

# 苏云金芽孢杆菌中华亚种 CT-43 菌株 伴胞晶体蛋白的特性\*

孙 明 喻子牛

(华中农业大学微生物科学技术系, 农业微生物重点开放实验室 武汉 430070)

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 为革兰氏阳性细菌, 在其芽孢形成过程中可产生一种对鳞翅目、双翅目和鞘翅目幼虫有高毒力的蛋白质伴胞晶体, 近来又发现它对动、植物寄生线虫以及扁形动物门的一些种类有毒, 现已成为芽孢杆菌的第二大研究对象<sup>[1-3]</sup>。

根据苏云金芽孢杆菌鞭毛抗原的差异可将其分为 45 种血清型 60 多个亚种, 另外还有一些无鞭毛菌株。1992 年发现了 7 大类 27 个亚类的杀虫晶体蛋白基因<sup>[1]</sup>, 近来又发现了许多新的杀虫基因。这些基因分别具有不同的杀虫活性, 加上苏云金芽孢杆菌可同时含有多种不同的杀虫基因, 从而使得苏云金芽孢杆菌的杀虫活性具有多样性<sup>[3]</sup>。

苏云金芽孢杆菌伴胞晶体的典型形态为菱形和方形, 许多菌株能形成卵形, 不规则形等形态的伴胞晶体<sup>[4]</sup>。

苏云金芽孢杆菌 CT-43 菌株为本室分离, 它无鞭毛, 且可产生  $\beta$  外毒素, 其质粒组成、生化特性和晶体蛋白组成不同于无鞭毛的苏云金芽孢杆菌武汉亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *wuhanensis*), 命名为苏云金芽孢杆菌中华亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *chinensis*)。现已用于“双毒制剂”的生产和应用。该菌株可产生 140000, 130000 和 65000 三种分子量的晶体蛋白<sup>[5]</sup>。本文报道 CT-43 菌株各个晶体蛋白形成伴胞晶体的形态, 各晶体蛋白的溶解和激活及其对杀虫毒力的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养基

苏云金芽孢杆菌中华亚种 CT-43(无鞭毛)菌株由本室分离并保藏, 苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, H3ab) HD-1 菌株由 Dulmage 博士提供。CT-43-3、CT-43-6、CT-43-7、CT-43-5 和 CT-43-55 均为 CT-43 菌株的突变株, 前三个为 I 型突变株, 只产生 140000 晶体蛋白; 后两个为 II 型突变株, 产生 130000 和 65000 晶体蛋白<sup>[5,6]</sup>。培养基 BP<sup>[5]</sup>和 PM<sup>[7]</sup>分别用来培养菌体和提取伴胞晶体。

### 1.2 伴胞晶体和晶体蛋白的提纯

用蔗糖密度梯度离心法提取伴胞晶体<sup>[8]</sup>, 按文献[5]的方法用 4mol/L 乙酸钠 (pH4.4) 提纯晶体蛋白。

### 1.3 SDS-PAGE 电泳及蛋白质含量测定

按文献[8]方法进行 SDS-PAGE 电泳, 分子量标准中含 97400, 66200, 43500, 30100 蛋白质 (Bio-Rad)。用 Bradford 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量<sup>[9]</sup>, 以小牛血清白蛋白 (Fraction V, Sigma) 为

\* 国家“八五”重点科技攻关项目资助。

本文于 1995 年 4 月 3 日收到。

质量标准。

#### 1.4 伴胞晶体的溶解和激活

采用标准方法溶解伴胞晶体,即 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{HCl}$  (pH9.5) 含 5% $\beta$ -巯基乙醇处理伴胞晶体,37℃保温 60min。胰蛋白酶(Sigma)激活晶体蛋白(与晶体蛋白按 1:50 混合),37℃保温 60min。

#### 1.5 电镜样品制备

样品悬液浸泡铜网后,2%磷钨酸染色 40s,漂洗、晾干、透射电镜(GEM 100 CX-2)观察。

#### 1.6 生物测定

按本室制定的标准方法测定对三龄小菜蛾(*Plutella xylostella*)幼虫的毒力<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 伴胞晶体的形态

