

中国 Btken-Ag 的特性及其杀虫毒肽的研究*

任改新 刘震 熊海山 王健 赵刚

(南开大学微生物系 天津 300071)

摘要 苏芸金芽孢杆菌肯尼亚亚种 Ag 株 (*Bacillus thuringiensis* serovar. *kenyae* strain Ag, 以下简称为 Btken-Ag) 是血清型 H4a-4c 中对棉铃虫、粘虫等多种夜蛾科害虫具有高毒力的优良品系, 经生理生化、H 抗原、酯酶谱、抗生谱和质粒谱等性状比较分析, 与标准株肯尼亚亚种 023 大体相同, 但其质粒谱及伴孢晶体多肽组分与 023 明显有别。该菌株伴孢晶体多形, 其主要杀虫成分为 61000 多肽, 经 ELISA 同源分析, 此毒肽与同血清型中的 023、7501 晶体蛋白高度同源, 与商品生产株 H3a-3b--HD-1 株部分同源, 与对蚊虫高效的 H14-1897 及球形芽孢杆菌 Ts-1 无同源性。此外, 对 H4 中 10 株相关株、H7-5、HD-1 及 1897 共 13 株进行了对棉铃虫、粘虫及蚊虫的杀虫毒力比较测定, 其中 Btken-Ag 的优选株 H4-1 及 b1-4 对棉铃虫的毒力高于 023 株及 HD-1 株。

关键词 苏芸金芽孢杆菌肯尼亚亚种 Ag 株, 毒肽, 酶联免疫吸附测定, 毒力, 棉铃虫

苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 下称 Bt) 制剂用以防治农林害虫已有 30 余年的历史, 近年来, 在防治人类及动物病的多种媒介昆虫的实践中受到世界卫生组织及各国的重视。当前已有印度谷螟 (*Plodia interpunctella*)、小菜蛾 (*Plutella maculipennis*) 及马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*) 对 Bt 中的一些株产生抗性的报道^[1,2]。Bt 种群内有 34H 血清型^[3], 不同株型的杀虫谱和毒力大小存在着一定的特异性、多样性。这与该菌所产生的杀虫物质以及其主要杀虫成分——伴孢晶体毒蛋白的多样性及其编码蛋白的基因不同有关^[4]。因此, 有目的深入研究开发具有特异杀虫特性的 Bt 新株系对 Bt 制剂的更新换代, 减缓抗性发生, 以及减少 Bt 生产中噬菌体危害具有十分重要的意义。1974 年在江西省弋阳县米仓采集到罹病的一点谷螟 (*Aphomia gularis*) 幼虫, 从其体内分离到编号为 7404 的 Bt 株, 经鉴定属血清型 H4a-4c, 为首次发现分布于中国的 Bt-kenyae 亚种^[5], 以其寄主一点谷螟学名两个字头代之, 称 Btken-Ag (Ag 株)。该菌不产生 β - 外毒素及溶血素, 其伴孢晶体呈菱形、方形、镶嵌形及不规则圆形, 对粘虫 (*Pseudaletia unipuncta*)、棉铃虫 (*Heliothis armigera*)、亚洲玉米螟 (*Ostrinia funacalis*) 有很强的毒力^[6]。中国科学院动物研究所、中国林业科学研究院林业研究所、中国科学院武汉病毒研究所、湖北省农业科学院植物保护研究所等有关单位分别在室内外对马尾松毛虫 (*Dendrolimus unipuncta*)、红铃虫 (*Pectinophora gossypiella*)、小黄地老虎 (*Agrotis ypsilon*)、棉铃虫等进行了实验, 证实该菌株毒力优于目前国外引进的 HD-1 株^[7]。法国、印度、比利时等国也先后报道了 Bt 肯尼亚亚种对棉花害虫如: 烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*)、海灰翅夜蛾 (*Spodoptera litterlis*)、棉铃虫具有比其他

* 国家“八五”攻关资助项目及国家教委科学基金资助项目。

本文于 1994 年 1 月 3 日收到。

Bt 株毒力高的特性,是国内外尚未开发的品系。据此,在已有的基础上对 Ag 株基本生化特性、杀虫毒力及毒肽进一步进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养基

