

苏云金芽孢杆菌晶体蛋白的分子遗传学

王 昊 白永廷

(中科院上海植物生理研究所)

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是种革兰氏阳性细菌。它在形成芽孢的同时,能够产生伴孢晶体蛋白,该蛋白活化后能杀死鳞翅目或双翅目昆虫幼虫,最近也有报道一变种能杀死鞘翅目昆虫幼虫。虽然苏云金芽孢杆菌及其杀虫性质在本世纪初就为人所知,但利用它作为杀虫剂只是近三十年的事。七十年代,广泛应用化学杀虫剂引起的各种弊端促使人们对苏云金杆菌进行深入研究,包括晶体蛋白的化学组成、活化机制、作用方式和代谢途径及筛选优良菌株作为大田应用的杀虫剂的研究。八十年代,随着重组 DNA 技术的普及,人们在毒蛋白的基因定位与分离、基因表达调节等方面进行了深入研究,使之成为现代微生物学和分子生物学中较为活跃的领域之一。此项研究既促进了苏云金杆菌在农业上的应用,又为在分子水平上研究原核生物的发育分化提供了一个较好的模式系统。

一、苏云金芽孢杆菌毒素蛋白及其作用

苏云金芽孢杆菌是一种棒状的好氧细菌,在自然界中可以不依赖于昆虫寄主而生存,属于非专一性寄生菌,在实验室中很容易在培养基上生长。当营养缺乏时,开始形成芽孢并合成一至数个蛋白晶体,可达细胞干重的 20—30%。对不同宿主专一的变种产生的晶体蛋白性质不同。在对鳞翅目昆虫专一的菌株中,晶体一般呈菱形,晶体蛋白亚基的分子量为 230 kD。这个天然的亚基包括两个多肽,单位为 130 kD。对鳞翅目专一的不同亚种产生的晶体蛋白无甚差异,通常含谷氨酸和天冬氨酸在 20%以上,因此等电点很低,约为 pH 4.6。一些作者还报道有与晶体蛋白相连的多糖。由苏

云金杆菌 *Israelensis* 产生的对双翅目昆虫专一的晶体蛋白有几种,分子量为 28—130 kD,其中 130 kD 和 28 kD 蛋白已分离纯化,并证明前者具有杀幼虫活性,后者具有外溶血活性,但 Wu.D 等报道后者单独不具毒性,然而对 130 kD 及 65 kD 组分的毒性有显著的促进作用。最近,有人报道了苏云金杆菌变种 *San diego* 产生的晶体蛋白对鞘翅目昆虫幼虫有毒。该晶体呈长方形,含 64 kD 的具毒性的多肽,该多肽与其它亚种产生的晶体蛋白的活性肽的氨基酸组成不同,也没有免疫交叉反应,更为突出的是该多肽似乎不象其它晶体蛋白的活性肽那样,不是由一个较大的前体加工而成。

关于晶体蛋白的毒性机制的研究,主要集中在对鳞翅目专一的晶体蛋白上。晶体蛋白及其亚基、溶解的单链蛋白,都是前毒素。前毒素活化发生在昆虫小肠中,进食消化后被肠液蛋白酶激活,成为有活性的 δ -内毒素。前毒素在体外可被胰蛋白酶活化,活性肽为 30—80 kD 大小的肽段,比这再小则其 δ -内毒素活性逐渐丧失,10 kD 以下完全不具活性。毒素作用的原初位点是中肠上皮细胞。最早的症状发生在晶体蛋白活化后几分钟,幼虫停止进食并开始瘫痪,1—3 天后死亡。组织学观察表明, δ -内毒素作用于靶细胞,使之膨胀和液泡化,最后细胞解体,内含物释出。但毒素作用的分子机制还不清楚。有人认为 δ -内毒素是膜毒素,具去垢剂样作用。Fast 等把 δ -内毒素结合于 Sephadex G-25 上,从而排除了毒素进入细胞的可能性,证明毒素直接作用于膜^[1]。T. Bulla 等利用毒素与磷脂结合实验证明毒素与特异的质膜磷脂反应,导致细胞解体^[2]。然而,毒素作用细胞后往往引起一系列代谢变化,

