# 对绿盲蝽具有杀虫活性 Bt 菌株的筛选及 Cry15Aa 蛋白活性的研究

张学雯[1,2]， 束长龙[2*]， 陆宴辉[2]， 刘春颖[2]， 张 杰[1,2]， 高继国[1*]

（1. 东北农业大学生命科学院，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** Bt 棉有效控制了棉田主要害虫棉铃虫（*Helicoverpa armigera*），然而原来处于次要地位的刺吸式口器害虫盲蝽（Heteroptera：Miridae）为害逐年加重，目前对绿盲蝽（*Apolygus lucorum* Meyer-Dür）有效的抗虫基因未见报道。本研究以本实验室保存的 Bt 杀虫基因和菌株为材料，对绿盲蝽进行杀虫活性筛选。利用本实验室先前克隆的 Mtx 类杀虫基因 *cry*15*Aa* 表达产物进行绿盲蝽杀虫活性测定，研究结果显示 Cry15Aa 蛋白对绿盲蝽具有一定的杀虫活性。通过杀虫活性测定，获得对绿盲蝽有效的 Bt 菌株 20 株；对这些菌株表达蛋白进行质谱鉴定，LC-MS/MS 质谱鉴定结果显示，这些菌株可能含有 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ae、Cry1Af、Cry1Ag、Cry1Ah、Cry1Ba、Cry1Be、Cry8Ha 等十余种对鳞翅目、鞘翅目害虫有杀虫活性的蛋白片段，并且有 4 株 Bt 菌株样品中检出了 Mtx 类杀虫蛋白 Cry15Aa 的片段。但是进一步基因鉴定结果表明，这 4 株菌株并不含有 *cry*15*Aa* 全长基因，推测这些菌株中含有 Cry15 类的新基因。上述研究结果表明这些菌株中可能存在对盲蝽有效的新型杀虫蛋白。本研究在发现了 *cry*15*Aa* 基因所表达的蛋白对绿盲蝽具有杀虫活性的同时，获得了对绿盲蝽具有杀虫活性的 Bt 新菌株，对绿盲蝽的生物防治具有重要的意义。

**关键词** 苏云金芽胞杆菌； 绿盲蝽； 杀虫活性； 二级质谱鉴定； Cry15Aa 蛋白

**中图分类号：** S 433.3，S 476.1 **文献标识码：** A **DOI：** 10.3969/j.issn.0529 - 1542.2016.03.009

# Screening of Bt isolates with insecticidal activity against *Apolygus lucorum* (Heteroptera：Miridae) and bioassay of Cry15Aa polypeptides

Zhang Xuewen[1,2]， Shu Changlong[2]， Lu Yanhui[2]， Liu Chunying[2]， Zhang Jie[1,2]， Gao Jiguo[1]

（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** Transgenic cotton with *cry* genes has controlled the main cotton pests (*Helicoverpa armigera*) effectively, however another non target mirid bugs (Heteroptera: Miridae) with sucking mouthparts have increased population sizes year by year. It has not been reported to the effective insecticidal genes of *Bacillus thuringiensis* against *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür), in this study, Bt insecticidal genes and isolates stored in our laboratory were prepared to assay the insecticidal activity against *A. lucorum*. The *cry*15*Aa* gene which belongs to Mtx in our lab was used to perform the bioassay to *A. lucorum*, the result showed that Cry15Aa polypeptides was certain insecticidal activity against *A. lucorum*. After bioassay against *A. lucorum*, twenty *A. lucorum* toxic Bt isolates were obtained. The LC-MS/MS identification showed these isolates might contains Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ae, Cry1Af, Cry1Ag, Cry1Ah, Cry1Ba, Cry1Be, Cry8Ha and other proteins which are insecticidal to lepidoptera and coleopteran pests, and four of them contains peptide fragment similar to Cry15Aa which belong to Mtx protein. But subsequence gene identification results indicated that these isolates not contains full length *cry*15*Aa* gene, it suggested that these isolates contains new *cry*15 type genes. The results indicated that these Bt i-