供试菌株中标准参考株苏芸金芽孢杆菌中 H3a-3b—HD-1、H7-5 H4a-4c—023、H14-1897 引自法国巴斯德研究所,其余 9 株中除 b1-4、H4-1 及 H4-3 为 Btken-Ag 株优选的生产株外,均为本实验室保存的 H4a-4c 中的不同株。球形芽孢杆菌高毒株 Ts-1 及无毒株 1.170 是作为 ELISA 阴性对照,菌株详细资料参考文献[5]及[8]。菌株活化用 NB 培养基,固体表面增殖用 NBA 培养基,液体发酵培养用 FBS 及 SBS 配方^①,II* 为 SBS 浓配方,供试的培养基灭菌后 pH 为 6.8—7.2。

1.2 抗生素谱、溶血试验、酯酶型及质粒谱试验

抗生素谱、溶血试验按常规方法进行,酯酶型及质粒谱试验按文献[9,10]并做了改进。

1.3 芽孢、伴孢晶体复合物的制备及伴孢晶体的纯化^[11]

1.4 杀虫毒肽的分离纯化

参考文献[12,13],用 UMT 抽提溶解伴孢晶体,用 PAGE 及 SDS-PAGE 进行电泳分析。毒肽的制备及纯化。

1.5 毒肽的抗体制备及 ELISA 分析

参考文献[14]进行。

1.6 生物测定

供试害虫为本实验室饲养的淡色库蚊、棉铃虫、粘虫及玉米螟幼虫。对发酵产物的毒力测定按常规浸液法和人工饲料感染法处理供试幼虫,而纯化的毒肽量少,采用微量人工饲料拌浸和微量注射法感染幼虫,统计百分死亡率及 LC_{50} 计算。

2 结果

2.1 细菌学特性

Btken-Ag 的形态和生理生化特性与标准株 023 相同,不产 β -外毒素及溶血素^②。H 抗原饱和吸收试验证明该株与 023 含有相同的抗原组分,属 H4a-4c。其酯酶带同 023 为三条(图 1A); 抗生素谱测定表明二菌对每毫升含 25、50、100 μ g 的 Amp、Cm、Sm、Tm、Em 及 Km 6 种抗生素的作用相同,对 Amp 和 Tm 具有高抗性,不抗 Sm、Em、Cm 及 Km。但其质粒谱不完全相同,023 标准株比 Btken-Ag 多两条小质粒带(图 1B)。

2.2 Btken-Ag 的杀虫谱及其与近缘株的毒力比较

采用 FBS、SBS 及 II* 三种生产培养基对 9 株 Btken-Ag 的近缘株和 4 株 Bt 中四个对比株进行了多次摇瓶发酵试验。在 250ml 摇瓶中装 20ml 培养基,灭菌后 pH 为 6.8—7, 30 $^{\circ}$ C, 220—250r/min 相同条件下培养,定期观察并测 pH 值,当 5% 的菌体自溶, pH 达 7.8—8 时终止发酵,进行活芽孢数的计数和生物测定。供试菌株除 36、s1 菌株外均能在上述三种培养基中大量同步地形成伴孢晶体及芽孢。在 FBS(II*) 固体含量为 4% 的条件下,发酵周期为 26h,活菌数为 40 亿/ml 以上;在 SBS 及 II* 固体含量

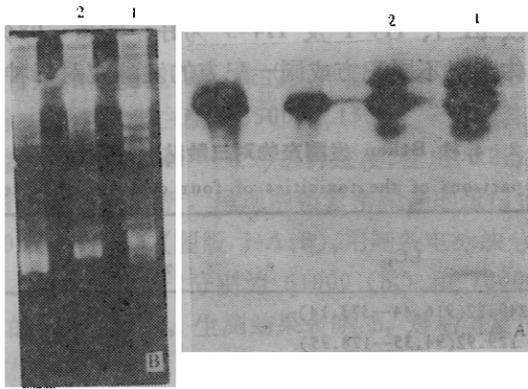


图 1 Btken-Ag 与标准株 023 的酯酶带(A)及质粒带(B)

Fig. 1 Esterase (A) and plasmid bands (B) of Btken-Ag with standard strain 023
1. Strain 023; 2. Btken-Ag.