所以它的作用机制远为复杂。有人甚至报道 δ -内毒素似乎对肿瘤细胞有某种抑制作用。

二、毒素蛋白基因

苏云金芽孢杆菌的菌株经常失去产生晶体蛋白的能力,然而却极少能恢复。基于这个现象,一些研究者提出晶体蛋白是由质粒编码的。Gonzalez等(1981)比较了野生菌株和治愈菌株 cry^- 的质粒电泳图谱,发现在五个菌株中,晶体蛋白的产生能力分别与五个特定大小的质粒相关^[3]。然而,这一实验不能确定产生晶体蛋白能力的丧失是结构基因丢失引起的还是质粒上的调节基因丢失引起的。

1982年,由于苏云金芽孢杆菌间质粒的高频转移成功,人们开始用之研究质粒与晶体蛋白的遗传关系。Gonzalez等发现,把HD-2菌株的75 MD质粒、HD-73的50 MD质粒、HD-263的44 MD质粒分别转移到 cry^- 菌株,后者获得了产生晶体蛋白的能力^[4]。然而利用质粒转移实验仍不能排除晶体蛋白产生能力的恢复是由于质粒编码的调节基因与受体菌中的结构基因反式互补的可能性。

基因定位的最直接结果来自基因分离。迄今已从6个亚种中分离出晶体蛋白基因(表1)。晶体蛋白基因既可存在于质粒上,也可存在于染色体上,或同时在两者上。导致这一情况的原因可能是基因定位于一个可移动的遗传因子上^[5]。Debabov在galleriae亚种中,用电镜观察到类似于转座子的茎环结构^[6]。D.Lereclus等发现在苏云金杆菌的几个菌株中,都存在一个称Th顺序的片段,它插入质粒时会诱导毗邻DNA的缺失,电镜下的茎环结构就是由这一Th顺序形成的^[7]。1986年该作者又证明这一Th顺序(Tn 4430)在大肠杆菌中有转座作用,顺序分析表明在该转座子两端有38 bp的反向重复顺序,在插入位点有5 bp的顺向重复,属于Tn 3转座子家族^[8]。A.Klier等在来自Berliner 1715菌株的带有晶体蛋白基因片段的重组质粒中,发现晶体蛋白基因与Th顺序

之间有带反向重复顺序的3 MD的片段^[9]。H. R. Whiteley等在Kurstaki HD-1, Thuringiensis HD-2, Kurstaki HD-73的含有晶体蛋白基因的大片段中,都发现了一至几个拷贝的有反向重复顺序的结构^[10]。

在克隆了第一个晶体蛋白基因后,Whiteley等用分离的基因的一个片段作探针,对22个 Cry^+ 菌株进行晶体蛋白基因定位。他们的结果与以前及以后的实验结果有些是一致的,有些是矛盾的。结果不吻合的原因可能是所利用的一段探针顺序并不与某些结构基因相关。所以探针杂交法只能作为基因克隆进行分布定位的辅助方法。

晶体蛋白基因克隆的方法大同小异。基本战略是先构建一个总质粒或总DNA的基因文库,然后利用免疫探针或DNA、RNA探针进行筛选,最后用生物检测法鉴定。已分离的基因的大致情况总结于表1。

值得指出的是:(1)由于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)转化系统的建立,用*B. subtilis*作为表达宿主,克服了在*E. coli*中低表达甚至不表达的困难,利于筛选。(2)近年来体外转录-翻译偶联系统不断完善,利用这一系统可直接进行蛋白检测和生物测定,并避免了昆虫拒食菌液的问题。(3)晶体蛋白mRNA转录有时间特异性,只有在芽孢形成早期才转录,且其mRNA较稳定(半寿期约为15分钟),而其它mRNA此时大大减少,因此可把晶体蛋白特异的mRNA分离出来,作为探针检测基因克隆。这几种方法目前都有成功的报道。

在克隆了晶体蛋白基因后,很多实验室都对基因结构进行了深入研究,包括基因在重组质粒上的精确定位、核苷酸顺序测定等。从一些菌株的晶体蛋白基因结构及顺序分析的结果来看,不同菌株来源的晶体蛋白基因结构有相似性,又不完全相同。例如在分析的10个菌株中,有5个菌株有与晶体蛋白基因相关的Th顺序^[9],并且在5个克隆的基因上,都发现有