**收稿日期：** 2015 - 04 - 14 **修订日期：** 2015 - 05 - 19
**基金项目：** 转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX0800912B)
* 通信作者 E-mail：shuchanglong@sina.com，gaojiguo1961@hotmail.com

solates may contain new insecticidal proteins toxic to mirid bugs. The obtaining of novel Bt isolates and the discovery of Cry15Aa with insecticidal activity against *A. lucorum* are significant to the biological control for *A. lucorum*.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*; *Apolygus lucorum*; insecticidal activity; LC-MS/MS identification; Cry15Aa polypeptides

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)含有的杀虫基因已被广泛应用于转基因抗虫作物中[1]。转基因棉花自 1996 年商业化种植以来,全球种植面积持续增加,有效地控制了棉花害虫的为害,减少了化学杀虫剂的使用[2-3]。我国于 1998 年开始商业化种植转基因棉花,仅 2014 年就种植了 390 万 $hm^2$ 的转基因棉花,占棉花总种植面积的 93%[4]。

目前种植的转基因棉花品种只对鳞翅目害虫具有较好的防治效果,例如:棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)和棉红铃虫(*Pectinophora gossypiella*)[5]、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)等[6-8];而对半翅目的盲蝽(Heteroptera:Miridae)等刺吸式害虫没有防效。由于转基因棉田的化学农药使用减少,减弱了对盲蝽等非靶标害虫的控制[9],使之从次要害虫逐渐成为 Bt 棉田的主要害虫,并且呈现逐渐加重的趋势[10]。苏云金芽胞杆菌 Mtx 杀虫蛋白是一类与球形芽胞杆菌(*Bacillus sphaericus*)杀蚊蛋白同源的杀虫蛋白,包括 Cry15、Cry23、Cry33、Cry38、Cry45、Cry51、Cry60、Cry64 等[11]。其中,Monsanto 公司发现的 Mtx 类杀虫蛋白 TIC807(Cry51Aa2)对豆荚草盲蝽[*Lygus hesperus*(Knight)]和美国牧草盲蝽[*Lygus lineolaris*(Palisot de Beauvois)]具有较好的杀虫活性[12]。在我国,棉田主要为害的盲蝽有绿盲蝽(*Apolygus lucorum* Meyer-Dür)、牧草盲蝽[*Lygus pratensis* (Linnaeus)]、中黑盲蝽(*Adelphocoris suturalis* Jakovlev)、三点盲蝽(*Adelphocoris fasciaticollis* Reuter)等几种[5],并且有逐年加重趋势,而国内对盲蝽有效的 Bt 杀虫基因的研究尚未见正式报道。因此,开展对棉盲蝽具有杀虫活性的 Bt 菌株及基因筛选对棉花害虫的绿色防控具有重要意义。

本研究在建立绿盲蝽生物活性测定方法的基础上,利用本实验室分离保存的 Bt 菌株及其杀虫基因进行绿盲蝽杀虫活性筛选,获得一个对绿盲蝽有效的杀虫基因,最终筛选出 20 株对绿盲蝽具有活性的 Bt 菌株,并完成了对部分活性菌株杀虫基因和蛋白的鉴定。

## 1　材料与方法

### 1.1　试验材料

#### 1.1.1　菌株和质粒

本研究用到的菌株和质粒见表 1。

**表 1　菌株与质粒**

**Table 1　Strains and plasmids**

| 菌株和质粒　Strain and plasmid | 特征　Character | 来源　Source |
|---|---|---|
| 菌株 Strain | | |
| *Escherichia coli* Rosetta (DE3) | 大肠杆菌表达菌株,氯霉素抗性 | 本实验室保存 |
| *B. thuringiensis* | Bt 野生菌株 | 本实验室保存 |
| 质粒 Plasmid | | |
| pEB-15Aa | 携带 *cry15Aa* 基因的 pEB 质粒,氨苄青霉素抗性和氯霉素抗性 | 本实验室保存[13] |

#### 1.1.2　培养基

液体 LB 培养基:胰蛋白胨 1%,酵母提取物 0.5%,NaCl 1%,调 pH 至 7.0,121℃灭菌 20 min。

#### 1.1.3　主要试剂和仪器

高分子量蛋白 marker(high molecular mass range marker)与低分子量蛋白 marker (low molecular mass range marker)购自伯乐(BioRad)公司;镍亲和层析柱填料(chelating sepharose fast flow)购自 GE 公司;胰蛋白酶(1∶250)购自 Amresco 公司;BSA 标准品购自 Thermo scientific 公司。主要仪器包括:美国 Beckman 公司高速离心机 Avanti J-26xp、德国 Eppendorf 公司台式离心机 5415C、美国 Bio-Rad 公司 Mini protein Ⅲ蛋白电泳仪、美国 GE 公司高效液相色谱系统 AKTA avant 25、美国 Cole-Parmer 公司超声波破碎仪 CP750、美国 Spex 公司高通量组织研磨仪 Geno/Grinder 2010。

