

## 几种苏芸金杆菌晶体的超微结构

李荣森 陈 涛 邓海凡 袁 丽

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

观察了苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 7 个菌株晶体的超薄切片, 不同来源的晶体内部超微结构有明显差异。6 种晶体具有晶格构造, 但 1897 菌株的晶体内部具有非均一构造。无鞭毛菌株 140 的晶体具有极易碎裂的特点。HD-1 的晶体的镶嵌型构造进一步被证实。血清 8 型 006 菌株的晶体不具有任何蛋白质晶格结构。讨论了苏芸金杆菌晶体的超微结构与其对昆虫毒力的关系。

在对苏芸金杆菌晶体的形态及表面结构与毒力关系的研究基础上<sup>[1]</sup>, 我们继续对 6 个变种的 7 株菌的晶体进行了超薄切片的电镜观察, 并对其中两种晶体作了扫描电镜观察, 以进一步了解不同晶体的内部超微结构和这些结构特点在昆虫病理上可能具有的意义。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌株与培养

使用了 7 个菌株<sup>[1]</sup>: T<sub>2</sub> (*Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*), 25 (*B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*), HD-1 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), D<sub>1</sub> (*B. thuringiensis* subsp. *dendrolimus*), 006 (*B. thuringiensis* subsp. *ostriniae*), 1897 (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*), 140 (*B. thuringiensis* subsp. *wuhanensis*)。

各菌株在斜面或平板的琼脂培养基上, 于 30 ± 1℃ 培养 3—4 天 (1897 菌株需 7—8 天), 菌体大部分形成芽孢、晶体时即可供超薄切片用。供电镜扫描用的晶体则是由培养 8—12 天的培养物中提纯的。

#### (二) 晶体样品的制备

供超薄切片用的样品采用上述完全菌培养物。供电镜扫描用的 T<sub>2</sub> 及 HD-1 菌株按 Pendleton 和 Morrison<sup>[2]</sup> 的方法提纯晶体。

#### (三) 超薄切片与电镜扫描

各菌株的新鲜培养物, 以戊二醛和锇酸双重

固定, 苯二甲酸二丙烯酯包埋, 于 LKB-88003 型超薄切片机上切片, 于覆有 Formvar 膜的铜网上滴样后经醋酸铀和柠檬酸铅双重复染, 然后在 JM-100C 型电镜下观察; 在电镜扫描中, 先将晶体悬液滴样, 然后在 JEE-4B 型真空喷涂仪上以黄金旋转喷涂再进行扫描观察。

### 结 果

#### (一) 晶体晶格及蛋白质亚单位的大小

D<sub>2</sub>、25、HD-1 菌株的晶体, 皆显示了苏芸金杆菌蛋白质晶体的典型晶格及亚单位构造 (图版 I-B、E、F), 其中 HD-1 晶体的结构似较致密。T<sub>2</sub> 晶体在多数情况下难以见到晶格构造, 偶尔可见到典型的晶格 (图版 I-A)。140 菌株的晶体极易碎裂, 但少数晶体的超薄切片仍隐约可见规则的条纹状构造 (图版 I-C), 在超薄切片中未能见到 140 菌株的镶嵌形晶体。1897 菌株晶体内部系非均一的构造, 部分区域显示出晶格结构 (图版 I-D)。006 菌株的晶体则完全没有见到晶格结构 (图版 I-G)。

经粗测各种晶体的晶格及蛋白质亚单位的大小如下: 25: 晶格 (边长, 下同)

本文于 1981 年 10 月 19 日收到。

本工作得到王学兰、张世敏同志的协助, 特表感谢。

10.9 × 10.9 nm, 亚单位 (长 × 宽, 下同) 13.5 × 4.6 nm; HD-1: 晶格 9.6 × 9.6 nm, 亚单位 15.4 × 3.7 nm; D<sub>2</sub>: 晶格 9.7 × 9.7 nm, 亚单位 11.3 × 3.5 nm; T<sub>2</sub>: 晶格 9.9 × 9.9 nm; 1897: 晶格 10.5 × 10.5 nm。可见各菌株晶体的晶格大小近似, 而亚单位大小则有差异。

## (二) 晶体的包膜

在 T<sub>2</sub>、D<sub>2</sub>、140、1897 菌株的四种晶体中皆可见到晶体外的一层包膜 (图版 I-A、B、C、D)。在超薄切片电镜观察中, 也曾见到 HD-1 和 25 的晶体外有一层包膜。在所有观察过的晶体中, 1897 晶体的包膜紧贴晶体, 且在图版 I-D 中见到包膜似有 2 层。这层膜显然不同于苏芸金杆菌中常见的芽孢外膜, 它只是包住晶体而与芽孢无任何连接。006 晶体周围有一层很厚的包被物, 不同于上述的晶体包膜。

