



基于基因组与蛋白组分析挖掘高效杀虫菌株 Bt S2480-1 毒蛋白基因

周燕^{1#}, 杨天宝^{1#}, 潘甘霖¹, 莫世栋¹, 刘传顺¹, 方宣钧^{2,3*}, 姜明国^{1*}

1 广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西多糖材料与改性重点实验室, 广西 南宁 530008

2 浙江农林大学暨阳学院生命科学研究所以, 浙江 诸暨 311800

3 海南省热带农业资源开发利用研究所, 海南 三亚 572025

周燕, 杨天宝, 潘甘霖, 莫世栋, 刘传顺, 方宣钧, 姜明国. 基于基因组与蛋白组分析挖掘高效杀虫菌株 Bt S2480-1 毒蛋白基因. 微生物学报, 2022, 62(9): 3587–3596.

Zhou Yan, Yang Tianbao, Pan Ganlin, Mo Shidong, Liu Chuanshun, Fang Xuanjun, Jiang Mingguo. Exploration of insecticidal genes in Bt S2480-1: based on the analysis of genome and proteome. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3587–3596.

摘要:【目的】鉴定苏云金芽孢杆菌野生型菌株 Bt S2480-1 的杀虫活性并挖掘该菌株含有的杀虫基因资源。【方法】采用 Illumina Hiseq2000 测序平台对 Bt S2480-1 菌株进行全基因组测序, 通过生物信息学方法获得该菌株的基因组信息、基因预测以及毒蛋白基因预测识别; 随后, 利用 LTQ-Orbitrap nano-LC-MS/MS 系统对该菌株的总蛋白进行了质谱分析; 最后以致倦库蚊幼虫和甜菜夜蛾幼虫为靶标昆虫对该菌株进行了生物活性测定。【结果】Bt S2480-1 基因组大小为 6.2 Mb, GC 含量为 35.11%, 拼接得到 1 个拟核和 3 个大质粒的可视化草图, 预测编码基因 6 297 个, 其中含有 12 个预测毒蛋白基因。Bt S2480-1 菌株总蛋白在 LTQ-Orbitrap MS/MS 质谱分析中共有 1 500 个蛋白质获得鉴定, 鉴定获得 11 个毒蛋白。Bt S2480-1 菌株总蛋白对致倦库蚊幼虫表现出非常高的杀蚊活性, 而对甜菜夜蛾幼虫杀虫活性相对偏弱, 其 LC_{50} 分别为 27.636 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% FL:

基金项目: 广西民族大学 2020 年度校级引进人才科研启动项目(2020KJQD23); 广西科技重大专项(桂科 AA18242026); 2022 年度广西高校中青年骨干教师基础能力提升项目(2022KY0159)

Supported by the Guangxi Minzu University 2020 School-Level Introduced Talents Scientific Research Start-Up Project (2020KJQD23), by the Science and Technology Major Project of Guangxi (AA18242026) and by the Basic Ability Improvement Project of Young and Middle-Aged Teachers in Guangxi Colleges and Universities (2022KY0159)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: JIANG Mingguo, mzxxyjiang@163.com; FANG Xuanjun, jim.xj.fang@hitar.org

Received: 25 January 2022; Revised: 20 March 2022; Published online: 30 May 2022

12.559–61.707 $\mu\text{g/mL}$ 和 496.833 $\mu\text{g/mg}$ (95% FL: 320.134–776.964 $\mu\text{g/mg}$)。【结论】 Bt S2480-1 菌株基因组分析显示共含有 12 个预测毒蛋白基因, LTQ-Orbitrap MS/MS 鉴定获得 11 个毒蛋白, Bt S2480-1 菌株总蛋白对致倦库蚊和甜菜夜蛾幼虫都具有杀虫活性。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; Bt S2480-1; 毒蛋白; LTQ-Orbitrap; 杀虫活性

Exploration of insecticidal genes in Bt S2480-1: based on the analysis of genome and proteome

ZHOU Yan^{1#}, YANG Tianbao^{1#}, PAN Ganlin¹, MO Shidong¹, LIU Chuanshun¹, FANG Xuanjun^{2,3*}, JIANG Mingguo^{1*}

1 Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modifications, School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning 530008, Guangxi, China