表 1 Btken-Ag 与其对比近缘株三种发酵产物对三种虫的毒力比较 (百分死亡率)
Table 1 Comparisons of the toxicities of three cultures of Btken-Ag with other homologous strains against three species pest (mortality %)

菌 号 No. strains	培养基 Mediums					
	FBS		SBS		II*	
	稀释倍数 Dilution rate					
	1000000	4000	30	4000	50	100
	虫种 Pest					
	蚊虫 <i>Culex pipiens</i>	棉铃虫 <i>Heliothis armigera</i>	粘虫*	棉铃虫 <i>Heliothis armigera</i>	粘虫	粘虫
023	12	10.4	31	59.4	38	4
b1-4	36	30.4	54	88.6	81	24.1
H4-1	24	32.6	66	94	81	8
H4-3	6	—	86	—	88	8
7304	24	39.5	84	84.4	86	12
7501	0	6.4	—	22.7	—	—
36	9	4.2	—	7.7	—	—
S1	0	15.2	—	0	—	—
7235	36	10.6	—	36	—	—
7417	24	11.4	—	12.5	—	—
HD-1	—	29.8	—	72.1	—	—
H7-5	—	—	—	61.7	—	—
H14	80	—	—	—	—	—
CK	0	10	2	10	2	0

* *Pseudaletia unipuncta*.

为 9—10% 的条件下,发酵周期为 32h 左右,活菌数为 60—70 亿/ml 左右;各菌的发酵性能相似,但同步率以 b1-4、H4-1 及 H4-3 为好;90%—98% 营养体在终止发酵时能形成芽孢及伴孢晶体,但不同配方或同一配方的发酵液对三种害虫的毒效则有很大差别(见表 1)。

表 2 4 株 Btken 发酵产物对三龄粘虫的毒力比较

Table 2 Comparisons of the toxicities of four cultures of Btken strains

菌株 Strains	LC ₅₀	γ 值 γ. value	X ²
b1-4	249.22(916.44—373.14)	0.96	1.57<3.84
	129.92(94.35—178.95)	0.97	1.17<3.84
H4-1	116.22(59.39—227.46)	0.93	0.75<3.84
	178.59(129.40—246.50)	0.96	2.14<3.84
H4-3	32.76(10.74—99.95)	0.95	0.83<5.99
	56.03(36.2—86.80)	0.97	1.03<5.99
023	17.19(4.28—68.95)	0.94	1.15<3.84
	56.44(65.60—127.15)	0.99	0.12<3.84

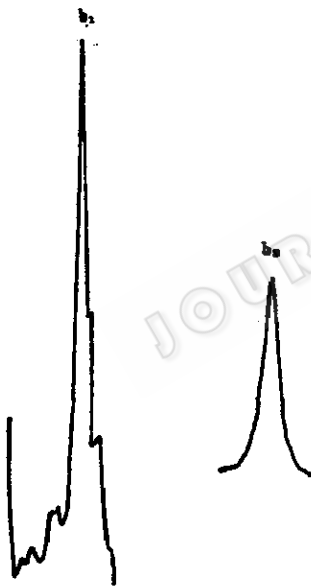


图 2 Ag 株晶体多肽聚丙烯酰胺凝胶电泳薄层扫描分析
Fig. 2 Thin-layer chromatography scanning analysis of the SDS-PAGE on Ag strain crystal polypeptide band (b₁ and b₂)

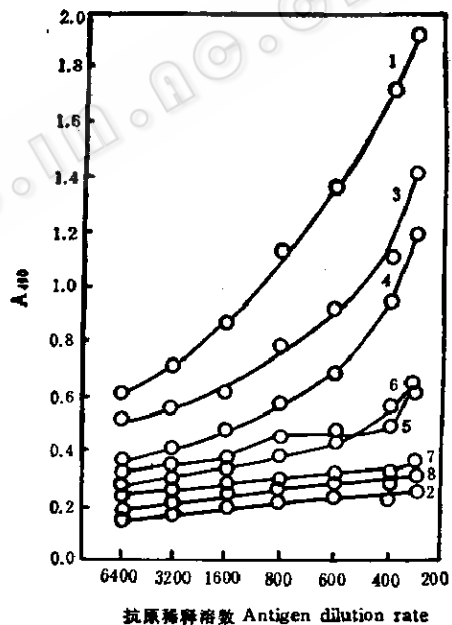


图 3 Btken-Ag 株毒蛋白抗体与其他菌株蛋白的交叉免疫测定(ELISA 双抗体夹心法)

Fig. 3 ELISA of toxic proteins of Btken-Ag with other strains about Bt and Bs

- 1. Btken-Ag 阳性对照 Positive control; 2. 1170 阴性对照 Negative control; 3. 023; 4. 7501; 5. DH-1; 6. 7601; 7. Ts-1; 8. IPa-82.

