

苏云金芽孢杆菌8010的研究

关 雄 编著

科 学 出 版 社

苏云金芽孢杆菌 8010 的研究

关 雄 编 著

科 学 出 版 社

1 9 9 7

内 容 简 介

本书对我国产量大、应用范围广的生物农药——苏云金芽孢杆菌 8010 菌株进行了全面、系统、深入的研究。全书分为概论和研究两大部分。概论中对苏云金芽孢杆菌的生物学、杀虫机理等作了简要介绍；研究部分，包括苏云金芽孢杆菌 8010 菌株的形态学、生理生化、血清学、氨基酸组成分析、致病力、杀虫谱、安全性测定、基因定位、克隆表达、PCR 技术用于杀虫基因的鉴定等。此外，对 8010 菌工业化生产也进行了比较系统的研究，包括发酵培养基优化研究、动力学模型、深层过滤及超滤技术用于分离浓缩以及高效价可湿性粉剂的研制。

本书可供高等院校生物系、农林院校植保系及从事农业微生物学、昆虫学及生物防治等工作的科研和技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

苏云金芽孢杆菌 8010 的研究/关雄编著. -北京:科学出版社,1997
ISBN 7-03-006085-7

I. 苏… II. 关… III. 苏云金杆菌制剂-研究 IV. TQ453.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 10030 号

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100017

北京双青印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1997 年 10 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1997 年 10 月第一次印刷 印张:12 3/4

印数:1-1 000 字数:305 000

定价:28.00 元

序

人类与害虫的斗争是个“永恒”的课题。化学农药在害虫防治中确实发挥了重要的作用,但也带来诸多问题,如人畜中毒、环境污染、害虫抗性及再生猖獗等。

生物农药异军突起并迅速发展,导致农药领域发生深刻的变化。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是目前世界上产量最大、研究最深入、应用最广泛的生物农药,由于其显著的经济效益、社会效益和生态效益,在研究、投资和开发方面吸引了各国政府,实现了重大的战略转移。

“绿色食品和生物农药”已为我国政府列入“21 世纪优先发展议程”。近年来,我国在发展高效低毒低残留化学农药的同时,大力加速和推进 Bt 的研究和开发。目前年产量已逾 3 万吨,在国际生物杀虫剂产业化和商品化的激烈争夺中已占有重要席位,其应用前景十分诱人。

关雄同志的研究得到了国家计委、国家科委的“攻关”资助,涉猎了大量的国内外文献,广泛接触研究前沿,取材于我国自行分离且已成为国内产量最大的生产菌株之一的 8010,系统深入地进行了分类学、免疫学、酶学、蛋白质以及核酸的基因分析,采用的基因克隆和表达的分子生物学技术路线先进可行。同时,针对生产上 Bt 制剂效价不高、产品不稳定等“瓶颈”问题,率先从工业化角度,探索了培养基优化、发酵动力学、浓缩技术以及高效价粉剂的研制。

关雄此书是国内第一本 Bt 研究专著,内容新颖、系统全面,有较强的理论性、实用性和可读性,它的出版将促进我国 Bt 的深入研究和加速产业化进程,为此我乐于推荐此书,并希望读者与著者共同研讨,相互交流。

谢联辉 院士

1997. 5. 25

出版说明

本书是在导师赵修复教授、高日霞教授悉心指导下完成的。导师高深的修养、渊博的学识、严谨的作风以及诲人不倦的品德给作者以很大的鼓励和帮助,使学生终生受益。

研究始终得到国家计委、国家科委,福建省教委、省计委、省科委及福建农业大学有关部门的项目资助和大力支持。英国剑桥大学生化系查理博士、日本北海道大学应用昆虫学实验室饭冢敏彦教授和伴户久德副教授、华中农业大学生命科学技术学院喻子牛教授、刘子铎博士、陈亚华博士、孙明博士、罗曦霞老师(现在加拿大)及植物系王沫老师无私提供了工作条件及许多技术路线。在资料整理过程中,国外同学刘斯军博士、姚一建博士及汤玉清博士等提供了许多宝贵资料。

福建农业大学陈锦权博士、徐金汉副教授、林同香博士、陈颖副教授、许文跃高级农艺师均协助完成了许多研究工作。植物保护系领导给予了工作上的大力支持,黄志鹏、林国宪老师及植保 91 级黄金翔、姚荣富、陈少伟、丁正民同学,植保 92 级汤玉波、邱思鑫、张柏莲、杨淑琼同学,植保 93 级杨必茂、宋菁、余月萍同学等参加了部分工作。笔者谨对上述单位和个人致以衷心的感谢!