2 Institute of Life Science, Jiyang College, Zhejiang A&F University, Zhuji 311800, Zhejiang, China

3 Hainan Institute of Tropical Agricultural Resources, Sanya 572025, Hainan, China

Abstract: [Objective] To identify the insecticidal activity of wild-type *Bacillus thuringiensis* strain Bt S2480-1 and explore the insecticidal gene resources. [Methods] The whole genome of Bt S2480-1 was sequenced by Illumina HiSeq2000. The genome information, genes, and insecticidal genes of the strain were analyzed with bioinformatics methods. The total proteins of Bt S2480-1 were analyzed by LTQ-Orbitrap nano-LC-MS/MS and the biological activity of Bt S2480-1 against *Culex quinquefasciatus* and *Spodoptera exigua* larvae was determined. [Results] The genome of Bt S2480-1 was 6.2 Mb, with GC content of 35.11%, and one nucleoid and three large plasmids were yielded through assembly, containing 6 297 coding genes with 12 encoding insecticidal proteins. Meanwhile, a total of 1 500 proteins of Bt S2480-1 were identified by LTQ-Orbitrap MS/MS, among which 11 were insecticidal proteins. The total proteins of Bt S2480-1 showed strong activity against *C. quinquefasciatus* larvae but relatively weak activity against *S. exigua* larvae, with LC_{50} of 27.636 $\mu\text{g/mL}$ (95% FL: 12.559–61.707 $\mu\text{g/mL}$) and 496.833 $\mu\text{g/mg}$ (95% FL: 320.134–776.964 $\mu\text{g/mg}$), respectively. [Conclusion] Bt S2480-1 contains 12 genes encoding insecticidal proteins and displays insecticidal activity against *C. quinquefasciatus* and *S. exigua* larvae.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Bt S2480-1; insecticidal protein; LTQ-Orbitrap; insecticidal activity

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*), 通常简称为 Bt, 是革兰氏阳性细菌, 其特点是在芽孢期能产生对特定的无脊椎动物种群有毒杀活性的伴孢晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICP)。作为昆虫致病细菌, 苏云金芽孢杆菌已经成为商业化的农业、林业害虫和控蚊化学杀虫剂的替代品^[1-2]。然而, 由于长期高强度及连

续使用的选择压力, 许多昆虫对已有 Bt 产品产生了抗性^[3], 因此, 不断挖掘更多的新型 Bt 杀虫菌株, 以对抗昆虫对有效杀虫剂产生的抗性, 可能是最简单、最有效和可行的策略。

不同的 Bt 菌株可能含有不同的毒蛋白基因, 而不同的杀虫毒蛋白对靶标昆虫具有不同的杀虫活性^[4]。文献显示已经鉴定的杀虫毒蛋

白对无脊椎动物的 4 个门以及节肢动物的 9 个目的近 600 种昆虫和有害生物有杀虫活性, 包括鳞翅目、鞘翅目、半翅目、双翅目、线虫(人类和动物寄生虫)以及一些蜗牛^[5-9]。在众多的 Bt 毒蛋白中, 大部分 Cry 类蛋白含有 3 个典型的保守结构域: Endotoxin_N、Endotoxin_M 和 Endotoxin_C, 但也有其他 Cry 蛋白显示并无典型保守结构域, 例如: Cry35Ab (Toxin_10 结构域)^[10]、Cry51Aa (ETX/MTX 结构域)^[11]等毒蛋白。另外, 同一蛋白家族的成员也具有不同杀虫活性。例如, Cry51 毒素(ETX/MTX 结构域)对鞘翅目和半翅目幼虫具有毒性^[11]; Cry75Aa1 (Mtx2)对鳞翅目(*Lepidoptera*)和双翅目(*Coleoptera*)昆虫具有杀虫活性^[12]; Cry64Ba/Cry64Ca (均含有 ETX/MTX2)两个蛋白共表达对两个重要的半翅目水稻害虫灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)和白背飞虱(*Sogatella furcifera*)有杀虫活性^[13]。因此, 挖掘新型毒蛋白对农业害虫的有效防治具有非常重要的意义。

随着现代生物技术手段的不断创新, 发现野生型菌株含有的毒蛋白基因, 不再仅仅是通用引物 PCR 扩增, 挖掘毒蛋白基因已经上升到基因组水平。Bt S2480-1 菌株分离自黑龙江凉水国家级自然保护区, 该菌株表现出良好的双翅目和鳞翅目昆虫毒杀活性, 扫描电镜观察显示该菌株在生长后期能伴随芽孢的形成产生大量的菱形伴胞晶体, 同时还含有球形伴胞晶体。因而, 鉴定该菌株含有的杀虫毒蛋白基因, 能更好地将该菌株应用到农林业害虫防治工作中。本研究利用基因组测序以及蛋白组 MS/MS 技术共同发掘 Bt S2480-1 菌株的毒蛋白基因, 并对这些毒蛋白的保守结构域进行分析, 为后续验证 Bt S2480-1 菌株毒蛋白的杀虫功能提供序列信息, 也为防蚊控蚊和鳞翅目害虫的防治工作提供新的资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株及培养条件

Bt S2480-1 菌株是从黑龙江省凉水自然保护区分离到的野生型菌株。其产孢培养条件为: NB 培养基, 30 °C、200 r/min, 72 h, 能产生大量芽孢及晶体蛋白混合物。

LB 培养基(g/L): tryptone 10, yeast extract 5, NaCl 10, 用 5 mol/L NaOH 溶液调整培养基的 pH 值为 7.0, 再用 ddH₂O 定容体积, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

NB 培养基(g/L): peptone 5, beef extract 3, NaCl 5, 用 5 mol/L NaOH 溶液调整培养基的 pH 值为 7.2, 再用 ddH₂O 定容体积, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.1.2 供试靶标昆虫及人工饲料配方

测试靶标昆虫: 3 龄致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)幼虫, 2 龄甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)幼虫。所有用于生物活性测定的昆虫均在广西民族大学广西多糖材料与改性重点实验室昆虫培养室进行人工饲养。

