

研究报告

Research Reports

对黏虫具有杀虫活性的 Bt 蛋白筛选及分析

杨素娟^{1,2}, 黄闽忠^{1,2}, 李艳秋^{1,2}, 周子珊²,
江幸福², 高继国¹, 程云霞², 张杰^{2*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 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 为筛选对黏虫[*Mythimna separata* (Walker)]具有毒杀作用的苏云金芽胞杆菌杀虫蛋白,本研究提取 Cry1 类、Cry2 类、Cry9 类及 Vip3A 类等 11 种蛋白,通过人工饲料喂毒方法对黏虫进行生物活性测定。结果表明, Cry1Ac、Cry1Ab、Cry2Ab、Cry1Be 及 Cry1Bb 蛋白对黏虫具有杀虫活性,其致死中浓度依次为 5.09、17.71、26.75、27.42 及 43.93 $\mu\text{g/g}$; Cry9Aa、Cry9Eb、Cry9Ee 蛋白对黏虫生长具有抑制作用,其浓度为 10 $\mu\text{g/g}$ 时的体重抑制率分别为 78.4%、79.0%、86.9%,浓度为 100 $\mu\text{g/g}$ 时的体重抑制率分别为 92.8%、95.7%、96.7%; Cry1Ba、Cry1Ca 和 Vip3Aa 蛋白对黏虫无显著活性。本研究为黏虫的生物防治奠定了基础,并为抗虫转基因作物的研究提供优良的候选基因。

关键词 苏云金芽胞杆菌; Cry 蛋白; 黏虫; 杀虫活性; 生长抑制

中图分类号: S 476.11 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.03.005

Screening and analysis of insecticidal activity of protein from *Bacillus thuringiensis* against *Mythimna separata*

Yang Sujuan^{1,2}, Huang Minzhong^{1,2}, Li Yanqiu^{1,2}, Zhou Zishan²,
Jiang Xingfu², Gao Jiguo¹, Cheng Yunxia², Zhang Jie²

(1. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, 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 In order to investigate the insecticidal activity of some *Bacillus thuringiensis* proteins against *Mythimna separata* (Walker), 11 proteins of Cry1, Cry2, Cry9 and Vip3A were extracted and used for bioassay against *M. separata* by feeding artificial diet. The bioassay results showed that Cry1Ac, Cry1Ab, Cry2Ab, Cry1Be and Cry1Bb had insecticidal activity against *M. separata* larvae, with a LC_{50} value of 5.09 $\mu\text{g/g}$, 17.71 $\mu\text{g/g}$, 26.75 $\mu\text{g/g}$, 27.42 $\mu\text{g/g}$ and 43.93 $\mu\text{g/g}$, respectively. Cry9Aa, Cry9Eb and Cry9Ee only inhibited growth of *M. separata*, with a growth inhibition rate of 78.4%, 79.0% and 86.9% at the concentration of 10 $\mu\text{g/g}$, and with an inhibition rate of 92.8%, 95.7% and 96.7%, respectively, at the concentration of 100 $\mu\text{g/g}$. However, Cry1Ba, Cry1Ca and Vip3Aa showed no apparent toxicity to *M. separata* larvae. It lays the foundation for biological control of *M. separata*, and may provide some excellent candidate genes for insect-resistant genetically modified crops.

Key words *Bacillus thuringiensis*; Cry protein; *Mythimna separata*; insecticidal activity; growth inhibition

黏虫[*Mythimna separata* (Walker)]属于鳞翅
目夜蛾科,是一种典型的远距离迁飞害虫,主要为害

玉米、小麦和水稻等禾谷类粮食作物以及棉花、豆类、
蔬菜等上百种植物,严重时造成作物减产甚至绝

收稿日期: 2015-03-25

修订日期: 2015-04-14

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2014ZX08004-009);公益性行业(农业)科研专项(201403031)

* 通信作者 E-mail: jzhang@ippcaas.cn

收^[1],在亚洲和澳洲经常暴发成灾^[2]。在我国,除新疆以外,全国各地均有发生。近年来,黏虫在我国的发生为害呈严重趋势,2012—2013 年全国黏虫连续暴发,其发生面积之大、虫口密度之高、损失之重,均属历史罕见,严重威胁我国粮食生产安全^[3]。黏虫的化学防治已经产生了诸多负面影响,如黏虫抗药性增强、环境污染、农产品质量安全隐患等严重后果,为实现黏虫的综合治理,亟须开辟生物防治等绿色防控途径。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)产生的晶体蛋白(Bt 蛋白)是主要的杀虫成分,对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等多种害虫,以及一些线虫、螨类和原生动物具有特异性的杀虫活性^[4]。