中国林业科学院王学聘、戴莲韵女士提出宝贵的修改意见。文稿完成后,蒙谢联辉院士审阅全文并作序,作者甚为感谢。

此外,还有下列专家帮助复印文献、赠送分子生物学工作材料或在试验设计时给予有益的启示。他们是:

中国农业科学院生物技术中心黄大方研究员、植物病虫害生物学国家重点实验室张杰副研究员、中国林业科学院卢孟柱博士(现在瑞典)、中国农业大学生物学院赖锦盛博士(现在美国)、中国农业科学院郑志亮博士(现在美国)、辽宁省微生物研究所谢玺文先生、中山大学生物防治国家重点实验室吴运兰女士、福建省微生物研究所林风博士、连云阳硕士、福建医学院黄勤老师及福建同安植保站彭建立同志等。

由于作者学识水平及工作能力有限,特别是对苏云金芽孢杆菌研究工作不够深入和全面,本书定还存在不少缺点和错误,恳请读者不吝指教。

关 雄

1997. 9. 5.

目 录

序

出版说明

前 言..... (1)

第一部分 苏云金芽孢杆菌概述

第一章 苏云金芽孢杆菌研究概述.....	(5)
一、苏云金芽孢杆菌的生物学.....	(5)
二、苏云金芽孢杆菌的杀虫机制.....	(6)
三、苏云金芽孢杆菌 ICP 基因定位和分类.....	(10)
四、苏云金芽孢杆菌 ICP 基因的分子克隆及序列分析.....	(13)
五、苏云金芽孢杆菌 ICP 基因工程菌研究.....	(19)
六、PCR 技术用于苏云金芽孢杆菌的研究.....	(25)
七、苏云金芽孢杆菌杀虫剂发酵及后处理技术.....	(35)
八、 <i>Bt</i> 转基因工程植物研究.....	(43)

第二部分 苏云金芽孢杆菌 8010 的生物学

第二章 苏云金芽孢杆菌 8010 形态学、生理生化反应、酯酶及血清测定、氨基酸组成.....	(55)
一、形态学观察.....	(55)
二、生理生化试验.....	(56)
三、酯酶及血清型测定.....	(57)
四、氨基酸组成分析.....	(58)
第三章 苏云金芽孢杆菌 8010 发酵及工业化生产.....	(62)
一、工艺流程.....	(62)
二、工艺条件.....	(62)
三、发酵培养条件.....	(63)
四、影响发酵液菌数的因素.....	(64)
五、对流干燥.....	(65)
第四章 苏云金芽孢杆菌 8010 杀虫谱及其对家蚕、小菜蛾、棉铃虫、甜菜夜蛾的致病力测定和防治.....	(70)
一、苏云金芽孢杆菌 8010 杀虫谱测定.....	(70)
二、致病力测定及防治.....	(71)
第五章 苏云金芽孢杆菌 8010 安全性测定.....	(84)
一、供试菌株及感染液制备.....	(84)

二、供试动物	(84)
三、感染方法	(84)
四、试验观察内容	(85)
五、对试验动物急性感染	(85)
六、对试验动物亚急性毒性试验	(86)
第六章 苏云金芽孢杆菌 8010 分子生物学研究	(87)
一、菌株、质粒及培养条件	(87)
二、质粒 DNA 的提纯及基因定位	(87)
三、质粒 DNA 的酶切	(90)
四、DNA 同源杂交检测	(91)
五、Glassmilk 法纯化回收 DNA 片段	(95)
六、目的基因与载体的体外重组	(95)
七、转化——氯化钙法转化大肠杆菌	(96)
八、克隆子的证实	(97)
九、表达产物检测	(98)
十、PCR 鉴定	(100)

第三部分 苏云金芽孢杆菌 8010 的工业化生产及产品研制

第七章 苏云金芽孢杆菌 8010 发酵培养基配方优化筛选	(105)
一、培养基	(105)
二、正交旋转实验设计	(106)
三、摇瓶培养及平板计数	(107)
四、芽孢数响应面方程的设立	(108)
五、优化回归方程	(108)
六、优化方程预测验证及几何解释	(112)
七、寻找最佳点	(112)
八、用于动力学研究的溶解性葡萄糖培养基筛选	(113)
第八章 苏云金芽孢杆菌 8010 发酵动力学	(117)
一、葡萄糖培养基间歇发酵动力学研究	(118)
二、流加发酵实验动力学研究	(122)
三、豆饼粉配方发酵实验动力学研究	(125)
第九章 苏云金芽孢杆菌 8010 发酵结构动力学模型	(129)
一、动力学模型的确定	(129)
二、四组分结构模型	(130)
三、结构动力学模型的计算	(133)
四、动态模拟	(136)
第十章 苏云金芽孢杆菌 8010 高效价粉剂的研制	(140)
一、发酵液的超滤浓缩	(141)
二、芽孢及晶体的回收率	(148)

