

## 研究报告

## Research Reports

# 对甜菜夜蛾具有杀虫活性的 Bt 菌株 *cry1Ca* 基因研究

王 杨<sup>1,2</sup>, 周子珊<sup>2</sup>, 刘永磊<sup>2</sup>, 韩 榕<sup>1</sup>, 张林静<sup>1\*</sup>, 张 杰<sup>2\*</sup>

(1. 山西师范大学生命科学学院, 临汾 041004; 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** 根据已报道的 14 个 *cry1Ca* 基因, 设计能够扩增 *cry1Ca* 全长基因的简并引物。利用该引物对本实验室分离的 472 株 Bt 菌株进行筛选。PCR 扩增发现 22 株菌含有 *cry1Ca* 基因。对 22 株菌株进行 *cry* 基因多样性分析, 结果获得 5 种类型酶切图谱, 表明这些菌株分为 5 种类型。SDS-PAGE 结果显示 22 株菌均表达约 130 ku 的蛋白。Western Blotting 结果证实这些菌株中 *cry1Ca* 基因均正常表达。提取菌株的晶体蛋白, 经胰蛋白酶活化, 对甜菜夜蛾 [*Spodoptera exigua* (Hübner)] 进行初步生测, 结果表明 22 株菌中活化的 Cry 蛋白对甜菜夜蛾均表现出很强的毒杀作用。进一步从 5 个类型的菌中各挑选一株毒力较高的菌株进行 LC<sub>50</sub> 的测定, 结果证实它们均具有很高毒力, 其中, T1-E12 (0.087 μg/g)、B16-C8 (0.103 μg/g)、T1-B8 (0.202 μg/g) 的活性与阳性对照菌株 G03 (0.090 μg/g) 相当, 具有生产应用潜力。本研究为新型高效 Bt 菌株的挖掘奠定了基础。

**关键词** 苏云金芽胞杆菌; *cry1Ca* 基因; 甜菜夜蛾; 致死中浓度

中图分类号: S 476.11 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.02.004

## Analysis of *cry1Ca* gene from *Bacillus thuringiensis* strains with high insecticidal activity against *Spodoptera exigua*

Wang Yang<sup>1,2</sup>, Zhou Zishan<sup>2</sup>, Liu Yonglei<sup>2</sup>, Han Rong<sup>1</sup>, Zhang Linjing<sup>1</sup>, Zhang Jie<sup>2</sup>

(1. School of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China;

2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract** One pair of degenerate primers, designed based upon the 14 known sequences of *cry1Ca* genes, was used to identify *cry1Ca* genes from 472 wild isolates of *Bacillus thuringiensis* screened in our laboratory, and there were 22 isolates containing *cry1Ca* genes. Five patterns of restriction fragment were obtained by the analysis of *cry* gene diversity depended on PCR-RFLP, indicating that 22 *B. thuringiensis* isolates could be classified as five types. SDS-PAGE analysis results showed that a main protein band with approximate 130 ku molecular mass was detected in each strain. Western Blotting analysis results also demonstrated that Cry1Ca proteins were expressed normally in all of the 22 strains. The preliminary bioassay was conducted with trypsin-activated Cry proteins extracted from 22 Bt isolates against the neonate larvae of *Spodoptera exigua* (Hübner). The results showed that all of these strains had high insecticidal activity against target larvae. The LC<sub>50</sub> values of the five selected Bt isolates representing five types against *S. exigua* were measured, and the results indicated that the toxicity of the five strains was very high; the insecticidal activity of the strains T1-E12 (0.087 μg/g), B16-C8 (0.103 μg/g) and T1-B8 (0.202 μg/g) was similar to that of the positive strain G03 (0.090 μg/g), and these strains have great potential

收稿日期: 2015-03-16

修订日期: 2015-04-12

基金项目: 国家“863”计划(2011AA10A203); 转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08009-003-001-004)

致谢: 感谢武汉科诺生物科技股份有限公司刘华梅博士提供甜菜夜蛾试虫, 感谢中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫研究组梁革梅研究员提供人工饲料

\* 通信作者 E-mail: jzhang@ippcaas.cn; linjingzh@aliyun.com

for commercialization. Our findings will lay the foundation for discovery of novel *B. thuringiensis* isolates.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*; *cry1Ca* gene; *Spodoptera exigua*; LC<sub>50</sub>

甜菜夜蛾 [*Spodoptera exigua* (Hübner)] 属鳞翅目夜蛾科, 作为一种世界性的多食性害虫, 长期为害包括棉花、番茄、大豆等在内的重要经济作物<sup>[1]</sup>。在中国, 甜菜夜蛾的为害程度日趋严重, 给农业生产造成巨大损失<sup>[2]</sup>。由于化学杀虫剂的滥用, 已导致害虫抗性上升、环境污染等严重后果。因此, 亟待加强 Bt 等生物农药的研究和利用。

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt), 是一种能够特异性毒杀害虫的革兰氏阳性细菌, 杀虫活性主要由 *cry* 基因所编码的杀虫蛋白起作用<sup>[3]</sup>。由于 Bt 杀虫蛋白具有对靶标害虫特异性毒杀以及对非靶标生物如小鼠、人等哺乳动物安全、无毒害等特点<sup>[4-5]</sup>, 已经成为世界上应用最为广泛的微生物杀虫剂<sup>[6-7]</sup>。1988 年第一个 *cry1Ca* 基因被克隆, 1990 年 Honée 首次报道了这个 *cry1Ca* 基因表达产物对甜菜夜蛾具有高毒杀作用<sup>[8]</sup>。迄今为止, 全球已有 14 个 *cry1Ca* 基因公布, 来自我国的 *cry1Ca* 基因数量达到 8 个 (Bt 杀虫蛋白国际命名委员会网站—[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/))。国内多家单位先后筛选出对甜菜夜蛾高毒力的 Bt 菌株, 如 S18-4<sup>[9]</sup>、WY-190<sup>[10]</sup> 和 Hcy 系列<sup>[11]</sup>、CZE99985<sup>[12]</sup>、G03<sup>[13]</sup> 等菌株。