从表 1 的结果结合各个菌株在三种培养基中的发酵性能来看, Btken-Ag 的两个优选的生产株 b1-4 及 H4-1 对一龄棉铃虫的毒力高于标准株 023 及 HD-1, 对三龄蚊虫、粘虫也具有较高的毒力;对 b1-4、H4-1、H4-3 及 023 株的 II[#] 发酵液所进行的

LC₅₀ 测定,其结果表明: b1-4 及 H4-1 的毒力比 023 及 H4-3 株高 3—4 倍(见表 2)。

2.3 杀虫毒肽

用密度梯度法结合双相法提纯 Ag 株的纯伴孢晶体,用 1mol/L NaCl 及 10mmol/L EDTA 三次洗涤除去污染的蛋白酶, 35000g 15min -4℃ 离心取上清液, 在 10mmol/L Tris-HCl 甘氨酸缓冲液(pH = 8.5)透析过夜,在用 0.22 μ l 微孔滤膜除去不溶物及个别芽孢, 然后进行 PAGE 分析, 呈现两条紧密相连的蛋白带, SDS-PAGE 分析仍为两条分子量为 60000 左右的带(图版 I-A、B),用制备电泳法分离制备得到两个组分,经 SDS-PAGE 分析上述两个组分,分别为 61000 (b₂) 和 76000 (b₁) (图版 I-C、D),薄层扫描也证明电泳的结果(图 2),生测结果表明 b₂ 对粘虫及玉米螟有杀虫活性。

以 61000 为主成份的毒肽作抗原对家兔免疫,取得抗体,用 ELISA 分析 Btken-Ag 株与其近缘株毒蛋白的同源性发现,属于 H4a-4c 的 023、7404 及 7501 与 Btken-Ag 毒蛋白高度同源,与 H3a-3b-HD-1 株部分同源,与蚊虫病原菌 H14-1897 及球形芽孢杆菌 Ts-1 无相同抗原成份。

3 讨论

Btken-Ag 的质粒谱带与标准参考株 023 有明显的差异,其伴孢晶体形态以及杀虫谱,毒力大小均有别于标准株 023 及近缘株 7501(晶体圆形)等株,进一步证明同属于 H4a-4c 型的不同地理株各有其菌株的特异性。Ag 株不但对难以防治的夜蛾科多种害虫,如:棉铃虫、粘虫、烟青虫及小黄地老虎毒力高,而且对林业上的松毛虫、杨舟蛾及国槐尺蠖等害虫极为敏感;在生产配方中,生产性能好,是值得开发成为商品制剂的我国优良品系,其优选株 b1-4、H4-1 可提供为生产株。

Btken-Ag 对上述主要害虫的毒力优于国外引进的 HD-1 品系,并对淡色库蚊有一定的敏感性,但该菌不产生 β -外毒素及溶血素,在综合防治害虫中更为安全而富于潜力。1991 年 Ecogen 公司 Michael A. Von Tersch 和荷兰 Bert Visser 分别报道 Btkenyae 有些品系对多种夜蛾毒力高,证明 Btkenyae 毒蛋白的基因编码与来自 HD-1 cryIA(c) 基因紧密相关,而 cryIA(c) 的基因序列与 HD-1 对比:二者 99% 相同,在所测的 1177 个氨基酸中仅有 7 个不同;并报道 Btkenyae 具有不同于 HD-1 株的 cryIE 基因,该基因编码的毒蛋白对当前难以对付的甜菜夜蛾 (*Laphygma exigua*) 毒力高我国分布的 Btken-Ag 从伴孢晶体的类型,毒蛋白的 ELISA 同源性测定显示出与 HD-1 有共性,但该株是否也有 cryIA(c) 基因及 cryIE 基因,为什么对松毛虫、粘虫和小黄地老虎的毒力比 HD-1 高,有待进一步研究。

致谢 刘昶同志参加部分工作;本校生命科学院分子生物所高才昌教授指导质粒提取工作;王树荣、张兆惠同志协助拍照,特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Tabashnik B E, Naomi F. *J Econ Entomol*, 1990, 83(5): 1671—1676.
- [2] Everich R C. *Resistant Pest Management Newsletter*, 1992, 4(1): 14—16.