**2.1.1 CT-43 菌株的伴胞晶体形态:**多种多样,有钝菱形、多边形、方形、近方形、卵形、不规则形等形态和它们的镶嵌体(图版 I-A,B)。

**2.1.2 CT-43 菌株各晶体蛋白形成的伴胞晶体形态:**CT-43 菌株的伴胞晶体经 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  选择性溶解后,通过电镜观察表明 65000 晶体蛋白形成方形晶体(图 1C)。I 型突变株产生 140000 晶体蛋白,其伴胞晶体为菱形(图 1D);II 型伴胞晶体(130000 和 65000)为菱形和方形及其镶嵌体(图 1E)。II 型伴胞晶体经 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  选择性溶解并经电镜观察表明 65000 晶体蛋白形成方形晶体,与 CT-43 菌株一样。

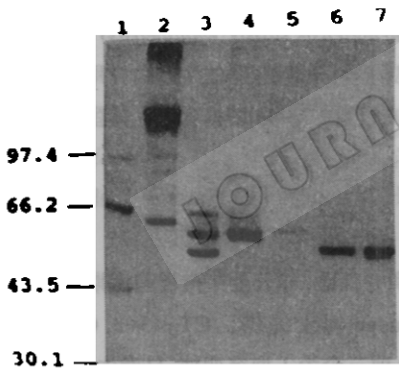


图 1 CT-43 菌株伴胞晶体蛋白经胰蛋白酶处理的 SDS-PAGE 图谱

1.分子量标准( $\times 1000$ );2.CT-43 菌株伴胞晶体;  
3.CT-43 菌株溶解的晶体蛋白(13000~14000)  
经胰蛋白酶处理;4,5.II 型突变株 CT-43-55 和  
CT-43-5 溶解的晶体蛋白(13000)经胰蛋白酶  
处理;6,7.I 型突变株 CT-43-3 和 CT-43-6  
溶解的晶体蛋白(14000)经胰蛋白酶处理。

CT-43 菌株的伴胞晶体对小菜蛾的  $\text{LC}_{50}$  值为  $2.96\mu\text{g}/\text{ml}$ ,比典型的高毒力菌株 HD-1 的毒力( $\text{LC}_{50}$   $0.702\mu\text{g}/\text{ml}$ )低 4.2 倍。但是,CT-43 菌株的伴胞晶体在溶解和激活之后毒力却很高, $\text{LC}_{50}$  分别为  $0.0507\mu\text{g}/\text{ml}$  和  $0.0369\mu\text{g}/\text{ml}$ ,比伴胞晶体的毒力分别高 58.4 倍和 80.2 倍。

### 2.2 伴胞晶体的溶解和激活

CT-43 菌株伴胞晶体由 140000,130000 和 65000 晶体蛋白组成<sup>[5]</sup>,采用标准溶解方法处理 CT-43 菌株的伴胞晶体时发现只有 140000 和 130000 蛋白可溶解而 65000 晶体蛋白却不能溶解。

可溶性的 130000~140000 晶体蛋白在体外由胰蛋白酶激活,可形成 66000,60000 和 55000 三种产物。I 型突变株(CT-43-6 和 CT-43-3)的 140000 晶体蛋白经胰蛋白酶激活产生 66000 和 55000 蛋白质。其中 66000 激活蛋白会随着胰蛋白酶浓度的提高或反应时间的延长而逐渐消失,Hofte 等认为它是 55000 激活蛋白的前体<sup>[11]</sup>。II 型突变株产生的 130000 晶体蛋白激活成 60000 蛋白质(图 1)。

### 2.3 对小菜蛾的毒力

表 1 列出了 CT-43 菌株各个晶体蛋白在伴胞晶体、溶解晶体蛋白和激活蛋白三种状态下对三龄小菜蛾幼虫的毒力,以及它们  $\text{LC}_{50}$  值的比较。