表1 克隆的晶体蛋白基因

作者(参考文献)	菌株	克隆片段	载体	检测手段	基因定位	进展情况
Schnepf, Whiteley 等 ^[11,12,13]	Kurstaki HD-1-Dipel	质粒 DNA Sau 3 A 部分酶切片段	E coli, pBR 322	放射免疫探针, 生物测定	30 及 47 MD 质粒	基因全顺序测定, 体外表达调节
Held 等 ^[14]	Kurstaki HD-1	总 DNA Eco RI 酶切,	E coli PBR 322 穿梭质粒 pHV 33	放射免疫探针, 生物测定	染色体和 45 MD 质粒	
Whiteley Schnepf ^[15]	Kurstaki HD-73	大质粒部分 DNA Bgl II 酶切	E coli: pBR 322	来自 HD-1-Dipel 的基因非探针, 蛋白鉴定及生物测定	45 MD 质粒	基因限制酶谱分析
A. Klier ^[16,17]	Beriner 1715	A 总 DNA 机械剪切 B 42 MD 质粒 BamHI 酶切	穿梭质粒 pHV 33	孢子形成特异 mRNA 作探针, 免疫检测及生物测定	染色体, 42 MD 质粒	A. 基因顺序测定, 体外转录及翻译
Cees Waelwijk ^[18]	israelensis	112 kb 质粒的 9.7 kb Hind III 片段	E coli, pBR 322	体外转录-翻译偶联系统	112 kb 质粒	基因全顺序分析
Sekar 等 ^[19]	israelensis	112 kb 质粒 XhoI 酶切	枯草芽孢杆菌质粒 pBC 16	芽孢中晶体形成, 生物测定	112 kb 质粒	
Ward 等 ^[20]	israelensis	72-75 MD 质粒 Hind III 酶切	E coli, pUC 12	体外转录-翻译偶联系统, 免疫检测, 生物测定	72-75 MD 质粒	基因全顺序分析
Yuji Shibano ^[21]	sotto	68 kb 质粒 XhoI 片段的 6.6 kb pstI 片段再克隆	pBR 322 pBR 325	免疫测定 生物测定	68 kb 质粒	结构基因顺序分析
A. klier 等 ^[9]	aizawa 7-29	45 MD 质粒的 BamHI 片段	pUC 8	berliner 1715 来源的晶体蛋白基因片段作探针. 生物测定	45 MD 质粒	基因及邻接顺序的限制酶谱分析
Alik honigman 等 ^[22]	thuringiensis	17 kb 质粒 Sal 部分酶切后克隆	pAcYC 184	免疫探针生物测定	17 kb 质粒	

几个带反向重复顺序的结构^[9,10]。对基因的限制酶谱分析也表明晶体蛋白基因组织彼此相似^[9]。Gonzalez 等根据晶体蛋白基因 Hind III 和 PVU II 限制酶切片段的大小, 把晶体蛋白基因分为两类^[5]。但是这种划分与晶体蛋白基因是来自染色体还是质粒无关。从限制酶谱来推断, I 型和 II 型基因编码的蛋白 N 端的顺序很相似, 而主要在 C 端及基因的 3' 端邻接顺序不同, 这与 Chestukhina 等的实验结果十分吻合, 后者提出晶体蛋白的 N-端形成一个稳定而紧密的结构域, 对应于分子的毒性部分^[22]。H. R. Whiteley 等利用基因部分缺失及与 β -半乳糖苷酶基因融合的方法, 发现在重组的 *E. coli*

菌株中, 毒肽表达需要 5' 端第 10 至 50 个密码子和 3' 端第 603—645 个密码子。有些证据还表明 3' 端被修饰明显地影响表达程度和肽的构型^[10]。

三、晶体蛋白基因表达的调控

对苏云金杆菌晶体蛋白表达的研究, 早年多着重于形态描述, 七十年代以后进行了大量的生化分析。Gonzalez 等首先在苏云金杆菌中发现了稳定的 mRNA 组分, 它与晶体形成有关, 仅在芽孢形成早期出现。Klier 等从形成芽孢的细胞中分离出不同于营养细胞的 RNA 聚合酶, 包括 I 型和 II 型。营养细胞中的 RNA

