11—17 Progue, p. 65, 1968.
- [19] Pendleton, I. R. and R. B. Morrison: *J. Appl. Bacteriol.*, 29: 519—528, 1966.
- [20] 湖北省天门县微生物所等: 微生物学报, 20 (1):1—5,1980。

THE SHAPE AND ANTIGENIC CHARACTERISTICS OF THE PARASPORAL CRYSTAL OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Ren Gaixin* Feng Xichang Feng Weixiong
(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing)

An electromicroscopic examination of the shape of the parasporal crystals associated with 19 strains of *B. thuringiensis* is reported. It shows five types of parasporal crystals: bipyramidal, square, irregular, embedded, sphaeroid. It is first showed that the atoxigenic parasporal crystals of *B. thuringiensis* subsp. *ostriniae* (006) are of an irregular type.

An explanation of the relation between the toxicity and shape of crystal is proposed.

This conclusion is supported by the agarose double diffusion patterns obtained when antigen reacts with antiserum prepared from pure crystals (by using isopycnic centrifugation) of four strains of *B. thuringiensis*.

*Present address: Dept. of Biology
Nankai University
Tianjin, China

Reprint requests should be sent to Dr. Ren Gaixin