Bt 蛋白针对不同夜蛾科昆虫的活性,国外已有不少研究报道。Cry1C、Cry1F 对甜菜夜蛾[*Spodoptera ex-empta* (Walker)]具有高毒力,而 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1B、Cry1D 对其有生长抑制作用^[5]。Cry1Ab、Cry1Bb、Cry1Fa、

Cry2Aa、Cry1Ia 和 Vip3Aa 对草地贪夜蛾[*Spodoptera fru-giperda* (Smith)]具有毒杀作用^[6-9]。在国内,相对于 Bt 对棉铃虫和玉米螟的杀虫作用研究,Bt 蛋白对黏虫杀虫活性研究相对滞后,关注较少。仅有少数报道发现 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Ac 蛋白对黏虫具有杀虫活性^[10-12]。

针对黏虫为害加重的现状,本文以本实验室 11 种 Bt 杀虫蛋白为基础,通过测定其 LC₅₀、体重抑制率从而获得对黏虫有活性的蛋白,再对这些蛋白进行序列分析比较研究,系统筛选对黏虫具有较高活性的杀虫蛋白。研究结果可为黏虫的生物防治提供菌株和蛋白资源,为我国抗虫转基因作物的研究提供优良的候选基因。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基
供试菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strain and plasmid	描述 Description	来源 Source
<i>E. coli</i>		
TG1	$\Delta(lac-proAB) supE thi hsd-5 (F' traD36 proA^{+} proB^{+} lacI^{q} lacZ\Delta M15)$	本实验室贮存
BL21	$F^{-}, ompT hsdS_B(r_B m_B^{-}), gal(\lambda CI 857, ind1, Sam^{r}, nin5, lacUV5-T7 gene1), dcm (DE3)$	本实验室贮存
BL21(DE3)-vip3Aa11	含有携带 <i>vip3Aa11</i> 基因的质粒 pSTK-3Aa11 (8.1 kb, Km ^r)	本实验室贮存
Rosetta(DE3)-1Ba3	含有携带 <i>cry1Ba3</i> 基因的质粒 pEB-1Ba3 (9.3 kb, Amp ^r , Cam ^r)	本实验室贮存
Rosetta(DE3)-1Bb2	含有携带 <i>cry1Bb2</i> 基因的质粒 pEB-1Bb2 (9.3 kb, Amp ^r , Cam ^r)	本实验室贮存
BL21(DE3)-1Be4	含有携带 <i>cry1Be4</i> 基因的质粒 pEB-1Be4 (9.3 kb, Amp ^r)	本研究构建
Rosetta(DE3)-9Aa3	含有携带 <i>cry9Aa3</i> 基因的质粒 pEB-9Aa3 (9.1 kb, Amp ^r , Cam ^r)	本实验室贮存
Rosetta(DE3)-9Eb1	含有携带 <i>cry9Eb1</i> 基因的质粒 pEB-9Eb1 (9.1 kb, Amp ^r , Cam ^r)	本实验室贮存
Rosetta(DE3)-9Ee1	含有携带 <i>cry9Ee1</i> 基因的质粒 pEB-9Ee1 (9.1 kb, Amp ^r , Cam ^r)	本实验室贮存
<i>B. thuringiensis</i>		
HD73	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> 标准菌株,含有 <i>cry1Ac1</i> gene	本实验室贮存
HD73 ⁻	HD73 无晶体突变株	本实验室贮存
Biot2Ab4	含有携带 <i>cry2Ab4</i> 基因的质粒 <i>pSXY422b-2Ab4</i> 的 HD73 ⁻ 工程菌(Erm ^r)	本实验室贮存
Biot1Ab13	含有携带 <i>cry1Ab13</i> 基因的质粒 <i>pSXY422b-1Ab13</i> 的 HD73 ⁻ 工程菌(Erm ^r)	本实验室贮存
Biot1Ca7	含有携带 <i>cry1Ca7</i> 基因的质粒 <i>pSXY422b-1Ca7</i> 的 HD73 ⁻ 工程菌(Erm ^r)	本实验室贮存
Plasmids		
pEB	<i>lac</i> 操纵子, T7 启动子, 多克隆位点, His · Tag, HSV · Tag, Amp ^r , 5.7 kb	本实验室贮存
pEB-1Be4	含有 3.6 kb <i>cry1Be4</i> 基因的 pEB 载体, Amp ^r , 9.3 kb	本研究构建

