

苏云金芽孢杆菌科默尔亚种 15A3 株的 *cry* 基因分析及杀虫特性*

陈月华** 任改新 吴卫辉 王津红 刘春勇

(南开大学生命科学院 天津 300071)

摘 要 筛选的苏云金芽孢杆菌野生菌株 15A3 经鉴定属血清 H-21 型科默尔亚种。用 PCR 及 RFLP 方法对其 *cry1* 类基因分析证明其含有 *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1D*, *cry1I* 及 *cry2* 六种 *cry* 基因,其 *cry1A* 基因 N 末端 1.45kb 片段与已发表的序列有差异。表达晶体蛋白质的分子量分别为 130,79,70,65,51 和 45kD。对家蝇致畸实验证明其不含 β -外毒素。发酵液对棉铃虫,甜菜夜蛾,小菜蛾及美国白蛾均具较高的毒力。证明野生的苏云金芽孢杆菌资源中也有具国外工程菌所特有的高效杀虫晶体蛋白基因组合的优良菌株。

关键词: *Bt* 科默尔亚种, *cry* 基因, 鳞翅目广谱

中图分类号: Q812 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209 (2002) 02-0169-06

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, *Bt*)的杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins, ICPs)基因中 *cry1Aa*, *cry1Ab* 和 *cry1Ac* 是杀虫毒力最高,且目前 *Bt* 制剂生产菌主要携带的基因种类,其中 *cry1Ac* 是被认为总体毒力最高,尤其对棉铃虫具特效的蛋白^[1]。国内已报道的 YBT-1520 菌株^[2]和 *Bt ken-Ag* 菌株^[3]均含有 *cry1Ac* 基因。由这两个菌株开发的制剂主要用于棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)等鳞翅目害虫的防治。但上述三种基因产物对甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)和海灰翅夜蛾(*S. littoralis*)等几种鳞翅目重要害虫几乎无毒或低毒。而 *cry1C* 和 *cry1D* 蛋白对这类害虫具高毒力^[4]。含有 *cry1C* 基因的 *Bt* 菌株比不含这种基因的 HD-1 菌株对草地夜蛾(*S. fragiperda*)的活性高三倍,对小菜蛾(*Plutella xylostella*)的活性高二至数倍^[5]。

由于 *Bt* 的各种 ICP 对昆虫有特异性,每一 *Bt* 菌株不可能含有所有的高效 ICP 基因,故 *Bt* 制剂与化学农药相比的最大弱点是活性谱窄。这样便影响了田间防治的应用效果。为了扩大 *Bt* 制剂的杀虫谱,近年来研究人员投入大量的人力财力对现有的 *Bt* 菌株进行遗传改良。美国原 Sandoz 公司利用接合转移的方法而获得的工程菌株^[6],其 *cry1Ac* 和 *cry1C* 基因均来自其它 *Bt* 菌株。1999 年, Sanchis 等报道^[7],将 *cry1C/Ab* 嵌合基因克隆进位点特异性重组载体,导入含有 *cry1Ac* 基因的 *Bt* 受体中而获得工程菌, *Bt* 工程菌外源基因的稳定性及选择压力等不利因素使生产工艺复杂化。

正是由于工程菌用于生产的不便,国内外学者一直没有放弃对野生 *Bt* 资源的开发。

* 国家‘九五’科技攻关项目(96-c01-02-01)及天津市‘九五’科技攻关项目(973102511)资助

** 联系人: yhchen@nankai.edu.cn

作者简介 陈月华(1951-),女,山东烟台人,南开大学生命科学院副教授,主要从事杀虫微生物分子生物学及生物技术研究。

收稿日期 2001-07-19,修回日期 2001-11-22

尾山和彦等人分离到一株 *Bt* 野生菌,属血清 H7 型,不但对鳞翅目害虫具高毒力,同时对三种鞘翅目及两种双翅目昆虫均有活性^[5]。本室分离的 *Bt* 15A3 菌株,自然含有 *cry*1Ac 和 *cry*1C 基因,室内生物测定证明对棉铃虫,甜菜夜蛾,小菜蛾及美国白蛾 (*Hyphantria cunea*) 均有毒力活性,已做初步报道^[8]。在此基础上继续对 15A3 菌株全部 *cry* 基因及晶体蛋白进行分析,对其血清型及 β -外毒素进行了鉴定及检测,而且进行了 1.2t 罐发酵实验,本文不但首次证明野生的 *Bt* 资源中也有具高效 ICP 基因组合的广谱菌株,而且证明高效菌株也不仅局限于已发表的几种血清型,对于开发我国野生的 *Bt* 资源提供了一个良好的例证。

