



## 技术主题

## Technology Feature

# 用扫描电子显微镜观察 Bt 菌的晶体蛋白形态的实验方法

周燕<sup>1,2</sup>, 黄飞燕<sup>1,2</sup>, 李莉<sup>1,2</sup>, 赵从<sup>2</sup>, 朱锦天<sup>2</sup>

1 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学生命科学技术学院, 南宁, 广西, 中国

2 海南省热带农业资源研究所, 三亚, 海南, 中国

✉ 通讯作者: Crystal.Z.Chow@gmail.com 作者

基因组学与生物技术, 2014 年, 第 3 卷, 第 1 篇 doi: 10.5376/gb.cn.2014.03.0001

本文首次以英文发表在 Bioscience Methods, 2014, Vol. 5, No. 1 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

引用格式:

Zhou et al., 2014, The Protocol that Using Scanning Electron Microscope to Observe Crystal and Spore of *Bacillus thuringiensis*, Bioscience Methods, 2014, Vol. 5, No. 1 pp.1-3 ( doi: 10.5376/bm.2014.05.0001)

**摘要** 利用扫描电镜能观察 Bt 菌株在芽孢形成过程中产生的伴胞晶体蛋白的形态, 是鉴定 Bt 菌株的快速、直观的鉴定方法。本实验方法是我们实验室用扫描电子显微镜观察 Bt 菌晶体蛋白和芽孢形态的常用实验方法。

**关键词** *Bacillus thuringiensis*; 扫描电子显微镜; 伴胞晶体蛋白; 芽孢形成

## The Protocol that Using Scanning Electron Microscope to Observe Crystal and Spore of *Bacillus thuringiensis*

Yan Zhou<sup>1,2</sup>, Feiyan Huang<sup>1,2</sup>, Li Li<sup>1,2</sup>, Cong Zhao<sup>2</sup>, Jintian Zhu<sup>2</sup>

1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, College of Life Science and Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, China

2 Hainan Institute of Tropical Agricultural Resources (HITAR), Sanya, Hainan, China

✉ Corresponding author, Crystal.Z.Chow@gmail.com; 作者

**Abstract** Using scanning electron microscopy can observe the crystal and spore that produced Bt strain during sporulation, which is recognized the fastest and the most intuitive method for identifying Bt strain. This protocol is a routine method in our laboratory used to observe morphology of Bt crystal protein and spore by the means of scanning electron microscope.

**Keywords** *Bacillus thuringiensis*; Scanning electron microscope (SEM); Parasporal crystal; Spore

## 引言

扫描电子显微镜利用电子与物质的相互作用原理扫描样品表面, 获取被测样品本身的各种物理、化学性质的信息, 如形貌、组成、晶体结构、电子结构等。四氧化锇(osmium tetroxide), 亦称作锇酸(Osmic Acid, OsO<sub>4</sub>), 是一种强氧化剂, 与氮原子有较强的亲和力, 对细胞结构中的蛋白质成分有良好的固定作用。利用锇酸固定晶体蛋白并于扫描电子显微镜下观察的方法被广泛应用于观察鉴定样本的表面结构与形状。

*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt, 是革兰氏阳性、芽孢形成菌。Bt 菌有个显著的特征, 能在芽孢形成期产生杀死昆虫的伴胞晶体蛋白。利用扫描电子显微镜观察 Bt 菌株在芽孢形成过程中产生的伴胞晶体蛋白, 是最直接、最有效鉴定 Bt 菌的技术手段。本文报告了用扫描电子显微镜观察 Bt 菌芽孢和晶体的实验方法。

## 1 仪器设备及参数

本技术流程采用的扫描电镜型号为 TESCAN VEGA 3 (图 1), 由捷克生产, 广西医科大学实验中心电镜室拥有。本实验使用的 TESCAN VEGA 3 扫描电镜的基本技术参数为: 分辨率: 高真空(二

收稿日期: 2014 年 05 月 05 日

接受日期: 2014 年 06 月 02 日

发表日期: 2014 年 06 月 15 日

次电子) 3.0 nm at 30 kv, 8.0 nm at 3 kv; 低真空(低真空二次电子): 3.5 nm at 30 kV; 放大倍数: 1~1000000×; 真空系统: 低真空 3~2000 Pa。



图 1 扫描电镜(型号: TESCAN VEGA 3)

Figure 1 Scanning electron microscopy (Model Number: TESCAN VEGA 3)

## 2 培养基、化学试剂及配制

本实验用的酵母粉、琼脂糖、氯化钠、四氧化锇、六甲基二硅胺烷等均购于国内各个生物试剂公司。LB、NB 培养基配方及制备参照 Zhou 等 (Zhou et al., 2013)。

## 3 实验流程

### 3.1 准备样品

具体样品制备方法参照 Zhang 等 (Zhang et al., 2012)。

### 3.2 样品处理

- (1) 4℃, 12000 g 离心 10 min 收集 500 μL 菌体。
- (2) 用预冷的 1 M NaCl 洗涤菌体 3 次。
- (3) 最后将菌体悬浮于 500 μL 预冷的超纯水中。
- (4) 取 10 μL 芽孢和晶体的混合物小心平铺在洁净的盖玻片上, 4℃低温真空干燥。
- (5) 固定: 用 1% 四氧化锇(OsO<sub>4</sub>)进行样品固定。
- (6) 将固定后样品置于金属样品台。