1/2 LB 液体培养基:0.5% 胰蛋白胨、0.25% 酵母抽提物、0.5% NaCl, pH 7.0, 121℃, 灭菌 20 min; LB 液体培养基:1.0% 胰蛋白胨、0.5% 酵母抽提物、1.0% NaCl, 121℃, 灭菌 20 min。

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶购自康润生物技术公司;限制

性内切酶、PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取、DNA 回收和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen 公司,其他生化和化学试剂均为市售。

D250 摇床,美国 NBS 公司;Avanti J-26XP 高速冷冻离心机,美国 Beckman Coulter 公司;Mini

Protein III蛋白电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统,GE 公司;CP750 超声波破碎仪,宁波新芝生物公司。

1.3 供试昆虫及人工饲料

黏虫(*M. separata*)及人工饲料,由中国农业科学院植物保护研究所迁飞害虫组提供。

1.4 *cry1Be₄* 表达载体构建

根据本实验室刘东明等克隆的 *cry1Be₄* 基因的全长序列^[13],设计引物 *cry1Be_F*(ACGC GAGCTC ATGAATCTATCAACCGATGCTCGTATTG, *Ecl*136 II)和 *cry1Be_R*(ACGC GAGCTCTTCCTC-CATAAGGAGTAATTCCACGC, *Ecl*136 II),由上海生工生物工程公司合成;PCR 扩增条件为 94℃预变性 10 min;94℃变性 1 min,54℃退火 1 min,72℃延伸 4 min,30 次循环;72℃延伸 10 min,目的片段长度为 3 603 bp,经单酶切后连接到 pEB 表达载体上,采用热激法转入大肠杆菌 BL21 中,筛选阳性克隆进行测序验证,序列测定由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

1.5 大肠杆菌 Cry 及 Vip 蛋白表达量的测定

Cry1Ba₃、*Cry1Bb₂*、*Cry1Be₄*、*Cry9Aa₃*、*Cry9Eb₁*、*Cry9Ee₁* 和 *Vip3Aa₁₁* 蛋白均于大肠杆菌中进行表达,大肠杆菌的培养采用 LB 培养基,蛋白的提取采用破碎离心法,具体见 Shu 等的方法^[14]。大肠杆菌中表达的蛋白包括可溶组分和不可溶组分,不可溶组分是由于蛋白在表达的过程中不完全正确折叠所导致的,其在生测过程中所表现的活性较低。为了得到较好的生测结果,需要探索获得可溶组分含量相对较高的表达条件,为生物活性测定提供足够的可溶蛋白。本研究设定了 18℃和 30℃两个诱导温度,以及 0.1、0.5、1.0 mmol/L 3 个 IPTG 终浓度,对大肠杆菌中表达的蛋白进行表达条件的优化。

杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析:吸取蛋白样品进行制样,100℃煮沸 5 min,13 000 g 离心 5 min,取上清液点样于 4%浓缩胶,8%分离胶,80 V 电泳 20 min,150 V 电泳直到胶底边缘。电泳结束后取出凝胶,进行脱色、染色及扫描图谱,具体方法详见文献^[15]。使用 National Institutes of Health 开发的 ImageJ 1.44 软件,分析电泳后的蛋白条带图谱并定量,具体使用方法参看 ImageJ User Guide 1.44。

1.6 苏云金芽胞杆菌 Cry 蛋白表达量的测定提取

Cry1Ab、*Cry1Ac*、*Cry1Ca* 及 *Cry2Ab* 蛋白均于苏云金芽胞杆菌中进行表达,苏云金芽胞杆菌的培养采用 1/2 LB 液体培养基,蛋白的提取采取重复溶解的方法^[16]进行,蛋白质的定量分析同 1.5 小节。