人工饲料配方: 1.5 L 水中含有兔粮 240 g, 小麦胚芽片 225 g, 酵母粉 15 g, 琼脂粉 45 g, 充分混匀, 常温发酵 30 min, 121 °C 灭菌 45 min 后, 加入抗坏血酸 12 g, 尼泊金甲酯 5.7 g, 山梨酸 1.5 g, 大豆油 4.5 mL, 搅拌均匀, 定型, 常温保存待用。

1.2 Bt S2480-1 菌株总 DNA 提取与检测

使用 OMEGA 细菌总 DNA 提取试剂盒从 Bt S2480-1 菌株液体培养物中提取总 DNA, 按试剂盒说明书进行操作。采用微量紫外分光光度计 NonoDrop 2000c 以及琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和完整性。

1.3 Bt S2480-1 菌株基因组测序和数据处理

Bt S2480-1 菌株基因组测序由国家人类基

因组南方研究中心(CHGC)完成, 采用 Illumina HiSeq2000 测序平台对 Bt S2480-1 菌株进行全基因组测序。随后采用 SOAP denovo2 短序列组装软件, 对质量控制处理后的 reads 数据进行组装。然后根据 reads 的 paired-end 与 overlap 关系, 对组装结果进行局部组装和优化, 最终形成 scaffolds。再利用 DIYA 子程序 diya-assemble_pseudocontig.pl 对获得的 scaffolds 进一步分类组合形成菌株的 pseudo 基因组。

1.4 Bt S2480-1 菌株 ORF 和编码基因的预测及功能注释

利用 Glimmer (<http://ccb.jhu.edu/software/glimmer/index.shtml>; version 3.02)和 MetaGeneMark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/metagenome/index.cgi>; version 1.0)工具分别对 Bt S2480-1 菌株基因组成分进行编码基因预测以及基因编码能力分析。再利用 KEGG automatic annotation server (KAAS, <http://www.genome.jp/tools/kaas/>; Ver.1.67x)对 Bt S2480-1 菌株的预测基因进行通路功能分析注释。进入 CGviewer server (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/index.html)在线平台, 提交需要进行可视化的 Bt S2480-1 基因组序列信息及注释的特征信息, 完成属性设置后可查看可视化分析的结果。

1.5 Bt S2480-1 菌株毒蛋白基因的预测识别

下载公共数据库(http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)发布的苏云金芽孢杆菌毒蛋白氨基酸序列(864 条), 以 Bt S2480-1 基因组预测蛋白序列作为搜索数据库, 利用 BLASTp 与构建的毒蛋白氨基酸序列数据库筛选 Bt S2480-1 中编码预测毒蛋白基因, 为了提高比对结果的准确性和可靠性, 主要参数 e 值设定为 $1e^{-5}$ 。

利用 SMART 在线工具(<http://smart.embl-heidelberg.de>)分析预测毒蛋白功能结构域, 并

在苏云金芽孢杆菌毒蛋白命名新系统细菌杀虫蛋白数据库 (<https://camtech-bpp.ifas.ufl.edu/>, BPPRC)中对 Bt S2480-1 菌株所有编码毒蛋白同源性进行比对分析。

1.6 SDS-PAGE 检测 Bt S2480-1 菌株总蛋白及 LTQ-Orbitrap MS/MS 质谱分析

Bt S2480-1 菌株在 30 °C 条件下用 NB 培养基连续培养 3 d, 直至芽孢和晶体完全形成, 期间, 每 4 h 收集一次菌液, 共收集了 18 个时间段。利用超声波细胞破碎仪提取 Bt S2480-1 各个时间段的蛋白质 (SONICS VCX750, SONICS&MATERIALS, INC. 53 church hill rd. newtown, CT USA), 设置工作条件为: 25% Amplitude, pulse on 3sec, pulse off 15 sec, working time 20 min, 最后混合所有提取蛋白质进行 SDS-PAGE 检测。

随后, 利用 LTQ-Orbitrap nano-LC-MS/MS 系统 (LTQ-Orbitrap Elite Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)鉴定 Bt S2480-1 菌株总蛋白表达情况。具体 LTQ-Orbitrap MS 样品制备过程参照 Fu 等^[14]进行。

1.7 Bt S2480-1 菌株生物活性测定

制备 Bt S2480-1 菌株发酵液: NB 培养基, 30 °C、200 r/min 培养 72 h 至芽孢完全形成并产生大量伴孢晶体蛋白。随后 8 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 加 10 mL 50 mmol/L Tris-HCl (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 10% glycerol, pH 7.8), 重悬菌体用于生物活性测定。分别挑选生理活性良好的 2 龄致倦库蚊幼虫和 2 龄甜菜夜蛾幼虫为靶标昆虫进行活性测定。每种昆虫测试 5 个梯度浓度, 每个浓度各处理 15 头, 每个处理独立重复 3 次, 分别以蒸馏水作为阴性对照。