三、产品的性能检测	(148)
四、生测虫种小菜蛾的人工饲养及冷藏研究	(149)
五、产品的效价测定	(153)
附录 生物农药 8010 总厂设计	(156)
参考文献.....	(173)

前 言

据 FAO 估计,全世界每年被病虫害夺去的谷物占应收成量的 20%~40%,由此造成的经济损失每年达 1200 亿美元。为了对付病虫害,每年需生产 200 多万吨农药,其中主要是化学农药,农药销售额每年高达 160 亿美元。

使用化学农药带来一系列严重问题:全世界每年约有 200 万人中毒,其中大约有 4 万人死亡。同时,化学农药还污染环境及食品,害虫也产生了抗性。50 年代以来,抗药性害虫已从 10 种增加到目前的 500 多种(谢振虎等,1992)。

消除化学农药对人类及环境的危害,已成为各国科学家们的研究主题。在 IPM 战略实施中,生物防治方法不失为一种较为有效的手段,并且日益深入人心。许多国家已研制出一系列选择性强、效率高、成本低、不污染环境且对人畜无害的生物农药。目前世界上已商品化的生物农药约 30 种,年销售额 7 亿美元,而且还有大批生物农药正进入野外试验阶段。预计到 2000 年,生物农药销售额将达 80 亿美元,约占目前农药销售量的一半(吴正铠等,1991)。

在生物农药中,研究最深入、使用最广泛的首推苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*)。它是一种天然存在的昆虫病原细菌,目前已发现 46 个血清型 60 个亚种。由于它能防治 100 多种鳞翅目害虫、多种双翅目害虫及鞘翅目害虫、植物病原线虫、螨、原虫、肝吸虫,有些还可毒杀白蚁,具有对人畜安全、害虫不易产生抗性、易于工业化生产等优点,许多国家如美国、日本、比利时、法国、英国、瑞士、德国、中国等都纷纷投入大量人力、物力竞相研究与开发。目前美国的 Du Pont 公司、Sandoz 公司、BMT 公司、Abbott 制药公司、Mycogen 公司,日本的东亚合成化学公司、住友化学药品公司、盐野义制药公司、协和发酵工业公司、大冢化学药品公司、日本农药公司、日本烟草公司、久保田公司等,以色列的 Ecogen 公司,德国的拜耳公司,印度的国际生物技术公司(BIL),比利时的生物化学制品公司,丹麦的 Novo 公司等都加入到研究与开发 *Bt* 的行列中。生产了许多新的生物农药如 Mattch、CellCap、Crymax、CoStar™、Skeetal、Bactimos、Bacticide、Biolep、Bioasp、CETAN、Biobit、Bactospeine、Florbac、Teknar、BugTime、Foray48B、Cutlass、Foil、Condor 等。我国湖北、河南、河北、湖南、福建、广东、山东、辽宁、江苏等数十个厂家和单位正在研究与生产(邓永鸿,1989;崔云龙,1991;王璋瑜,1993;喻子牛,1995)。

虽然 *Bt* 的工业化生产为人类创造“无公害”的生存环境提供了条件,能直接抵抗某些病虫害植株的培育成功,的确令人兴奋不已,但要真正使这些成果得到普及和应用,真正使人们生活在一个“无公害”的生态环境中,还不是近期内所能解决的问题,还需要人们继续努力,不断探索。这是因为:①目前虽已实现 *Bt* 的工业化生产,但由于其易变性,高产菌株很容易衰退,所以,经过很大努力、花费很长时间才筛选培育出来的一株高产菌,用不了多长时间,就不得不更换菌株,而更换的菌株的杀虫谱大多与前者有差异,这就有可能使某些害虫在根治之前而又复发,造成虫害的大流行。②由于大多数 *Bt* 都具有溶源性,不管我们操作条件多么严格,无菌、无污染程度多么高,都难以避免各种理化因素的诱发而使

温和噬菌体转变为裂性噬菌体,从而引起倒罐,给生产造成严重损失。③目前用于杀虫剂生产的 *Bt* 菌株多为从自然界筛选的天然菌株,其基因产物表达水平受到细菌自身调节系统及毒素基因拷贝数的限制,仍存在杀虫范围窄、有效成分易降解等缺点。因此,近年来许多科学家正致力于采用遗传工程的办法,对原来的 ICP 基因重组改造,构建成杂种基因或工程菌,以提高杀虫效率、扩大杀虫谱、延长有效期或改进制剂效能。这个研究领域已十分活跃,并展示出极好的前景(张俊龙,1989;Jerald 等,1992;王卫国等,1993;黄大方等,1993)。