1.7 Cry 蛋白和 Vip 蛋白对黏虫的室内生物活性测定

参考蒋善军等的方法^[11],生测法使用含有 Bt 蛋白的人工饲料饲喂黏虫初孵幼虫,7 d 后统计死亡率。具体如下:称取 30 g 人工饲料放置于灭菌的培养皿中;加入待测样品溶液 3 mL(初筛均使用 10 μg/g 和 100 μg/g 两个浓度,使用 24 孔培养板法进行,复筛依据初筛的校正死亡率设定浓度,使用改良的培养皿法进行),充分搅拌,混匀后平均分装于 3 个培养皿中;根据饲料的干湿程度室温放置一段时间,直到饲料表面没有水滴。每皿接入 30 头初孵幼虫,每个浓度重复 3 次,共处理 90 头试虫(试虫接完后于培养皿盖内垫三层卫生纸,盖紧培养皿,用橡皮筋扎紧,以防试虫逃逸);将样品置于 25℃光照培养箱中培养,L/D=16 h//8 h,湿度 70%~80%,每天观察饲料干湿程度,适当做出微调(培养箱湿度太低则向里加水,太高则进行干燥处理);培养 7 d 后调查死虫和活虫数并称重,计算死亡率、校正死亡率(由于大肠杆菌中表达的蛋白使用 20 mmol/L Tris-HCl 溶解,而苏云金芽胞杆菌中表达的蛋白使用 50 mmol/L Na₂CO₃ 溶解,因此生测时分别设置对照,校正死亡率也分别计算)。生测数据采用 SPSS 13.0 计算致死中浓度(LC₅₀)^[17],死亡率、校正死亡率及体重抑制率。

死亡率(%)=死虫数/(死虫数+活虫数)×100;

校正死亡率(%)=[(对照存活率-处理组存活率)/对照存活率]×100;

体重抑制率(%)=[1-(处理组平均体重/对照组平均体重)]×100。

2 结果和分析

2.1 大肠杆菌中 Cry 及 Vip 蛋白的表达

通过反复摸索获得了本文大肠杆菌蛋白表达的适合条件:*Cry1Bb* 在 18℃,IPTG 终浓度 1.0 mmol/L 的条件下进行表达;*Cry1Be* 在 30℃,IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L 时进行表达;*Cry9Ee* 在 30℃,IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 时进行表达;*Cry1Ba*、*Cry9Aa*、

Cry9Eb 和 Vip3Aa 蛋白均在 18℃,IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 时进行表达。提取后对以上蛋白进行 SDS-PAGE 分析(图 1),箭头所指条带为目的蛋白,从左到右依次为 Cry1Ba、Cry1Bb、Cry1Be、Cry9Aa、Cry9Eb、Cry9Ee 及 Vip3Aa 的可溶组分 SDS-PAGE 结果,其分子量大小依次为 137、137、136、129、130、130、89 ku。

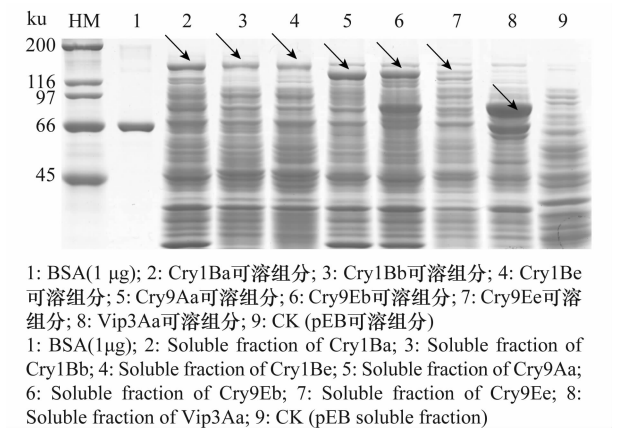


图 1 大肠杆菌中表达的 Cry 及 Vip 蛋白可溶组分 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 1 Analysis of soluble Cry and Vip proteins expressed in *E. coli* by SDS-PAGE

2.2 苏云金芽胞杆菌中表达的 Cry 蛋白提取

对 Bt 中表达的 Cry 蛋白进行 SDS-PAGE 分析

(图 2),箭头所指条带为目的蛋白,从左到右依次为 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ca 及 Cry2Ab,其分子量大小依次为 130、133、135、65 ku。

