

苏云金杆菌伴孢晶体的研究进展

曹湘玲 白永廷

(中国科学院上海植物生理研究所)

苏云金杆菌是革兰氏阳性菌,能产生一种伴孢晶体蛋白(δ -内毒素),占细胞重量的20%—30%,对多种鳞翅目昆虫幼虫和某些双翅目昆虫幼虫具有毒性。最近发现一类新的苏云金杆菌菌株,对鞘翅目的多种昆虫有毒性。

Berliner(1915)^[1]和Matte's(1927)看到苏云金杆菌结孢子菌株中存在伴孢晶体,开始了昆虫病原菌的研究。Hannay(1953)再次发现了晶体状的伴孢体。Fitz-James(1955)^[2]证明苏云金杆菌的晶体物质是一种蛋白组份,并研究了伴孢晶体的产生。Angus(1954, 1956)^[3]试验晶体对家蚕的毒性,证明苏云金杆菌伴孢晶体对鳞翅目昆虫幼虫具有毒性。Heimpel(1967)将伴孢晶体蛋白命名为 δ -内毒素。Bulla等人(1977,1979)^[4,5]鉴定原毒素的分子量为 1.3×10^5 道尔顿,在弱碱条件下分解成 6.8×10^3 道尔顿毒素,对昆虫有毒性。Stahly(1978)^[6]和Gonzalez(1980)^[7]证明产晶体基因存在于大质粒上,Schnepf和Whiteley(1980)^[8]从kurstaki HD-1菌株中分离到毒素基因,证明该基因在一个大质粒上,Yujishibano等人(1985)^[9]从苏云金杆菌 sotto 株大质粒中克隆出产毒素基因,并测定了该基因的核苷酸顺序。目前苏云金杆菌的毒素蛋白已作为生物杀虫剂而大量生产。比利时 VanMontagu 等人(1985)已将杀虫基因转移进烟草组织,并获得有某种抗虫害能力的烟草植株。

一、苏云金杆菌伴孢晶体的生化特性

1. 伴孢晶体的纯化 目前报道的晶体纯化方法多利用苏云金杆菌孢子和晶体之间密度、表面性质和溶解度的差异,采用聚乙二醇

一葡聚糖硫酸钠双相分配,蔗糖梯度离心,氯化铯梯度离心纯化晶体蛋白。近年来 Cooksey^[10]等人用泛影葡胺等梯度离心,建立了孢子和晶体的快速分离方法,泛影葡胺梯度离心的优点是:1. 可以不用超离心,2. 比氯化铯经济,3. 对孢子无毒害,4. 晶体与孢子不易聚集,近来后一种方法被广泛采用。

2. 伴孢晶体的溶解 苏云金杆菌所产生的伴孢晶体是一种碱溶性蛋白,伴孢晶体不溶于中性和酸性的水溶液^[11],要使伴孢晶体溶解必须提高pH值,升高温度,因为晶体在剧烈的环境中会引起肽和酰胺键水解,内毒素降为无生物活性的毒素蛋白,必须严格控制晶体溶解条件。

Bulla等人^[3]比较了几种晶体溶解系统,从而找到较理想的对 δ -内毒素无害的晶体溶解条件。晶体在1%SDS(W/V),2%巯基乙醇, 4.96×10^{-3} mol/L Tris,6 mol/L 尿素, 38.4×10^{-3} mol/L 甘氨酸,(pH 8.4),70℃保温15分钟条件下解离成单体。电泳鉴定分子量为 1.3×10^5 道尔顿。晶体溶解与保温时间有关,晶体在 13.5×10^{-3} mol/L NaOH pH 12中保温3小时,经DEAE-Bio-gel A柱层析得到40%单体。当保温时间延长4—5小时,晶体几乎完全解离成单体^[5]。当保温时间大于24小时或延长至168小时只有30%单体存在,70%为无毒的小分子物质。晶体在高温和高pH条件下降解原因是与晶体结合着的金属蛋白酶、巯基、丝氨酸在上述条件中被活化^[4,12]。晶体的溶解度和毒性与pH值和温度有关,Nishitsuji-Uwo等人^[13]得到同样的结果。

