

## 苏云金芽胞杆菌肠毒素基因的 PCR 检测

袁志明<sup>1,2</sup> 蔡全信<sup>1</sup> Andrup L<sup>3</sup> Eilenberg J<sup>4</sup> 庞 义<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(<sup>2</sup> 中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

(<sup>3</sup> 丹麦国立职业健康研究所 哥本哈根)

(<sup>4</sup> 丹麦皇家畜牧和农业大学 哥本哈根)

**摘 要:**采用多重引物 PCR 进行了 45 株苏云金芽胞杆菌、2 株蜡状芽胞杆菌和 2 株球形芽胞杆菌溶血素 BL、肠毒素 T 和 *entS* 基因的检测,结果表明 95.6% 苏云金芽胞杆菌含溶血素 *hblA* 基因,91.1% 含 *bceT* 基因,93.3% 含 *entS* 基因。用两种商业化肠毒素检测试剂盒 TECRA 和 RPLA 进行所有菌株肠毒素的体外免疫测定,大部分苏云金芽胞杆菌和阳性蜡状芽胞杆菌都能产生不同水平的肠毒素活性,同 *hblA* 基因 PCR 检测结果基本相符。尽管 DBT007 和 T24 001 含有 *hblA* 基因,但用 TECRA 却检测不到肠毒素;Dmu39 菌株不含肠毒素基因,但用 TECRA 却检测出高的肠毒素活性。苏云金芽胞杆菌 BDT248 和球形芽胞杆菌不含肠毒素基因和肠毒素。结果表明昆虫病原菌苏云金芽胞杆菌的安全性有待进一步研究。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌, 蜡状芽胞杆菌, 球形芽胞杆菌, 肠毒素, 检测

**中图分类号:** Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 02-0148-07

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)由于其对多种害虫的特异性毒杀作用而受到人们广泛的关注。目前已发现其在营养体生长和芽胞形成阶段主要可以产生三类毒素,晶体毒素(Cry),溶细胞毒素(Cyt)和 VIP 毒素(Vegetative Insciticial Protein),这些毒素的杀虫活性、杀虫谱和作用方式都不相同,与磷脂酶、蛋白酶、几丁质酶和  $\beta$ -外毒素协同作用而对目标昆虫表现出特异性的毒性<sup>[1]</sup>。自从发现苏云金芽胞杆菌以色列亚种(*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*)对双翅目昆虫有杀虫活性以来,现已发现 Bt 对鳞翅目、鞘翅目、膜翅目、同翅目和直翅目昆虫有杀虫活性,同时对螨类、线虫,原生动物等显示出毒杀活性,显示出良好的应用开发前景<sup>[2]</sup>。实际上,Bt 已成为目前世界上应用最广泛的生物杀虫剂,在多种害虫的综合防治中发挥了重要的补充作用。

Bt 同蜡质芽胞杆菌(*B. cereus* 简称 Bc)、炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis*)和蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*)同属芽胞杆菌属蜡质芽胞杆菌组,不同菌株具有相似的形态特征和较高的 DNA 同源性<sup>[3]</sup>。Bt 同蜡质芽胞杆菌间的区别仅仅在于 Bt 在芽胞形成过程中能产生位于芽胞胞外膜外的伴胞晶体,而且 Bt 菌株在昆虫体内和体外可以通过杀虫质粒的丢失而转化为 Bc,相反 Bc 也可以通过 DNA 的水平转移获得杀虫质粒而转化为 Bt<sup>[4,5]</sup>。基因组同源性分析也表明这两种细菌在 DNA 水平上无明显的差别,但一个被认为是人和高