鳞翅目害虫是农作物的主要害虫,而 *Bt cryI* 基因对其有特异毒性。因此,*cryI* 基因克隆及相应工程菌的构建在生产上有重大的应用价值。

福建农业大学研究与开发的 *Bt* 8010 杀虫菌含有 *cryI* 基因,经形态、生理生化、免疫学、分类学、生态学、毒力学等测定,已证实它是一株毒力较强的 *Bt* 菌株(高日霞等,1986;关雄等,1992,1994,1995,1996)。在山东、浙江、江苏、广东、福建以及出口东南亚、试销南美等地试验,证明它对果树、蔬菜、茶叶、花卉等多种害虫有特效,是目前国内产量最大的苏云金杆菌制剂之一,也是一种比较理想、竞争力强、经济效益、生态效益和社会效益极其显著的生物农药。

鉴于目前生物农药工厂应用出发菌株生产的普通型生物农药仍然存在着效价不高、杀虫谱有限、产品不够稳定等问题。

本研究以 *Bt* 8010 菌为出发菌株,通过对 δ -内毒素蛋白基因的分离、纯化,经过核酸限制性内切酶消化,转移到受体菌上进行克隆表达,并分析其基因结构。目的在于:①建立一套 *Bt* ICP 基因从克隆到表达的分子生物学技术和方法;②进行 *Bt* 8010 *cryI* 基因定位,并克隆其 *cryI* 基因和分析表达;③从根本了解 *Bt* 8010 杀虫基因的分子机制,掌握控制基因表达的遗传密码,为将来能人工合成有生命的物质来抵御害虫奠定理论基础。也为构建多功能的“工程菌”和“工程植物”打下基础。

我国重要农作物病虫害近百种,常年发生面积约 30 亿亩次。在各类防治剂用量趋于平稳的情况下,苏云金杆菌杀虫剂的年产量迅速增加,由 1989 年的 1000 吨、1991 年的 3500 吨发展到 1994 年的近 3 万吨,但其应用仍占不到总防治面积的 4%,离“世界环境和发展大会”决议达到 60%的要求相差甚远。如果到本世纪末棉花和蔬菜防虫面积的 20%使用苏云金杆菌杀虫剂,年产量 6 万吨仍难以满足要求。

我国是一个农业大国,要以占世界 7%的耕地养活占世界 22%的人口,农业生产压力较大。我国对微生物农药的研制与推广应用一直十分重视,国家“六五”、“七五”、“八五”都将 *Bt* 杀虫剂列为科技攻关项目,然而至今仍未打开大规模工业化生产的局面。30 多年来均处于小规模、低水平重复,曾经出现过三起三落的大反复。中国 *Bt* 生物农药的出路在哪里?三起三落的原因均出于产品质量上不去,生产成本下不来。

鉴于目前绝大多数生物农药工厂所生产的 *Bt* 产品存在效价不高、杀虫谱比较窄、产品质量不稳定、生产成本高等问题,影响了 *Bt* 生物农药的工业生产和推广应用。因此,本研究试图从工业化生产的角度,研究发酵过程动力学及发酵液有效成分的分离提取,寻找成本低、效果好、能耗少、产品效价高的发酵及分离手段,为解决 *Bt* 生物农药生产上存在的问题提供理论与实践的依据。

第一部分

苏云金芽孢杆菌概述

第一章 苏云金芽孢杆菌研究概述

一、苏云金芽孢杆菌的生物学

根据《伯杰细菌鉴定手册》第九版,该菌归为第二类第十八群、G⁺的芽孢杆菌属中一个种。它有别于蜡状芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌的主要特征是在形成芽孢的同时,在菌体内的一端或两端形成具蛋白质性质的一个或多个能形成各种形状的伴孢晶体。

自 1901 年日本首次从患猝倒病的家蚕中分离到苏云金芽孢杆菌猝倒亚种(*B. thuringiensis* subsp. *sotto*)至今,已从世界各地采集的昆虫、土壤、蚕渣、仓库灰尘、植物体表面等基质上分离到数万株苏云金芽孢杆菌。该菌在世界范围内从高山到平地、从积雪到地下水、从沃土到沙漠均有分布,其菌种和基因资源十分丰富,发掘相当迅速。

土壤是微生物的大本营。1987 年 Martin 和 Travers 从土壤中找到新的苏云金芽孢杆菌菌种,这一事实改变了苏云金芽孢杆菌的历史。因为起初科学家们认为,只有找到死昆虫才能找到这些细菌。本来以为它是一种昆虫病,但实践证明,苏云金芽孢杆菌实际上是多种土壤中的正常组分。同时,在海拔约 640m 的高处几乎没有昆虫生存,而在那里,科学家们仍发现了能杀死毛虫、蚊子和甲虫的苏云金芽孢杆菌菌种。Travers 和 Martin 研究的从土壤中分离苏云金芽孢杆菌的新技术,仅花了 2 年时间就鉴定了 72 个菌种,而大家熟知的 24 个菌种却花了 85 年时间才被发现。