本实验室在前期筛选对甜菜夜蛾高毒力菌株的基础上<sup>[14]</sup>, 继续加大力度, 采用菌株分型结合 PCR-RFLP 技术, 选取了已报道对甜菜夜蛾具有高毒力的 *cry1Ca* 基因<sup>[8,15-16]</sup> 作为切入点, 对我们近两年新分离的 Bt 菌株进行活性筛选与基因鉴定, 发掘对甜菜夜蛾具有高效杀虫活性的菌株, 发现了一批高毒力菌株, 这些菌株的共同特点就是都含有 *cry1Ca* 基因。本研究为高效毒杀甜菜夜蛾的 Bt 菌株的发掘与利用创造了条件。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 研究菌株来源

472 株野生 Bt 菌株为本实验室从国内土壤中分离、筛选并保存。

阳性对照菌株: HD-1Ca7 (*cry1Ca7* 基因转入 HD 73<sup>-</sup> 工程无晶体突变株), 以及 G03 野生 Bt 菌株, 含有 *cry1Aa*、*cry1Ac*、*cry1Ca*、*cry2Ab* 基因, 是由河北农林科学院植保所分离, 对甜菜夜蛾等夜蛾

科害虫具有高毒力。

#### 1.1.2 培养基

液体 LB 培养基: 胰蛋白胨 1%, 酵母抽提物 0.5%, NaCl 1%, pH 调至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

液体 1/2 LB 培养基: 胰蛋白胨 0.5%, 酵母抽提物 0.25%, NaCl 0.5%, 调 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

#### 1.1.3 试虫及人工饲料来源

甜菜夜蛾试虫由武汉科诺生物科技股份有限公司提供; 甜菜夜蛾试虫人工饲料由中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫组提供。

#### 1.1.4 主要生化试剂

引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; 核酸聚合酶、限制性内切酶以及标准 DNA、蛋白 marker 购自大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司; 胰蛋白酶 (1:250) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 第一抗体: 小鼠来源单抗, 购自美国一龙 (Envirologix) 公司; 第二抗体: HRP 标记的羊抗鼠单抗, 购自美国 Sigma 公司; 显色液: SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate 试剂盒购自 Thermo Scientific 公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 *cry1Ca* 基因简并引物设计

通过从 Bt 杀虫蛋白国际命名委员会网站—[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) 网址查询获得目前已报道的 *cry1Ca* 第 4 等级基因共有 14 个, 除 *cry1Ca10*、*cry1Ca14* 外的 12 条基因编码序列能够通过 GenBank 登录号从 NCBI 上下载; 将 12 条基因序列进行多序列比对, 设计出能够扩增 *cry1Ca* 基因全长的简并引物。

设计引物序列, 上游引物 5'-ATGGAGGAAAATA-ATCAAAATC-3', 下游引物 5'-ATTASTCCTTATG-GAGGAATAA-3'。

### 1.2.2 Bt 菌株基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 提取参考张彦蕊等<sup>[17]</sup>的方法。

### 1.2.3 Bt 菌株 *cry1Ca* 基因鉴定

对 472 个基因组进行分组, 以 5~7 个菌株基因组混合作为一组模板, 利用 *cry1Ca* 基因简并引物首先进行第一轮 PCR 扩增, 然后对能够扩增出信号的混合基因组再分别进行第二轮筛选, 最终确定到菌株。

PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性

45 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 3.5 min, 30 次循环; 72 °C 延伸 10 min。

PCR 反应体系: 2×PCR Taq Mixture 10 μL, 引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 超纯水 7 μL, 总计 20 μL 体系。

#### 1.2.4 *cry1Ca* 基因的扩增、克隆与测序分析

包括 *Cry1Ca* 原毒素在内的所有 130 ku *Cry* 蛋白都包含一个位于 N 末端、600 氨基酸的活性区域<sup>[18]</sup>(C 末端与杀虫作用无关)。因此从基因的 5' 端到约 2.2 kb 设计引物, 利用 PrimeStar 高保真聚合酶扩增, 产物连接载体送测序。设计引物序列: 上游引物 5'-ATGGAGGAAAATAATCAAAATC-3', 下游引物 5'-AATTAAAAGCTTATACCCGT-3'。

PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 次循环; 72 °C 延伸 10 min。

PCR 反应体系: 2×PrimeStar 10 μL, 引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 超纯水 7 μL, 总计 20 μL 体系。

测序交由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

#### 1.2.5 菌株晶体形态观察

利用 1/2 LB 培养基对供试菌株培养 30 h, BX 63 显微镜(日本 Olympus)进行 100×油镜观察并拍照, 具体方法参见文献<sup>[19]</sup>。

#### 1.2.6 菌株 *cry* 基因多样性分析

采用 PCR-RFLP 技术对筛选出的野生菌株进行 *cry* 基因类型的多样性分析; 简并引物及 PCR-RFLP 流程参考束长龙建立的方法<sup>[20]</sup>。该对简并引物是作者根据多类 *cry* 基因的保守区同源序列经过聚类分析所设计, 利用 *Hinf* I 限制性内切酶对扩增产物进行酶切, 能够展示出不同带型的酶切图谱, 有助于对不同 Bt 菌株的 *cry* 基因组成进行差别鉴定。