**作者简介:**袁志明(1963-),男,湖北潜水人,中国科学院武汉病毒研究所研究员,硕士,1994 和 1999 年赴法国丹麦进行合作研究,研究方向为杀虫微生物。

**收稿日期:**2000-04-12, **修回日期:**2000-09-29

等动物的潜在致病菌,另一个由于其杀虫活性被认为是有益昆虫病原菌<sup>[6]</sup>。已经证明一些 *B. cereus* 能导致人食物中毒和感染,是人畜的条件致病菌<sup>[7]</sup>,由呕吐毒素和腹泻肠毒素引起的呕吐和腹泻是 Bc 所引起的两种主要食物中毒类型<sup>[8~10]</sup>。目前对几种肠毒素基因及其编码的毒素蛋白进行了详细研究。其中溶血毒素 BL(hemolysin BL)是由一个结合亚基 B(37.5kD)和两个溶血亚基 L1(38.2kD)和 L2(43.5kD)组成,所有三个亚基都是其红细胞溶血活性所必须的<sup>[11]</sup>。肠毒素 T(Enterotoxin T)是由单一亚基组成,同 Hbl 无同源性<sup>[8]</sup>。另外 Asano 等对从 *B. cereus* B-4ac,中克隆的 *entFM* 基因进行了分析,但无其表达蛋白活性的报道<sup>[9]</sup>。最近人们对一种由三亚基组成的非溶血肠毒素(Nhe)及基因进行了研究,证明它的三亚基组成结构及氨基酸序列同 Hbl 具有极高的相似性<sup>[10,12]</sup>。

由于 Bt 和 Bc 间的同源性关系,Bt 安全性问题越来越受到人们重视。而且研究也表明在 Bt 菌株中,包括一些商业化应用的菌株中广泛含有 *hblA* 和 *bceT* 基因,体外的生物活性测定结果表明 Bt 菌株在发酵过程中能产生高水平的肠毒素活性<sup>[6,9,13~15]</sup>。同时最近还有 Bt 引起的伤口感染和其它临床疾病等方面的临床报道<sup>[16,17]</sup>。由于 Bt 在世界上不同环境下的大量应用所导致对人体潜在的危险性,以及质粒 DNA,特别是编码人类致病毒素蛋白的质粒在 Bt 和 Bc 高频率的水平传播,Bt 的安全性应进行进一步的评估。

在本研究中,采用双引物和多重引物 PCR 对 45 株 Bt、2 株 Bc 和 2 株球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*,简称 Bs)进行了 *hblA*、*bceT* 和 *entS* 等肠毒素基因的检测,同时用两种肠毒素免疫测定试剂盒对不同菌株的肠毒素活性进行了测定,为 Bt 菌株的安全性评估提供了基础数据和实验方法。

1 材料和方法

1.1 菌株

蜡质芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)F4433/73 和 ATCC33096 菌株分别用于肠毒素基因和肠毒素检测的阳性和阴性对照菌株,来源于丹麦国立职业健康研究所;其它苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*)和球形芽胞杆菌(*B. sphaericus*)菌株的来源和特性见表 1。

表 1 *Bacillus* sp. 中肠毒素基因的检测结果

Table 1 Detection of enterotoxin and enterotoxin genes in *Bacillus* species

Serotypes	Subsp.	Strains	Resources	Presence of enterotoxin gene as determined by				
				PCR			Oxoid BECT-RPLA <sup>4</sup>	Tecra <sup>5</sup>
				<i>hblA</i> <sup>1</sup>	<i>bceT</i> <sup>2</sup>	<i>entS</i> <sup>3</sup>		
1	<i>thuringiensis</i>	HD-2	USDA	+	+	+	2048	4
2	<i>finitimus</i>	HD-3	USDA	+	-	+	2048	4
3aa3c	<i>alesti</i>	HD-4	USDA	+	+	+	1024	4
3a3b3c	<i>kustaki</i>	HD-1	USDA	+	+	+	512	4
		HD-73	USDA	+	+	+	>2048	4
		DBT696	KVL	+	+	+	64	4
		DBT698	KVL	+	+	+	128	3
		LBT155	KVL	+	+	+	256	4
		TBT001	Ciba	+	+	+	2	3
		TBT007	Novo	+	+	+	256	4
		TBT008	Zeneca	+	+	+	256	4
		TBT061	Abbott	+	+	+	512	4