通过 I 型和 II 型突变株可测出 140000 和 130000 伴胞晶体和溶解晶体蛋白对小菜蛾的毒力。I 型突变株的伴胞晶体 (140000), 及经  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶解后的 140000 晶体蛋白的  $\text{LC}_{50}$  值分别为 6.42 和  $0.197\mu\text{g}/\text{ml}$ 。虽然 140000 伴胞晶体毒力不及原始菌株毒力的一半, 但其溶解后却是原始菌株毒力的 15 倍。

II 型突变株的伴胞晶体 (130000 和 65000) 及其 130000 溶解蛋白的毒力都比原始菌株 CT-43 的伴胞晶体毒力高,  $\text{LC}_{50}$  值分别为 0.393 和  $0.0240\mu\text{g}/\text{ml}$ , 分别提高 7.53 倍和 123 倍。65000 伴胞晶体的毒力很低, 难以测出。I 型和 II 型突变株的伴胞晶体在溶解前后毒力分别相差 32.6 和 16.3 倍。

表 1 CT-43 菌株各晶体蛋白在不同状态下对三龄小菜蛾幼虫的毒力\*

毒素状态	伴胞晶体					溶解晶体蛋白					激活晶体蛋白			
	菌株	HD-1	CT-43				HD-1	CT-43				HD-1	CT-43	
晶体蛋白 分子量	—	140000	140000	—	—	—	140000	140000	—	—	—	140000	140000	—
	130000	130000	—	130000	—	130000	130000	—	130000	—	130000	130000	—	130000
	65000	65000	—	65000	65000	65000	—	—	—	65000	65000	—	—	—
$\text{LC}_{50}$	0.702	2.96	6.42	0.393	>100	ND	0.0507	0.197	0.0240	>100	ND	0.0369	ND	ND
SE	0.112	0.051	0.512	0.010	—	—	0.0003	0.044	0.0022	—	—	0.0065	—	—
R	4.22	1.00	0.461	7.53	—	—	58.4	15.0	123	—	—	80.2	—	—

\* 从 I 型和 II 型突变株和通过溶解伴胞晶体获得 CT-43 的各个毒素成分; 采用“材料和方法”中的标准方法溶解伴胞晶体及用胰蛋白酶激活晶体蛋白。

ND. 未检测。

R. 毒力指数: 指 CT-43 菌株伴胞晶体  $\text{LC}_{50}$  值与各状态毒素的  $\text{LC}_{50}$  值的比值。

### 3 讨论

CT-43 菌株伴胞晶体形态多种多样, 其各个晶体蛋白可单独形成典型的菱形或方形伴胞晶体。超薄切片结果也证实 CT-43 菌株伴胞晶体形态的多样性, 并发现晶体蛋白能大量合成, 一个细胞可同时产生多个伴胞晶体, 甚至充满细胞内所有能占据的空间<sup>[12]</sup>。CT-43 菌株产生晶体蛋白的量而且种类多, 在形成伴胞晶体时, 各晶体蛋白可能随机镶嵌组合, 形成形态各异的伴胞内含体, 尽管 65000 晶体蛋白只形成方形伴胞晶体。

经聚合酶链反应 (PCR) 检测发现 140000、130000 和 65000 晶体蛋白分别由 cryIB、cryIA (a) 和 cryII 基因编码<sup>[13]</sup>。

CT-43 菌株的伴胞晶体在溶解以后毒力提高很大, 可提高 16.3~58.4 倍。但溶解晶体蛋白在激活后毒力的变化并不太大 (1.37 倍)。II 型突变株的伴胞晶体比 I 型突变株的伴胞晶体毒力高 16.3 倍; 而 130000 晶体蛋白比 140000 晶体蛋白的毒力高 8.21 倍, 比原始菌株 130000~140000 晶体蛋白的毒力高 2.11 倍。也就是说 140000、130000 及 130000~140000 对小菜蛾可以表现不同的毒力。而且在各晶体蛋白中 130000 晶体蛋白对小菜蛾的毒力最高。由此表明针对性地排除低毒力的基因, 可相对提高菌株的毒力。另外, 在苏云金芽孢杆菌制剂中加入有助于伴胞晶体溶解的介质会有助于毒力的提高。对其他鳞翅目昆虫, 如菜青虫、斜纹夜蛾的毒力还有待进一步测定。

### 参 考 文 献

[1] Feitelson J S, Payne J, Kim L. *Bio / Technology*, 1992, 10: 271~275.