参考引物序列: 上游引物 con\_1f 序列 5'-TATGC-WCAAGCWGCCAATYTWCATYT-3', 下游引物 con\_5r 序列 5'-GGRATAAATCAATTYKRTCWA-3'。

PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 38 °C 退火 2 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 次循环; 72 °C 延伸 10 min。

PCR 反应体系: 2×PCR Taq Mixture 15 μL, 引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 超纯水 12 μL, 总计 30 μL。

PCR 酶切体系: PCR 产物 10 μL, 酶切缓冲液

3 μL, *Hinf* I 1 μL, 超纯水 16 μL, 37 °C 反应 2 h。

#### 1.2.7 *Cry* 蛋白提取、胰蛋白酶消化以及定量

菌株 *Cry* 蛋白提取采用 1/2 LB 液体培养基、重复溶解的方法进行提取, 具体详见 Zhou 等的方法<sup>[19]</sup>。菌株提取 *Cry* 蛋白的 SDS-PAGE 分析参考萨姆布鲁克等<sup>[21]</sup>的方法进行; 并以 1.0 μg(浓度为 0.2 mg/mL)牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白进行条带定量, 定量采用图像分析软件(Image J)测定电泳条带灰度值, 并根据标准 BSA 浓度计算 *Cry* 蛋白浓度。参考 Bravo 文献<sup>[22]</sup>选择胰蛋白酶(1:250)对提取的 *Cry* 蛋白进行消化; 按照质量比 1:10(胰蛋白酶:*Cry* 蛋白质)加入胰蛋白酶, 37 °C 下消化 2 h, 继而对消化蛋白条带进行 SDS-PAGE 分析、定量。

#### 1.2.8 Western Blotting 对筛选菌株 *cry1Ca* 基因表达检测

对供试菌株所提取 *Cry* 蛋白的消化产物进行 10% SDS-PAGE 电泳: 2 块凝胶重复, 其中 1 块作为平行胶进行考马斯亮蓝染色, 另一块用于 Western Blotting 分析。利用 eBlot 快速转印仪(中国 Gen-script)10 min 将胶上蛋白转移至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉(1×TBS-T 溶解)室温封闭 2 h; 1×TBS-T 漂洗 3 次, 每次 10 min; 加入 TBS-T 稀释的鼠抗 *Cry1Ca* 蛋白单克隆抗体(1:1 000), 室温孵育 1 h; 1×TBS-T 漂洗 3 次, 每次 10 min; 加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗(1:2 000), 室温孵育 1 h; 1×TBS-T 漂洗 3 次, 每次 10 min; 膜上加显色液, 利用 ImageQuant LAS 4000 mini 凝胶成像仪(美国 GE Healthcare)进行曝光、拍照。

#### 1.2.9 甜菜夜蛾杀虫活性的测定

甜菜夜蛾杀虫活性的初步测定: 处理组样品为所筛选 22 株野生 Bt 菌株、对照菌株 G03、HD-1Ca7 菌株提取的 *Cry* 蛋白, 共计 24 组; 添加一定比例胰蛋白酶的 50 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(pH=10.0)溶液设立为阴性对照组。按照 10 g/重复称取人工饲料分别置于规格为 60 mm 的培养皿中, 分别加入 1 mL 待测样品溶液, 并将其充分混合均匀。每处理组设初始浓度 70 μg/g、1/10 初始浓度 7 μg/g, 每个浓度 2 个重复, 每重复接初孵试虫 30 头。完成分装并放置于 26 °C 光照培养箱(光周期 L//D=12 h//12 h)进行为期 7 d 的培养。每天检查培养箱内温度、相对湿度及饲料是否变质; 到期分别调查试虫死、活虫数目, 统计并计算校正死亡率<sup>[23]</sup>。校正死亡率计算公

式如下:

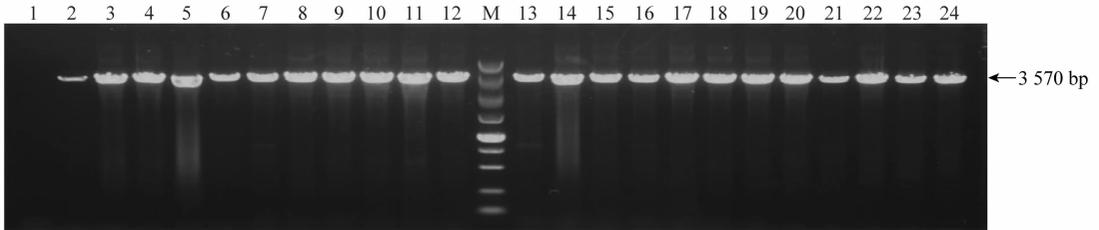
校正死亡率(%)=[(处理组死亡率-对照组死亡率)/(1-对照组死亡率)]×100%。

菌株 LC<sub>50</sub> 值测定:选择对照菌株 G03、HD-1Ca7 菌株以及经 PCR-RFLP 分析、cry 基因组成有差异的菌株进行复筛;LC<sub>50</sub> 梯度设立 6.000、2.000、0.667、0.222、0.074、0.025 μg/g 共 6 个浓度,每个浓度 3 个重复,每重复接 30 头初孵试虫,其他流程同初筛。参考 Vincent<sup>[24]</sup> 的方法,利用 SPSS 13.0 软件进行 LC<sub>50</sub> 值的计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 含有 cry1Ca 基因菌株鉴定与测序分析