续表 1

		TBT066	Abbott	+	+	+	512	3
4a4b	<i>sotto</i>	HD-7	USDA	+	-	+	512	4
4a4c	<i>kenyae</i>	HD-551	USDA	+	+	+	512	4
5a5b	<i>galleria</i>	HD-224	USDA	+	+	+	2048	3
5a5c	<i>condensis</i>	T05A03	USDA	+	-	+	512	4
6	<i>entomocidus</i>	HD-9	USDA	+	+	+	>2048	4
7	<i>aizawai</i>	HD-11	USDA	+	+	+	512	3
		HD-127	USDA	+	+	+	128	3
		Z113	WHIOV	+	+	+	256	4
		TBT005	Novo	+	+	+	128	3
		TBT062	Abbott	+	+	+	128	3
		LBT161	KVL	+	+	+	128	3
8a8b	<i>morrisoni</i>	HD-12	USDA	+	+	+	1024	5
8a8c	<i>ostrinae</i>	HD-51	USDA	+	+	+	256	4
		DBT7	KVL	+	+	+	0	2
9	<i>tolworthi</i>	HD-537	USDA	+	+	+	256	3
10a10b	<i>darmstadiensis</i>	HD-146	USDA	+	+	+	256	4
11a11b	<i>toumanoffi</i>	HD-201	USDA	+	+	+	256	4
12	<i>thompsoni</i>	HD-542	USDA	+	+	+	1024	4
14	<i>israelensis</i>	HD-567	USDA	+	+	+	16	5
		TBT002	Summit	+	+	+	4	4
		LBT97	KVL	+	+	-	128	4
		TBT063	Abbott	+	+	+	8	4
15	<i>dakota</i>	HD-932	USDA	+	+	+	1024	5
16	<i>indiana</i>	HD-521	USDA	+	+	+	256	4
17	<i>tohkuensid</i>	HD-866	USDA	+	+	+	256	4
18	<i>kumamaotoensis</i>	HD-867	USDA	+	+	+	256	3
19	<i>tochigiensis</i>	HD-868	USDA	+	+	+	1024	5
22	<i>shandongiensis</i>	HD-1012	USDA	+	+	+	256	4
23	<i>japanensis</i>	T23001	USDA	+	+	+	1024	5
24	<i>neoleonensis</i>	T24001	USDA	+	+	+	>2048	2
45	<i>roskildiensis</i>	Dmu39	KVL	-	-	-	0	5
	<i>No denomination</i>	DBT248	KVL	-	-	-	0	1
	<i>B. sphaericus</i>	CIP5125	IP	-	-	-	0	1
		2362	IP	-	-	-	0	1
	<i>B. cereus</i>	4433/73	AMI	+	+	+	256	4
		ATCC	AMI	+	+	+	0	2
		33018						

IP: Institute Pasteur, France; KVL: Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark; AMI: National Institute of Occupational Health, Denmark; WHIOV: Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, China.

1. PCR was done with hblA specific primers(hbl1 and hbl2, or hbl3 and hbl4), + :positive, - :negative;
2. PCR was done with becT specific primers(becT3 and becT4), + :positive, - :negative;
3. PCR was done with entS primers, + :more than 2 desired bands were detected; - , no desired band was detected.
- 4,5. The numbers refer to the strength of the immunoassay reaction according to the manufacturer's instructions.