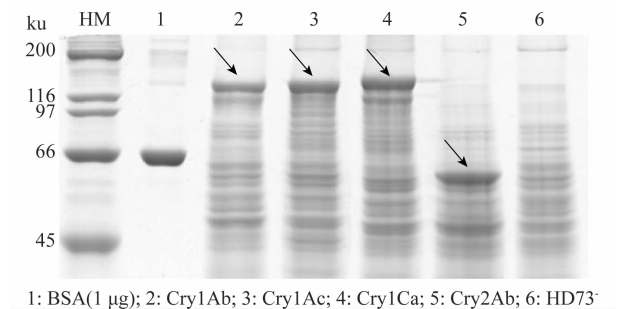


图 2 苏云金芽胞杆菌中表达的 Cry 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Analysis of Cry proteins in *Bacillus thuringiensis* by SDS-PAGE

2.3 Cry1、Cry2 及 Vip 蛋白对黏虫生物活性初次测定结果

Cry1、Cry2 及 Vip 蛋白对黏虫生物活性测定结果(表 2)表明,共有 5 种对黏虫杀虫活性较高的蛋白,按浓度为 100 μg/g 时的校正死亡率从高到低依次是 Cry2Ab、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Bb、及 Cry1Be,而 Cry1Ba、Cry1Ca 及 Vip3Aa 对其无显著活性,试虫生长发育仍然正常,大小与对照相似。Cry9 类蛋白生测时,试虫未能正常生长发育,大小基本与接虫时一样。

表 2 Bt 蛋白对黏虫生物活性初次测定结果¹⁾

Table 2 Preliminary bioassay results of Bt proteins against <i>Mythimna separata</i> larvae						
蛋白 Protein	浓度/μg·g ⁻¹ Concentration	接虫数/头 Inoculum	死虫数/头 Death	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	
CK	H ₂ O	24	4	16.70	—	
	Na ₂ CO ₃	24	0	0.000	—	
	Tris-HCl	24	3	12.50	—	
Cry2Ab	10	24	3	12.50	12.50	
	100	24	22	91.67	91.67	
Cry1Ab	10	24	1	4.100	4.10	
	100	24	21	87.50	87.50	
Cry1Ac	10	24	7	29.10	29.10	
	100	24	16	66.67	66.67	
Cry1Bb	10	24	1	4.160	—	
	100	24	17	70.83	66.67	
Cry1Be	10	24	6	25.00	14.29	
	100	24	15	62.50	57.14	
Vip3Aa	10	24	3	12.50	0.00	
	100	24	5	20.80	9.52	
Cry1Ba	10	24	2	8.333	—	
	100	24	4	16.70	4.80	
Cry1Ca	10	24	0	0.000	0.00	
	100	24	1	4.170	4.17	

1) 生测所用 Na₂CO₃ 为 50 mmol/L,pH 9.6,Tris-HCl 为 20 mmol/L,pH 8.0。
Na₂CO₃ used for bioassay at 50 mmol/L, pH 9.6; Tris-HCl at 20 mmol/L, pH 8.0.

2.4 Cry1 及 Cry2 蛋白对黏虫的 LC₅₀测定结果

对初筛获得的 5 种有活性的蛋白进行了复筛(表 3),并使用 SPSS 软件计算出了 5 种蛋白的致死中浓度。Cry1Ac、Cry1Ab、Cry2Ab、Cry1Be 及 Cry1Bb 的 LC₅₀ 依次为 5.09、17.71、26.75、27.42 $\mu\text{g/g}$ 和 43.93 $\mu\text{g/g}$ 。

2.5 Cry9 蛋白对黏虫生物活性测定结果

由于前期发现 Cry9 类蛋白可导致黏虫无法正常生长发育,因此后续对 Cry9Aa、Cry9Eb、Cry9Ee 3 个蛋白进行了复筛(表 4)。以 20 mmol/L 的 Tris-HCl 为阴性对照,设定了 10 $\mu\text{g/g}$ 和 100 $\mu\text{g/g}$ 2 个浓度,统计了初孵幼虫取食 7 d 的体重变化情况,并计算出了其生长抑制率。结果发现,当浓度为 10 $\mu\text{g/g}$ 时以上 3 种蛋白对黏虫的体重抑制率均

在 75% 以上;100 $\mu\text{g/g}$ 时,其体重抑制率均在 90% 以上,并且 Cry9Ee 活性最好,其次是 Cry9Eb 和 Cry9Aa。

表 3 Cry1、Cry2 蛋白对黏虫的生测结果
Table 3 The bioassay results of Cry1 and Cry2 proteins against *Mythimna separata* larvae