- [3] Barjac de H, Frachon F. *Entomophaga*, 1990, 36(2): 233—240.
 [4] Hofte H, Whiteley H R. *Microbiological Reviews*, 1989, 53(2): 242—255.
 [5] 任改新, 李克田, 杨明华. 微生物学报, 1975, 15(4): 292—301.
 [6] 任改新, 冯喜昌, 冯维熊. 微生物学报, 1983, 23(1): 57—62.
 [7] 中国科学院动物研究所苏芸金杆菌研究组. 微生物学报, 1978, 18(2): 352—354.
 [8] 任改新, 孙桂华, 朱呈智. 微生物学通报, 1985, 12(4): 145—147.
 [9] Norris T R. *J Gen Microbiol*, 1985, 28: 7.
 [10] 高才昌, 张燕娜, 任改新. 微生物学通报, 1985, 12(3): 101.
 [11] 王 瑛, 冯喜昌, 温 洁. 微生物学报, 1980, 20(3): 285—288.
 [12] Chestukhina G G. *Biochem J*, 1980, 187: 457—465.
 [13] 莽克强, 徐乃正, 方荣祥. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975.
 [14] 王 健, 任改新, 尚克进. 微生物学报, 1990, 30(5): 369—374.

CHARACTERS AND INSECTICIDAL POLYPEPTIDE OF A NEW STRAIN OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *KENYAE* IN CHINA

Ren Gaixin Liu Xia Xiong Haishan Wang Jian Zhao Gang

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract A new strain of *Bacillus thuringiensis* Bt with high toxicity against noctuidae larvae has been screened for many generations since isolated from larvae candle of *Aphomia gularis* in Yiyang County, Jiangxi Province, in China. By comparison and analysis of results of physiological and biochemical test, flagella antigen identification and esterase type, the strain is identified as H4a-4c Bt serovar. *kenyae*. Since its crystal protein type and plasmid type are different from those of Bt serovar. *kenyae*'s type 023. The strain is assigned a novel strain: Btken-Ag. Btken-Ag's parasporal crystals are multi-morphorous: bipyramid, cube, small irregular sphere and embedded. After UMT dissolve, PAGE and SDS-PAGE separation preparation and analysis, it is found that its major insecticide component to *Heliothis armigera* is 61kD toxic protein. By ELISA homology analysis, it is found that this toxic protein has high homology with crystal protein of 023 and 7501 (H4a-4c), partly homology with that of HD-1(H3a-3b), but no homology with that of Bti(H14) and (*Bacillus sphaericus*) Ts-1 strain. In bioassay with larvae from *Culex pipiens*, *Pseudaletia unipuncta* and *Heliothis armigera*, together with other ten Bt strains, Btken-Ag is toxic to 3 star larvae of *Culex pipiens*; two isolates of Btken-Ag (b1-4 and H4-1) show higher toxicity than type strain 023 and HD-1 do to *Pseudaletia unipuncta* and *Heliothis armigera*.

Key words *Bacillus thuringiensis* serovar. *kenyae* strains Ag (Btken-Ag), Toxic-peptide, ELISA, Toxicity, *Heliothis armigera*

图 版 说 明

Explanation of plate

A. B Btken-Ag 伴孢晶体多肽的 PAGE(A) 及 SDS-PAGE(B); C. D Btken-Ag 伴孢晶体多肽的 PAGE 制备电泳及 SDS-PAGE 分析。s = 标准蛋白; 管 1—3 (b1); 管 4—5 (b2)。

A. B. PAGE and SDS-PAGE(B) of crystals polypeptide of Btken-Ag C. D. Preparative PAGE and SDS-PAGE of crystals polypeptide of Btken-Ag; C. preparative PAGE. Tube 1—3(b1), 4—5(b2)
 D. 10% SDS-PAGE analysis of b1 and b2, s = standard proteins.