## (三) 几种晶体的特殊结构

电镜照片清楚地显示出 1897 晶体内部的非均一构造, 并在膜外尚有两团晶体蛋白质样物质。图版 I-D 中表明 1897 晶体至少由三部分构成, 一是有清晰晶格构造的部分, 二是隐约可见条纹构造的部分, 第三部分则完全没有晶格构造。无论在何切片中都可见到 1897 晶体膜保持完整而紧贴晶体。且晶体内各部分是相互镶嵌的, 因此可以认为这是一种特殊镶嵌形的晶体。

超薄切片的观察进一步证实了 HD-1 菌株中的镶嵌形晶体, 由图版 I-F 可清楚地看到具有晶格构造的晶体本体和没有晶格构造的长椭圆形镶嵌体。在扫描电镜观察中 (图 1) 还可看到多种形态的镶嵌体: 卵形、球形和不规则的团块状, 照片中的方形物也可能是一种镶嵌体, 个别方形物似与晶体的凹陷有一定联系, 由于晶体经过提纯, 自然状态受到破坏, 未能看到此种方

形物与晶体本体的嵌合情况。有的研究者<sup>[4]</sup>曾报道类似的结果。

在所有情况下都未见到 006 晶体的任何晶体构造 (图版 I-G), 只见到在一层厚厚的外被内包含着一种均质的内含物。在某些情况下, 外被物破损, 内含物流出而内部变空。

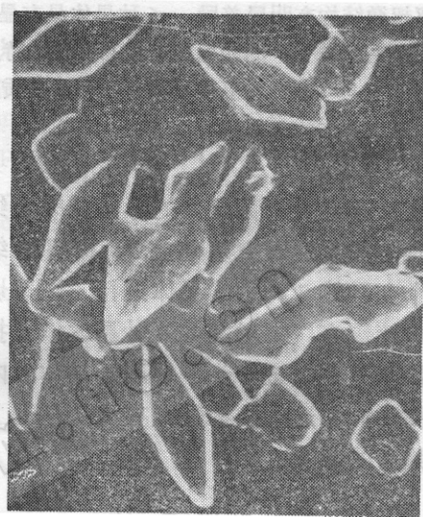


图 1 苏芸金杆菌 HD-1 菌株晶体的扫描电镜照片 (×40,000)

Fig. 1 The scanning electromicroscopic photograph of the crystals of strain HD-1

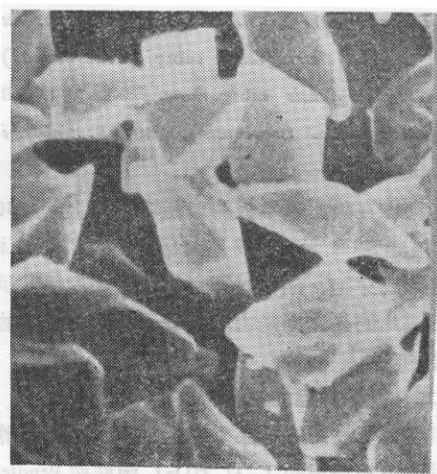


图 2 苏芸金杆菌 T<sub>2</sub> 菌株晶体的扫描电镜照片

Fig. 2 The scanning electromicroscopic photograph of the crystals of strain T<sub>2</sub>

#### (四) 扫描电镜观察

HD-1 晶体的电镜扫描结果已如上述。对 T<sub>2</sub> 菌株晶体的电镜扫描观察(图 2), 得到了与以前在形态和外部结构观察中有所不同的结果, 菱形晶体比例大为增加, 方形晶体减少, 不过菱形晶体中有许多是粗短形, 其中有的近于方形。

### 讨 论

由 7 种苏芸金杆菌晶体的超薄切片观察可以看出, 虽然其中 3 株 (25, HD-1, D<sub>2</sub>) 的晶体具有大致相同的内部超微结构, 但与其它几株晶体的结构有所不同; 即使在这 3 种晶体中, HD-1 晶体的镶嵌形构造又异于其它两种。此外, 1897 菌株晶体的非均一内部结构更为复杂而独特, 尚未见于已有的报道。有意思的是, 1897 除了有固定形状的晶体之外, 尚在细胞中存在着定形的晶体样团块, 如果这不是由于操作原因造成的假象, 那么这可能是在晶体生物合成中同时形成的蛋白质晶体碎块。据此可以推测, 某些苏芸金杆菌可形成蛋白质晶体碎片或毒性蛋白质分子而游离于细胞之中。1897 晶体对鳞翅目幼虫毒性低而对几种蚊幼虫具有高毒性, 也许与这种结构及其外部的牢固包膜有关。