### 3.3 样品观察

- (1) 镀膜: 在真空镀膜喷金仪中对金属样品台进行金属镀膜, 镀金厚度约 20~30 nm。
- (2) 扫描电镜观察: 型号 TESCAN VEGA 3, 工作电压 30.0 kV, 工作距离 9.0~9.8 mm, 观察并拍照。

## 4 例证分析

*Bt* 最主要特征就是在生长后期产生芽孢和伴孢晶体, 因此在这个时期用扫描电子显微镜来观察其形态是最佳的。本案例中, 我们以 *Bt* 分离株 S3299-1 (Fang et al., 2011)为实验材料, 钼酸固定法对生长后期的 *Bt* 菌进行扫描电镜鉴定。如图 2 结果显示, 在 SEM HV 30.0 kV View field: 7.223 μm WD: 7.313 mm 30.00 kx 观察条件下, 能清晰观察到 S3299-1 菌株的芽孢以及产生的菱形晶体。

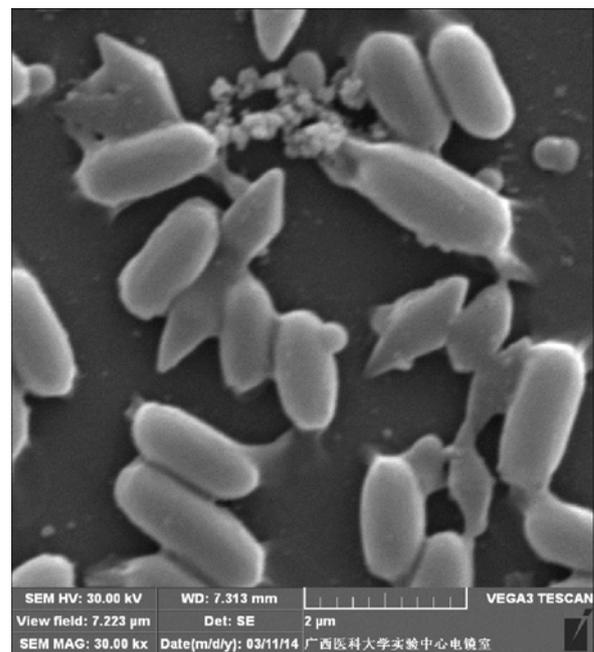


图 2 *Bt* S3299-1 菌株的扫描电镜观察

Figure 2 Micrographs of *Bt* S3299-1 observed under scanning electron microscope

## 5 注意事项

首先, 待观察的菌体要培养到芽孢完全形成, 即 48~72 h 以上不同的菌株可能不同, 保证存在预期需要观看的内容的材料

其次, 四氧化锇(OsO<sub>4</sub>) 具有挥发性对眼睛、粘膜、呼吸道有强烈刺激作用, 操作时要戴口罩。

第三, 由于扫描电子显微镜要求样品必须是干燥的, 因此, 样品固定后一定要保证其脱水完全, 以免影响观察结果。

最后, 用剪刀剪裁盖玻片时, 注意不要使样品被弄脏, 贴的时候也不要反过来, 以免影响样品的观察结果。

#### 发表文献

- Zhao L.S., Li C.X., Tian L., Zhang W.F., Xie L., Li Y.Z., and Fang X.J., 2011, Identification and Expression of *cryIAc31* from *Bacillus thuringiensis* S3299-1, Genomics and Applied Biology (online) Vol.30 No.5 (DOI: 10.5376/gab.cn.2011.30.0005)
- Liu et al., 2011, New Vector pBUC3 can Express Bt *CryIAc31* during the Vegetative Phase in *Bacillus thuringiensis*, Bt Research, Vol.2, No.2 9-13 (doi: 10.5376/bt.2011.02.0002)
- Fang et al., 2011, Bt S3299-1, a *Bacillus thuringiensis* strain high-yielding Bipyramidal Crystal with High Larvacidal Toxicity against Diamondback Moth (*Plutella xylostella*), Bt Research, Vol.2, No.5 19-21 (doi: 10.5376/bt.2011.02.0005)

#### 致谢

这是 HITAR 实验室常用的用于 Bt 晶体蛋白形态观察

的试验方法, 感谢 HITAR 允许将该方法公布。本工作是在广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室进行案例验证。在此表示感谢。

#### 参考文献

- Fang et al., 2011, Bt S3299-1, a *Bacillus thuringiensis* strain high-yielding Bipyramidal Crystal with High Larvacidal Toxicity against Diamondback Moth (*Plutella xylostella*), Bt Research, Vol.2, No.5 19-21 (doi: 10.5376/bt.2011.02.0005)
- Zhang W., Crickmore N., George Z., Xie L., He Y.Q., Li Y., Tang J.L., Tian L., Wang X., and Fang X., 2012, Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillus thuringiensis*--an alternative to Bti, J. Invertebr. Pathol., 109(2): 217-222
- Zhou Y., Huang F.Y., Zhao C., and Zhu J.T., 2013, SDS-PAGE analysis of Bt parasporal crystal proteome, Bioscience Methods, 4(1): 1-4