

# 苏云金芽孢杆菌液体培养物上清液中杀虫活性物质的研究

崔云龙

(山东农业大学,泰安 271018)

岡部宗一

(长濑产业公司研究开发中心,日本)

浅野昌司

(久保田公司技术开发研究所,日本)

采用离心、柱层析、氨基酸组成及序列分析、生物鉴定等方法,对具有杀虫活性的苏云金芽孢杆菌培养物上清液进行了研究。发现上清液中杀虫活性的出现时间与菌的自溶同步。上清液中含有的分子量为 60-kDa 的蛋白是起杀虫作用的主成分,分离纯化该蛋白质,对其进行了氨基酸组分和 N 末端序列分析。结果表明,该蛋白与 P1 蛋白在 N 端有 18 个氨基酸的序列完全一致,氨基酸的组分相似,说明二者同源。同时还发现,上清液与沉淀混用能提高杀虫活性。

**关键词** 苏云金芽孢杆菌;上清液;杀虫

目前,国内外工业规模生产苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 制剂的后处理工艺,基本上是采用将发酵液离心或板框压滤的方法回收菌体<sup>1,2</sup>。离心后的上清液或板框滤出液作为废液放掉。作者等在实验中发现,经 43,000g 离心后的上清液仍有很强的杀虫活性,离心后沉淀的毒力降低了。为了减少杀虫活性成分的损失,提高收率,我们对上清液中的杀虫活性物质进行了研究。

## 材料和方法

### (一) 供试菌种

实验用菌种是苏云金芽孢杆菌库斯塔克变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*) HD-1 菌株。由美国圣地亚哥州的 Mycogen 公司提供。

### (二) 培养基

采用 PGSM 培养基,摇瓶用液体培养基 (g/L), 细菌胨 (Difco) 7.5, 葡萄糖 1,  $K_2HPO_4$  4.35,  $KH_2PO_4$  3.4, 混合盐溶液 (每 100ml 含  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.46g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.04g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.28g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4g) 5 ml, 氯化钙溶液 (每 100 ml 含  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  3.66g) 5ml。平板培养基是在液体培养基中加 2% 琼脂。

### (三) 培养、上清液的收集及活性检测

本文于 1991 年 3 月 13 日收到。

中国科学院武汉病毒研究所李荣森副研究员和南开大学生物系任改新副教授均对本文提出过宝贵意见, 谨此致谢。

用 1000ml 底部带档板的专用发酵瓶进行摇瓶培养, 每瓶液量 300ml, 高温灭菌后, 用斜面复壮菌种接种。300 r/min, 30℃ 培养 8 小时后, 每隔一定时间取样离心, 进行镜检并测定上清液的活性, 据需要增测培养液及沉淀的活性。把第 32 小时的培养液, 用 43,000g 离心 1 小时, 收集上清液, 置 4℃ 保存备用。

#### (四) 蛋白质含量的测定

柱层析时, 用 A280nm 测定, 一般测定参照 Lowry 等的方法<sup>[3]</sup>。

#### (五) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

电泳胶片的制做参照 Laemmli 的方法<sup>[4]</sup>。浓缩胶的浓度采用 3.0%, 分离胶的浓度是 7.5%。改考马斯亮蓝染色为高敏感度的银染色。

#### (六) 伴孢晶体和上清液中杀虫活性成分的纯化

伴孢晶体的提纯, 采用液体双相法; 上清液中杀虫活性成分的分离主要采用 DEAE-TOYOPERA 柱层析、Fast protein liquid chromatography (瑞典 Pharmacia 公司生产) 和生物测定等方法。

#### (七) 杀虫活性测定

在纯化过程中用 2 龄小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 幼虫作为生测虫种。扩大实验时, 又加用斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*)、茶小卷叶蛾 (*Adoxophyes orana*) 两种敏感性不同的鳞翅目昆虫对纯品进行了生物毒力测定。柱层析时, 每一号管 5 头, 通常测定, 每组 20 头, 重复 3 次, 用涂布了一定量上清液或精制过程中样品的食饵饲喂 72 小时, 调查死活头数。

## 结 果

### (一) 菌体形态、上清液的杀虫活性与培养时间的关系

对培养 8 小时后的培养液, 每隔一定时间进行取样镜检, 离心后测定上清液杀虫活性的结果如表 1 所示。实验结果表明, 上清液中的杀虫活性从培养后第 18 小时开始出现。此时有 1—2% 的菌体开始自溶, 杀虫活性随着自溶率的升高成正比例增大, 到第 32 小时, 自溶率达 95% 时, 杀虫活性达最高峰, 随后逐渐下降, 到第 68 小时, 降低了 19%。