聚合酶起识别作用的 σ 亚基为55 kD, 该亚基在芽孢形成过程中逐渐消失, 代之以两个新的亚基, 分子量分别为35 kD及27 kD。Kain-Guion等证明, 这种RNA聚合酶转录产物恰与那种稳定mRNA同源。利用部分纯化的mRNA, Gold等进行了体外翻译试验, 来确定发育过程中晶体蛋白基因的转录时间。但这个实验不能排除mRNA是在营养期合成而在芽孢形成时被激活的可能性。

利用克隆的基因研究表达, 简化了实验系统。可以从分析基因核苷酸顺序入手, 研究对转录及翻译有调节功能的结构, 也可以利用 S_1 核酸酶对不同发育阶段的RNA进行作图定位, 分析转录调节。还可以利用体外表达系统, 人为加入一些因子, 研究转录及翻译的必需条件。例如, 用克隆的基因系统, Whiteley等发现在苏云金芽孢杆菌中, 晶体蛋白基因有两类转录起始点, 分别在芽孢形成较早时期和较晚时期形成转录产物, 前者称RNA I, 后者称RNA II。在*E. coli*中的转录起始点位于这两类转录起始点之间。RNA II的启动子与枯草芽孢杆菌中被 δ^{55} -RNA聚合酶识别的顺序无同源性, 与和芽孢形成相关的基因, 如SPOVG、SPOVC的启动子顺序也不同源。在翻译起始密码上游三个碱基处, 存在有一个11 bp的顺序, 能与枯草杆菌中16S rRNA的3'端顺序很好地互补。而且在翻译终止密码前, 有一个潜在的核糖体结合位点, 保证了核糖体不会中途脱离。不寻常的是, 在3'和5'端不翻译区的起始密码和终止密码处, 有相同的八个碱基顺向重复顺序, 5'端的八碱基顺向重复顺序可能与3'端的重复顺序互补, 使两端邻近, 核糖体可从晶体蛋白mRNA的一端直接移到翻译起始点^[9,10]。在*Israelensis*中, DNA顺序分析表明, 克隆的基因虽然有相当于枯草芽孢杆菌中-35和-10区域保守顺序, 然而两者间距离不保守, 这种情况下表达只能在较低水平上发生, 这与晶体蛋白的高表达是矛盾的。所以, 很可能是晶体蛋白基因被一个不同的RNA聚合酶

所识别, 它含有不寻常的 σ 因子。这一假设被Klier等(1982)体外表达实验所验证。他们把克隆的来源于beriner 1715的晶体蛋白基因进行了体外表达, 发现与该基因互补的mRNA只有在包含35 kD及27 kD两个多肽的RNA聚合酶存在下才出现^[16]。

综合这些实验结果, 可以看出以下几点:

(1) 基因在苏云金杆菌及枯草芽孢杆菌中, 只有在芽孢形成早期才开始转录; (2) 晶体蛋白基因主要被一个含35 kD及27 kD两个多肽的RNA聚合酶所转录; (3) 在所有分离的晶体蛋白基因5'端, 都发现了与16S rRNA 3'端互补的核糖体结合顺序, 暗示翻译很有效, 所以表达调节主要在转录水平上, mRNA的高稳定性及其翻译的有效性对高表达也很有意义。(4) 除了染色体来源的beriner 1715晶体蛋白基因外, 都可在*E. coli*中表达, 无时间特异性, 但表达水平很低。可能是在*E. coli*中晶体蛋白基因转录起始点与在苏云金杆菌中的不同, 并且启动子不能很好地被*E. coli* RNA聚合酶识别。

四、晶体蛋白研究展望

对苏云金芽孢杆菌晶体蛋白的深入研究, 为其应用开辟了广阔的领域。

利用苏云金芽孢杆菌作杀虫剂, 对人畜无害, 不会造成环境污染和生态不平衡, 而且可以不断开发新菌株。这方面一个有诱惑力的改进是: 用遗传工程方法, 把几个菌株的优良性状组合在一起。1983年, Klier等把含有从beriner 1715中来的晶体蛋白基因的重组质粒转移到*israelensis*菌株中, 杂合体能产生两种晶体蛋白, 同时杀死鳞翅目和双翅目昆虫幼虫。另外, 毒素作用一般发生在昆虫消化食物之后, 而昆虫进食与环境条件有关, 如果毒素摄入量不足, 幼虫会从麻痹状态中恢复, 2—3天后又可进食。用遗传工程方法改造菌株, 使之直接产生活性毒素或高毒性产物, 将改善这一情况。