3. 伴孢晶体理化性质 de Barjac(1981)^[14] 已将苏云金杆菌鞭毛蛋白抗原分成15种血清型, 6种尚有亚型。不同血清型菌株所产生的 δ -内毒素, 由于结构不同而表现出对不同昆虫具有不同毒性。人们将苏云金杆菌杀虫剂分为二类: 第一类苏云金杆菌内毒素对鳞翅目昆虫幼虫有毒性, 简称P I。这类毒素的伴孢晶体是由分子量 2.3×10^5 道尔顿蛋白二体聚合而成的, 在电镜下观察为双金字塔形, 用弱碱溶液和变性剂处理后得到分子量 $1.3-1.4 \times 10^5$ 道尔顿单体——原毒素。第二类苏云金杆菌的内毒素简称P II, 除了和P I对粉纹夜蛾幼虫有相同毒性外, P II对双翅目昆虫幼虫有毒性, P II分子量 6.5×10^4 道尔顿, 第二类内毒素的伴孢晶体在扫描电镜下观察为不规则的立方体, Yamamoto和Lizuka(1983)^[15]对P II进一步研究证明, P II由苏云金杆菌 *kurstaki*、*thuringiensis*、*kenyae*和*tolworthi*的变种产生的。对不同寄主昆虫具有不同毒性的 δ -内毒素(P I和P II)的结构不同, 表现为P I和P II的等电点、蛋白图谱、晶体溶解性质、和胰蛋白酶降解性质都有差异。

苏云金杆菌伴孢晶体是一种相同蛋白质的聚集体, P I单体分子量 1.3×10^5 道尔顿, 其中碳水化合物占5%, 蛋白占95%。分别测定伴孢晶体、原毒素和毒素的氨基酸组份, 发现毒素与原毒素之间氨基酸组成不同, 毒素中天冬氨酸、丝氨酸、丙氨酸含量高, 色氨酸含量低。5%碳水化合物分析: 葡萄糖占3.8%、甘露糖占1.8%, 每个蛋白亚基约有20个分子葡萄糖和10个分子甘露糖。Bateson Stainsby报道了晶体有己糖和戊糖, 戊糖主要是阿拉伯糖。碳水化合物和蛋白如何聚集成晶体的机理尚不清。有人认为碳水化合物起平衡亚基作用。

4. 原毒素的纯化 由于苏云金杆菌的毒素存在于伴孢晶体中、提取较困难, 近年来发展了许多分离 δ -内毒素的方法。有人用碱处理晶体去除与晶体结合的蛋白酶^[4], 得到纯原毒素,

即晶体在 13.5×10^{-3} mol/L NaOH (pH 12)溶解再经Sephrose-CL-4 B凝胶过滤得到理化性质与伴孢晶体相同的原毒素。保温数天再经DEAE-Bio-gel层析得到纯的毒素, 对靶昆虫幼虫具有毒性。也有人采用聚丙烯酰胺等电聚焦法得到电泳纯的毒素^[16]。

二、伴孢晶体的起源和功能

长期以来人们认为苏云金杆菌伴孢晶体是: (1) 进化过程中的退化器官, (2) 代谢过程中的中间产物或末端产物。(3) 贮存食物。(4) 芽孢外壳蛋白过剩。然而上述假设未能一一证明^[11]。Herbart, Lecadet, Somerville^[18,20]发现晶体合成时间与芽孢形成早期一致, 通过化学方法和免疫学研究证明, 晶体蛋白和芽孢外壳蛋白是同一种物质。Bulla等人^[19]用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定晶体和芽孢外壳蛋白具有同一迁移率, 两种制备物的生物毒性相同, 证明芽孢外壳蛋白和晶体具有同一种蛋白组分。

苏云金杆菌的营养细胞不含芽孢及晶体。晶体是伴随芽孢的形成而形成的。Somerville^[18](1971)指出苏云金杆菌的营养细胞中缺乏编码晶体蛋白的mRNA, 在芽孢形成第I期前3/4小时编码晶体蛋白的mRNA出现, 芽孢形成第II期末电镜下可以观察到晶体并测定到晶体抗原。Lecadet(1971)用标记氨基酸参入晶体蛋白试验表明, 芽孢形成III和IV期晶体蛋白合成速度最快。所有的晶体合成几乎是同时进行。Somerville(1971)^[18]认为80%以上晶体蛋白的氨基酸是来自芽孢形成前营养细胞中的游离氨基酸库。

晶体蛋白不仅是苏云金杆菌细胞壁组份, 也是芽孢外壳蛋白成分。芽孢外壳在体内的功能:(1) 保护作用; 芽孢对溶菌酶具有抗性^[7]。(2) 芽孢外壳蛋白对芽孢萌发过程起促进作用。通过对苏云金杆菌不产晶体的突变株分析, 证明了伴孢晶体在体内的功能。筛选突变体方法是, 经80℃保温的苏云金杆菌的芽孢于丰富的培养基上生长, 测定对溶菌酶的抗性, 得到大