至今,苏云金芽孢杆菌的分离数,昆虫体上占 22%,土壤中占 44%,贮藏物中占 18%,其他(粉尘、植物体上等)占 16%。

苏云金芽孢杆菌对营养条件要求不高。所需主要营养物质属动植物蛋白质衍生物。能在多种碳源、氮源和无机盐中正常发育。通常所需的碳源是:淀粉、糊精、麦芽糖、葡萄糖等。所需氮源是牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、花生饼粉、鱼粉、玉米浆等。所需的无机盐有 K₂HPO₄、MgSO₄、CaCO₃ 等。主要元素有 P、S、Mg、K、Na、Ca 6 种,微量元素有 Mn、Zn、Si、Cu、Fe 等。

苏云金芽孢杆菌在 10~40℃ 范围内都能生长,以 28~32℃ 为最适。35~40℃ 生长很快,但易衰老,温度低则生长缓慢。因此在一定范围内提高温度会缩短生长期,但菌数量会降低;而温度低则生长慢,生长期延长,菌数相对来说则增高。与其他细菌类似,该菌适于微碱性条件,最适 pH 值是 7.5,当 pH 值达到 8.5 时还能形成芽孢,如 pH 降至 5 以下则不能形成芽孢。苏云金芽孢杆菌是一种好氧细菌,需要足够的空气才能生长发育良好。尤其当芽孢形成时,若缺乏足够的空气会延迟芽孢的形成或不能形成。空气不足还影响到生长速率、菌数和晶体。在深层培养时通气不良会造成细菌溶解,使菌数降低。紫外线、阳光对芽孢都有致死作用。芽孢暴露在紫外光下很快失去活性。抗生素、化学物如放线菌素 D、氯霉素、红霉素等亦有影响。乳化剂对芽孢萌发有抑制作用,如 Triton X-100 在 100μg/ml 时,全部抑制了芽孢萌发。

苏云金芽孢杆菌发现后很长一段时间内,在种的分类研究中是有争论的。主要焦点在

于 Berliner 所发现的 *Bacillus thuringiensis* 是一个独立的种,还是 *B. cereus* 的一个变种,这就牵涉到伴孢晶体的生成是否稳定,是否可以作为上述两种的区别依据。

苏云金芽孢杆菌伴孢晶体在培养基继代中,不利于生长的发酵条件和其他因素,如物理、化学、酸碱等影响会形成 cry^- ,但在 Berge's Manual 上考虑到昆虫病原的经济重要性,仍把苏云金芽孢杆菌作为一个单独的种来处理。

近 20 年来,人们发现苏云金芽孢杆菌是对双翅目、鞘翅目、虱目、同翅目、膜翅目、食毛目、蜚蠊目、蚤目、毛翅目、直翅目、等翅目、毛蠓科等昆虫有效的菌株,还发现它是对鳞类、线形动物门中的动植物寄生线虫、原生动物门中的鞭毛虫、变形虫和草履虫及扁形动物门中的扁虫、吸虫、绦虫等特异性菌株,1993 年报道了对蚂蚁有活性的苏云金芽孢杆菌菌株。目前苏云金芽孢杆菌活性范围还有继续扩大的趋势,世界各国科学家都在筛选发掘新的菌株和发掘更多的有用材料(喻子牛,1993,1996;罗绍彬,1995)。

二、苏云金芽孢杆菌的杀虫机制

苏云金芽孢杆菌的侵染方式是“病从口入”, δ -内毒素通过胃毒作用使昆虫致死。除了晶体毒素对敏感昆虫造成毒血症外,该菌还可以由消化道侵入到昆虫体腔中,通过大量繁殖而引起败血症。

在感病初期,昆虫不安、拒食,随着病情发展,不久即见病虫腹足或臂足抓住物体,虫体倒挂而死。一般害虫如菜青虫感病后,食欲减退,行动迟缓,反应失灵,兼有吐泻症状,偶见黑斑出现于体背或体侧,死后虫体伸长,中肠发黑,整个消化道变黑呈腐烂状,虫体内充满乳糜液样物,死后不久整个虫体呈棕褐色或黑色。

苏云金芽孢杆菌杀虫的“法宝”是蛋白质晶体毒素,它对害虫有强烈毒性。完整的晶体具有物理稳定性,当敏感昆虫摄食伴孢晶体后,在中肠肠液碱性条件下打开二硫键降解为毒性亚单位或称原毒素(protoxin),进而在肠道胰蛋白酶的作用下激活成抗蛋白酶的毒素核心片段(toxic core fragment),与刷状缘结合位点(brush border membrane vesicles, BBMV)特异性受体高亲和性地结合,快速而不可逆地插入细胞质膜,形成孔或病灶(lesion),破坏钾、钠离子梯度,使钾的运输和 ATP 合成中断,细胞线粒体失去功能,细胞膜传递受到干扰,膜引起非极化。最后通过胶体渗裂解(colloid-osmotic lysis)将细胞膨胀并裂解,肠腔内容物渗入血腔,微生物迅速繁殖,昆虫死亡。由于高等动物和人体肠胃中缺乏能溶解晶体的条件,故这种杀虫毒素具有很大的应用价值和理论意义,受到人们的高度重视。