1.2 DNA 提取

斜面活化的菌株在 LB 培养基中 30℃ 摇床培养过夜(200r/min), 离心收集 2mL 培养的菌体(8000r/min, 10min, 20℃), 然后悬浮在 100μL 含 2mg/mL 溶菌酶的 TE 缓冲液中,

37℃处理 30min 后,再加入 20μL RNase(20μg/mL)在 50℃处理 15min 以降解 RNA。加入 30μL 10%SDS 到处理液中,70℃处理约 30min,待菌体充分裂解后,冷却至室温,进行常规的酚—氯仿抽提和异丙醇沉淀 DNA,干燥后溶 100μL TE 缓冲液中保存备用。

1.3 PCR 分析

用于 PCR 检测的特异性溶血素 *hblA*,肠毒素 T(*bceT*)和 *entS* 基因引物是根据发表的三种肠毒素基因的核苷酸序列设计,合成的 8 组 PCR 引物的序列、位置、预计扩增片断的大小和相关参考文献见表 2。通过预备实验确定最佳 PCR 扩增条件,包括模板 DNA、引物和 MgCl<sub>2</sub> 浓度及 DNA 复性和延伸温度等。PCR 反应条件:95℃变性 10min 后进行 30 个循环,包括 95℃变性 1min,55℃复性 1min 和 72℃延伸 3min,最后在 72℃延伸 10min。在 1%琼脂糖凝胶进行 PCR 产物的分析。分别采用单一和多重 PCR 引物进行目的基因片断的扩增和检测。

表 2 肠毒素基因检测中应用的 PCR 引物

Table 2 PCR primers used or detection o enterotoxin genes in *Bacillus* species

Primer	Sequence	Nucleotides	Product size/bp	References
Hbl1	5'-GCTAATGTAGTTTCACCTGTAGCAAC	121-146	874	[14]
Hbl2	5'-AATCATGCCACTGCGTGACATATAA	969-994		
Hbl3	5'-ACGAACAATGGAGATACGGC	169-188	1018	[15]
Hbl4	5'-ATTTTGTGGAGTAACAGTTTCTAC	1162-1186		
BecT1	5'-GAATTCCTAAACTTGCACCATCTCG	2208-2232	646	[14]
BecT2	5'-CTGCGTAATCGTGAATGTAGTCAAT	2208-2232		
BecT3	5'-TTACATTACCAGGACGTGCTT	1354-1374	428	[15]
BecT4	5'-TGTTTGTGATTGTAATTCAGG	1761-1781		
TY123	5'-GGTTTAGCAGCAGCTTCTGTAGCTGGGG	19-46	271	[9]
TY124	5'-CTTGCCAACACTTGTAGCACTTGGCC	262-289		
TY123	5'-GGTTTAGCAGCAGCTTCTGTAGCTGGGG	19-46	581	[9]
TY125	5'-GTTTCGTTAGATACAGCAGAACCACC	574-599		
TY123	5'-GGTTTAGCAGCAGCTTCTGTAGCTGGGG	19-46	857	[9]
TY126	5'-GTAACGTTATTGTTATTGTTATTGTTAACG	846-875		
TY123	5'-GGTTTAGCAGCAGCTTCTGTAGCTGGGG	19-46	1222	[9]
TY127	5'-CAGAACTAATACGTACACCAGTTGCATCTG	1211-1240		

1.4 肠毒素的免疫测定

用两种商品化的蜡质芽胞杆菌肠毒素免疫测定试剂盒(BCET-RPLA Oxoid,Unipath Ltd.,Basingstoke,England)和 TECRA VIA(Bioenterprises Pty,Australia)对所有菌株的肠毒素蛋白进行了活性测定。斜面活化菌株在 LB 培养基中摇床培养过夜后(30℃,200r/min),再按 1%的量转接到新鲜的 LB 培养基中,在同样条件下继续培养 12~14h。离心(8000r/min,7min)除去菌体,上清液经微孔滤膜(0.2μ)过滤后直接用于肠毒素的检测。肠毒素的检测和免疫反应强度的确定和记录根据试剂盒生产厂家提供的标准方法进行。