1 材料和方法

1.1 菌株

Bt 15A3 为本室分离;*Bt ken-Ag* 和 *Bt* 9510 为本室保藏菌种,作为毒力对比及晶体蛋白检测参照菌株;*Bt* HD-847 为血清 H-21 标准菌标,由中国科学院动物研究所引自法国巴斯德研究所,王瑛研究员惠赠。

1.2 H-血清型鉴定

采用常规方法将 15A3 菌株及各供试菌株活化后制备 H 抗原,与本室制备并保存的 H-1 ~ H-21 标准抗血清进行鞭毛抗原凝集反应。

1.3 毒力测定

用对棉铃虫高毒力的 *Bt ken-Ag* 和对甜菜夜蛾高毒力的 *Bt* 9510 作为毒力对比菌株,生测方法按苏云金芽孢杆菌国家标准中规定的方法。野外对紫红李和白蜡树上的美国白蛾防治实验采用喷雾法,观察其杀虫效果。

1.4 PCR, RFLP

分别按文献[8,9]方法,PCR 仪为新加坡制造 NJ-4800 型,引物、酶及试剂均购自上海 Sangon 公司。

1.5 杀虫晶体蛋白分析

按本室常规法制备待测菌的 ICPs,进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 β -外毒素测定

按冯喜昌等人方法^[10],家蝇由天津市防病中心提供。

1.7 发酵性能及毒力

用 1.2t 容积标准发酵罐进行发酵实验,采用固含量 8.0% 的发酵培养基,芽孢接种,培养温度为 $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,施行三级给风,发酵周期 38 小时左右,视芽孢晶体脱落 20% ~ 30% 时终止,及时进行毒力测定。

2 实验结果

2.1 *cry* 基因鉴定结果

经特异引物 PCR 及 PCR-RFLP 分析,15A3 菌株含有 6 种 ICP 基因。它们分别是: *cry*1Aa, *cry*1Ac, *cry*1Ca, *cry*1D, *cry*1I 和 *cry*2,图 1 和表 1 证明前 4 种基因的鉴定结果,两对类通用引物扩增片段分别为 C 末端 1.6kb 和 N 末端 1.45kb,其中 *cry*1Aa 在 1.45kb 片

段上应有两个切点,形成 726、244 和 493bp 的三个片段,但 15A3 菌株缺少 493bp 的片段,其它完全相同,说明 15A3 菌株的 *cry1Aa* 基因 N 末端 1.45kb 片段与已发表的序列有差异。PCR-RFLP 结果见图 1,表 1。

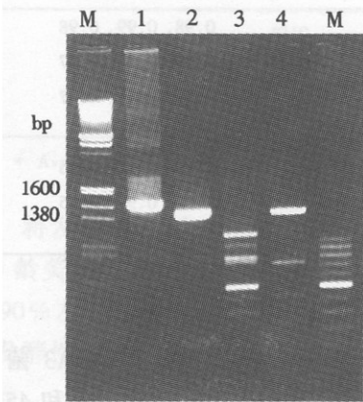


图 1 15A3 菌株 PCR 产物及 RFLP 电泳图谱

Fig.1 PCR amplification with *cryI*-type universal primers and RFLP patterns of strain 15A3
M: Marker (λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III);
Line1,2:PCR products of primer 1 and primer 2;
Line2:RFLP patterns of primer 1 products;
Line4:RFLP patterns of primer 2 products.

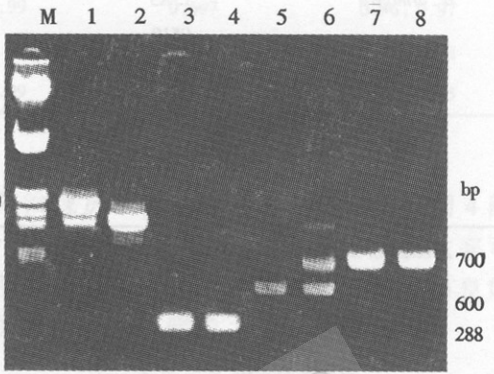


图 2 15A3 菌株及 H21 标准株 *cry* 基因电泳图谱

Fig.2 PCR Amplification products with specific primers of strains 15A3 & H21
M: Marker (λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III);
Line1.3.5.7: *cry1Ac*,1C,2,1I of strain 15A3;
Line2.4.6.8: *cry1Ac*,1C,2,1I of strain H21.