量溶菌酶敏感型和不产晶体的突变株,电镜观察这类突变株的芽孢外壳蛋白占野生型芽孢外壳蛋白的20%^[6]。如80℃处理不同时间芽孢于丰富培养基上培养,得到多于1/1000的不产晶体的突变株。而这类突变株少部分是对溶菌酶敏感突变株,而大部分是溶菌酶抗性突变株。由此使人们考虑到苏云金杆菌产晶体的基因由质粒编码。试用质粒治愈试剂:丝裂霉素,吡啶橙、溴乙锭等试剂处理菌株,也得到高频率的不产晶体的突变株,证明苏云金杆菌伴孢晶体的丢失由质粒治愈引起的,即伴孢晶体蛋白基因存在于质粒上。

用热处理方法得到的不产晶体的突变株,其芽孢没有快速萌发能力。但在萌发过程中加入L-丙氨酸和次黄嘌呤后萌发速度加快,说明加入L-丙氨酸和次黄嘌呤后不产晶体突变株能合成一种新的芽孢外壳蛋白。利用溶菌酶敏感不产晶体突变株的芽孢在含L-丙氨酸和次黄嘌呤的培养基上萌发5分钟等方法分离芽孢,得到的芽孢与正常菌株的一致,保留环丝氨酸抗性,芽孢能在最低培养基上快速萌发和生长。这一结果说明芽孢外壳蛋白是芽孢萌发和生长所必需的。

三、伴孢晶体毒性

摄入晶体后昆虫的病理现象有:(1)肠细胞膨胀前液泡化,(2)肠上皮细胞分泌活性增加,(3)肠壁对钠离子透性增加,而葡萄糖摄入血淋巴的速度下降,(4)钾离子运输受阻^[21],(5)血淋巴中钾离子浓度增高,(6)中肠麻痹,幼虫瘫痪。

昆虫幼虫摄入苏云金杆菌芽孢和伴孢晶体后的表面症状:拒食,脱水,死亡。幼虫产生上述症状的原因是,多数鳞翅目昆虫幼虫和少数双翅目昆虫幼虫的肠内有特定的碱性(pH≈10.0)肠消化酶,该酶在碱性条件下激活。P I的原毒素降解成分子量3—8×10⁴道尔顿的毒素,P II的原毒素降解成分子量2.5—2.8×10⁴道尔顿毒素,这两类毒素在昆虫幼虫体内

产生毒效。

Angus和Heimple等人^[22]电镜观察了家蚕幼虫摄入苏云金杆菌 sotto 株的伴孢晶体后中肠上皮细胞的反应,2小时后肠上皮细胞开始脱水,10小时后肠上皮细胞成气泡状,大部分细胞已涨破。也有人认为毒素对昆虫幼虫的毒性是神经中毒,呼吸受阻,糖和离子运输失调,或酶促引起的毒性。这一问题还需进一步研究。

四、苏云金杆菌研究前景

1. 免疫学研究 苏云金杆菌不仅能控制农作物的虫害,还具有其它生物特性。例如苏云金杆菌在巨蚕蛾 *Hyalophoa cecropia* 滞育蛹的血淋巴中产生二种可溶性的免疫抑制剂,选择性地抑制大肠杆菌的活性,但对蜡状芽孢杆菌无毒。苏云金杆菌伴孢晶体能使经羊血球细胞免疫的鼠和豚鼠体液免疫反应增强^[23],也能引起动物血清中19S(IgM)和7S(IgG)的抗体水平增高,原毒素诱导动物血清中产生一种新的7S溶血性抗体。近来有人认为,晶体对Yoshida的腹水肿瘤有免疫作用。Prasaid和Shethna报道^[24]了伴孢晶体的制备能抑制体内和体外的Yoshida腹水肿瘤生长。由此表明苏云金杆菌伴孢晶体能作为一种动物细胞肿瘤的抑制剂,加强动物抗肿瘤能力。