2 结果

在优化 PCR 条件下,采用两组溶血素 BL 基因特异性引物(*hbl1-hbl2* 和 *hbl1-hbl4*),可从大部分 Bt 菌株和阳性 BcF4433/73 菌株中分别扩增出 874bp 和 1018bp 的特异性片断,Bt 菌株中溶血素 BL 基因的阳性检出率为 95.6%。采用肠毒素 T 基因特异性引物

bceT3-bceT4,可从上述菌株中扩增出 407bp 的肠毒素 T 基因片断,Bt 菌株 *bceT* 基因的阳性检出率为 91.1%;用 4 组特异性的 *entS* 引物,分别可以从大部分 Bt 菌株和阳性 Bc 菌株中可以扩增出 4 条分子量分别为 261,581,857 和 1,220bp 的特异性 DNA 片断,但在 L166 和 HD573 菌株中只能检测出 261,581 和 1220bp 三条带,在 L97,DBT696,DBT698 和 P59 菌株中只检测出不同大小的两条 DNA 带,如图 1。在 DBT007,Dmu39,DBT248 和 Bc 肠毒素阴性菌株及两株 Bs 菌株中,未检测到特异性的溶血素 BL,肠毒素 T 基因,但用 *entS* 特异性引物 TY123 和 TY126,可从 Bs 菌株扩增出一条约 550bp 的片断,但 DNA 片断的序列分析表明,该片断同 Bc 一种核糖体蛋白基因(D50303)具有较高的同源性,而同 *entS* 基因无同源性。证明在 Bs 菌株中无肠毒素基因存在(另文发表)。分别采用单组或多组 PCR 引物都可以得到相同的肠毒素基因的 PCR 检出结果。

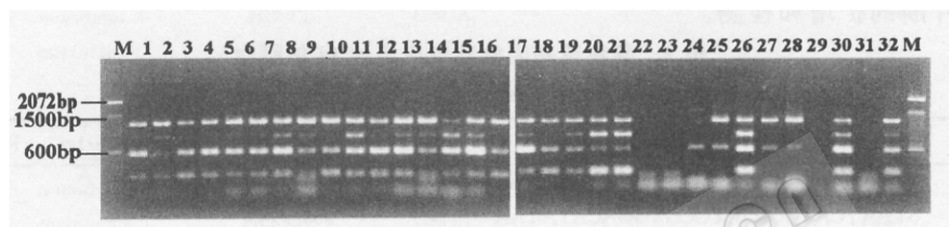


图 1 苏云金杆菌肠毒素基因检测 PCR 扩增图谱

Fig.1 PCR amplification patterns to *Bacillus thuringiensis*

Lane M: 100bp maker; 1: HD-2; 2: HD-3; 3: HD-1; 4: HD-73; 5: TBT001; 6: TBT061; 7: L155; 8: HD-7; 9: HD-551; 10: HD-224; 11: HD-11; 12: TBT005; 13: TBT007; 14: TBT060; 15: L161; 16: Z113; 17: HD-12; 18: HD-537; 19: HD-542; 20: HD-567; 21: TBT002; 22: L97; 23: Dmu39; 24: DBT7; 25: DBT696; 26: H18; 27: DBT698; 28: P59; 29: DBT248; 30: DBT230; 31: ATCC33018 and 32: F4433/73.

Enterotoxin gene fragments amplified using Primers Mixture B composed of Ty123, TY124, TY125, TY126 and TY127.

采用两种体外免疫测定试剂盒(TECRA)和 RPLA 测定所有检测菌体的肠毒素活性,结果如表 2。TECRA 测定所有大部分 Bt 和肠毒素阳性 Bc 菌株的肠毒素为阳性反应(4 以上),DBT7,DBT248,T24001,Bs 菌株和 BcATCC33018 为阴性反应(小于 3);用 RPLA 试剂盒检测的大部分 Bt 菌株的肠毒素滴度为 128~2048,部分菌株的肠毒素滴度大于 2048,如 HD-73,HD-9 和 T24001 菌株等,但 BtTBT248,DBT7,TBT09,BcATCC33018 和 Bs 菌株的肠毒素滴度为 0,其它几株用于商业化生产的 Bt 菌株的肠毒素滴度较低<sup>[2~8]</sup>,如 TBT001,TBT002 和 TBT061 等。