#### 1.1.4　供试昆虫

绿盲蝽由中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫研究组在室内周年饲养,饲养方法与条件参见陆宴辉等[14]。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 Bt 蛋白对绿盲蝽的生物活性测定

将酶解消化后的 Bt 蛋白加入绿盲蝽人工饲料中[15]，均匀混合后，制成胶囊，对绿盲蝽进行生物活性测定，在生物活性测定过程中，每个处理设置了 3 个重复，每个重复接 10 头绿盲蝽若虫，将制成的胶囊分别放入各自编号的透明玻璃指形管中（高 8.0 cm，直径 2.0 cm），然后将 1 日龄若虫接入到试管中，接好若虫的试管用棉花塞封好，防止若虫逃逸，然后将试管置于人工气候箱中，温度为（26±1）℃，相对湿度为 60%～70%，光照为L//D=14 h//10 h。2 d 更换一次人工饲料，每天观察并记录绿盲蝽若虫存活的情况[16]。

#### 1.2.2 Cry15Aa 蛋白的表达与提取

将携带 *cry15Aa*[13]基因的质粒 pEB-15Aa 转入大肠杆菌 Rosetta（DE3）中，筛选阳性菌落，接种于 5 mL LB 液体培养基（含有氨苄青霉素和氯霉素）培养 8 h 左右，转接入 300 mL LB 液体培养基（含有氨苄青霉素和氯霉素）中培养至 $A_{600}$ 为 0.5 时，加入终浓度为 1 mmol/L IPTG，分别在 16、30℃ 下 150 r/min，12 h，比较在 16℃和 30℃下，Cry15Aa 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达量。Cry15Aa 蛋白在大肠杆菌中的表达与提取参见 Zhou 等[17]的方法。SDS-PAGE 电泳分析 Cry15Aa 蛋白的表达情况。

#### 1.2.3 Cry15Aa 蛋白的亲和层析纯化

将 Cry15Aa 蛋白的可溶组分通过镍亲和层析柱，进行亲和层析纯化，具体参见 Guo 等[18]的方法。SDS-PAGE 检测洗脱下来目的蛋白 Cry15Aa 的纯度。

#### 1.2.4 Cry15Aa 蛋白对绿盲蝽的生物活性测定

Cry15Aa 蛋白的凝胶过滤纯化：利用 AKTA avant 蛋白液相分析系统对经过亲和层析纯化得到的 Cry15Aa 蛋白溶液进行缓冲液的置换（脱盐除咪唑）。将目的蛋白以 2 mL/min 的流速通过 G25 脱盐层析柱，然后用置换缓冲液 20 mmol/L $Na_2CO_3$/$NaHCO_3$（pH 10.0）以 2 mL/min 进行洗脱，分体积收集样品进行 SDS-PAGE 检测并定量。

SDS-PAGE 分析与定量：收集的蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析，SDS-PAGE 分析参见萨姆布鲁克·J 等[19]的方法，并以 BSA 蛋白为标准、利用 National Institutes of Health 的 Image J（1.44）软件对蛋白条带进行定量，参见 Image J User Guide 1.44 使用方法。

按照 1.2.1 所述的方法测定经凝胶过滤纯化的 Cry15Aa 蛋白对绿盲蝽的生物活性。

#### 1.2.5 Bt 菌株杀虫蛋白的提取、酶解与纯化

Bt 蛋白的提取：将活化的 Bt 菌株均匀涂布于 LB 平板上，30℃培养至菌体裂解。收集菌体，悬浮于 30 mL 灭菌水中；置于高通量研磨仪，1 600 g、5 min进行振荡破碎；4℃、8 000 g 离心 10 min，弃上清；沉淀用 30 mL 预冷的 1 mol/L NaCl 悬浮，高通量研磨仪振荡，离心，沉淀用 15 mL 预冷的灭菌水悬浮，即获得胞晶混合物。加入 15 mL 裂解液，高通量研磨仪振荡混匀（条件同上），4℃裂解过夜；4℃、8 000 g 离心 10 min，转移上清液，加入 1/10 体积的 4 mol/L NaAc（pH=4.5），混匀，冰上放置 1 h；4℃、8 000 g 离心 10 min，收集沉淀，25 mL 预冷的灭菌水反复冲洗多次，最终收集的沉淀用 50 mmol/L $Na_2CO_3$（pH=10.0）溶液溶解。

