

几种苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白对黑龙江省主要蔬菜害虫小菜蛾活性分析

韩岚岚¹, 戴长春¹, 宋福平², 张 杰², 赵奎军¹

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院 植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

摘 要: 利用已克隆的 3 种 Bt cry 基因 cry1Ca, cry1Ia, cry2Ab 和 1 种野生菌株 HD-73 (cry1Ac)表达的 4 种 Bt Cry 杀虫晶体蛋白, 对小菜蛾进行生物活性分析, 并将 Cry1Ac 杀虫晶体蛋白分别与其它 3 种蛋白按 1:1 的比例组合, 对小菜蛾进行生物活性测定。结果表明: 单独使用 Cry1Ac 的活性最高, LC50 为 2.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cry1Ac 与 Cry2Ab 混合对小菜蛾的具有较高的毒力, LC50 为 48.91, 高于其它组合。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; Cry 蛋白; 生物测定; 小菜蛾

中图分类号: S 436.341.2⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)08-0198-03

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是目前世界上应用最广泛的生物杀虫剂之一, 其主要活性是它能够产生杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystall Proteins, ICPs)或 δ -内毒素, 它对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、同翅目昆虫及动植物寄生线虫等有特异性毒杀作用, 而对人和家畜无害, 不污染环境。

随着苏云金芽孢杆菌在生物杀菌剂中的应用, 到目前为止已经发现的高毒力的有效杀虫晶体蛋白及蛋白组合较少, 这限制了 Bt 的应用。因此, 从克隆的 3 种 Bt cry 基因和 1 种野生菌株表达的 4 种杀虫晶体蛋白对小菜蛾的活性进行分析, 对开发和丰富的 Bt 资源有着十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 菌株及来源

研究所用 Bt Cry 蛋白均由农科院植保所生物技术组提供, 见表 1。

表 1 供试菌株的 Cry 蛋白及其 pH 值

供试菌株表达的蛋白	Cry1Ac	Cry1Ca	Cry1Ia	Cry2Ab
分子量/kDa	133	134.7	81.2	70.7
pH	4.43	4.75	6.00	9.11

1.2 杀虫晶体蛋白的制备

1.2.1 Bt 菌株培养 活化 HD-73 菌株, 以 1%接种量转接于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 30℃, 230 r/min 培

养至芽孢形成, 离心沉淀后 4℃保存备用。

1.2.2 大肠杆菌菌株的培养 活化克隆基因 cry1Ca, cry1Ia, cry2Ab 在受体菌 BL21 (DE3)中表达的菌株, 以 1%接种量转接于 LB 液体培养基中 37℃, 230 r/min 培养 8 h, 离心、收集沉淀, 4℃保存备用。

1.2.3 蛋白提取 将上面收集的沉淀加入适量的 20 mM Tris (pH 8.0)悬浮, 200 Hz 超声破碎裂解后, 再离心收集上清或沉淀并溶解。用 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)纯化、SDS-PAGE 检测、定量, 稀释一定的浓度进行生物活性测定。

1.2.4 杀虫晶体蛋白 SDS-PAGE 分析 将纯化的蛋白饱和溶于 10 mM 的 Na_2CO_3 (pH 10.0)溶液, 取溶解 100 mL, 加入 50 mL 3 样品缓冲液混匀, 煮 10 min; 14 000 rpm 离心 10 min, 取上清为电泳样品。

1.3 生物活性测定

1.3.1 试虫 小菜蛾(*Plutella xylostella*) 2 龄孵幼虫。

1.3.2 初筛 将定量的蛋白均匀的与人工饲料混合(初发蛋白浓度为 100 mg/kg), 称取 5 g 人工饲养分装于经消毒(5%福尔马林浸泡)的 24 孔细胞培养板中。用毛笔轻轻接入 2 龄小菜蛾幼虫, 每孔 1 头, 每处理重复 3 次, 放置 25℃光照培养箱中, 培养 96 h 后调查死、活虫数, 计算死亡率、校正死亡率。

1.3.3 复筛 根据初筛的结果, 对小菜蛾有较高毒力的 Cry 蛋白进行复筛, 求出致死中浓度 LC50 并将 Cry1Ac 与 3 种 Cry 蛋白分别按 1:1(蛋白含量)混配, 对小菜蛾进行生测, 96 h 后调查死、活虫数, 计算死亡率、校正死亡率, 求出 LC50。