表 1 培养时间对菌体形态、上清液杀虫活性的影响

Table 1 Effect of culture time on cell form and insecticidal activity of supernatant

培养时间 Culture time (h)	8	16	18	20	24	28	32	68
半致死浓度 LC <sub>50</sub> (稀释倍数) (Dilution times)	—	—	1	2	100	720	1000	810
菌体形态 Cell form	—	均为营养体 all the vegetative cells	1% 菌体 自溶 1% of the cell's lysis	2—5% 菌体 自溶 2—5% of the cell's lysis	10% 菌体 自溶 10% of the cell's lysis	65% 菌体 自溶 65% of the cell's lysis	95% 菌体 自溶 95% of the cell's lysis	99% 菌体 自溶 99% of the cell's lysis

## (二) 杀虫活性成分的分离、鉴定

取 300ml 上清液, 冷冻干燥浓缩为 30ml, 添加到预先调制好的 DEAE-TOYOPERA 柱 ( $\phi 2.5 \times 38\text{cm}$ ) 上, 用 300ml 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 8.10 (缓冲液 A) 淋洗后, 再用 200ml 0—0.2mol/L NaCl 线性梯度液洗脱(图 1)。缓冲液 A 的淋洗液中没有检出杀虫活性, 说明杀虫活性成分完全被树脂所吸附。在 NaCl 线性梯度洗脱液 0.175 mol/L 处检出了杀虫活性, 收集有杀虫活性的洗脱液浓缩、透析除盐, 供进一步纯化。

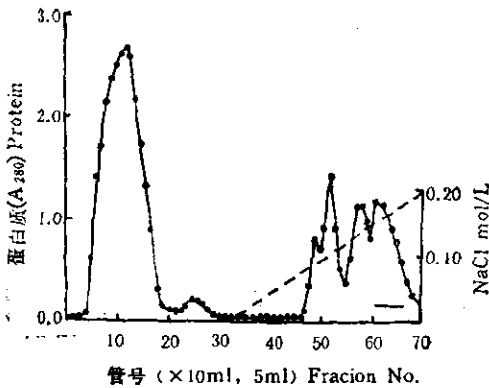


图 1 用 DEAE-TOYOPERA 柱层析分离上清液中的杀虫活性成分

●—● 蛋白质 (“—”表示该部分洗脱液有杀虫活性)

Fig. 1 DEAE-TOYOPERA column chromatography of insecticidal ingredients from supernatant

●—● Protein (“—” indicates insecticidal activity in that part of elution liquid)

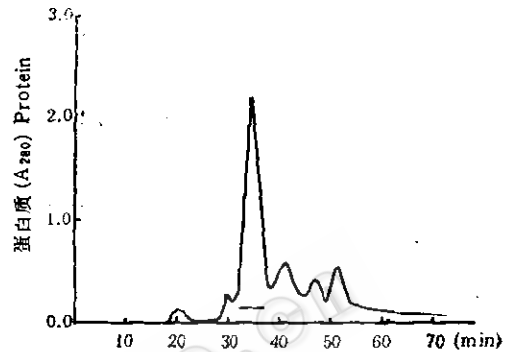


图 2 DEAE-TOYOPERA 柱层析得到的杀虫活性成分经 FPLC 层析的结果

“—”表示该部分洗脱液有杀虫活性

Fig. 2 FPLC of the insecticidal ingredients from DEAE-TOYOPERA column chromatography

“—” indicates insecticidal activity in that part of elution liquid

在预备实验时, 先采用了 0—0.5mol/L 的 NaCl 线性梯度液, 杀虫活性成分在 NaCl 线性梯度 0.2mol/L 以前被洗出。为了提高分离能力, 故采用了 0—0.2mol/L NaCl 线性梯度液进行洗脱。

把以上收集到的含杀虫活性成分的洗脱液用 Pharmacia 公司生产的 Fast protein liquid chromatography (FPLC) 进一步纯化。层析柱是 FPLC 专用的 Superose 12 ( $\phi 1 \times 30\text{cm}$ ), 洗脱液采用含 0.1mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液, pH 8.10, 流速 0.4ml/min, 层析结果如图 2。保持时间到第 35 分钟时, 出现一个主要的分离峰, 并与杀虫活性相对应。随后出现的三个分离峰, 没有检出杀虫活性。收集第一个主分离峰的洗脱液, 浓缩后用 SDS-PAGE 鉴定其纯度(图 3)。通常用考马斯亮蓝染色时, 标准分子量蛋白(a)只能看到 6 种标准分子蛋白带。而银染色由于敏感度提高, 在标准分子蛋白条带之间还出现了许多细小的蛋白带。碱解后的伴孢晶体蛋白(b)经银染色后, 除能看到通常染色时出现的 P1 (135-kDa) 和 P2 (65-kDa) 二条主要的蛋白区带外, 还有许多细小的蛋白带。(c)是上清液冷冻干燥浓缩 20 倍后上样的结果, 电泳结果表明, 上清液中不含有 P1 和 P2 二种伴孢晶体蛋白。分子量最大的蛋白也只有 60-kDa。