利用所设计引物对 472 个提取的野生 Bt 菌株基因组进行 PCR 扩增,经过琼脂糖凝胶电泳,最终筛选发现 22 株野生 Bt 菌株能够扩增出大小为 3 570 bp 的明显条带(图 1)。测序结果同已知的 cry1Ca 基因进行比对,结果发现 22 条基因 5' 端到约 2.2 kb 序列同 cry1Ca7 基因的活性区域序列完全相同。



1~12: 阴性对照、HD-1Ca7 阳性对照、B15-B4、B16-C8、C12-C8、T1-A2、T1-A5、T1-B8、T1-E12、T1-E10、T1-D7、T1-F10; M: DNA marker DL 5000 (分子量自上至下分别为 5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp); 13~24: T1-F1、T1-E9、T2-C8、T2-C5、T2-D2、T2-C12、T2-D10、T3-A8、T3-C12、T3-E10、T4-C10、T5-E8  
1~12: Negative control, HD-1Ca7 positive control, B15-B4, B16-C8, C12-C8, T1-A2, T1-A5, T1-B8, T1-E12, T1-E10, T1-D7, T1-F10; M: DNA marker DL 5 000 (molecular weight is 5 000, 3 000, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250 and 100 bp respectively from top to bottom); 13~24: T1-F1, T1-E9, T2-C8, T2-C5, T2-D2, T2-C12, T2-D10, T3-A8, T3-C12, T3-E10, T4-C10, T5-E8

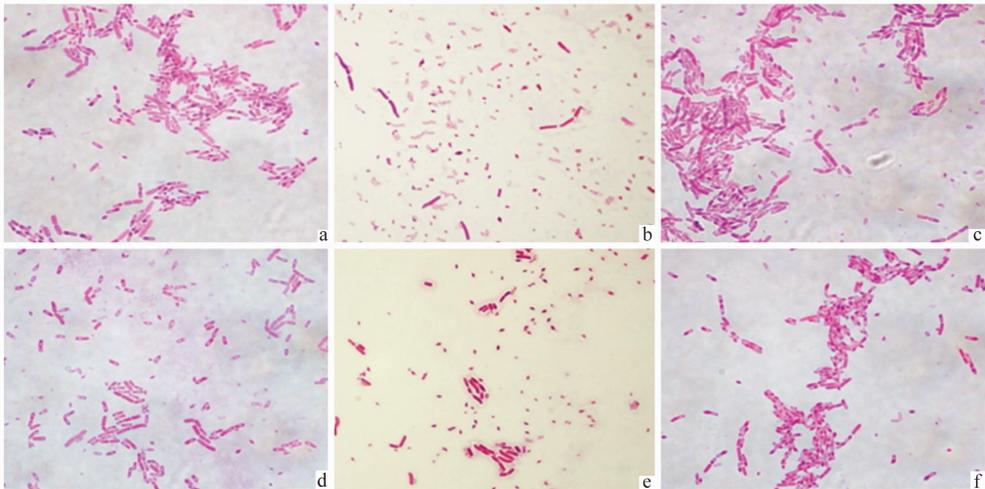
图 1 22 株 Bt 菌株中 cry1Ca 基因 PCR 扩增鉴定结果

Fig. 1 Amplification results of cry1Ca gene from 22 Bt isolates by PCR

### 2.2 菌株晶体形态观察

对 22 株 Bt 菌株进行光学显微镜晶体形态观

察,发现这 22 株菌株晶体均呈现出与参照菌株 G03 一致的双锥体形(图 2)。



a-f: 分别为菌株 G03、T1-E12、T2-C5、B16-C8、T1-E9、T5-E8 的晶体形态;放大 1 000 倍  
a-f: The crystalline morphology of strains G03, T1-E12, T2-C5, B16-C8, T1-E9 and T5-E8; 1 000×

图 2 部分 Bt 菌株晶体形态的光学显微镜观察结果

Fig. 2 Morphology of partial Bt isolates under optical microscope

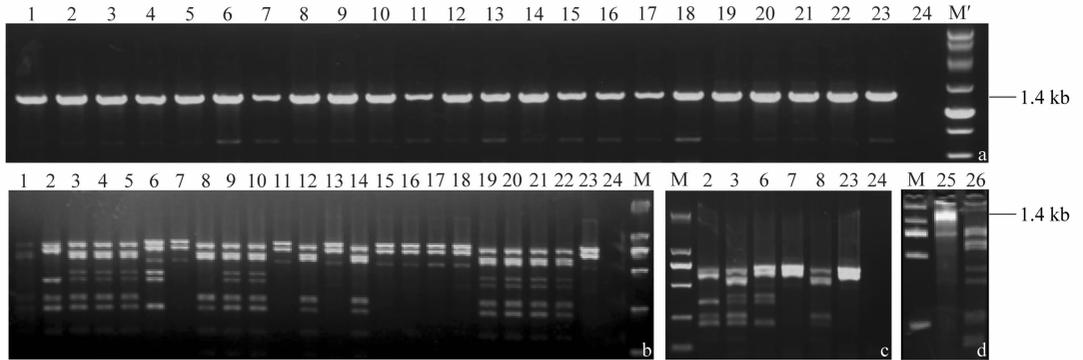
### 2.3 利用 PCR-RFLP 对筛选菌株进行 cry 基因多样性鉴定

利用该对简并引物对 22 株野生菌株进行 PCR

扩增,结果显示从这些菌株基因组中均能够扩增出一条大小约为 1.4 kb 的明显条带(图 3a);继而对扩增的 1.4 kb 条带进行 Hinf I 限制性内切酶酶切,经