酶解与纯化：取 1.5 mL 蛋白样品，胰蛋白酶（250 U）与蛋白样品以质量比 1∶10 混合后，37℃温育 3 h；酶解后的蛋白样品 4℃、15 000 g 离心 15 min，取上清液经 G25 脱盐柱去除胰蛋白酶、短肽等杂质。

#### 1.2.6 Bt 菌株蛋白的质谱鉴定

对绿盲蝽具有杀虫活性菌株酶解后的蛋白，进行 SDS-PAGE 分析，切取部分蛋白条带送往北京华大蛋白质研发中心有限公司进行质谱鉴定。

#### 1.2.7 *cry15Aa* 与 *cry51Aa2* 基因的 PCR 检测

根据 1.2.1 的测定结果选择对绿盲蝽具有杀虫活性的 Bt 菌株，参照 Shu 等的方法[20]提取其基因组 DNA，以 Bt 菌株基因组 DNA 为模板，利用所设计的 *cry51Aa2* 引物（F：5′-TTGGCAATTTTAGATTTAAAATC -3′；R：5′-TTAATTTGTTTTTATTGGACTTGTTGG-3′）和 Primer star 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。反应条件为：95℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，50℃退火30 s，72℃延伸 2 min，30 个循环。对绿盲蝽具有杀虫活性菌株中的 *cry51Aa2* 基因进行 PCR 检测。cry15Aa 基因检测引物与 PCR 条件参考文献[13]进行。

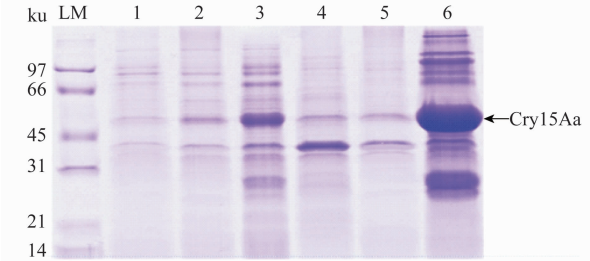
## 2 结果与分析

### 2.1 Cry15Aa 蛋白的提取与纯化

利用实验室克隆的 *cry15Aa* 基因进行 IPTG 诱导表达，通过 SDS-PAGE 分析发现（如图 1 所示），当 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L，诱导温度为 30℃时，Cry15Aa 蛋白获得了较高的表达量，并且在可溶组分与非可溶组分中均有约 50 ku 条带表达（泳道 3 和 6）。

进一步将离心收集的 Cry15Aa 蛋白的可溶组分进行镍柱亲和层析纯化，SDS-PAGE 电泳结果显示，最终洗脱下分子量约为 50 ku 的 Cry15Aa 蛋白（图 2）。理论上 *cry15Aa* 基因的表达应获得分子量

约为 35 ku 的蛋白，分析这可能与蛋白在大肠杆菌表达体系中折叠异常有关。



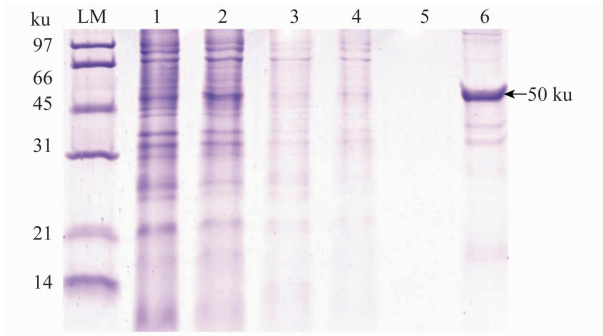

LM: Low molecular protein marker; 1: Rosetta-pEB可溶性组分; 2: Rosetta-15Aa可溶性组分(16℃); 3: Rosetta-15Aa可溶性组分(30℃); 4: Rosetta-pEB非可溶性组分; 5: Rosetta-15Aa非可溶性组分(16℃); 6: Rosetta-15Aa非可溶性组分(30℃)
LM: Low molecular protein marker; 1: Rosetta-pEB soluble component; 2: Rosetta-15Aa soluble component (16℃); 3: Rosetta-15Aa soluble component (30℃); 4: Rosetta-pEB non-soluble component; 5: Rosetta-15Aa non-soluble component (16℃); 6: Rosetta-15Aa non-soluble component (30℃)