蛋白 Protein	致死中浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ LC ₅₀	95%置信区间/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 95% Confidence interval
Cry1Ac	5.09	3.72~6.83
Cry1Ab	17.71	14.78~20.85
Cry2Ab	26.75	21.89~32.64
Cry1Be	27.42	17.28~43.80
Cry1Bb	43.93	28.59~78.02

表 4 Cry9 蛋白对黏虫的体重抑制率¹⁾

Table 4 The weight inhibition rate of Cry9 protein against *Mythimna separata* larvae

蛋白 Protein	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Concentration	接虫数/头 Inoculum	活虫数/头 Survivor	总重量/g Total weight	平均虫重 /g · 头 ⁻¹ Average weight	体重抑制率/% Weight inhibition rate
CK	Tris-HCl	48	45	1.373	0.030 5	—
Cry9Aa	10	48	46	0.303	0.006 6	78.4
	100	48	41	0.090	0.002 2	92.8
Cry9Eb	10	48	45	0.286	0.006 4	79.0
	100	48	42	0.055	0.001 3	95.7
Cry9Ee	10	48	44	0.175	0.004 0	86.9
	100	48	41	0.041	0.001 0	96.7

1) 生测所用 Tris-HCl 浓度为 20 mmol/L,pH 为 8.0。
Tris-HCl used for bioassay at the concentration of 20 mmol/L (pH 8.0).

3 讨论

本研究提取了对鳞翅目具有杀虫活性的 11 种 Bt 蛋白,对鳞翅目夜蛾科的黏虫进行生物活性测定,结果显示 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Bb、Cry1Be 和 Cry2Ab 蛋白对黏虫具有较好的杀虫活性,Cry9Aa、Cry9Eb、Cry9Ee 蛋白对黏虫仅具有生长抑制作用,而 Cry1Ba、Cry1Ca 和 Vip3Aa11 蛋白对黏虫无显著毒杀作用。

目前国内关于 Bt 蛋白对黏虫杀虫活性的研究很少,2010 年蒋善军利用 Cry1Ab、Cry1Ac 蛋白饲喂黏虫,获得了 Cry1Ac 蛋白对黏虫初孵幼虫处理 18 d 的 LC₅₀ 为 11.23 $\mu\text{g/g}$,本研究发现了多种对黏虫具有杀虫活性的蛋白,并且获得了其致死中浓度 LC₅₀,其中 Cry1Bb 和 Cry1Be 对黏虫具有较好的毒杀作用,3 种 Cry9 蛋白对黏虫具有显著的体

重抑制作用。已有报道显示 Cry1B、Cry9A 蛋白与 Cry1A 蛋白无交互抗性^[18],因此这些蛋白新的活性的发现,有望用于害虫对 Cry1A 产品抗药性治理,并为抗虫转基因作物的研发提供新的基因来源。

为了分析 Cry1Ba 与 Cry1Bb、Cry1Be 对黏虫的活性差异,我们从其蛋白质的氨基酸序列出发,以 SWISS-MODEL 软件预测了 Cry1Ba 与 Cry1Bb、Cry1Be 蛋白的三维结构,并使用 DNAMAN 软件,比较了各结构域的相似性以便于初步分析其杀虫特异性的分子机制。通过比对发现:Cry1Bb 和 Cry1Be 的 Domain II 氨基酸序列相似度很高,同时两者与 Cry1Ba 的 Domain II 的相似度较低,且三者的 Domain I 氨基酸序列相似度很高,相似度为 91.02%,而三者 Domain III 的氨基酸序列相似度都很低(表 5)。

表 5 Cry1Bb、Cry1Be 和 Cry1Ba 的结构比较

Table 5 The structure comparison of Cry1Bb, Cry1Be and Cry1Ba

		Cry1Ba			Cry1Bb		
		Domain I	Domain II	Domain III	Domain I	Domain II	Domain III
Cry1Be	Domain I	93.15%	—	—	79.45%	—	—
	Domain II	—	65.53%	—	—	81.46%	—
	Domain III	—	—	35.00%	—	—	37.86%
Cry1Bb	Domain I	77.63%	—	—	—	—	—
—	Domain II	—	68.93%	—	—	—	—
—	Domain III	—	—	60.43%	—	—	—