生物活性测定条件: 置于 28 °C 培养室, 保

持 70%相对湿度, 光周期设置为光照 12 h 暗培养 12 h, 在 24、48、72 h 时观察并记录实验数据。

2 结果与分析

2.1 Bt S2480-1 菌株基因组测序分析

通过利用 Illumina HiSeq2000 基因组测序平台对 Bt S2480-1 菌株进行双末端测序, 通过组装拼接最终获得 236 个 scaffolds (N_{50} =386 kb), 356 个 contigs (N_{50} =130 kb), 基因组大小为

6.2 Mb (GC%=35.11)。其中, 长度>500 bp 的 scaffolds 为 106 个, contigs 为 226 个。

通过与参考基因组及质粒比对, 经过拼接, Bt S2480-1 菌株有 4 个复制子, 除 1 个 4.31 Mb 的染色体(Bt2480-1 pseudo chromosome)外, 还有 3 个质粒序列, 分别命名为 Bt2480-1 plasmid01、Bt2480-1 plasmid02、Bt2480-1 plasmid03, 使用可视化工具分别对各复制子作基因组序列可视化环形图(图 1)。

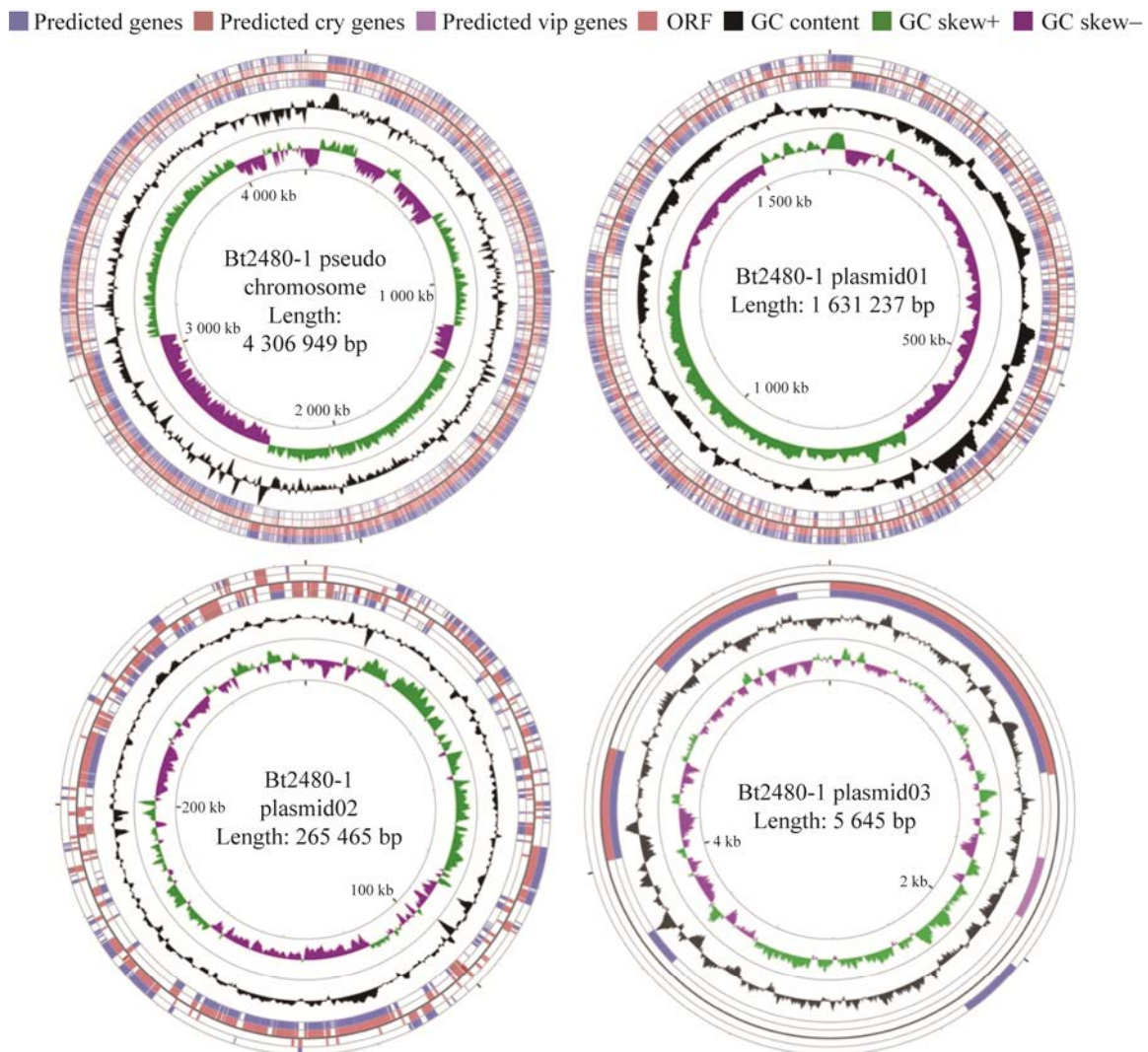


图 1 Bt S2480-1 基因组可视化图

Figure 1 Genome visualization map of Bt S2480-1. The circle from inside to outside: 1: GC skew; 2: G+C content; 3: predicted ORF.