**图 1　不同温度下 Cry15Aa 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析结果**

**Fig. 1　SDS-PAGE analysis of the expression of Cry15Aa protein in *E. coli* Rosetta (DE3) at different temperatures**

## 2.2　Cry15Aa 蛋白对绿盲蝽的生物活性测定结果

经凝胶过滤纯化的 Cry15Aa 蛋白进行定量分析后，终浓度为 0.12 mg/mL，对绿盲蝽进行生物活性测定，初步生测结果显示：以 20 mmol/L $Na_2CO_3$/$NaHCO_3$(pH 10.0)缓冲液为空白对照(死亡率为 23.3%)，绿盲蝽的死亡率为 46.7%，校正死亡率为 30.5%。说明 Cry15Aa 蛋白对绿盲蝽具有一定的活性。




LM: Low molecular protein marker; 1: Rosetta-pEB可溶性组分; 2: Rosetta-15Aa可溶性组分; 3: 流穿后Rosetta-pEB可溶性组分; 4: 流穿后Rosetta-15Aa可溶性组分; 5: Rosetta-pEB可溶性组分(ElutionⅡ洗脱); 6: Rosetta-15Aa可溶性组分(ElutionⅡ洗脱)
LM: Low molecular protein marker; 1: Rosetta-pEB soluble component; 2: Rosetta-15Aa soluble component; 3: Rosetta-pEB soluble component after flow-through; 4: Rosetta-15Aa soluble component after flow-through; 5: Rosetta-pEB soluble component (ElutionⅡ); 6: Rosetta-15Aa soluble component (ElutionⅡ)

**图 2　Cry15Aa 蛋白镍柱亲和层析纯化的 SDS-PAGE 分析**

**Fig. 2　SDS-PAGE analysis of purified Cry15Aa polypeptides with nickel affinity chromatography column**

## 2.3　Bt 菌株杀虫蛋白的制备与对绿盲蝽的生物活性

将实验室分离的 360 株 Bt 菌株培养至芽胞晶体释放，提取蛋白，将提取的 Bt 蛋白进行酶解纯化，然后对绿盲蝽进行生物活性测定，进行活性筛选。根据绿盲蝽 Bt 蛋白生物活性测定的试验结果，计算校正死亡率，最终筛选出校正死亡率大于 40%的 Bt 菌株 20 株(表 2)。

**表 2　Bt 菌株蛋白对绿盲蝽生物活性测定结果[1)]**

**Table 2　Bioassay results of 20 Bt isolates against *Apolygus lucorum***

| 菌株编号 Strain no. | 死亡率/% Mortality | 校正死亡率/% Corrected mortality | 菌株编号 Strain no. | 死亡率/% Mortality | 校正死亡率/% Corrected mortality |
|---|---|---|---|---|---|
| $CK^-$ | 26.7 | — | $C_7-A_{10}$ | 63.3 | 49.9 |
| $C_8-E_3$ | 56.7 | 40.9 | $C_7-A_9$ | 63.3 | 49.9 |
| $C_8-D_6$ | 56.7 | 40.9 | $C_8-B_7$ | 63.3 | 49.9 |
| $C_{12}-F_7$ | 56.7 | 40.9 | $P_{13}-F_5$ | 63.3 | 49.9 |
| $C_{12}-F_2$ | 56.7 | 40.9 | $B_{15}-E_1$ | 63.3 | 49.9 |
| $C_{12}-C_4$ | 56.7 | 40.9 | $P_{13}-E_2$ | 63.3 | 49.9 |
| $C_9-F_2$ | 56.7 | 40.9 | $P_{13}-F_2$ | 63.3 | 49.9 |
| $P_{12}-C_3$ | 56.7 | 40.9 | $B_{15}-A_5$ | 63.3 | 49.9 |
| $C_7-E_5$ | 56.7 | 40.9 | $B_{16}-D_2$ | 63.3 | 49.9 |
| $C_8-B_6$ | 60.0 | 45.4 | $C_9-E_4$ | 73.3 | 63.6 |
| $P_{13}-D_2$ | 63.3 | 49.9 | | | |