近年来大量的研究表明,Cry 蛋白上某些氨基酸位点或区域与杀虫特异性有关,由于 Domain II 是 Cry 毒素中变化最多的区域^[20],该区域被认为是与 Cry 毒素作用的特异性有关,同时 Domain II 上暴露在外面的 Loop 区域与特异的幼虫中肠蛋白结合有关^[21-22],与杀虫特异性有着密不可分的关系。因此,本文以 PyMOL 软件分析了 Cry1Bb、Cry1Be 和 Cry1Ba 蛋白 Domain II 上的 Loop 1、Loop 2、Loop 3 的氨基酸序列。结果显示:三者 Loop 1 上的氨基酸序列相似度较高,而 Cry1Bb、Cry1Be 的 Loop 1、Loop 2、Loop 3 氨基酸序列相似度均较高,但两者与 Cry1Ba 的 Loop2、Loop3 氨基酸序列差异非常大(表 6)。但也有研究发现:Cry4Aa 蛋白对尖音库蚊(*Culex pipiens*)的活性相关区域不是 Domain II 的 Loops,可能是 Domain III 的某个位点^[23]。

表 6 Cry1Bb、Cry1Be 和 Cry1Ba 的 Domain II 上 Loop 区域氨基酸组成比较¹⁾

Table 6 The comparison of amino acid residues of Loops in Domain II with Cry1Bb, Cry1Be and Cry1Ba

Proteins	Loop1	Loop2	Loop3
Cry1Ba	WSNTR	LLWGIYLFPI	IILQSRVNP
Cry1Bb	WSSTQ	LFTT	IIGNTLRA
Cry1Be	WSNTQ	LLTT	LISGNTLRA

1) 表中粗体部分为差异氨基酸。
The amino acid sequence of the table for the differences in gray.

综上所述,Cry1Ba 的 Loop2、Loop3 区域氨基酸序列与 Cry1Bb、Cry1Be 具有非常大的差异,可能是导致其活性差异的关键因素。进而我们推测 Cry1Bb、Cry1Be 与黏虫中肠刷状缘膜囊泡 BBMV 上的受体可以结合,而 Cry1Ba 无法与之结合。关于其杀虫机理还需进一步深入的研究。

参考文献

[1] 李光博. 粘虫[M]//中国农业科学院植物保护研究所. 中国农

作物病虫害. 北京:中国农业出版社, 1996:657-723.

[2] Hirai K. Migration of the oriental armyworm *Mythimna separata* in East Asia in relation to weather and climate. III. Japan [M]// Drake V A, Gatehouse A G. Insect migration:tracking resources through space and time. Cambridge, England:Cambridge University Press, 1995:117-130.

[3] 江幸福, 张蕾, 程云霞, 等. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析[J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(6):1444-1449.

[4] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3):775-806.

[5] Bai C, Degheele D, Jansens S, et al. Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1993, 62(3):211-215.

[6] Luo K E, Banks D, Adang M J. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -Endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(2):457-464.

[7] Bergamasco V B, Mendes D R P, Fernandes O A, et al. *Bacillus thuringiensis* CryIIa₁₀ and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2013, 112(2):152-158.

[8] Estruch J J, Warren G W, Mullins M A, et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(11):5389-5394.

[9] dos Santos K B, Neves P, Meneguim A M, et al. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lepidoptera:Noctuidae)[J]. Biological Control, 2009, 50(2):157-163.

[10] Wang Ling, Jiang Xingfu, Luo Lizhi, et al. A cadherin-like protein influences *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxicity in the oriental armyworm, *Mythimna separata* [J]. Environmental Microbiology Reports, 2013, 5(3):438-443.