2. 晶体合成调节 苏云金杆菌的伴孢晶体是一种亚基聚集体,亚基聚集机理尚不清楚,有人在转录水平上研究了苏云金杆菌伴孢晶体形成和芽孢形成的调控,Glatron和Rapoport^[25]看到苏云金杆菌细胞恒定期的晶体蛋白的mRNA(半衰期10分钟)比营养细胞的mRNA(半衰期2分钟)稳定。晶体形成过程中的mRNA协调方式有待研究,Landolo等人^[26]从苏云金杆菌的休眠芽孢中分离到一种蛋白组份能抑制噬菌体的转录。这种抑制剂可能是极为重要的,因为它不仅能抑制苏云金杆菌噬菌体的转录,也能抑制其它模板的转录。近来有人用基因工程的研究方法从苏云金杆菌的 sotto

大质粒中克隆出产毒素的基因,并测定了该基因的核苷酸顺序,这对于伴孢晶体的研究是一种推动。

最近美国 Mycogen 公司的研究人员 Herrstadt 等人^[27]和德国的 Krieg 等人^[28]报告,他们分离出新的一类苏云金杆菌,对鞘翅目昆虫有毒性。但对鳞翅目和双翅目昆虫无毒性。Krieg 等人把他们分离到的菌株定名为 *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*。Herrstadt 等人则把他们分离到的菌株定名为 *Bacillus thuringiensis* var. *sandiego*。由于没有比较,不了解它们是否是相同的菌株。*Bacillus thuringiensis* var. *sandiego* 产生的毒素晶体,在电镜下观察为扁平的长方形。新分离到的这类菌株的伴孢晶体含有一条分子量约 6.4×10^4 道尔顿的多肽。对多种鞘翅目昆虫进行了杀虫试验证明具有活性,例如科罗拉多土豆甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*, 绵子象鼻虫 *Anthonomus grandis*, 榆叶甲虫 *Pyrrhalta luteola*, 黑葡萄象鼻虫 *Otiorynchus sulcatus*。这一类毒素和鳞翅目特异的菌株 HD-1 和 HD-73 的毒素抗血清不发生交叉免疫反应。并且这两类毒素的胰蛋白酶分解出的片断也不相同。由于新分离的苏云金杆菌菌株对许多鞘翅目昆虫有毒性,因而扩大了苏云金杆菌在农业上可能应用的范围。

摘 要

苏云金杆菌能产生伴孢晶体蛋白,又叫 δ -内毒素,对鳞翅目、双翅目、甚至鞘翅目的许多种昆虫幼虫有毒性。这类蛋白在芽孢形成期大量合成。对鳞翅目昆虫有毒的伴孢晶体一般为双金字塔形,蛋白质分子量为 1.3×10^5 道尔顿,对双翅目昆虫有毒的伴孢晶体一般为不规则的立方体,蛋白质分子量 6.5×10^4 道尔顿。对鞘翅目昆虫有毒的伴孢晶体一般为扁平长方形,蛋白质分子量为 6.4×10^4 道尔顿。对毒素蛋白的分离纯化方法、物理化学性质、毒理以及其它方面的研究现状做了介绍。

参 考 文 献

- [1] Berliner, E., 1915, *Z. Angew. Ent.*, 2: 29-56.
- [2] Hannay, C. L. and Fitz-James, P. C., 1955, *Can. J. Microbiol.*, 1: 694-710.
- [3] Angus, T. A. 1956, *Can. J. Microbiol.*, 2: 122.
- [4] Bulla, L. A. Jr. et al., 1977, *J. Bacteriol.*, 130: 375-383.
- [5] Bulla, L. A. Jr. et al., 1979, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 91: 1123-1130.
- [6] Stahly, D. P. et al., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84: 581-588.
- [7] Gonzalez, Jr. et al., 1981, *Plasmid.*, 5: 351-365.
- [8] Schenpf, H. E. et al., 1981, *Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 2893-2897.
- [9] Yujishibano, et al., 1985, *Gene.*, 34: 243-251.
- [10] Cooksey, K. E. et al., 1968, *Biochem. J.* 106: 445-454.
- [11] Cooksey, K. E. et al., 1969, *J. Invertebr. Pathol.*, 13: 461-462.
- [12] Chestukhina, G. G. et al., 1977, *Biokhimiya.*, 42: 1660-1667.
- [13] Nishititsuji-Uwo, J. et al., 1977, *J. Invertebr.*, 29: 162-169.
- [14] de Barjac, H., 1981, in "Microbial Control of Pests and Plant Diseases. 1970-1980", p. 35-43. Academic Press New York.
- [15] Yamamoto, T. et al., 1983 *Curr Microbiol.*, 9: 279-284.
- [16] 陈俊标等人, 1985, 微生物通报, 12: (1) 3-5.
- [17] Katz, E. et al., 1977 *Bacteriol Rev.*, 41: 449.
- [18] Somerville, H. J. 1971 *Eur. J. Biochem.*, 18: 226-237.
- [19] Bulla, L. A. Jr. et al., 1980, *Crc Crit Rev Microbiol.*, 8: 147-204.
- [20] Lecadet, M. M. et al., 1971, *Eur. J. Biochem.*, 23: 282-294.
- [21] Griego, V. M. et al., 1979, *J. Insect Physiol.*, 25: 283.
- [22] Heimpel, A. M. et al., 1959, *J. Insect Path.*, 1: 152-170.
- [23] Prasad, S. S. S. V. 1975, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62: 517.
- [24] Prasad, S. S. S. V. 1976, *Indian. J. Sci.*