利用 Glimmer 在 Bt S2480-1 基因组中识别得到 6 573 个开放阅读框(open read frame, ORF) 序列, 其中拟核基因组上分布了 4 491 个, 3 个质粒上分别有 1 763 个、307 个和 12 个(表 1)。通过 MetaGeneMark 对预测的 Bt S2480-1 基因组进行编码基因预测, 共得到 6 297 个编码基因, 其中拟核基因组分布有 4 366 个, 3 个质粒上分别含有 1 663 个、262 个和 6 个(表 1)。通过 KAAS 对该 6 297 个预测蛋白进行蛋白功能注释发现, 共有 1 227 个蛋白注释到已知功能上, 而剩余未注释出功能的蛋白标记为假设蛋白(hypothetical protein)。

2.2 Bt S2480-1 菌株毒蛋白编码基因的预测识别

通过与构建的本地 Bt 毒蛋白数据库进行比对, 将序列比对结果中出现的基因列为 Bt S2480-1 菌株可能携带的毒蛋白编码基因, 结合与已知毒蛋白同源性分析, 去除比对分数较低的预测基因, 最终筛选出预测基因中可能编码毒蛋白的基因共计 12 个(表 2), 均被预测为 Cry/Cyt 类毒蛋白的编码基因, 在新的细菌杀虫蛋白数据库命名系统中, 这 12 个预测毒蛋白被划分为 5 个类别。其中 Cry 类毒蛋白编码基因 4 个(plasmid1_gene235、plasmid2_gene242、plasmid2_gene243、plasmid2_gene262), Cyt 类毒蛋白编码基因 3 个(plasmid1_gene1609、plasmid2_gene103、plasmid2_gene194), App 和 Tpp 类毒蛋白编码基因各 1 个(plasmid1_gene167

表 1 Bt S2480-1 基因组预测信息

Table 1 Genome predicted information of Bt S2480-1

Genome	ORF	Gene
Chromosome	4 491	4 366
S2480p01	1 763	1 663
S2480p02	307	262
S2480p03	12	6
Total	6 573	6 297

表 2 Bt S2480-1 菌株 12 个预测毒蛋白基因同源性比对信息

Table 2 Homology alignment information of 12 predicted toxic protein genes of Bt S2480-1 strain

Predicted genes	Homologous genes	Homologous toxic protein	Identify/%
plasmid1_gene235	<i>cry70Bb1</i>	Cry70Bb1	98.8
plasmid1_gene167	<i>app4Aa1</i>	App4Aa1	71.5
plasmid1_gene1609	<i>cyt1Ca1</i>	Cyt1Ca1	20.1
plasmid2_gene4	<i>tpp49Ab1</i>	Tpp49Ab1	36.7
plasmid2_gene103	<i>cyt1Da1</i>	Cyt1Da1	19.9
plasmid2_gene186	<i>mpp75Aa2</i>	Mpp75Aa2	27.3
plasmid2_gene189	<i>mpp15Aa1</i>	Mpp15Aa1	29.3
plasmid2_gene194	<i>cyt1Da1</i>	Cyt1Da1	23.2
plasmid2_gene213	<i>mpp15Aa1</i>	Mpp15Aa1	28.6
plasmid2_gene242	<i>cry10Aa3</i>	Cry10Aa3	29.5
plasmid2_gene243	<i>cry50Ba2</i>	Cry50Ba2	25.1
plasmid2_gene262	<i>cry68Aa1</i>	Cry68Aa1	41.3

和 plasmid2_gene4), Mpp 类毒蛋白编码基因有 3 个(plasmid2_gene186、plasmid2_gene189 和 plasmid2_gene213)。除了 plasmid1_gene167、plasmid1_gene235 和 plasmid1_gene1609 这 3 个基因位于质粒 1 (Bt2480-1 plasmid01) 外, 其余 8 个毒素基因均位于质粒 2 (Bt2480-1 plasmid02) 上。

按照苏云金芽孢杆菌毒蛋白国际命名委员会的分类规则, plasmid1_gene235 归属于第 4 分类等级(一致性>95%), 说明 plasmid1_gene235 是 *cry70Bb1* 的同源基因; plasmid1_gene167 归属于第 3 分类等级(一致性为 78%–94.99%); 其余 10 个预测基因均归属于第 1 分类等级(一致性<45%), 说明这些预测基因可能是全新的毒蛋白基因, 我们后续需要对它们全长的 ORF 进行细致的分析(表 2)。