1.4 数据处理

POLO 软件进行分析。

第一作者简介: 韩岚岚(1970-), 女, 讲师, 博士, 现主要从事农业害虫防治研究工作。

通讯作者: 赵奎军。E-mail: kjzhao@163.com。

基金项目: 国家“863”资助项目(2004AA214090)。

收稿日期: 2008-03-26

2 结果与分析

2.1 初筛

表 2 几种 Bt Cry 蛋白对小菜蛾幼虫的活性测定

样品	浓度 /mg · kg ⁻¹	重复数	总试虫数	死虫数	死亡率 /%	校正死亡率 /%
对照		3	90	0	0	
Cry1Ac	100	3	90	90	100	100
Cry2Ab	100	3	90	39	43.33	43.33
Cry1Ia	100	3	90	33	36.67	36.67
Cry1Ca	100	3	90	21	22.22	22.22

以 10 mM 的 Na₂CO₃ (pH 10.0)溶液为对照, 对小菜蛾 2 龄幼虫的进行生物活性的测定。96 h 观察并记录

表 3 Cry 1Ac、C2Ab、Cry 1Ia 对小菜蛾幼虫的活性测定

样品	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	试虫数	死虫数	死亡率/%	校正死亡率/%	LC50/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	斜率
对照		48	1	2.08			
	20	48	48	100	100	LC50: 2.39	
	6.67	48	28	58.33	57.44	95%置信限区间	1.287±0.154
	48	19	39.58	36.17	0.9120~6.95441		
	0.74	48	14	29.17	23.41		
Cry1Ac2.22	0.25	48	7	14.58	10.39		
		48	1	2.08			
	20	48	18	37.5	36.17	LC50: 56.27	
	6.67	48	14	29.17	27.67	95%置信限区间	0.651±0.165
	2.22	48	10	20.83	19.15	9.23~863.89	
Cry2Ab	0.74	48	8	16.67	14.90		
	0.25	48	2	4.17	2.13		
		48	1	2.08			
	20	48	18	37.5	36.17	LC50: 109.20	
	6.67	48	13	27.08	25.53	95%置信限区间	1.065±0.263
Cry1Ia	2.22	48	10	20.83	19.15	57.143~535.923	
	0.74	48	7	14.58	12.77		
	0.25	48	3	6.25	4.26		

根据以上结果, 将 Cry1Ac 分别与 Cry2Ab、Cry 1Ia、Cry1Ca 3 种蛋白按 1 : 1 组合, 对 2 龄小菜蛾幼虫进行生物活性测定, 见表 4。

2 种蛋白混合对小菜蛾毒力由强到弱的顺序是: Cry1Ac & Cry2Ab、Cry1Ac & Cry 1Ia、Cry1Ac & Cry1Ca。

表 4 Bt Cry 蛋白正交组合对小菜蛾幼虫的活性测定

样品	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	试虫数	死虫数	死亡率/%	校正死亡率/%	LC50/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	斜率
对照		48	0	0	0		
	60	48	27	56.25	56.25	LC50: 48.91	
	30	48	17	35.42	35.42	95%置信限区间	1.445±0.240
	15	48	11	22.97	22.97	34.778 ~ 84.819	
	7.5	48	7	14.58	14.58		
Cry1Ac & Cry2Ab	3.8	48	2	4.17	4.17		
	60	48	18	37.5	37.5		
	30	48	11	22.97	22.97	LC50: 113.15	
	15	48	7	14.58	14.58	95%置信限区间	1.320±0.355
	7.5	48	4	8.33	8.33	63.570 ~ 530.192	
Cry1Ac & Cry 1Ia	3.8	48	2	4.17	4.17		
	60	48	13	27.08	27.08		
	30	48	9	18.75	18.75	LC50: 221.07	
	15	48	6	12.5	12.5	95%置信限区间	1.116±0.372
	7.5	48	3	6.25	6.25	90.85 ~ 9319.6	
Cry1Ac & Cry1Ca	3.8	48	2	4.17	4.17		

试验结果, 见表 2。

从表 1 中可以看出 Cry1Ac 蛋白对小菜蛾幼虫的杀虫活性最强, 其次是 Cry2Ab、Cry 1Ia、Cry1Ca, 其中 Cry 1Ia 对小菜蛾的活性国内外未见报道。根据此结果进一步测定 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Cry 1Ia 的蛋白对小菜蛾幼虫的生物活性, 见表 3。

2.2 复筛

从表 3 可知, Cry1Ac、Cry2Ab、Cry 1Ia 对小菜蛾幼虫毒力的 LC50 分别为 2.39、56.27 和 109.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 说明这 3 种 Cry 蛋白对小菜蛾幼虫都有较强毒杀作用, Cry1Ac 对小菜蛾的毒力最高。