### 3 讨论

在合适的 PCR 条件下,用两组特异性的 *hblA* 基因引物分别可以从大部分 Bt 菌株和 Bc 阳性对照菌株中分别扩增出 874bp 和 1018bp 的两个溶血素基因片断;用肠毒素基因 T(*bceT*)特异性引物(*bceT*3-BceT4),可扩增出 407bp 的 DNA 片断;但用特异性的肠毒素 T 基因引物 *becT*1 和 *becT*2,都不能从检测的菌株中扩增出目的基因片断,这同 Manoty-nen 和 Lindstrom 的研究结果相符,发现该组引物只能从 *bceT* 模式菌株 *B. cereus* B-4ac 中扩增出目的片断,而在其它所有检测菌株中检测不出 *bceT* 基因,证明 *becT*1 和 *becT*2 不是芽胞杆菌肠毒素基因检测的特异性引物<sup>[14]</sup>。可从不同的 Bt 和阳性 Bc 菌株中扩增

出,261,581,857 和 1,222bp 的 *entS* 基因片段,但在 TBT079,DBT7,DBT696,DBT698,PS9 和 DBT230 和菌株中缺少 1~2 特异性的扩增片段说明该菌株中的肠毒素基因同 *entS* 基因不完全相同。在 BDBT248 和菌株中,用不同的引物都未检测到肠毒素基因和溶血素基因。本研究采用多重引物 PCR 同样可以扩增出不同大小的目的基因片段,重复性较好,可以用于 *Bacillus* 菌株肠毒素基因的检测。

两种 Bc 肠毒素商品免疫测定试剂盒已广泛用于不同芽胞杆菌肠毒素的检测,但大量的研究结果却表明这两种试剂免疫测定试剂盒中的抗血清分别识别肠毒素中不同的亚基抗原,其中 TECRA 识别 Nhe 毒素中 40 和 41kD 非毒性抗原;而 RPLA 识别溶血素 BL 复合物中的 L2 组分肠毒素的亚基,所以尽管 TBT079 菌株中不含 *hblA* 基因和 *becT* 基因,但 TECRA 检测表明该菌株确有强的肠毒素活性,说明在该菌株中不含肠毒素基因但可能产生非溶血性肠毒素。在 DBT7 菌株中尽管可检测出 *hblA* 和 *becT* 基因,但免疫检测表明该菌株不产生肠毒素,可能该菌株的肠毒素基因不表达或表达量较低,或由于其溶血素 BL 复合物中 L2 组分的结构和序列的差异而不被试剂盒中 L2 抗体所识别所致。用 RPLA 检测出 T24 001 菌株肠毒素滴度大于 2048,但 TETRA 试剂盒却检测不出肠毒素活性,只说明该菌株产生高活性的溶血素 BL 而不产生非溶血性肠毒素。

实验结果表明在绝大部分 Bt 菌株中都含有 3 种不同的肠毒素基因,体外的免疫测定也表明在 Bt 菌株的营养体生长阶段会产生大量的肠毒素。因此 Bt 菌株的大量应用所造成的对人和高等动物的安全性有待今后进一步研究。但目前只有少量有 Bt 引起的感染的临床报道,这可能是由于:1)Bt 肠毒素同 Bc 肠毒素氨基酸序列的差异,使其致病性较低;2)Bt 芽胞不能在人和高等动物的小肠内萌发生长,产生足够量的肠毒素;3)一些有 Bt 菌株引起的感染和其它临床疾病被误检为 Bc,实际上,有人已从临床中分离的 Bc 菌株中分离筛选出多株 Bt 菌株(B. M. Hansen 个人通讯)。另外由于杀虫质粒和其它人类致病毒素编码质粒在不同芽胞杆菌中的高频率转移,增加了 Bt 应用时潜在的危险性。因此建议在今后的 Bt 生产和应用中应选用不含肠毒素基因或产肠毒素量低的 Bt 菌株,或通过现代分子生物学技术剔除 Bt 菌株中的肠毒素基因,构建新型安全的 Bt 工程菌株。