表 1 用 *cry1* 类基因通用引物扩增 15A3 菌株 *cry1* 基因及其酶切片段分析

Table 1 PCR amplification with *cryI*-type universal primers and analysis of restrictive enzyme digest

	Primers-1		Primers-2	
PCR product	1.6kb		1.45kb	
Restrictive enzyme	<i>Pst</i> I, <i>Xba</i> I		<i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> I	
Digest fragments	1117,960,801,760,518,423,322,240,140		1457,819,726,434,310,244	
Fragments of <i>cryI</i> -type genes	1Aa:1117,518	1Ac:801,518,322	1Aa:726,244,	1Ac:726,434,244
	1Ca:760,423,240,140		1Ca:1457	1D:819,310,307

使用 *cry1Ac*、*cry1C*、*cry1I* 和 *cry2* 这 4 对特异引物扩增 15A3 菌株及 H-21 标准菌株的 *cry* 基因,这 4 个基因的特异性扩增片断的大小依次为:1.8kb、288bp、700bp 和 600bp。H-21 标准菌株不含 *cry1Ac* 1.8kb 特异大小片断,其它基因均有完全相同的特异性扩增带,见图 2,说明 15A3 菌株与标准 H21 菌株虽然血清型完全一致,但 *cry* 基因是有差异的。

2.2 血清型鉴定

15A3 菌株与测试的 21 种 H 抗原的凝集反应中,只与 H-21 有凝集反应,并且与标准 H-21 菌株的凝集效价完全相同,故 15A3 菌株属血清 H-21 型。

2.3 杀虫特性

15A3 菌株对棉铃虫和甜菜夜蛾的毒力测定结果见表 2, *ken-Ag* 菌株含有 *cry1Ac* 蛋白,故对棉铃虫高毒,但对甜菜夜蛾几乎无毒;9510 菌株含有 *cry1C* 蛋白对甜菜夜蛾高效,但

对棉铃虫稍差,因 15A3 菌株含有上述两种蛋白,故表现出广谱的毒力。

表 2 15A3 菌株对棉铃虫和甜菜夜蛾的毒力*

Table 2 Toxicity of strain 15A3 against *H. armigera* and *S. exigua**

Larvae	Bt Strains	LC ₅₀ (μL/mL)	Correlation coefficient
<i>H. armigera</i>	15A3	0.26	0.98, 0.99, 0.98
	9510	1.10	0.99, 0.99, 0.97
	<i>Ken-Ag</i>	0.18	0.99, 0.96, 0.97
<i>S. exigua</i>	15A3	0.42	0.99, 0.96, 0.95
	9510	0.51	0.99, 0.97, 0.95
	<i>Ken-Ag</i>	极低	

* Average of three testing.

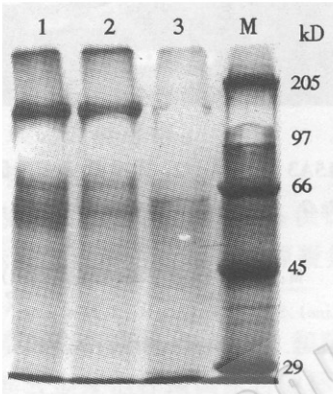


图 3 15A3 菌株 ICP 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 Patterns of strain 15A3 ICPs by SDS-PAGE

M. Marker; Line 1: strain 15A3; 2: 9510; 3: *Ken-Ag*.

2.4 晶体蛋白分析结果

经 SDS-PAGE 分析,15A3 菌株分别产生 130、79、70、65、51 和 45kD 左右的 6 种晶体蛋白。9510 菌株和 *ken-Ag* 菌株分别含有 *Cry1C* 和 *Cry1Ac* 蛋白,在此作为参比菌株。见图 3。

2.5 β-外毒素测定结果

从表 3 的结果可见,所测定的 5 个浓度均未见畸形蛹,幼虫死亡也无规律,全部处理的正常蛹占 92% 以上,说明 15A3 菌株不形成热稳定性的 β-外毒素。

表 3 15A3 菌株对家蝇致畸实验结果

Table 3 Test aberration of strain 15A3 against house fly

Normal pupa			Aberration pupa		Mortality	
	Number	%	Number	%	Number	%
CK	55	95	1	1.7	2	3.4
10x	56	98.2	0		1	1.8
50x	55	93	0		4	7
100x	56	98	0		1	2
200x	53	96	0		2	4
400x	57	92.5	0		4	6.6

2.6 发酵的毒力

1.2t 罐发酵试验,每毫升发酵液的平均菌数达 76 亿,对棉铃虫的毒力效价平均为 4000IU,对难以防治的甜菜夜蛾的半致死剂量平均为 700μL/mL。表 4 列出 3 批次发酵液

对棉铃虫,甜菜夜蛾的生测结果。

表 4 15A3 菌株 3 批发酵液的毒力测定结果*

Table 4 Bioassay of fermentation products of strain 15A3*

No. of fermentation	<i>H. armigera</i> (IU/ μ L)	Related index	<i>S. exigua</i> LC ₅₀ (μ L/mL)	Related index
1	4319	0.98, 0.99	0.597	0.96, 0.97
2	3860	0.98, 0.97	0.708	0.98, 0.98
3	3940	0.99, 0.99	0.804	0.95, 0.95