这与 FPLC 的结果相一致。(d) 是将上清浓缩液用蒸馏水稀释后上样的结果, 与(c)不同的是在 60-kDa 蛋白带之上又出现了一条蛋白带。(d) 与 (c) 相比, 有数条低分子量的蛋白带消失了。(e) 是纯化得到的杀虫活性蛋白, 与上清浓缩液中 60-kDa 蛋白的泳动位置相同, 且下边的低分子量蛋白已被去除, 说明该杀虫活性蛋白已被纯化为单一成分。(f) 是将伴孢晶体用胰蛋白酶降解后电泳的结果。伴孢晶体被胰蛋白酶降解后, P1 蛋白及 P1 下边的较低分子量的蛋白区带均消失, P2 蛋白依然存在, 在 P2 蛋白带之下, 一条 62-kDa 的蛋白带变粗增大了。此结果说明, P2 蛋白对胰蛋白酶不敏感, P1 蛋白以及由 P1 降解产生的低分子量蛋白均对胰蛋白酶敏感, 能被降解为约 62-kDa 的蛋白。这与山本等人<sup>[6]</sup>的结果一致。

### (三) 氨基酸组分的测定

为了搞清纯化得到的 60-kDa 杀虫活性蛋白的性质, 对其进行了氨基酸组成的测定, 分析结果(表 2) 与伴孢晶体的 P1 和 P2 蛋白的氨基酸组分相比较, 得知该蛋白与 P1 蛋白的氨基酸组分相似<sup>[7]</sup>。

### (四) N 末端氨基酸序列的分析

为了进一步了解该杀虫活性蛋白与 P1 蛋白的关系, 对其进行了 N 末端氨基酸序列的分析。测得 N 末端 18 个氨基酸的一级结构是 N-X-X-Glu-Asp-Zle-Glu-Thn-Gly-Tyr-Thr-Pro-Ile-Asp-Ile-Ser-Leu-Ser-Leu-Thr-Gln。第一、二个氨基酸因干扰未能测出。把第 3—20 个氨基酸的序列与 P1 和 P2 N 末端的序列进行比较得知, 该序列与 P1 的第 27—44 个氨基酸的序列完全一致<sup>[8]</sup>。N 末端有 18 个氨基酸的序列完全相同。说明从上清液中分离得到的 60-kDa 的杀虫活性蛋白与 P1 的 N 末端同源。

### (五) 毒力鉴定

用两种敏感性差异较大的鳞翅目昆虫, 测定了 60-kDa 提纯品的毒力, 同时测定了上清液及伴孢晶体对这两种昆虫的毒力作为对照(表 3)。小菜蛾用 2 龄幼虫, 斜纹夜蛾用蚁虫。结果表明, 上清液的毒力很高。反复进行多次实验的结果大致相同。小菜蛾与斜纹夜蛾的敏感程度尽管不同, 但趋势相似。纯品的毒力比上清液降低了, 可能是精制过程中部分蛋白失活所致。上清液和提纯品的毒力明显高于伴孢晶体, 说明 60-kDa 蛋

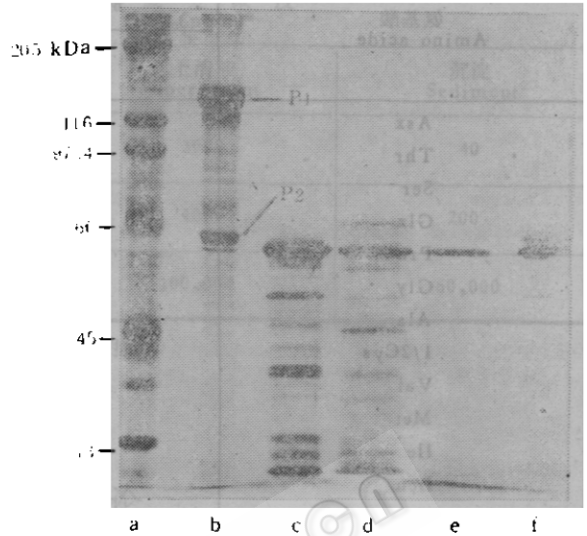


图 3 纯化得到的杀虫毒素蛋白质的电泳图谱

a. 标准分子量蛋白质; b. 晶体蛋白; c. 上清液的 20 倍浓缩液; d. 浓缩液的等倍稀释液; e. 纯化得到的杀虫活性蛋白; f. 经胰蛋白酶分解后的晶体蛋白。