- of Bt cotton in China[J]. Science, 2010, 328(5982):1151 - 1154.
- [10] Wu K, Li W, Feng H, et al. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris* spp. (Hemiptera; Miridae) on Bt cotton in northern China [J]. Crop Protection, 2002, 21:997 - 1002.
- [11] Leopoldo P, Delia M, Colin B, et al. *Bacillus thuringiensis* toxins; an overview of their biopesticidal activity [J]. Toxins, 2014, 6:3296 - 3325.
- [12] Baum J, Sukuru U, Penn S, et al. Cotton plants expressing a hemiptern-active *Bacillus thuringiensis* crystal protein impact the development and survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera; Miridae) nymphs [J]. Journal of Economic Entomology, 2012, 105(2):616 - 624.
- [13] Li Ying, Shu Changlong, Zhang Xuwen, et al. Mining rare and ubiquitous toxin genes from a large collection of *Bacillus thuringiensis* strains [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2014, 122:6 - 9.
- [14] 陆宴辉, 吴孔明, 蔡晓明, 等. 利用四季豆饲养盲蝽的方法 [J]. 植物保护学报, 2008, 35(3):215 - 219.
- [15] Feng Hongqiang, Jin Yinli, Li Guoping, et al. Establishment of an artificial diet for successive rearing of *Apolygus lucorum* (Hemiptera; Miridae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2012, 105(6):1921 - 1928.
- [16] 宋国晶, 李国平, 封洪强, 等. 用正交试验法优选绿盲蝽若虫人工饲料配方植物保护 [J]. 植物保护, 2010, 36(6):96 - 99.
- [17] Zhou Zishan, Lin Huiyan, Li Ying, et al. The minimal active fragment of the Cry1Ai toxin is located between 36 and 6051 [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(5):1036 - 1042.
- [18] Guo Shuyuan, Zhang Chunlu, Lin Xiaoyin, et al. Purification of an active fragment of Cry1Ie toxin from *Bacillus thuringiensis* [J]. Protein Expression and Purification, 2011, 78:204 - 208.
- [19] 萨姆布鲁克·J, 拉塞尔·D·W. 2002 分子克隆实验指南 (第3版) [M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2008.
- [20] Shu Changlong, Zhang Jingtao, Chen Guihua, et al. Use of a pooled clone method to isolate a novel *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxin with activity against *Ostrinia furnacalis* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2013, 114(1):31 - 33.
- [21] 文学, 张宝红. 转基因抗虫棉研究现状与展望 [J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(2):194 - 199.
- [22] 郭建英, 周洪旭, 万方浩, 等. 两种防治措施下转 Bt 基因棉田绿盲蝽的发生与为害 [J]. 昆虫知识, 2005, 42(4):424 - 428.
- [23] Brown L, Whiteley H. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(2):549 - 557.
- [24] Naimov S, Valkova R, Duki S, et al. Carboxy-terminal extension effects on crystal formation and insecticidal properties of Cry15Aa [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 108(1):56 - 58.
- [25] Naimov S, Boncheva R, Karlova R, et al. Solubilization, activation, and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *thompsoni* HD542 crystal proteins [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(23):7145 - 7151.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 35 页)

- [11] 蒋善军, 罗礼智, 胡毅, 等. Cry1Ac 毒蛋白对粘虫生长发育、繁殖及飞行能力的影响 [J]. 昆虫学报, 2010, 53(12):1360 - 1366.
- [12] 白雪峰, 李长友, 程林友, 等. Bt 菌株 QCL-1 中 *cry2Ac10* 基因的克隆、表达和活性研究 [J]. 生物技术, 2007, 17(4):10 - 13.
- [13] 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.
- [14] Shu Changlong, Su Huiqin, Zhang Jie, et al. Characterization of *cry9Da4*, *cry9Eb2*, and *cry9Ee1* genes from *Bacillus thuringiensis* strain T03B001 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(22):9705 - 9713.
- [15] 萨姆布鲁克·J, 拉塞尔·D·W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [16] 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.
- [17] 贾春生. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC_{50} [J]. 昆虫知识, 2006, 43(3):414 - 417.
- [18] 刘楠, 王少丽, 宋福平, 等. Cry1Ba3、Cry1Ia8 蛋白对 Cry1Ac 抗性小菜蛾的杀虫活性研究 [J]. 植物保护, 2010, 36(2):66 - 70.
- [19] 苏慧琴, 束长龙, 何康来, 等. 苏云金芽胞杆菌 *cry9Aa* 基因的克隆、表达及活性分析 [J]. 植物保护学报, 2010, 37(6):541 - 546.
- [20] Boonserm P, Davis P, Ellar D J, et al. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 348(2):363 - 382.
- [21] Bravo A, Gomez I, Conde J, et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 2004, 1667(1):38 - 46.
- [22] Bravo A, Gómez I, Porta H, et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity [J]. Microbial Biotechnology, 2013, 6(1):17 - 26.
- [23] Howlader M T H, Kagawa Y, Miyakawa A, et al. Alanine scanning analyses of the three major loops in domain II of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin Cry4Aa [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(3):860 - 865.

(责任编辑: 田 喆)