

• 研究论文 •

苏云金杆菌营养期蛋白杀虫活性 及 *Vip3A-LS1* 基因克隆

陆秀君^{1a}, 郝会海^{1b}, 宋萍^{1a}, 杜克久^{*1b}, 李国勋^{*1a 2}

(1 河北农业大学 a 植物保护学院 河北省农业病虫害生物防治工程技术研究中心,
b 林学院, 河北保定 071001; 2 莱阳农学院 害虫生物防治研究所, 山东青岛 266109)

摘要: 对营养期高活性杀虫菌株进行筛选, 得到高效菌株 BtLS1, 对其营养期杀虫蛋白活性及发酵特性进行了系统研究, 克隆了该菌株的 *vip3A* 新基因。测定了 31 株 *vip3A* 基因阳性菌株营养期杀虫蛋白的活性, 发现 BtLS1 和 BtLS8 菌株对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 生长的抑制作用明显高于其他菌株。进一步研究表明, BtLS1 菌株营养期杀虫蛋白对初孵和 2 龄甜菜夜蛾幼虫的体重增长抑制率分别为 95.3% ± 2.1% 和 90.7% ± 6.6%; 对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 初孵幼虫的校正死亡率为 22.1%, 对 2 龄幼虫的体重增长抑制率为 78.7% ± 6.6%。发酵液中以胞内可溶性物质为主。设计 *vip3A* 全长基因特异引物 PCR 扩增, 插入质粒 pBluescript SK(+), 克隆测序证实该菌株中存在 *vip3A* 新基因, 命名为 *Vip3A-LS1*, GenBank 登录号为 DQ016968。按该序列推断的蛋白与同类蛋白的 8 个氨基酸之间存在差异。

关键词: 苏云金杆菌; 营养期杀虫蛋白; 活性; *Vip3A-LS1* 基因克隆

中图分类号: S482.39.Q785

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)01-0054-05

Bioactivity of *vip3A* Protein from *Bacillus thuringiensis* Isolates and Cloning of *Vip3A-LS1* Gene from BtLS1

LU Xi-jun^{1a}, HAO Hu-hai^{1b}, SONG Ping^{1a}, DU Ke-jiu^{*1b}, LI Guo-xun^{*1a 2}

(1 Agricultural University of Hebei, a. College of Plant Protection, Biocontrol Centre of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, b. College of Forestry, Baoding 071001, Hebei Province, China;

2 Institute of Pest Biological Control, Laiyang Agricultural College, Qingdao 266109, Shandong Province, China)

Abstract Vegetative insecticidal protein (VIP), which was highly toxic to Lepidoptera and Coleoptera was found from some Bt strains in recent years. Bioassay of the VIPs from 31 isolates with *vip3A* genes detected by PCR, was carried out. The results showed that the strain of BtLS1 had higher toxicity to *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. The mortality rates against *S. exigua* and *H. armigera* (1st instar) were 9.7% and 22.1% respectively and the inhibiting rates of larval weight against *S. exigua* and *H. armigera* (2nd instar) were 90.7% ± 6.6% and 78.7% ± 6.6% respectively. VIP was mostly

收稿日期: 2006-07-25 修回日期: 2007-01-06

作者简介: 陆秀君 (1970-), 女, 河北人, 博士, 副教授, 主要从事昆虫病原微生物的相关研究, E-mail: lxxijun2002@yahoo.com.cn * 通讯作者: 李国勋 (1942-), 男, 黑龙江人, 博士生导师; 杜克久 (1965-), 男, 河北人, 博士生导师. 联系电话: 0532-86080150 E-mail: gx50@yahoo.com.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) (2003CB114201); 重大国际合作研究项目 “昆虫中肠新靶标及其生物防治分子机理的研究”; 河北省自然科学基金项目 (303213).

soluble in cell of Bt LS1. The *vip3A* gene amplified from Bt LS1 was cloned into pBluescript SK(+) and *Vip3A-LS1* gene was obtained. The GenBank accession number was DQ016968. 8 AAs in *Vip3A-LS1* were different from other deduced *vip3A* proteins.

Key words *Bacillus thuringiensis*; vegetative insecticidal protein; bioactivity; *Vip3A-LS1* gene cloning

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 是目前研究最深入、应用最广泛的生防微生物, 随着 Bt 制剂长期广泛的使用及转基因植物的大面积推广, 害虫对其的抗药性问题已较为突出^[1-3]。近年来, 在某些 Bt 菌株中发现了在遗传和杀虫机理上与其杀虫晶体蛋白均不相同的新型杀虫蛋白——营养期杀虫蛋白 (vegetative insecticidal proteins, VIPs), 该类蛋白对鳞翅目夜蛾科害虫具有广谱和特异的杀虫活性^[4-9], 这一发现对于高效广谱基因工程微生物的构建、转基因抗虫植物的培育及控制害虫抗性发展都具有重要意义。