Fig. 3 SDS-PAGE of purified insecticidal toxin protein

a. Standard molecular weight protein; b. Crystal protein; c. 20times concentrated solution of supernatant; d. The concentrate was diluted with aqual water; e. Purified insecticidal toxin proteins; f. Crystal protein was treated with trypsin.

表 2 纯化得到的 60-kDa 蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of purified 60-kDa protein from supernatant

氨基酸 Amino acids	60-kDa 蛋白 60-kDa protein	PI 蛋白 <sup>[7]</sup> PI protein
	g 残基数/100g g residues/100g protein	
Asx	10.63	13.31
Thr	6.84	5.99
Ser	10.3	6.49
Glx	9.91	11.98
Pro	7.08	5.32
Gly	11.33	6.82
Ala	5.52	5.32
1/2Cys	0.00	1.66
Val	5.65	7.32
Met	1.29	0.83
Ile	6.26	5.40
Leu	7.97	7.49
Tyr	3.80	3.83
Phe	5.87	4.83
Lys	0.61	2.5
His	1.58	2.16
Arg	7.08	7.65
Trp	0.07	1.80

表 3 上清液、60-kDa 蛋白、伴孢晶体对二种鳞翅目昆虫的毒力

Table 3 Supernatant, purified 60-kDa protein and parasporal crystal against two Lepidoptera species

昆虫种 Insect species	半致死浓度 LC <sub>50</sub> (ng protein/cm <sup>2</sup> )		
	上清液 Supernatant	60-kDa 蛋白 60-kDa protein	伴孢晶体 Parasporal crystal
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	0.97	1.67	3.1
斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i>	1011	2809	4285

白较伴孢晶体不含或者少含无效蛋白。

#### (六) 培养物、上清液和沉淀的毒力比较

采用小菜蛾、茶小卷叶蛾和斜纹夜蛾 3 种鳞翅目的昆虫,对培养 32 小时的培养物、上清液及沉淀进行毒力测定(表 4)。为了实验和比较方便,用蒸馏水把离心后的沉淀稀释至离心前同体积进行比较实验。结果表明,离心后的沉淀对 3 种昆虫的毒力均降低。对小菜蛾和茶小卷叶蛾的毒力分别下降 27.5% 和 20%。对斜纹夜蛾的毒力下降 2/3。但上清液的杀虫效果表明,上清液中并不含有培养液离心后损失的全部毒力。该结果表明,上清液与沉淀混用,其毒力高于单用一种。特别是用斜纹夜蛾作测试虫时,上清液与沉淀

表 4 培养物、上清液及沉淀对三种鳞翅目昆虫的毒力

Table 4 Culture, supernatant, and sediment against three Lepidoptera species

昆虫种 Insect species	半致死浓度 LC <sub>50</sub> (ppm)*		
	培养物 Culture	上清液 Supernatant	沉淀 Sediment
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	25	1000	40
茶小卷叶蛾 <i>Adoxophyes orana</i>	160	4000	200
斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i>	19,000	100,000	60,000