140 晶体在做超薄切片时特别容易碎裂, 使我们联想到先前在超声波处理时也容易碎裂的情况。这可能意味着 140 晶体具有某种结构上的特异性。T<sub>2</sub> 晶体的超薄切片也较常见到碎裂的情况, 而且在大部分情况下不易见到其晶格构造, 其原因尚不明。值得指出的是 T<sub>2</sub> 晶体的扫描电镜观察出现了不同于我们早先的形态与表面结构研究的结果。在扫描电镜照片中方形晶体很少, 而菱形明显增多, 许多菱形都较粗短, 有的晶体平面投影近乎方形。造成这种情况的原因可能是由于取样不均或

者是该菌本身存在产生方形和菱形晶体的两种营养体, 在移接培养过程中二者的数量比例发生了变化。一般来说, 此菌株的晶体较粗大。

006 菌株的晶体超薄切片未显示任何蛋白质晶体的结构特点, 联系以前, 研究中表面结构和毒力测定的结果, 我们初步认为它不是一种真正的蛋白质晶体。

不同苏芸金杆菌晶体毒力的差异<sup>[1,5-12]</sup>和形态结构上的多样性<sup>[1,3,4,13-15]</sup>已有较多的报道, 而在晶体的毒力与其形态结构是否有关这一问题上存在着分歧。我们认为二者有一定关系。有的研究者指出, 菱形晶体的蛋白质数目及其分子量明显不同于四面体晶体, 这意味着苏芸金杆菌晶体的形态结构与蛋白质化学组成和结构之间存在着联系。因而, 这也可能对不同形态和超微结构的晶体的毒力差异提供进一步的解释。

### 参 考 文 献

- [1] 李荣森、陈涛: 微生物学报, 21(3): 311—317, 1981。
- [2] Pendleton, I. R. and R. B. Morrison: *Nature*, 212(5063): 728—729, 1966。
- [3] Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.*, 33(1): 192—206, 1969。
- [4] Sharp, E. S. and F. L. Baker: *J. Invertebr. Path.*, 34(4): 320—322, 1979。
- [5] Angus, T. A.: *J. Invertebr. Path.*, 9(2): 256—260, 1967。
- [6] Pendleton, I. R.: *J. Invertebr. Path.*, 13(3): 423—428, 1969。
- [7] Yamvrias, C. and T. A. Angus: *J. Invertebr. Path.*, 15(1): 92—99, 1970。
- [8] Dulmage, H. T.: *J. Invertebr. Path.*, 18(3): 353—358, 1971。
- [9] 中国科学院动物研究所苏芸金杆菌组: 微生物学报, 18(4): 352—354, 1978。
- [10] de Barjac, H.: *C. R. Acad. Sc.*, 286(10): 797—800, 1978。
- [11] 王瑛等: 昆虫学报, 24(1): 42—47, 1981。
- [12] Grigorova, I. M. et al.: *J. Invertebr. Path.*, 9(4): 503—509, 1967。
- [13] Junko Nishiitsutsuji-Uwo et al.: *J. Invertebr. Path.*, 25(3): 355—361, 1975。

[14] Johnson, D. E. et al.: *Can. J. Microbiol.*,  
26(4): 486—491, 1980.

[15] Calabrese, D. M. et al.: *Can. J. Microbiol.*,  
26(8): 1006—1010, 1980.

## THE ULTRA-STRUCTURE OF THE CRYSTALS FROM SEVERAL STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Li Rongsen Chen Tao Deng Haifan Yuan Li

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

The ultrathin sections of seven strains which belong to six varieties of *Bacillus thuringiensis* were observed under electron microscope. Different ultra-structures existed among these various crystals. Six of them showed crystal lattice structure, but the structure of the crystal from the strain 1897 (H-14) was heterogenous. The crystals of the non-flagellated strain, strain 140, were easy

to be broken. It was demonstrated that there was a mosaic structure in the crystal of the strain HD-1 belonging to serum type 3. The crystal of the strain 006 of serum type 8 did not show any organized structure of the protein crystal. The relationship between the ultra-structure of the crystals from *Bacillus thuringiensis* and the toxicity to insects were discussed.

### 图 版 说 明

7 株苏芸金杆菌晶体的超薄切片: A. T<sub>2</sub> (×120,000); B. D<sub>2</sub> (×120,000); C. 140 (×80,000); D. 1897 (×132,000), (A、B、C、D 中的箭头示晶体的包膜); E. 25 (×120,000); F. HD-1 (×83,000), 箭头示无晶格构造的长椭圆形镶嵌体; G. 006 (×72,000), 粗箭头示厚层包被物, 细箭头示包被物破损, 内含物流出。

The ultra-thin sections of crystals from 7 strains of *Bacillus thuringiensis*: A. T<sub>2</sub>; B. D<sub>2</sub>; C. 140; D. 1897, (The arrows A, B, C, D showed the envelope of the crystals); E. 25; F. HD-1 (The arrow showed embedded body of long-ellipse shape of non-structure crystal lattices); G. 006 (The coarse arrows showed thick layer wrapper, the thin arrow showed flow out of the content when wrapper was broken.