Carroll 和 Ellar(1991)通过 X 射线晶体衍射确定 CryIIIA 结构。其中,蛋白质有 3 个结构性特异功能区,Ⅰ区由 N 端 290 个氨基酸残基组成;Ⅱ区包含第 291~500 残基,Ⅲ区直至末端。

Ⅰ区是一串 7 个 α -螺旋,在交叉部分,以疏水的第 5 区螺旋为中心,其余 6 个螺旋成六角形排列,第 1 和 7 个螺旋的外端接近 Ⅱ区,在已确定的那些蛋白质结构中,Ⅰ区的结构是独特的,据 Yamamoto 和 Powell(1993)报道,接近 Ⅱ区的第 1 和 7 个螺旋的侧面富含疏水性氨基酸残基,螺旋的可溶性表面($\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$)正如预料的那样具有亲水性。

Ⅱ区是 3 个结构同源的 β 折叠组成三角柱,1 和 2 层是高度同源的,每层由决定同一

结构基元(序列)的 4 条不同 β 链组成。内部 2 条 β 链构成一条 β 带伸出它外部两条 β 链,在内部链的末端有一环状伸入可溶区。3 层含有 3 条 β 链(β_1 、 β_{10} 、 β_{11})和一短 α -螺旋(α_8),用来维持 1 和 2 层的基本构型。

Ⅲ 区含有几个不同的 β 链,Ⅲ 区的 jelly-roll 结构是一很普通的结构,在许多其他蛋白质中均可见。

Cry Ⅲ A 和 Cry I 的结构同源性分析表明,伴随着晶体蛋白的溶解和活化,避免毒素被昆虫肠液中的蛋白质进一步酶切是必需的。在Ⅲ区内,cry I 和 cry Ⅲ 基因富含第 17 和 23 条链的一级序列,Hofte 和 Whiteley 称之为 4 和 5 块件,cry Ⅲ A 的第 17 条 β 链的序列(4 块件)和 cry I 蛋白相应的序列都含有一些精氨酸及赖氨酸残基,提供胰蛋白酶酶解位点。第 23 条链的作用可能是导致杀虫活性丧失,活性丧失可能是肠蛋白酶对第 17 条链或其它链造成的缺失引起的。

有关晶体蛋白和昆虫中肠膜之间的相互作用及其与各自的受体结合,根据 CryⅢA 的结构和所有 Cry 蛋白结构的同源性,Yamamoto 和 Powell 提供了以下互作模式:

I 区插入膜,毒素分子打开了 I 区与Ⅱ区和Ⅲ区的结合,I 区与Ⅱ区和Ⅲ区的不牢固连接有助于同受体结合后开始裂解过程的进行,水疗法表明,第 1 和 7 个 α -螺旋是高疏水的,而与这些螺旋连接的Ⅱ区和Ⅲ区是相对亲水的,疏水性的不同可能造成毒素分子内在的不稳定结构,进一步推测 I 区可能形成多聚体(也许是 hexamers),环形的 hexamer 含有与液膜相连接的疏水上表面,hexamer 的亲水性内表面由螺旋 3 和 4 组成,它限制着亲水性的分子通过膜的气孔内表面。这是为进行生化研究提供解释苏云金芽孢杆菌毒素作用机理的模型证据。

Hofte 和 Whiteley(1989)发表了 cryI 基因类型蛋白的杀虫谱。根据他们的文章,所有 cryI 蛋白质对大菜粉蝶和烟草天蛾都有活性。

Moar 等(1990)发表了对其他重要的农业害虫例如粉纹夜蛾和烟芽夜蛾的杀虫活性,证明 Cry I A(c)是最具活性的蛋白质,其次是 CryIA(b)和 Cry I A(a)。

Ge 等(1989)和 Van Frankenhuyzen 等(1991)发表了 Cry I A(a)对家蚕及落叶性森林鳞翅目害虫非常有效,如舞毒蛾。而 Cry I A(c)对其活性甚低。Visser 等(1990)和 Moar 等(1990)报道 Cry I A(b)是 Cry I A 类型中对甜菜夜蛾最有效,也可能对其他夜蛾有效(见表 1.1)。