2%琼脂糖凝胶电泳,结果展示出不同酶切图谱(图 3b)。对酶切图谱条带数目以及大小进行分析,确定这 22 个样品酶切带型汇总为 5 类(图 3c),其中类型 1 对应菌株为 B16-C8;类型 2 对应菌株为 C12-C8、T1-A2、T1-A5、T1-D7、T1-F10、T3-C12、T3-E10、

T4-C10、T5-E8 共 9 株;类型 3 对应菌株为 T1-B8;类型 4 为 T1-E12、T1-F1、T2-C8、T2-D2、T2-C12、T2-D10、T3-A8 共 7 株;类型 5 为 B15-B4、T1-E10、T1-E9、T2-C5 共 4 株。G03 菌株 PCR-RFLP 结果(图 3d),其酶切图谱与类型 2 相似。



a-d: 分别为以 con\_1f/con\_5r 引物对 Bt 菌株进行 PCR 扩增(a)及 *Hinf* I 酶切图谱结果(b); 酶切图谱分类结果(c); G03 菌株 PCR-RFLP 图谱(d); 1~24: 22 株筛选菌株, HD-1Ca7 阳性对照; 24: 阴性对照; 25: G03 1.4 kb 扩增产物; 26: G03 扩增产物经 *Hinf* I 酶切图; M': DNA marker DL 5 000; M: DNA marker DL 2 000 (分子量自上至下为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp)

a-d: Electrophoresis of PCR-amplified products of Bt strains by using primers con\_1f/con\_5r(a); restriction enzyme patterns of PCR products digested with *Hinf* I (b); comparison and classification of restriction mapping (c); PCR-RFLP mapping of G03(d); 1-24: 22 screened Bt strains, HD-1Ca7 positive control; 24: Negative control; 25: G03 1.4 kb PCR product; 26: G03 PCR-RFLP mapping; M': DNA marker DL 5 000; M: DNA marker DL 2 000 (molecular weight is 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp respectively from top to bottom)

图 3 22 株 Bt 菌株 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定结果

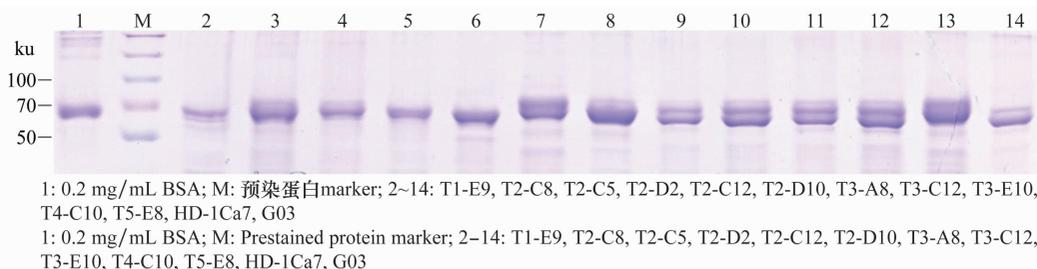
Fig. 3 Identification results of *cry* genes of 22 Bt isolates by PCR-RFLP

## 2.4 Cry 蛋白提取、消化、定量

对供试菌株提取的 Cry 蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果显示菌株均表达分子量大小约为 130 ku 的蛋白(图 4)。按照条带扫描情况计算出了 Cry 蛋白浓度;利用胰蛋白酶按照比例消化原毒素,图 5 是 2 h 消化结果,130 ku 消失,蛋白条带集中于 60 ku 附近,并完成了消化条带的定量计算。

## 2.5 Western Blotting 分析结果

利用 Cry1Ca 抗体对 Cry 蛋白消化产物进行 Western Blotting 分析,结果显示,样品在 60 ku 均获得较好杂交条带(图 6 b),与 Cry1Ca 阳性对照一致。



1: 0.2 mg/mL BSA; M: 预染蛋白marker; 2~14: T1-E9, T2-C8, T2-C5, T2-D2, T2-C12, T2-D10, T3-A8, T3-C12, T3-E10, T4-C10, T5-E8, HD-1Ca7, G03

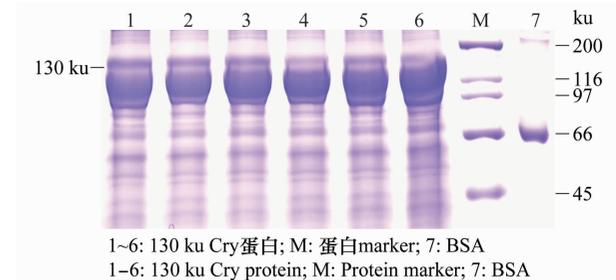
1: 0.2 mg/mL BSA; M: Prestained protein marker; 2~14: T1-E9, T2-C8, T2-C5, T2-D2, T2-C12, T2-D10, T3-A8, T3-C12, T3-E10, T4-C10, T5-E8, HD-1Ca7, G03

图 5 胰蛋白酶活化 Cry 蛋白样品分析结果

Fig. 5 Analysis of Cry protein digested with trypsin

## 2.6 甜菜夜蛾杀虫活性的测定结果

经定量计算的 Cry 蛋白消化产物,取终浓度为



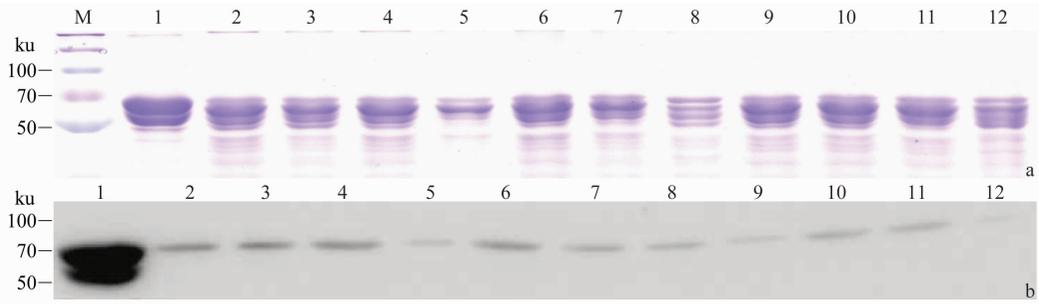
1~6: 130 ku Cry 蛋白; M: 蛋白marker; 7: BSA  
1-6: 130 ku Cry protein; M: Protein marker; 7: BSA