2.3 菌株 Bt S2480-1 毒蛋白序列结构域分析

利用 SMART 在线工具分析这 11 个预测毒蛋白的保守功能结构域(图 2)。结果显示, 这 12 个预测毒蛋白基因编码蛋白的保守功能结构

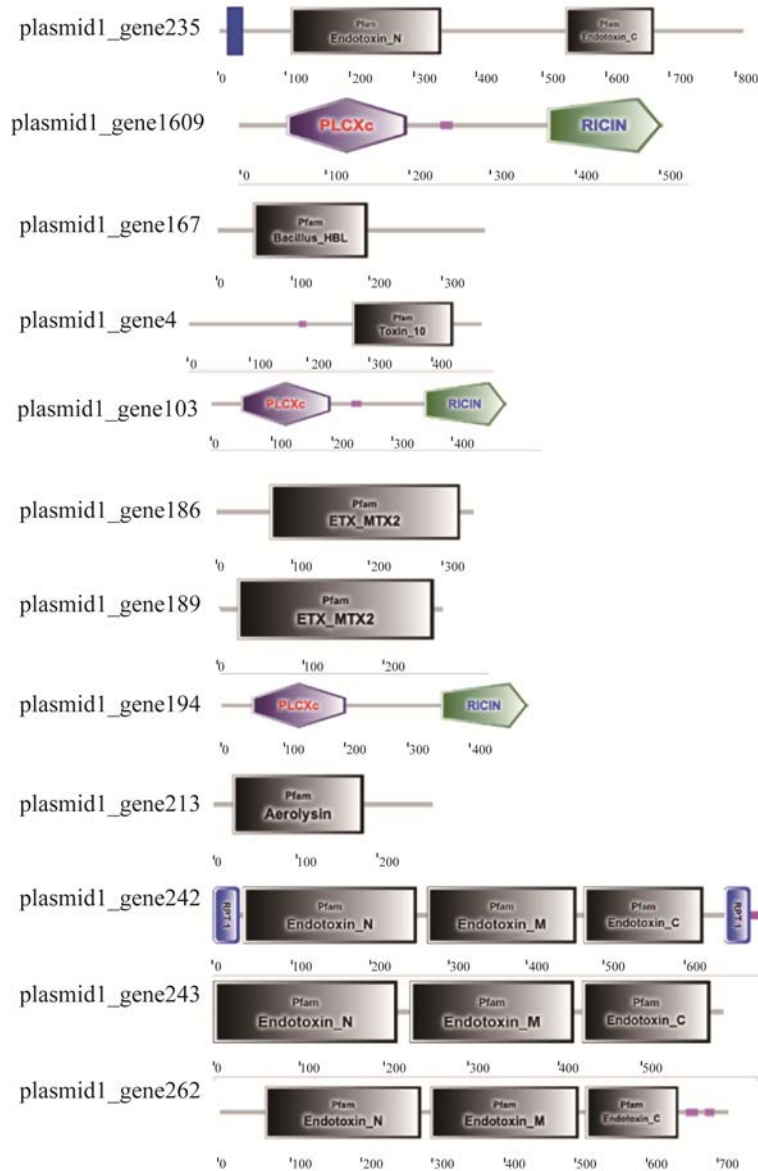


图 2 Bt S2480-1 菌株 12 个预测毒蛋白的保守结构域分析

Figure 2 Conserved domains of 12 predicted toxins of Bt S2480-1 strain.

域的类型丰富, 预示着这些预测毒蛋白可能有丰富的杀虫功能。其中, plasmid2_gene242, plasmid2_gene243, plasmid2_gene262 具有 Cry 类杀虫蛋白典型的 3D 结构域, 即包括 Endotoxin_N、Endotoxin_M、Endotoxin_C 3 个结构域; 而 plasmid1_gene235 仅含有 N 端的 Endotoxin_N 和 C 端的 Endotoxin_C 结构域, 缺

少中间的 Endotoxin_M 结构域。plasmid1_gene1609, plasmid2_gene103, plasmid2_gene194 为 Cyt 类杀虫蛋白, 均含有 1 个 Ricin 结构域和 PLCXc 结构域。plasmid2_gene4 含有一个 Toxin_10 结构域。根据系统公布的毒蛋白, 发现部分 Cry 蛋白具有 RICIN 或 Toxin_10 这 2 个结构域。plasmid2_gene186 和 plasmid2_gene189

均属于 Mpp 类毒蛋白,都含有一个 ETX_MTX2 结构域,研究发现, Mtx2 是营养期产生的杀蚊蛋白,因此,推测这可能是 2 个杀蚊毒蛋白;而 plasmid2_gene213 虽然也同属于 Mpp 类毒蛋白,但其保守结构域为 aerolysin,气溶素(aerolysin)是一种细菌 β 桶型孔道形成毒素,推测 plasmid2_gene213 可能是个穿孔蛋白。

2.4 Bt S2480-1 菌株总蛋白及 LTQ-Orbitrap MS/MS 质谱分析预测毒蛋白

对 Bt S2480-1 菌株 18 个时间段的混合总蛋白进行 SDS-PAGE 检测(图 3), Bt S2480-1 菌株表达的毒蛋白大小基本在 200、120、100、50、32、27 kDa 左右。用 LTQ-Orbitrap Elite Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Germany) 质谱仪对上述混合总蛋白进行了 LTQ-Orbitrap MS/MS 蛋白表达谱分析,初步获得了 Bt S2480-1 菌株的全蛋白组表达数据,从 Bt S2480-1 菌株的混合蛋白中共鉴定了 1 500 个蛋白质,前期预测的 12 个毒蛋白中,仅有 plasmid2_gene243 一个毒蛋白未被鉴定到(表 3)。推测可能是在样品处理过程中该蛋白损失或该蛋白本身表达量低等原因造成的,在后续的实验我们会对其实际表达情况做进一步的验证与鉴定。