PCR 检测表明 TBT248 中不含 *hblA*、*becT* 和 *entS* 等肠毒素基因,而且不产生肠毒素活性。但该两菌株的杀虫活性较低,可以通过质粒转移和现代分子生物学技术改良该菌株的杀虫活性构建新一代安全的 Bt 杀虫菌株。

## 参 考 文 献

- [1] Schnepf E,Chrickmore N, Van R J, et al. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**:775~806.
- [2] Feitelson J S,Payne J, Kim L. *Bio/Technology*, 1992, **10**:271~275.
- [3] Ash C,Farrow J A E, Wallbanks S. *Lett Appl Microbiol*, 1992, **13**:202~206.
- [4] Gonzales J M Jr,Brpwn B J, Carlton B C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**:6951~6955.
- [5] Jarrett P, Stephenson M. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**:1608~1614.
- [6] Carlson C R, Kolsto A B. *J Bacteriol*, 1993, **195**:1053~1060.
- [7] Drobniewski F A. *Clin Microbiol Rev*, 1993, **6**:553~557.
- [8] Agata N, Ohta M, Arakawa Y. *Microbiology*, 1995, **141**:983~988.
- [9] Asano N, Nukumizy Y, Bando H, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**:1054~1057.

- [10] Lund T, Granum P E. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **178**:355~361.
- [11] Beecher D J, Schoeni J, Wang A C L. *J Biol Chem*, 1997, **272**:233~239.
- [12] Damgaard P K. *FEMS Immun Med Microbiol*, 1993, **12**:245~250.
- [13] Granum P E, O'Sullivan K, Lund T. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **178**:225~229.
- [14] Mantynen V, Lindstrom K. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**:1634~1639.
- [15] Granum P E, Anderson A, Gayther C. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **141**:145~149.
- [16] Damgaard P H, Granum P E, Bresciani J, et al. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997, **18**:47~53.
- [17] Bernstein L, Bernstein J A, Miller M, et al. *Environmental Health Perspectives*, 1999, **107**:575~582.

## DETECTION OF ENTEROTOXIN GENES IN *BACILLUS THURINGIENSIS* BY PCR

Yuan Zhiming<sup>1,2</sup> Cai Quanxin<sup>1</sup> Andrup L<sup>3</sup> Eilenberg J<sup>4</sup> Pang Yi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

(<sup>2</sup> The State Key Lab. For Biocontrol Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

(<sup>3</sup> National Institute of Occupational Health, Copenhagen, Denmark)

(<sup>4</sup> The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark)

**Abstract:** The presence of hemolysin HblA (*hblA*), enterotoxin BceT (*bceT*) and enterotoxin S (*entS*) genes from 45 strains of *B. thuringiensis*, 4 strains of *B. cereus* and *B. sphaericus* have been detected respectively by multiple PCR. The results showed that 95.6% *B. thuringiensis* strains contain the B component of hblA gene, 91.1% and 93.3% of them contain bceT and entS genes sequences respectively. The enterotoxin productions in all strains have also been analysis using two commercial immunoassay kits (TECRA and RPLA) and it has proved that most of *B. thuringiensis* stains and the positive *B. cereus* strain can produce entero toxins during their growth. However, the two hblA sequence positive stains, DBT007 was negative when tested both by RPLA and Tecra, T24 001 was negative when assayed by Tecra and positive by RPLA. One hblA sequence negative strain Dmu39 was negative when tested by RPLA but positive by Tecra. No enterotoxin and enterotoxin gene could be detected in *B. thuringiensis* DBT248 and the *B. sphaericus* strains. The results suggest that the potential risk of using *B. thuringiensis*, as biopesticide needs to be further evaluated.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, Enterotoxin, PCR, Immunoassay.

### 重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《微生物学报》编辑部