图 4 部分 Bt 菌株提取 Cry 蛋白原毒素的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 4 Partial results of SDS-PAGE analysis of protoxin extracted from screened Bt strains

70、7  $\mu\text{g/g}$  分别对甜菜夜蛾进行初步生测,结果说明供试菌株对甜菜夜蛾均有较高毒力(表 1);在

70  $\mu\text{g/g}$  浓度下, 22 株菌株校正死亡率在 96% 以上(19 株菌同对照菌株 G03、HD-1Ca7, 校正死亡率为 100%), 且存活虫体大小同初孵, 无明显增

长; 7  $\mu\text{g/g}$  浓度下, 有 18 株菌校正死亡率在 90% 以上, 3 株菌校正死亡率在 84%~90% 之间, 1 株为 75.4%。



a: 考马斯亮蓝染色结果; b: Cry1Ca免疫印迹结果; M: 预染蛋白marker; 1: HD-1Ca7; 2~12: 部分供试Bt菌株  
a: Results of gel stained with Coomassie brilliant blue; b: Results of Western Blotting; M: Prestained protein marker; 1: HD-1Ca7; 2~12: Partial screened Bt isolates

图 6 Western Blotting 分析结果

Fig. 6 Analysis of Cry1Ca proteins by Western Blotting

表 1 Bt 活化毒素对甜菜夜蛾初步生物活性测定结果<sup>1)</sup>

Table 1 Preliminary bioassay results of Bt toxins against the larvae of *Spodoptera exigua*

菌株 Strain	70 $\mu\text{g/g}$		7 $\mu\text{g/g}$		菌株 Strain	70 $\mu\text{g/g}$		7 $\mu\text{g/g}$	
	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality		死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality
B16-C8	100.0	100.0	96.7	96.5	T2-C8	100.0	100.0	96.7	96.5
C12-C8	98.2	98.1	94.7	94.4	T2-D2	100.0	100.0	98.5	98.4
T1-A2	100.0	100.0	95.0	94.7	T2-C12	100.0	100.0	98.3	98.2
T1-A5	100.0	100.0	96.6	96.4	T2-D10	100.0	100.0	96.8	96.6
T1-D7	100.0	100.0	76.7	75.4	T3-A8	100.0	100.0	98.3	98.2
T1-F10	100.0	100.0	85.5	84.7	B15-B4	100.0	100.0	98.4	98.3
T3-C12	100.0	100.0	89.8	89.2	T1-E10	100.0	100.0	90.3	89.8
T3-E10	100.0	100.0	100.0	100.0	T1-E9	100.0	100.0	100.0	100.0
T4-C10	100.0	100.0	93.4	93.0	T2-C5	100.0	100.0	95.0	94.7
T5-E8	100.0	100.0	96.7	96.5	G03(CK <sup>+</sup> )	100.0	100.0	88.3	87.7
T1-B8	100.0	100.0	100.0	100.0	HD-1Ca7(CK <sup>+</sup> )	100.0	100.0	98.3	98.2
T1-E12	96.8	96.6	96.6	96.4	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (CK <sup>-</sup> )			5.2	—
T1-F1	98.4	98.3	96.6	96.4					

1) 左栏 22 个 Bt 菌株样品从上至下按照 5 类 PCR-RFLP 酶切图谱以虚线相隔, 进行排序。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 50 mmol/L, pH=10.0。  
22 Bt isolates in the left column are sorted from top to bottom by 5 patterns of restriction fragment which are separated by dotted line.  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 50 mmol/L, pH=10.0.

根据初步生物活性结果并结合基因鉴定酶切图谱差异分析, 从 5 个类型 Bt 菌株中各选取 1 株毒力高的为代表(B16-C8、C12-C8、T1-B8、T1-E12、T1-E10)进行 LC<sub>50</sub> 测定; 生测结果表明(表 2), T1-E12(0.087  $\mu\text{g/g}$ )、B16-C8(0.103  $\mu\text{g/g}$ )、T1-B8(0.202  $\mu\text{g/g}$ ) 的活性很高, 与阳性对照菌株 G03(0.090  $\mu\text{g/g}$ ) 相当; 而菌株 C12-C8(0.610  $\mu\text{g/g}$ )、T1-E10(0.677  $\mu\text{g/g}$ ) 的 LC<sub>50</sub> 接近, 毒力分别比对照菌株 G03 低 6.8 倍和 7.5 倍。

表 2 Bt 活化毒素对甜菜夜蛾生物活性测定结果

Table 2 Bioassay results of Bt toxins against the larvae of *Spodoptera exigua*

菌株 Strain	致死中浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ LC <sub>50</sub>	95% 置信区间/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 95% Confidence interval
T1-E12	0.087	0.056~0.124
B16-C8	0.103	0.056~0.164
T1-B8	0.202	0.107~0.332
C12-C8	0.610	0.430~0.829
T1-E10	0.677	0.445~0.996
G03(CK <sup>+</sup> )	0.090	0.052~0.136
HD-1Ca7(CK <sup>+</sup> )	0.098	0.059~0.145