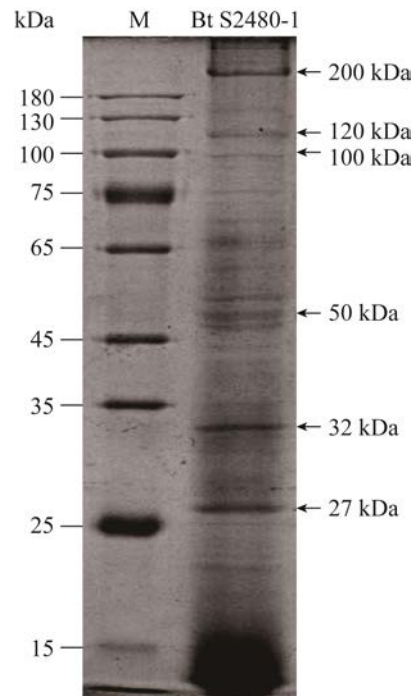


图 3 Bt S2480-1 菌株总蛋白 SDS-PAGE 分析
Figure 3 SDS-PAGE analysis of total protein of Bt S2480-1 strain. M: protein marker; Bt S2480-1: Bt S2480-1 total protein.

2.5 Bt S2480-1 对致倦库蚊和甜菜夜蛾幼虫的杀虫活性测定

分别以 2 龄致倦库蚊和甜菜夜蛾幼虫为靶标昆虫,以 ddH₂O 为阴性对照,测定 Bt S2480-1

表 3 LTQ-Orbitrap MS 鉴定到的 BT S2480-1 总蛋白中的预测毒蛋白信息

Table 3 The predicted toxin proteins detected by LTQ-Orbitrap MS in total protein samples of Bt S2480-1

Protein ID	Score	Coverage	Proteins	Unique peptides	Peptides	PSMs	AAs	MW/kDa	Calc.pI
plasmid1_gene167	22.26	25.04	1	5	7	12	357	40.1	6.81
plasmid1_gene235	36.50	50.20	1	3	3	9	807	91.5	6.65
plasmid1_gene1609	30.44	30.94	1	1	5	12	512	57.9	5.38
plasmid2_gene4	22.40	25.44	1	3	3	6	496	55.0	5.19
plasmid2_gene103	28.01	18.23	1	3	3	6	486	55.8	4.69
plasmid2_gene186	31.11	11.48	1	3	3	14	331	36.7	6.25
plasmid2_gene189	49.72	31.34	1	11	13	24	268	29.6	8.73
plasmid2_gene194	14.37	15.36	1	2	2	4	504	56.5	5.30
plasmid2_gene213	27.17	25.32	1	4	4	9	248	29.5	7.01
plasmid2_gene242	28.02	31.60	1	4	4	7	689	79.1	6.73
plasmid2_gene262	24.86	24.48	1	3	3	7	736	80.0	4.88

菌株对蚊虫和甜菜夜蛾幼虫的杀虫活性。生物活性测定结果显示, Bt S2480-1 菌株总蛋白对致倦库蚊和甜菜夜蛾幼虫杀虫活性 LC_{50} 分别为 27.636 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% FL: 12.559–61.707 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和

496.833 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (95% FL: 320.134–776.964 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (表 4), 表明 Bt S2480-1 菌株总蛋白对致倦库蚊幼虫表现出非常高的杀蚊活性, 而对甜菜夜蛾幼虫杀虫活性相对偏弱。

表 4 Bt S2480-1 总蛋白对致倦库蚊幼虫和甜菜夜蛾幼虫的生物活性测定

Table 4 Bioassays the insecticidal activity of total protein of Bt S2480-1 against *Culex quinquefasciatus* and *Spodoptera exigua* larvae

Target insects	Regression equation	LC_{50}	95% confidence interval	Correlation coefficient
<i>Culex quinquefasciatus</i>	$Y=1.085X-1.564$	27.636 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12.559–61.707 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.738
<i>Spodoptera exigua</i>	$Y=2.523X-6.804$	496.833 $\mu\text{g}/\text{mg}$	320.134–776.964 $\mu\text{g}/\text{mg}$	0.789

3 讨论

毒蛋白是 Bt 菌株至关重要的毒力因子, 对鳞翅目、双翅目和鞘翅目害虫具有特定的杀虫活性。本研究基于基因组学与蛋白组学技术共挖掘到 Bt S2480-1 菌株中的 12 个预测毒蛋白基因。其中 plasmid1_gene235 与 Cry70Bb 蛋白的序列一致性高达 98.8%, 属于同源基因, 而有关 Cry70Bb 毒蛋白的杀虫活性目前未见单独报道, 但含有该蛋白的菌株对白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*)、淡色库蚊 (*Culex pipiens*) 和冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 均具有很高的杀蚊活性^[15]。plasmid1_gene167 与 App4Aa 蛋白的序列一致性为 71.5%, 属于 Bt 毒蛋白分类系统的第 3 分类等级, 虽然不属于新型毒蛋白等级(毒蛋白分类定义蛋白序列一致性 <45% 时为新型毒蛋白), 但是它们也是非常重要的一类基因。结构域分析显示, 其结构域为 *Bacillus*_HBL, 一种溶血素 BL 结构域, 为肠毒素, 也是苏云金芽孢杆菌的杀虫成分之一^[16], 且它能协同磷脂酶 C 使细胞裂解^[17]。其余的 10 个预测毒蛋白均属于新型毒蛋白分类等级。