- Ind. Res.*, 35: 626.
- [25] Glatto, M. F. et al., 1972, *Eur J. Biochem.*, 54: 1291.
- [26] Landolo, J. J. et al., 1976, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69: 237.
- [27] Herrnstadt, C. et al., 1986, *Biotechnology.* 4: 305-308.
- [28] Krieg, A. et al., 1983, *Z. Ang. Ent.*, 96: 500-508;

植物细胞的转化系统*

俞新大

(南开大学生物系)

植物细胞转化系统在体细胞遗传学、分子遗传学及遗传工程研究中已有许多应用,然而植物细胞转化的概念至今尚无严格定义。众所周知,“转化”(transformation)一词最初是用来描述细菌系统中由外部提供的裸露 DNA 转移遗传信息的过程。当 Doy 等(1973)报道细菌基因通过噬菌体转入植物细胞并且表达时,他们采用了一个新词“转入”(transgenesis)来说明其结果^[1]。但是,这个词的含义和必要性并不完全清楚。八十年代以来,在植物细胞遗传操作实验中仍广泛采用“转化”一词来描述植物细胞对于外源遗传物质的摄取、整合及表达的过程。供体不但是分离的 DNA,甚至可以是完整的细菌、球质体、质粒、病毒、细胞核、染色体或用脂质体作载体等等。可见转化的含义已大大超越了原先的概念。本文就目前植物细胞转化系统的研究方法、技术特点及其进展作一论述。

一、整体和离体组织水平的冠瘿性转化

虽然早期有许多转化研究,但植物细胞转化现象的真正确立是从冠瘿瘤的研究开始突破的。七十年代中期,人们弄清了冠瘿转化的实质是由根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的诱瘤质粒(tumour-inducing plasmid)引起的,简称 Ti 质粒。该质粒的一个片段 T-DNA 能插入植物细胞核 DNA 中并共价结合,由于转移 DNA 的作用,转化的植物细胞能在无激素

培养基上持续生长,并合成一类正常植物所没有的冠瘿碱(opines)。由于冠瘿的形成过程包括遗传信息从细菌转移到植物细胞并且表达,因此它是一种天然转化系统。

利用农杆菌的基因转移能力, Murai 等(1983)用菜豆蛋白基因和胭脂碱合成酶基因启动子组建的嵌合基因 Ti 质粒农杆菌感染向日葵幼苗茎部和离体的茎切段,结果外源基因能在植物细胞中整合,并在转化的细胞中检测到菜豆蛋白^[2]。蒋兴邨等(1985)用农杆菌诱发栽培大豆获得转化的大豆细胞系,并证实 T-DNA 能在大豆细胞系中表达和传递^[3]。Deak 等(1986)用苜蓿幼苗茎切段和农杆菌过夜培养物共培养三天,然后在选择性培养基上培养,结果在切断处长出许多绿芽,产生转化再生植物的频率较高,分子杂交表明,外源卡那霉素抗性结构基因能稳定地转移整合和表达^[4]。根癌农杆菌也能转化某些单子叶植物,直接在石刁柏的茎切段上接种农杆菌可诱导瘤状物,该组织能在无激素培养基上生长,并检测到 T-DNA 和编码的冠瘿碱^[5]。

许多植物的叶片具有再生植株的能力,因此离体叶圆片转化法受到人们的重视。McCor-mick 等(1986)将番茄叶片小块浸入农杆菌培养液中,温和振荡,使叶块边缘都被感染。经培养后产生愈伤组织并分化出大量小植物, T-

* 周之杭副教授热情指导,特此致谢。