### 3 讨论

70 多年来, Bt 菌株作为微生物杀虫剂已经取得了巨大的成功<sup>[6]</sup>。虽然 Bt 在生物农药中所占比例最高, 但整个生物农药在农药中所占比重还非常小, 因此针对甜菜夜蛾等重要害虫新型高效 Bt 菌株的挖掘仍然有很大的发展空间。

本研究以对甜菜夜蛾高毒力的 *cry1Ca* 基因鉴定入手, 从 472 株野生 Bt 菌株中成功筛选到 22 株包含 *cry1Ca* 基因的野生 Bt 菌株, 并通过 Western Blotting 分析证实了这些 *cry1Ca* 基因的表达。利用本实验室近期建立的、基于 PCR-RFLP 技术进行菌株分型<sup>[20]</sup>, 将这些菌株分为 5 种类型。在此基础上, 筛选到 T1-E12、B16-C8 和 T1-B8 三个菌株, 它们对甜菜夜蛾幼虫的活性与阳性对照 G03 菌株相当。G03 菌株是由河北农林科学院植物保护研究所在执行“八五”攻关项目期间分离获得的, 对甜菜夜蛾、棉铃虫等夜蛾科以及小菜蛾、亚洲玉米螟等害虫具有高毒力。目前, 该菌株已经作为受体菌构建了对鳞翅目、鞘翅目害虫的工程菌株, 并于 2014 年 12 月获得农业部颁发的转基因生物生产应用证书<sup>[13]</sup>, 正在进行农药登记。这 3 个高毒力菌株的获得, 将丰富我国杀虫菌株资源, 为新型 Bt 生物农药产业化奠定了基础。

*cry1Ca* 第四等级基因自 1988 年到 2015 年共报道 14 个(其中由中国提交的基因有 8 个, 占 57.1%); 而 *cry1Ac* 第四等级基因从 1985 年到 2015 年, 共报道发现 38 个(其中由中国提交的基因有 16 个, 占 42.1%)(Bt 杀虫蛋白国际命名委员会网站 [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)), *cry1Ca* 基因的总数远低于 *cry1Ac* 基因。从基因鉴定的层面发现, 在野生 Bt 菌株中的丰度和分布, 前者远远低于后者<sup>[25-26]</sup>。由此推测: 在自然界中, *cry1Ca* 基因可能比 *cry1Ac* 基因更加保守, 而且在自然界中分布有限。本文研究结果也印证了这一点: 472 个菌株仅有 22 个菌株含有 *cry1Ca* 基因, 而且 5 种类型的 22 个菌株中的 *cry1Ca* 基因全部为 *cry1Ca7*。因此若要挖掘新型 *cry1Ca* 基因仍需付出更大的努力。

Western Blotting 结果证明这些菌株中 *cry1Ca* 基因都表达了 Cry1Ca 蛋白, 生物活性测定结果显示供试菌株活化蛋白展示了很高的杀虫活性; 但是这样的高活性是仅仅来自于 Cry1Ca 蛋白的单独贡献, 还是其他 Cry 蛋白协同增效, 仍然需要进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Robinson G S, Ackery P R, Kitching I J, et al. HOSTS—A database of the world's lepidopteran hostplants [EB/OL]. Natural History Museum, London. Accessed on August, 2010. <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/hostplants/>
- [2] 文礼章, 文意纯, 诸凤丹, 等. 我国甜菜夜蛾间歇性暴发频度的大尺度地理差异及其成因分析[J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(1): 232-247.
- [3] Whalon M E, McGaughey W H. *Bacillus thuringiensis*: use and resistance management [M]. Insecticides with novel modes of action. Springer Berlin Heidelberg, 1998: 106-137.
- [4] Siegel J P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2001, 77(1): 13-21.
- [5] Song Yan, Liang Chunlai, Wang Wei, et al. Immunotoxicological evaluation of corn genetically modified with *Bacillus thuringiensis cry1Aa* gene by a 30-day feeding study in BALB/c mice [J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): e78566.
- [6] Bravo A, Likitvatanavong S, Gill S S, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(7): 423-431.
- [7] Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62: 775-806.
- [8] Honée G, Vriezen W, Visser B. A translation fusion product of two different insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* exhibits an enlarged insecticidal spectrum [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(3): 823-825.
- [9] 蒋冬花, 邓日强, 庞义, 等. 对夜蛾科幼虫高毒力的苏云金芽孢杆菌菌株及其晶体蛋白特性[J]. 中国生物防治, 1997, 13(2): 82-85.
- [10] 牛桂兰, 闫建平, 郑大胜, 等. 高毒效杀甜菜夜蛾苏云金芽孢杆菌 WY-190[J]. 中国生物防治, 2002, 18(4): 166-170.
- [11] 高梅影, 戴顺英, 彭可凡, 等. 苏云金杆菌 *cry1C* 基因检测及其与杀虫活性的关系[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(5): 19-21.
- [12] 陈在佺, 吴继星, 张志刚. 对甜菜夜蛾高毒苏云金芽孢杆菌菌株 CZE99985 的研究[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(5): 31-33.
- [13] Wang Guangjun, Zhang Jie, Song Fuping, et al. Engineered *Bacillus thuringiensis* GO33A with broad insecticidal activity against lepidopteran and coleopteran pests [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5): 924-930.
- [14] 郭靖, 周子珊, 蔡吉林, 等. 对甜菜夜蛾具有高毒力的 Bt 菌株筛选[J]. 植物保护, 2013, 39(1): 8-13.
- [15] Hernández-Martínez P, Ferré J, Escriche B. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 97(3): 245-250.