1) $CK^-$ 为 50 mmol/L $Na_2CO_3$(pH=10.0)处理，死亡率为 26.7%。
$CK^-$: treatment with 50 mmol/L $Na_2CO_3$(pH=10.0); the mortality of $CK^-$ is 26.7%.

## 2.4　对绿盲蝽具有杀虫活性 Bt 菌株的蛋白鉴定

利用 *Cry15Aa* 与 *cry51Aa2* 基因的引物对 20 株 Bt 菌株进行 PCR 检测，发现 20 株 Bt 菌株中并不含有已经报道的对盲蝽具有杀虫活性的 *Cry15Aa* 与 *cry51Aa2* 基因。

对所提取的 20 株 Bt 菌株蛋白酶解消化，进行 SDS-PAGE 分析，结果发现，13 株菌株 $C_8-E_3$、$C_8-D_6$、$C_8-B_7$、$C_8-B_6$、$B_{15}-A_5$、$C_9-E_4$、$B_{16}-D_2$、$C_{12}-C_4$、$C_7-A_{10}$、$C_7-A_9$、$P_{13}-F_5$、$B_{15}-E_1$ 和 $C_9-F_2$ 获得了 60 ku 的片段；菌株 $C_{12}-F_2$、$P_{13}-F_2$、$C_{12}-F_7$、

$P_{13}-E_2$、$P_{12}-C_3$、$C_7-E_5$ 和 $P_{13}-D_2$ 菌株只有小条带，而且并不突出(图 3)。对切取的部分条带进行 LC－MS/MS 质谱分析，图中黑色方框(1～26)即为选取质谱鉴定的条带。20 株菌株中共有 11 株经质谱分析获得结果，利用 Mascot 在 Bt 杀虫蛋白库中对进行本地数据库检索，结果发现，仅 8 株菌株($B_{15}-A_5$、$C_9-E_4$、$C_7-A_9$、$P_{13}-F_5$、$B_{15}-E_1$、$P_{13}-E_2$、$C_9-F_2$、$P_{12}-C_3$)中可能含有 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ae、Cry1Af、Cry1Ag、Cry1Ah、Cry1Ba、Cry1Be 和 Cry8Ha 等蛋白的片段(表 3)。除此之外，菌株 $P_{13}-F_5$、$P_{13}-E_2$、$C_9-F_2$ 和 $P_{12}-C_3$ 中还检测到了 Cry15Aa 蛋白的片段，虽然 Cry15Aa 蛋白序列覆盖度较低。