Cry1Ac 单独对小菜蛾的毒力为 LC50 为 2.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 Cry1Ac 与这 3 种 Cry 蛋白的混合后对小菜蛾的 LC50 均大于其单独作用的 LC50。因此, 这 3 种 Cry 蛋白组合对小菜蛾的毒力低于 Cry1Ac 单独对小菜蛾毒力。

3 讨论

以上 4 种 Bt Cry 蛋白对小菜蛾的活性分析结果表明 它们对小菜蛾都有毒杀作用, Cry1Ac 毒力最强, 其次为 Cry2Ab、Cry1Ia、Cry1Ca。Cry1Ac 与其它 3 种蛋白组合对小菜蛾有较强的毒性, 根据 LC50 可知, 这 3 种组合蛋白对小菜蛾有较强的毒力, 虽然其毒杀效果没有超单独使用 Cry1Ac 的毒杀效果 但是在延缓小菜蛾对 Cry 蛋白产生抗性上将起重要作用 可用于生物防治和基因改造; Bt Cry 蛋白组合对小菜蛾生测没有增效, 这可能是由于这些蛋白作用于小菜蛾中肠的部位相同, 彼此之间存在竞争的结果, 或是与小菜蛾中肠部位的结合能力不同, 或是受到小菜蛾中肠的内部环境的影响, 这些因素都会影响 Bt Cry 的毒力。

国内外对已有相关报道, Bt Cry 蛋白的在昆虫中肠的受体主要是类钙粘蛋白、氨肽酶(APN), 但是其作用机

理现在还不明确, 该结果可以为进一步研究其作用机理及 Bt 制剂商品化应用提供理论依据。对开发和丰富的 Bt 资源有着十分重要的意义。

参考文献

- [1] 张履鸿, 李国勋, 赵奎军. 农业经济昆虫学[M]. 哈尔滨: 哈尔滨船舶工程学院出版社, 1993: 245.
- [2] 戴莲韵, 王学聘. 苏云金芽孢杆菌研究进展[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 53.
- [3] Schnepf H E, Tomczak K, Ortega J P, et al. Specificity—determining regions of a lepidopteran—specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* [J]. J Biol Chem, 1990, 265: 20923-20930.
- [4] Aronson A I, Han Eun—Soo, Mcgaughey W, et al. The solubility of Inclusion Proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon Protoxin composition and is a factor in toxicity to insects [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57: 981-986.
- [5] 樊东, 韩岚, 赵奎军. 植物提取液对黑龙江省主要十字花科蔬菜害虫小菜蛾的杀虫活性研究 [J]. 北方园艺, 2003(2): 54-55.

Analysis Activity of Cry Protein from *Bacillus thuringiensis* Against *Plutella xylostella* of Vegetable Pest in Heilongjiang Province

HAN Lan-lan¹, DAI Chang-chun¹, SONG Fu-ping², ZHANG Jie², ZHAO Kui-jun¹

(1. College of Agriculture Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150080, China; 2. State Key Lab. of Biology for Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100193, China)

Abstract: Using expression protein of cry2Ab, cry1Ia, cry1Cb which had been cloned and a nature strain HD—73(cry1Ac) against *Plutella xylostella*. And mixed Cry1Ac with one of the other three Cry proteins(1:1) against *Plutella xylostella*. The bioassay result demonstrated that Cry1Ac were higher than other three, and LC50 was 2.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The LC50 of co-toxicity of Cry1Ac and 2Ab to *Plutella xylostella* was 48.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$. It was meant that Cry 1Ac and Cry2Ab were high toxicity than the other Cry proteins combinations.

Key words: Bt; Cry protein; Bioassay; *Plutella xylostella*

中国科技核心期刊、全国优秀农业期刊

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊, 为中国科技核心期刊、全国优秀农业期刊。该刊为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据中国期刊引证研究报告统计, 2007 年度《植物遗传资源学报》影响因子达 0.914。

报道内容为大田、园艺作物, 观赏、药用植物, 林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评

论。诸如, 种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新, 信息学、管理学等; 起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

季刊, 大 16 开本, 128 页。定价 20 元, 全年 80 元。各地邮局发行, 邮发代号: 82-643。国内刊号 CN11-4996/S, 国际统一刊号 ISSN1672-1810。

本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 3 元。

地址: 北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院

《植物遗传资源学报》编辑部 邮编: 100081

电话: 010-62180257 010-62180279(兼传真)

E-mail: zwyczyxb2003@163.com zwyczyxb2003@sina.com