表 1.1 专化性功能区*

专化性	CryIA(a)	CryIA(c)	CryIC	CryIIA	参考文献
<i>B. mori</i>	332~450				Ge 等(1991)
<i>T. ni</i>		335~450			"
<i>H. virescens</i>		335~615			"
<i>M. sexta</i>		429~447			Schnepf 等(1990)
<i>H. virescens</i>		332~772			Ge 等(1991)
<i>S. littoralis</i>			261~654		Honee 等(1991)
<i>Diptera</i>				307~382	Widner 和 Whiteley(1990)

* 表中数字指氨基酸残基,此表据 Yamamoto 及 Powell(1993)

尚有一些报道指出 Cry I A 类型蛋白序列的细微差别可导致杀虫活性的明显不同。例如, *Bt kurstaki* NRD12 的 Cry I A(b) 对粉纹夜蛾和甜菜夜蛾的杀虫活性比 HD-1 中 Cry I A(b) 高得多(Moar 等, 1990), 而来源于 HD-1 和 NRD12 的 Cry I A(c) 蛋白杀虫活性则比 HD-73 的 Cry I A(c) 蛋白杀虫活性高(Moar 等, 1990)。

小菜蛾和玉米螟对 *Bt kenya* HD-588 Cry I A(c) 敏感大大超过对 HD-263 的 Cry I A(c) (Von Tersch 等, 1991)。

Cry I B 只表现对大菜粉蝶 (Hofte 和 Whiteley, 1989) 及菜粉蝶有效 (Brizzars 等, 1991)。

Cry I C 对各种夜蛾高效 (Sanchis 等, 1988; Visser 等, 1988)。

Cry I D 只对烟草天蛾有效 (Hofte 和 Whiteley, 1989)。

Visser 等 (1988) 发现 Cry I E 对甜菜夜蛾与 Cry I C 一样有效, 但 Masson 等 (1992) 则发现对该虫无效。

Cry I F 与 Cry I A(b) 杀虫谱相似, 但它对棉铃虫活性非常弱 (Chamber 等, 1991)。

根据 cry I DNA 分析, 用寡核苷酸突变以确定苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素区域对毒性的作用也已进行 (Wu 和 Aronson, 1990)。

所有的 cry 毒性基因有着共同的进化起源, 因为它们的氨基酸高度同源, 而 cyt 基因及其蛋白表达则与 cry 基因及其表达物显著不同 (Sarjeet 等, 1992)。

不同苏云金芽孢杆菌伴孢晶体溶解性不同。 *Bt k* HD-1 的 Cry I 毒素在 pH9.5 时溶解, 而完全溶解 Cry II 毒素需 pH12, *Bti* 的 Cry IA, Cry IB 和 cytA 毒素在 pH9.5 时溶解, Cry I VD 溶于 pH12, Cry I A(c) 毒素在 pH 低于 3.5 或高于 9.5 时溶解, 在 pH5~8.5 之间, 其溶解度很低。这种溶解度与 Cry I A(c) 三维构象有些联系。其毒素结构 20% 是 α -螺旋, 35% β -折叠, 45% 无序。

通过免疫学研究也探索了毒素的三维结构, Cry I 蛋白的抗血清与许多 Cry I 蛋白能起交叉反应, 但不能与 Cry II 蛋白反应, 表明两种蛋白在抗原上是特异的。

加拿大森林害虫防治研究所研究了云杉卷叶蛾肠液的蛋白混合物对苏云金芽孢杆菌猝倒亚种内毒素的沉淀。他们利用柱层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离出一种 75kDa 蛋白, 该蛋白呈现出类似弹性蛋白酶的活性。舞毒蛾、森林天幕毛虫、白斑天幕毛虫的肠液也能产生相同的沉淀现象, 而家蚕肠液则反应微弱。因此, 可以说明昆虫中肠液对内毒素的不同加工过程在蛋白晶体活性表达方面是起了很大作用 (Milne 等, 1995)。

加拿大国立研究院生物技术所研究了 Cry I A(a) 杀虫毒素晶体结构与膜穿孔形成的关系。通过 X 射线衍射研究了 HD-1 激活的 65kDa Cry I A(a) 毒素在平面双分子脂膜间形成穿孔的情况。用同晶替换法确定其三维空间构象。毒素由三个不同的结构域构成。N 端是由中间疏水、外围亲水脂的 8 个 α -螺旋组成, 中间和 C 端主要是 β -折叠。该构型与 Cry III A 相比, 尽管两种蛋白折叠方式类似, 但其功能域 II 明显不同。这完全支持了功能域 II 是表面受体识别和结合部位的分子遗传学研究的结论。分子表面的静电势并非一致, α -螺旋的一边带负电荷, 精氨酸残基占优势, 因而在鳞翅目昆虫中肠液高度碱性环境中观察到的是正电荷分布, “盐桥”在结构上及在毒素发挥作用中的重要性是很明显的。在平面脂双分子层中, Cry I A(a) 形成离子选择通道, 其导电性明显小于已报道的 Cry III A, 但与其他 Cry 毒素相似 (Grochulski 等, 1995)。