- ically-based Rodent Management. ACIAR Monograph, 1999, 59:119-214.
- [17] 王大伟, 丛林, 王宇, 等. 繁殖季节和非繁殖季节布氏田鼠种群参数和生理特点的差异[J]. 生态学报, 2010(13): 3562-3568.
- [18] 张学昌. 雄性布氏田鼠 *Stra8*、*Scp3* 和 *Dmc1* 基因的克隆及其季节性表达分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [19] 内蒙古锡林郭勒盟卫生防疫站. 布氏田鼠的生态研究[J]. 动物学报, 1975(1): 30-39.
- [20] 罗泽珣, 郝守身, 梁志安, 等. 呼伦贝尔草原有关布氏田鼠防治方面的某些生物学研究[J]. 动物学报, 1975, 21(1): 51-61.
- [21] 张洁, 周庆强, 钟文勤, 等. 布氏田鼠种群年龄的研究[J]. 动物学报, 1978, 24(4): 344-357.
- [22] 张洁, 钟文勤. 布氏田鼠种群繁殖的研究[J]. 动物学报, 1979, 25(3): 250-259.
- [23] 武晓东. 用标志重捕法对布氏田鼠的分居, 种群组成和生态寿命的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 1988(1): 12.
- [24] 殷宝法, 魏万红, 张堰铭, 等. 小型哺乳动物的繁殖投入与繁殖成功率[J]. 兽类学报, 2003, 23(3): 259-265.
- [25] 宛新荣, 钟文勤, 刘伟, 等. 布氏田鼠的繁殖启动与繁殖适应对策[C]//中国动物学会兽类学分会第六届会员代表大会暨学术讨论会论文摘要集, 2004.
- [26] Liu Xiaohui, Yue Lingfen, Wang Dawei, et al. Inbreeding avoidance drives consistent variation of fine-scale genetic structure caused by dispersal in the seasonal mating system of brandt's voles[J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): e58101.
- [27] 张建军, 施大钊. 布氏田鼠雄性的优势地位[J]. 动物学杂志, 2006, 40(6): 19-24.
- [28] 宛新荣, 张新阶, 刘伟, 等. 布氏田鼠标志种群的社群等级及其季节变化[J]. 生态学杂志, 2007, 26(3): 359-362.
- [29] Cant M A. Social control of reproduction in banded mongooses [J]. Animal Behaviour, 2000, 59(1): 147-158.
- [30] Marchlewska-Koj A. Sociogenic stress and rodent reproduction [J]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 1997, 21(5): 699-703.
- [31] 孙儒泳, 张玉书, 方喜叶. 啮齿类繁殖生态研究中雄性繁殖强度的意义[J]. 动物学报, 1977, 23(2): 187-199.
- [32] 齐晓光. 秦岭川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*) 的繁殖策略、社会组织与个体扩散迁移机制的研究[D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [33] 刘力宽, 刘季科. 6-MBOA 对植食性小哺乳类繁殖作用的研究进展[J]. 兽类学报, 1998, 18(1): 60-67.
- [34] Meek L R, Lee T M, Gallon J F. Interaction of maternal photoperiod history and food type on growth and reproductive development of laboratory meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) [J]. Physiology & Behavior, 1995, 57(5): 905-911.
- [35] Solomon N G. Effect of the pre-weaning environment on subsequent reproduction in prairie voles, (*Microtus ochrogaster*) [J]. Animal Behaviour, 1994, 48(2): 331-341.
- [36] Stetson M H, Elliott J A, Goldman B D. Maternal transfer of photoperiodic information influences the photoperiodic response of prepubertal Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*) [J]. Biology of Reproduction, 1986, 34(4): 664-669.
- [37] 刘力宽, 刘季科, 苏建平. 光周期对环青春期雄性根田鼠繁殖发育的作用与光周期信息的母体传递模式[J]. 兽类学报, 2001, 21(1): 57-66.
- (责任编辑: 田 喆)
- 
- (上接 25 页)
- [16] Dingha B N, Moar W J, Appel A G. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin on the metabolic rate of Cry1C resistant and susceptible *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Physiological Entomology, 2004, 29(5): 409-418.
- [17] 张彦蕊, 束长龙, 宋福平, 等. 一种简单、快速的苏云金芽胞杆菌基因组 DNA 提取方法[J]. 生物技术通报, 2012(11): 197-201.
- [18] Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins; mode of action, insect resistance and consequences for crop protection[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(1): 3-22.
- [19] Zhou Zishan, Yang Sujuan, Shu Changlong, et al. Comparison and optimization of the method for Cry1Ac protoxin preparation in HD73 strain [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(8): 1598-1603.
- [20] 束长龙. 苏云金芽胞杆菌资源多样性分析与杀虫基因发掘[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 29-30.
- [21] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 著. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [22] Bravo A, Sánchez J, Kouskoura T, et al. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(27): 23985-23987.
- [23] Abbott W S. A method of computing the effectiveness of an insecticide [J]. Journal of Economic Entomology, 1925, 18(2): 265-267.
- [24] Vincent K. Probit analysis [EB/OL]. The San Francisco State University. Department of Biology Document Repository. Last Accessed on March, 2010. <http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf>
- [25] 朱军, 谭芙蓉, 余秀梅, 等. 四川盆地生态区苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因的鉴定及新型模式 *cry* 基因的克隆[J]. 微生物学报, 2009(3): 324-330.
- [26] Shu Changlong, Liu Dongming, Zhou Zishan, et al. An improved PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for the identification of *cry1*-type genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(21): 6706-6711.
- (责任编辑: 田 喆)