- [2] 喻子牛, 孙明, 陈亚华, 等. 农业生物技术学报, 1995, 3(2): 100~110.
- [3] Hofte H, Whiteley H R. *Microbiol Rev*, 1989, 53(2): 242~255.
- [4] 陈涛. 伴胞晶体的生物合成和形态结构. 见: 喻子牛主编. 苏云金芽孢杆菌. 北京: 科学出版社, 1990. 187~214.
- [5] 孙明, 张剑冰, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌中华亚种CT-43伴胞晶体及其晶体蛋白的杀虫特性. 见: 湖北省科学技术协会编. 中国科学技术协会首届青年学术年会湖北卫星会议论文集. 武汉: 武汉大学出版社, 1994, 283~285.
- [6] 张剑冰, 耿广东, 孙明, 等. 华中农业大学学报, 1993, 12(6): 579~584.
- [7] Yamamoto T, Iizuka T. *Arch Biochem Biophys*, 1983, 227(1): 233~241.
- [8] Thomas W E, Ellar D J. *J Cell Sci*, 1983, 60: 181~197.
- [9] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, 72(1~2): 248~254.
- [10] 罗曦霞, 顾宝根, 姜辉, 等. 苏云金芽孢杆菌的毒力测定和产品质量标准化. 见: 喻子牛主编. 苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用. 北京: 农业出版社, 1994. 167~202.
- [11] Hofte H, Van Rie J, Van Houtven A *et al. Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(8): 2010~2017.
- [12] 鲁松清, 喻子牛. 华中农业大学学报, 1995, 14(1): 64~68.
- [13] 孙明, 吴岚, 刘子铎, 等. 苏云金芽孢杆菌中华亚种CT-43杀虫晶体蛋白基因的鉴定. 见: 现代农业科学研究进展. 天津: 天津科技出版社, 1995. 381~383.

## CHARACTERIZATION OF INSECTICIDAL CRYSTAL PROTEINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *CHINENSIS* CT-43

Sun Ming Yu Ziniu

(Department of Microbial Sciences and Technology, Laboratories of Agro-Microbiology,

Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* CT-43, no flagellum, produces various shaped parasporal crystals, which consist of 140000, 130000, and 65000 proteins. Based on two kinds of mutant, 140000 and 130000 crystal protein individually forms bipyramidal crystal and the 65000 protein forms cuboidal crystal, and that the 140000 and 130000 protein is scivated by trypsin into 55000 and 66000 proteins and 60000 protein, respectively. Bioassay were conducted to 3rd instar *Plutella xylostella* larvae with crystals, soluble crystal proteins, and activated crystal proteins, respectively, and it indicated that high toxic mutants can be obtained by curing low toxic crystal genes, and that the toxicity of crystals can be improved 16.3 to 58.4 times after solubilization.

**Key words** *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis*, Parasporal crystal, Solubilization and activation, Insecticidal capacity

### 图 版 说 明

苏云金芽孢杆菌中华亚种 CT-43 伴胞晶体在透射电镜下的形态: A, B. CT-43 菌株 ( $\times 5800, \times 7200$ ); C. CT-43 菌株的 65000 伴胞晶体 ( $\times 7200$ ), 即 CT-43 的伴胞晶体经标准溶解方法处理后的不溶解部分; D. I 型突变株 CT-43-7 ( $\times 7200$ ), S 为芽孢; E. II 型突变株 CT-43-55 ( $\times 7200$ ).