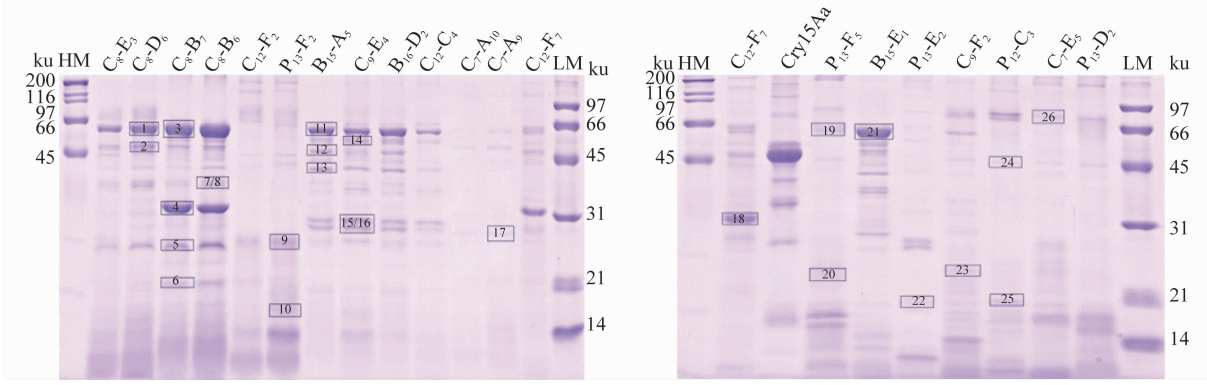



**图 3　胰蛋白酶消化后的 Bt 蛋白的 SDS-PAGE 分析**

**Fig. 3　SDS-PAGE analysis of Bt proteins digested with trypsin**

**表 3　对绿盲蝽具有杀虫活性的 Bt 菌株中主要蛋白的质谱鉴定结果[1)]**

**Table 3　Mass spectrometry results of proteins from the isolates with insecticidal activity against *Apolygus lucorum***

| 菌株编号 Strain no. | 条带编号 Band no. | 杀虫蛋白 Insecticidal protein | 得分 Score | 匹配肽段/个 Matches | 覆盖度/% Coverage |
|---|---|---|---|---|---|
| $B_{15}-A_5$ | 13 | Cry1Aa | 2 552 | 81 | 20 |
| | | Cry1Ab | 1 827 | 66 | 20 |
| $C_9-E_4$ | 15/16 | Cry1Ac | 4 107 | 168 | 28 |
| | | Cry1Aa | 2 996 | 128 | 21 |
| | | Cry1Ae | 2 242 | 101 | 17 |
| $C_7-A_9$ | 17 | Cry1Ac | 8 529 | 336 | 28 |
| | | Cry1Aa | 6 805 | 258 | 25 |
| | | Cry1Af | 5 662 | 232 | 31 |
| | | Cry1Ae | 5 536 | 237 | 17 |
| $P_{13}-F_5$ | 19 | Cry15Aa | 3 888 | 85 | 15 |
| | 20 | Cry15Aa | 3 446 | 83 | 16 |
| $B_{15}-E_1$ | 21 | Cry1Aa | 31 284 | 833 | 37 |
| | | Cry1Ag | 23 293 | 624 | 24 |
| | | Cry1Ae | 10 214 | 317 | 17 |
| | | Cry1Ah | 8 918 | 260 | 24 |
| | | Cry1Be | 4 315 | 125 | 30 |
| | | Cry1Ba | 2 030 | 56 | 10 |
| $P_{13}-E_2$ | 22 | Cry1Aa | 6 779 | 172 | 23 |
| | | Cry1Ag | 5 917 | 149 | 15 |
| | | Cry1Be | 2 098 | 79 | 17 |
| | | Cry1Ah | 1 409 | 51 | 10 |
| | | Cry15Aa | 2 032 | 68 | 9 |
| $C_9-F_2$ | 23 | Cry8Ha | 5 485 | 154 | 8 |
| | | Cry1Aa | 4 329 | 117 | 23 |
| | | Cry1Be | 1 643 | 67 | 12 |
| | | Cry15Aa | 2 001 | 66 | 20 |
| $P_{12}-C_3$ | 24 | Cry1Aa | 2 816 | 103 | 22 |
| | 25 | Cry1Aa | 1 749 | 73 | 15 |
| | | Cry15Aa | 1 109 | 53 | 6 |

1) 匹配肽段数目大于 50 即为有效。
The number of matches is effective when it is more than 50.

## 3 讨论

转基因抗虫棉的广泛种植，有效地控制了棉花害虫的危害，减少了农药的使用，带来了巨大的经济效益与生态效益[21]。因此，筛选对棉花害虫高效的 Bt 杀虫基因具有重要的意义。然而，自 1997 年我国开始商业化种植转 Bt 基因棉以来，棉田化学农药使用量因此而大幅度减少，减弱了对盲蝽等转基因棉花非靶标害虫的控制，使之成为棉花的主要害虫[9, 22]，因此，针对棉盲蝽等刺吸式口器害虫筛选有效的 Bt 菌株及杀虫基因是目前一项紧迫的研究工作。

盲蝽成虫以口针刺吸棉株嫩叶、幼芽、幼嫩花蕾的汁液为害，因此，Bt 胞晶混合物难以直接用于杀虫活性测定。本研究针对绿盲蝽刺吸取食这一特点，利用中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫组建立的人工饲料测定方法，进行了 Bt 纯化蛋白的杀虫活性评估[15-16]，尽管对照害虫存在较高的死亡率，但是与对照组相比，360 株 Bt 菌株中，有 20 株菌株表现出显著的杀虫效果。上述结果说明，虽然人工饲料测定方法仍需进一步改进，但是已经可以用于盲蝽有效 Bt 菌株与基因的初步评估，对当前相关研究工作有重要的促进作用。