* Average of two testing (determine)

将发酵液稀释 100 倍,在南开大学校园内防治观赏植物紫红李及小白蜡树破网 4 龄~5 龄美国白蛾,结果证明 *Bt*15A3 制剂对高龄美国白蛾速效性好,施药 30h 后死亡率可达 90% 左右,结果见表 5。由表 4,表 5 结果说明含有多种高效 ICP 的 15A3 菌株具有良好的发酵性能,且对多种鳞翅目害虫具高效广谱的特性。

表 5 15A3 菌株发酵液防治美国白蛾死亡率统计

Table 5 Effects of strain 15A3 on the mortality of *H. cunea*

Treatment	Amount of larval	larval mortality % at :	
		30h	48h
Untreated	139	0	0
<i>Prunus Salicina</i>	137	92.8	97.1
<i>Fraxinus L.</i>	102	87.1	91.4

3 讨论

*Bt*15A3 是分离自土壤的野生菌株,其最大的特点是含有多种高效的 ICP 基因,特别是 *cry*1Ac 和 *cry*1C 两个基因是国内外学者构建工程 *Bt* 菌株的目的基因组合。目前国外已有这种工程菌生产的 *Bt* 制剂,但尚未见到带有这两个基因的野生菌株用于开发的报导。而且,在用于商品制剂的国内外 *Bt* 生产菌种中,也从未见有 H21 血清型的菌株,国内目前尚没有防治甜菜夜蛾的 *Bt* 制剂。因此 15A3 菌株的发现与开发,不但为发掘我国野生 *Bt* 资源作了有益的尝试,而且为 *Bt* 生产菌株的更新换代,为筛选高效、广谱、新型的 *Bt* 菌株提供了一个非基因操作的简捷途径,证明开发 *Bt* 资源中的新基因及其优势组合还是大有潜力的。

参 考 文 献

[1] Palidam M. *J Invertebr Pathol*,1992,59 :109 ~ 111.

[2] 孙 明,刘子锋,喻子牛.微生物学报,2000,40(4) :365 ~ 271.

[3] 陈月华,关海山,曾 林,等.南开大学学报,1999,32(1) :19 ~ 22.

[4] Frankenhuyzen K V. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In Entwistle P E, *et al.* ed. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide : theory and practice. Chichester: Wiley & Sons, 1993:9 ~ 40.

中国科学数据共享平台: <http://journals.im.ac.cn>

- [5] 尾山和彦,今村圭一,御室直树,等. 专利公开号 CN1240002A,1999.
- [6] Piot Jean-Christophe, European Patent Application Publication number 0582541A2 1994.
- [7] Sanchis V, Gohar M, Chaufaux J, et al. *Appl and Environ Microbi*, 1999, **65**(9): 4032 ~ 4039.
- [8] 陈月华,王津红,李红秀,等. 具有多种高效 *cry* 基因苏支金芽孢杆菌菌株 15A3 的特性. 见 喻子牛等主编. 微生物农药及其产业化. 北京: 科学出版社, 2000. 73 ~ 78.
- [9] Guo W S, Chak K E. *Appl and Environ Microbi*, 1996, **62**(4): 1369 ~ 1377.
- [10] 冯喜昌,王 瑛,冯维熊,等. 昆虫学报, 1975, **18**(4): 374 ~ 382.

Characterization of *cry* Gene and Broad Spectrum Against Lepidopteran of *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* 15A3

Chen Yuehua Ren Gaixin Wu Weihui Wang Jinhong Liu Chunyong
(Nankai University College of Life Sciences, Tain Jin 300071, China)

Abstract: *Bacillus thuringiensis* wild type strain 15A3 belongs to subspecies *colmeri* serotype H-21. RFLP and PCR analysis show that it contains six types of ICP genes: *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1D*, *cry1I* and *cry*. The sequence of the 1.45kb N-terminal fragment of *cry1Aa* differed from that of published. SDS-PAGE showed that the crystal consists of proteins with molecular weight about 130, 79, 70, 65, 51 and 45kD. Strain 15A3 didn't synthesize heat-stable β -exotoxins according to test of house fly aberration. The 1.2 tons fermentative production exhibited high toxicity against three lepidopteran pests: *H. armigera*, *S. exigua* and *H. cunea*. It was proved that wild type strain can produce a broad spectrum of ICP.

Key words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, ICP gene, Broad spectrum

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊现改为每册 128 面,全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期缩短,内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。在新的一年里,《微生物学报》将更好的为科研工作者服务,为促进科技资源信息化最大限度的共享做出积极贡献。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部