依据苏云金芽孢杆菌毒蛋白命名新系统细菌杀虫蛋白数据库(BPPRC), Bt S2480-1 菌株的

这 12 个预测毒蛋白基因编码蛋白的保守功能结构域类型丰富, 包括 Cry、Cyt、Mpp、App 以及 Tpp 5 类杀虫蛋白, 预示着这些预测毒蛋白可能有丰富的杀虫功能, 具有杀虫广谱性。本研究中, 仅以致倦库蚊和甜菜夜蛾为靶标昆虫, 对 Bt S2480-1 菌株进行了杀虫活性测定, 后续实验中我们需要扩大这些毒蛋白的靶标昆虫包括对鳞翅目、双翅目、鞘翅目幼虫以及癌细胞等的杀虫活性, 以进一步确定这些毒蛋白的杀虫广谱性, 从而能更好地发挥该菌株的杀虫性能。

研究发现, 杀蚊模式菌株 Bti (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) 的高效杀蚊活性主要是因为其体内含有 10 个之多的毒蛋白, 且其中的 Cry4Aa、Cry4Ba、Cry10Aa、Cry11Aa、Cyt1Aa 和 Cyt2Ba 6 个毒蛋白之间存在复杂的相互作用, 它们协同增效 (synergy effect) 产生不同水平毒性, 且作用于不同蚊子类型^[18-19]。本研究的 Bt S2480-1 菌株的预测毒蛋白中也有 Cry 和 Cyt 类毒蛋白, 是否这些毒蛋白之间也存在协同增效作用, 产生更高的杀虫活性? 因此, 后续实验中我们需要深入探究这些毒蛋白之间的协同作用关系; 另外, 还可以对该菌株进行转录表达分析研究, 以探讨 Bt S2480-1 菌株这

预测的 12 个毒蛋白编码基因体内表达的时序关系，从而能在农林业害虫防治工作中更好地利用该菌株及其杀虫毒蛋白基因。

参考文献

- [1] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775–806.
- [2] Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(3): 283–300.
- [3] Baumann P, Clark MA, Baumann L, Broadwell A. *Bacillus sphaericus* as a mosquitocidal pathogen: properties of the organism and its toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 1991, 55(3): 425–436.
- [4] Charles JF, Nielson-LeRoux C, Delécluse A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annual Review of Entomology*, 1996, 41: 451–472.
- [5] Hofte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Revista Argentina De Microbiología*, 1989, 53(2): 242–255.
- [6] Van Frankenhuyzen K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 101(1): 1–16.
- [7] Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins (Basel)*, 2014, 6(4): 22–43.
- [8] De Maagd, RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Entomology*, 2003, 37(2): 409–433
- [9] Chougule NP, Bonning BC. Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. *Toxins*, 2012, 4(6): 405–429.
- [10] Kelker MS, Berry C, Evans SL, Pai R, McCaskill DG, Wang NX, Russell JC, Baker MD, Yang C, Pflugrath JW, Wade M, Wess TJ, Narva KE. Structural and biophysical characterization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1. *PLoS One*, 2014, 9(11): 125–155
- [11] Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2017, <http://www.btnomenclature.info/>.
- [12] Bowen DJ, Chay CA, Flasiniski S, Yin Y., Novel insect inhibitory proteins. Monsanto Technology LLC, US Patent Application: No. A120170044568. 2017.
- [13] Liu Y, Wang Y, Shu C, Lin K, Song F, Bravo A, Soberón M, Zhang J. Cry64Ba and Cry64Ca, two ETX/MTX2- type *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins active against Hemipteran pests. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 2018, 84(7): e01996-17.
- [14] Fu Qiang, Pan LM, Huang DL, Wang ZQ, Hou Z, Zhang M. Proteomic profiles of buffalo spermatozoa and seminal plasma. *Theriogenology*, 2019, 134(3): 74–82.
- [15] Fayad N, Kambris Z, El Chamy L, Mahillon J, Kallassy Awad M. A novel anti-dipteran *Bacillus thuringiensis* strain: unusual Cry toxin genes in a highly dynamic plasmid environment. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 2020, 87(5): e02294-20.
- [16] Ryan PA, MacMillan JD, Zilinskas BA. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(8): 2551–2556.
- [17] Granum PE, Nissen H. Sphingomyelinase is part of the ‘enterotoxin complex’ produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 110(1): 97–100.
- [18] Crickmore N, Bone EJ, Williams JA, Ellar DJ. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 131(3): 249–254.
- [19] Wirth MC, Park HW, Walton WE, Federici BA. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 2005, 71(2): 185–189.