加拿大魁北克蒙特略大学 Vachon 等(1995)研究了 *sf9* 细胞中苏云金芽孢杆菌诱导产生的离子通道。探索了苏云金芽孢杆菌单价阳离子含量与草地贪夜蛾(*S. frugiperda*) *sf9* 细胞胞内 pH 值的效应,采用荧光指示等方法,证实内毒素能专一性地提高敏感细胞质膜至少对 H^+ 、 K^+ 和 Na^+ 的通透性。

英国剑桥 Li 等(1995)分析了 *Bt kyushuensis* 杀蚊膜穿孔 CytB 蛋白的结晶,用 X 射线衍射技术分析,该晶体呈六角形双锥体。同时还测定了结构的一些参数和分子量。Li 等(1996)研究了 CytB 内毒素结构与膜穿孔之间的联系,证明该蛋白是一种膜穿孔蛋白,能致死双翅目幼虫,在体外具有广泛的溶细胞活性。针对野生型蛋白和半胱氨酸突变的蛋白,采用重原子诱导的同晶替换研究了 CytB 的晶体结构。

英国牛津大学 Biggin 等(1996)进行了 α -螺旋肽和脂双分子层依赖于电压相互作用的模拟试验。利用苏云金芽孢杆菌 Cry III A 内毒素形成穿孔结构域的 α -5 和 α -7 螺旋的合成肽,分析了与膜有关插入膜状态时的电压。

美国俄亥俄州立大学科学家在该领域做了大量工作。通过 FPLC 从舞毒蛾 BBMV 中提取了氨肽酶 N,它是 Cry I A(c)的结合蛋白,但不与 Cry I A(a)和 Cry I A(b)结合,也不与 Cry III 结合。用生物素标记制成的 BBMV 蛋白探针进行蛋白质印迹说明 Cry I Ac 只与 120kDa 蛋白结合(Valaitis, 1995),并指出结构域 III 参与受体结合(Lee 等, 1995)。通过研究, Cry I Aa 和 Cry I Ac 对舞毒蛾(*L. dispar*)有协同作用,而 Cry I A 和 Cry I Ab 则有拮抗作用(Lee 等, 1996)。他还用比较配位印迹(ligand blotting)竞争测定研究了苏云金芽孢杆菌毒素结合位点的不一致性。调查了 Cry I Aa, Cry I Ab 和 Cry I Ac 毒素对舞毒蛾 BBMV 的受体结合特性。同源竞争结合测定表明 Cry I A 毒素具有高度的结合亲和性,异源竞争测定表明 3 种毒素有相同的结合位置。但是,配位印迹实验却与之不符,这说明只通过单一的竞争试验或配位印迹均不能确定毒素结合位点(Lee 等, 1996)。

Kwak 等(1995)探讨野生和突变株毒素与舞毒蛾 BBMV 的结合, Cry I Aa 和 Cry I Ac 的结合与其毒性直接相关,而 Cry I Ab 则不然。Cry I Aa 和 Cry I Ac 遵循着结合与毒性关系的反比“规则”,在 Cry I Ac 假定的环中一些位置用丙氨酸取代,以便验证这些环是否与受体结合关系密切。

根据苏云金芽孢杆菌毒素与烟草夜蛾中肠上皮细胞结合特性,比较了敏感和抗性菌株 Cry I Aa, Cry I Ab, Cry I Ac 的受体-结合特性,用 ^{125}I 标记毒素,采用二个株系昆虫中肠 BBMV 进行了饱和以及竞争结合试验。敏感株系对 3 种毒素都存在饱和的专一的高亲和力的结合,结合位点的浓度与毒性直接相关。抗性株系 Cry I Ab 和 Cry I Ac 的结合亲和力与敏感株系相似。异源竞争结合试验和配体印迹分析支持了对毒素存在有复合结合位点的假说。提出了 3 个毒素结合蛋白的改变是抗性产生的主要因素,并不是 Cry I A 的所有受体起了毒性作用(Lee 等, 1995)。

Rajamohan 等(1996)通过定点诱变,检测了 Cry I Ab 第 2 环结构域 III 对烟草天蛾(*M. sexta*)和烟芽夜蛾(*H. virescens*)的可逆和不可逆结合。他们研究了不同类型氨基酸残基侧链特性对不可逆结合毒性的作用。

Dean 等(1996)研究了 Cry III A 内毒素结构域 III 3 个表面的结构以评估受体结合和毒性的作用,通过定点诱变来分析。突变蛋白不可逆地结合到大黄粉虫膜受体上并插入 BBMV 后的结构稳定性及对该虫的活性。该研究证实了环在结合和插入上的功能重要性。通