近年来研究发现 Cry51Aa 是一类对盲蝽具有活性的 Bt 杀虫蛋白[12]，Cry51Aa 属于 Mtx 类杀虫蛋白，结构上与目前广泛应用的 Cry1A 类杀虫蛋白不同。因此，本研究利用实验室此前克隆的 Mtx 类杀虫蛋白基因 *cry15Aa* 对绿盲蝽进行杀虫活性研究，结果显示 Cry15Aa 蛋白对绿盲蝽具有一定的杀虫活性。Cry15Aa 于 1992 年首次在苏云金芽胞杆菌 HD542 中被发现，可以形成菱形晶体[23]，在 HD542 中表达的 Cry15Aa 蛋白大小约 35 kDa[24]，对鳞翅目害虫苹果蠹蛾（*Cydia pomonella*）、烟草天蛾（*Manduca sexta*）和菜青虫（*Pieris rapae*）都有一定的杀虫活性[25]，本研究发现，其与另外一个 Mtx 蛋白 Cry51Aa 相似，对半翅目害虫盲蝽也有一定的杀虫活性。

为了对盲蝽有效的 Bt 菌株中可能含有的杀虫蛋白进行鉴定，对上述菌株进行了 LC-MS/MS 质谱分析，在 $B_{15}-A_5$、$C_9-E_4$、$C_7-A_9$、$P_{13}-F_5$、$B_{15}-E_1$、$P_{13}-E_2$、$C_9-F_2$ 和 $P_{12}-C_3$ 等菌株中检测到 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ae、Cry1Af、Cry1Ag、Cry1Ah、Cry1Ba、Cry1Be、Cry8Ha 等对鳞翅目、鞘翅目害虫有效的 Bt 杀虫蛋白的片段；在 $P_{13}-F_5$、$P_{13}-E_2$、$C_9-F_2$ 和 $P_{12}-C_3$ 中检测到了 Mtx 类蛋白 Cry15Aa 的片段，说明这些菌株中可能含有 Cry15Aa 类似的蛋白。进一步 PCR 鉴定结果表明上述菌株中并不含有已知的 *cry15Aa* 与 *cry51Aa* 基因，显示这 4 株菌株中可能含有 Cry15 类的新基因。上述研究结果表，本研究筛选获得的 20 株 Bt 菌株中可能含有对绿盲蝽具有杀虫活性的新基因。

总之，本研究针对日益严重的棉花害虫盲蝽开展 Bt 菌株筛选与鉴定研究，筛选获得了对绿盲蝽具有一定杀虫活性的基因 1 个，对绿盲蝽有效的 Bt 菌株 20 株，这些研究结果对绿盲蝽的防治具有重要的意义。

## 参考文献


[1] Sanahuja G, Banakar R, Twyman R M, et al. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial application [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(3): 283-300.

[2] Wu Kongming, Lu Yanhui, Feng Hongqiang, et al. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin containing cotton [J]. Science, 2008, 321: 1676-1678.

[3] Carrière Y, Crickmore N, Tabashnik B. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33: 161-168.

[4] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops [J]. 2014, ISAAA Briefs 49 (ISAAA, Ithaca, NY, 2014).

[5] 陆宴辉. Bt 棉花害虫综合治理研究前沿[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(4): 809-819.

[6] Chitkowski R, Turnipseed S, Sullivand M, et al. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of Noctuid (Lepidoptera) pests [J]. Journal of Economic Entomology, 2003, 96(3): 755-762.

[7] Sivasupramaniam S, Moar W, Ruschke L, et al. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests [J]. Journal of Economic Entomology, 2008, 101(2): 546-554.

[8] Tindall K, Siebert M, Leonard B, et al. Efficacy of Cry1Ac: Cry1F proteins in cotton leaf tissue against fall armyworm, beet armyworm, and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2009, 102(4): 1497-1505.

[9] Lu Yanhui, Wu Kongming, Jiang Yuying, et al. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption

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 Xuewen, 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 605I [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)