但是, 直接利用苏云金杆菌作杀虫剂还是有潜在的危險。即, 当芽孢沉积在田里, 它们或许会暴露于与之亲缘相近的一种人类病原菌——炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)或其噬菌体, 转化或转导成一种类似的病原菌。在实验室中, 苏云金杆菌的转化及转导都有成功的报道, 因此这种担心是不无道理的。解决这一问题的方法之一, 是利用植物遗传工程, 把毒素蛋白基因引入植物, 使之表达, 昆虫食后会死亡。迄今为止所有实验都证明 δ -内毒素不对人体产生危害, 这一想法是可行的。

近年来由于植物遗传转化技术的发展, 特别是利用根癌农杆菌和 Ti 质粒改造的载体, 已经把几种外源基因引入植物并能表达。比利时一个研究组最近把毒素蛋白基因引入烟草, 看到了表达, 但还不足以杀死进食叶子的昆虫(据 Herrera-Estrella, L. 来华报告)。因此, 在增强毒素基因在植物中表达这一环节上还需努力。有些作者曾报道晶体蛋白为糖蛋白, 而糖蛋白在真核和原核生物中的加工过程可能是不同的, 然而至今还不知道毒素蛋白杀虫活性与糖组分有什么关系, 总之, 把 δ -内毒素基因引入植物并使之表达, 具有广阔的应用前景, 然而也是一项艰巨的工作。

摘 要

本文综述了苏云金芽孢杆菌晶体蛋白研究的最新进展, 着重阐述了晶体蛋白的分子遗传学, 包括晶体蛋白基因的定位及分离、基因结构及其与蛋白质结构与功能的关系, 基因在芽孢形成过程及在体外系统中的表达调节及其分子机制, 指出了晶体蛋白基因研究在理论上的意义和在实际应用中的前景。

参 考 文 献

[1] Fast, P. G. et al., 1978, *Experientia*, 34:

762-763.

- [2] Thomas W. E. and Elias D. J. 1983, *FEBS Letters*, 154: 362-368
- [3] Gonzalez, J. M. et al., 1981, *Plasmid*, 5: 351-365.
- [4] Gonzalez, J. M. et al., 1984, *Plasmid*, II: 28-38.
- [5] Gonzalez, J. M. et al., 1979, *Plasmid*, 3: 92-98.
- [6] Debabov, V. G. et al., 1980, *J. MOL. Biol.*, 14: 818-823.
- [7] Lereclus, D. et al., 1984, *EMBO J.*, 3: 2561-2567.
- [8] Lereclus, D. et al., 1986, *MGG*, 204: 52-57.
- [9] Klier A. et al., in "Molecular Biology of Microbial differentiation", eds: Hoch Z. A., Sitlow. P. 217-223.
- [10] Whiteley, H. R. et al., in "Molecular Biology of Microbial differentiation", eds: Hoch Z. A., Sitlow. p. 225-229.
- [11] Schnepf, H. E. et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78: 2893-2897.
- [12] Schnepf, H. E. et al., 1985, *J. Biol. Chem.*, 260: 6264-6267.
- [13] Schnepf, H. E. et al., 1985, *J. Biol. Chem* 260: 6273-6280.
- [14] Held, G. A. et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 79: 6065-6069.
- [15] Whiteley, H. R. et al., in "Molecular cloning and gene regulation in bacillus", 1982, AP. pp. 131-144.
- [16] Klier, A. F. et al., 1982, *EMBO J.*, 1: 791-799.
- [17] Klier, A. F. et al., 1983, *MGG*, 186: 391-398.
- [18] Cees Waelwijk. et al., 1985, *Nucleic Acid Research*, 13: 8207-8217.
- [19] Sekar, V. et al., 1985, *Gene*, 33: 151-158.
- [20] Ward. E. S. et al., 1983, *FEBS Letters*, 175: 377-382.
- [21] Yuji Shibano. et al., 1985, *Gene*, 34: 243-251.
- [22] Chestukhina. et al., 1982, *Arch. Microbiol.*, 132: 159-162.
- [23] Alik Honigman. et al., 1986, *Gene*, 42: 69-77.