\* 设定原液为 100ppm, 稀释 10 倍为 10ppm, 其它依此类推。

混用时的增效作用十分明显。

## 讨 论

上述实验结果表明, 有杀虫活性的上清液不含有 P1 和 P2 蛋白。起杀虫作用的是一约 60-kDa 的蛋白。它比 P1 经胰蛋白酶降解后的 62-kDa 毒素蛋白还小 2-kDa, 它与 P1 的氨基酸组成相似, N 末端与 P1 有 18 个氨基酸的序列相同, 说明二者同源。由于上清液杀虫活性出现的时间与菌的自溶开始同步, 且随自溶率的升高, 活性逐渐增大。当自溶率达 95% 时, 活性也达最大, 随后又逐渐降低, 到第 68 小时降低了 19%。说明 60-kDa 的杀虫活性蛋白可能是先存在于菌体内, 随菌的成熟自溶而被释放到培养液中。苏云金芽孢杆菌能产生金属螯合敏化蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、亮氨酸蛋白酶、巯醇蛋白酶及氨肽酶, 这些酶在胞内合成后, 部分被分泌到胞外的培养基中, 成为胞外酶; 部分留存于胞内; 也有一些蛋白酶附着于伴孢晶体的晶格内<sup>[10,11]</sup>。附着于伴孢晶体表面的蛋白酶, 能将伴孢晶体降解为 135-kDa 至 65-kDa 的蛋白及低分子量的多肽<sup>[10]</sup>。胞外氨肽酶的作用是将培养基中的多肽降解为氨基酸供给生长需要<sup>[11]</sup>。这些报道均说明上清液中的 60-kDa 蛋白不是胞外蛋白酶和氨肽酶降解伴孢晶体产生的。胞内蛋白酶和氨肽酶是否分解合成过程中的伴孢晶体, 这方面的报道材料尚少, 有待进一步研究。60-kDa 蛋白与 P1 相比尽管在 N 末端少了开头的 24 个氨基酸, 后部短了约 75-kDa 肽链, 但毒力并没有降低。说明开头的一段肽链和后部的 75-kDa 肽链均非活性中心的组成部分。这与 Höfte 等人<sup>[12]</sup>的报道结果一致。据 Höfte 等人的研究, berliner 1715 菌株的 135-kDa 杀虫蛋白经胰蛋白酶降解后, 产生 60-kDa 的毒素蛋白, 其活性中心是从 N 末端的第 29 个氨基酸开始约 60-kDa 的序列, 前 28 个氨基酸和后部的约 75-kDa 肽链均非活性中心的组成部分。HD-1 菌株的 P1 蛋白基因在重组菌株和培育抗虫植物方面得到广泛应用<sup>[13]</sup>。本实验结果对 P1 蛋白基因在遗传工程上的应用具有重要意义。为了获得稳定质粒, 减小重组基因片断, 可以把合成 P1 蛋白开头 24 个氨基酸和 60-kDa 后肽链的 cDNA 删除。

目前, 苏云金芽孢杆菌制剂的生产工艺, 基本上均采用将发酵液离心或进行板框压滤

来回收菌体,而将上清液或者滤液扔掉。因此,放罐时间一定要掌握在菌体成熟,但尚未自溶或少量开始自溶(5%左右)时进行。否则,将因菌体自溶而使毒力下降,收率降低。

### 参 考 文 献

- [1] 陈国相: 生物农药的知识,科学出版社,北京,1982年。  
 [2] 崔云龙: 生物防治通报,7(2): 96—97,1991。  
 [3] Lowry, O. N.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951。  
 [4] Laemmi, U. K.: *Nature*, 227: 680—685, 1970。  
 [5] Yamamoto, T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103: 414—421, 1981。  
 [6] 山本敬司等: 蛋白質·核酸·酵素,29(6): 444—453,1984。  
 [7] Bulla, L. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256: 3000—3004, 1981。  
 [8] Schnepf, H. E. et al.: *ibid.*, 260: 6264—6272, 1985。  
 [9] Kondo, S. I. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 51: 455—463, 1987。  
 [10] Chestukhina, G. G. et al.: *Biochem. J.*, 187: 457—465, 1980。  
 [11] 喻子牛等: 苏云金杆菌,科学出版社,北京,1990年。  
 [12] Höfte, H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 161: 273—280, 1986。  
 [13] 中村啓子等: バイオサイエンスとインタストリ,48: 11—18,1990。

## STUDIES ON INSECTICIDAL INGREDIENTS FROM CULTURE SUPERNATANT OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Cui Yunlong

(Center of laboratory, Shandong Agriculture University, Taian 271018)

Okabe Souichi

(Research and Development Center, Nagase Co., Ltd., Kobe High-Tech park, 2-2-3 Murotani, Nishi-Ko, Kobe 673 Japan)

Asano Xiaoxi

(Research Development Headquarters, Kubota, Ltd., 5—6 Koyodai, Rygasaki City, Ibaraki, Japan 301)

Studies on the insecticidal activity of culture supernatant of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, by centrifugation, column chromatography, protein sequence determination, bioassay and other methods. Found that insecticidal activity of culture supernatant appeared on synchronism with cells lysis. Main insecticidal ingredients of culture supernatant is toxin protein of 60 kilodaltons (kDa). Analyse that purified the toxin protein, we find that its amino acid composition was similar with 135-kDa P1 protein, and its sequence of N-terminal 18 amino acid was same with that of part of the P1 protein. The results presented here provided that the toxin protein was the same source with the P1 protein. Further found that supernatant have synergizing action on the sediment of culture.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*; Supernatant; Insecticidal