目前有关营养期杀虫蛋白的研究主要涉及昆虫新毒性基因的克隆表达、杀虫机理以及基因重组利用等方面^[2-11], 而对于该类蛋白在 Bt 自然菌株中的杀虫活性及分泌特性尚缺乏相关研究资料。为了进一步发掘自然资源, 明确该类蛋白在 Bt 菌株中的杀虫活性及发酵特点, 从中得到高毒性营养期杀虫菌株和 *vip3A* 新基因, 笔者以土壤中分离所得菌株为材料, 通过分子鉴定结合生物测定, 对 Bt 菌株中营养期蛋白的杀虫活性及发酵特性进行了系统研究, 以期为直接利用高活性营养期杀虫菌株、获得高效营养期杀虫蛋白新基因及开发新型微生物杀虫剂提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株、质粒及培养基

苏云金杆菌 LS1 及其他菌株均从河北省各县市土壤中分离得到; 标准菌株 *Bt* subsp. *kurstaki* HD1 (HD1), 大肠杆菌 *E. coli* DH10b 及 pBluescript SK(+) 质粒均为河北农业大学生物防治研究室保存、提供; LB 液体培养基、LB 固体培养基按常规配方配制。

1.2 活性测定方法

1.2.1 高效营养期杀虫菌株的初筛 选取 31 株经 PCR 检测 *vip3A* 呈阳性的 Bt 菌株进行生物活性的初步筛选。试虫为继代饲养的敏感品系甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (3 日龄), 由河北农业大学生

物防治研究室提供。Bt 菌株经常规培养 16 h 均稀释至 1×10^7 cells/mL, 超声破碎, 采用人工饲料混合饲食法进行杀虫活性测定^[12]。药液与饲料比例 (体积/质量) 为 0.1 mL/g。每处理接入试虫 24 头, 重复 3 次, 以无菌水处理为对照, 置于 28℃、相对湿度 70%~80% 的条件下饲养, 96 h 后测定各处理体重, 计算幼虫的体重增长抑制率。

1.2.2 高效菌株营养期杀虫蛋白活性测定 选取初筛生物活性较高的 Bt LS1 菌株, 其菌液按 1.2.1 节方法超声破碎后, 用 PBS 缓冲液透析, 制备营养期杀虫蛋白, 测定该杀虫蛋白对甜菜夜蛾和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的活性。测定方法同 1.2.1 节。

1.3 营养期杀虫蛋白发酵特性分析

参考刘荣梅等方法^[8], 分别提取 Bt LS1 菌株的营养期胞内和胞外蛋白, 将培养 16 h 的菌液于 4 000 r/min 下离心 1 min, 取沉淀加入 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0), 超声破碎, 离心取上清液, 经硫酸铵沉淀后用无菌水透析 48 h 得胞内蛋白; 上清液过 0.45 μm 滤膜, 同样方法得到胞外蛋白。比较胞内和胞外蛋白对 2 龄甜菜夜蛾的活性差异, 分析该类蛋白的发酵特性。生测方法同 1.2.1 节。

1.4 Vip3A-LS1 基因的克隆

以 Bt LS1 菌株碱裂解法提取的质粒为模板, 参照陈建武等方法设计全长基因引物^[3], 引物序列为 *Vip3A-S*: GCGGGATCCATGAACAAGAATAA TACTAAATTAAG; *Vip3A-T3*: GTCGACGATCCCC ATCTTACTTAATAGAGACAT。委托上海生物工程有限公司合成, 扩增所用相关试剂购自 TaKaRa 公司。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 共 32 个循环, 72℃ 再延伸 10 min, 在质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶中检测。回收靶片段用 *Bam*H I 和 *Sal*I 双酶切, 与同样酶切的质粒载体 pBluescript SK(+) 用 T4 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH10b 感受态细胞, 以蓝白斑筛选阳性转化子, PCR 和酶切检

测正确。委托 TaKaRa 公司进行测序, 通过网上序列比对分析, 确定相似性。

2 结果与分析

2.1 高毒力营养期杀虫菌株的初步筛选

对含有 *vp3A* 基因的 Bt 菌株进行营养期生物活性测定, 结果见表 1。其中 BtLS8 和 LS1 两菌株营养期培养液对甜菜夜蛾体重增长的抑制率分别为 93.6% 和 91.1%, 活性明显高于其他菌株, 因此选择 LS1 菌株进行下一步生物活性测定。

Table 1 Bioactivity of vegetative culture from Bt strains against *S. exigua* (16 h)

Bt isolate	Inhibiting rate of weight (%)	Bt isolate	Inhibiting rate of weight (%)	Bt isolate	Inhibiting rate of weight (%)
CK	0	S23	54.7	WZ-4	3.4
LS1	93.6	YZ-5	50.1	S4	0
LS8	91.1	XL-12	48.3	S14	-3.0
DG-8	85.3	XL-8	44.9	L2	-6.9
S16	80.1	WZ-7	27.5	S10	-7.9
S5	74.2	S13	13.1	CZ-37	-10.8
S6	69.8	CZ-11	12.6	WY-11	-12.3
S2	64.5	S1	9.3	CZ-28	-12.3
CYZ-4	60.5	WY-16	7.5	S3	-18.8
CYZ-16	57.2	S22	3.5	WY-19	-38.2
S17	56.1	S19	3.4		

Table 2 Bioactivity of vegetative insecticidal protein from BtLS1 against *S. exigua*

In star	Treatment	Mean corrected lethal rate (%)	Mean inhibiting rate of weight (%)
1st	LS1	9.7 ± 0.8	95.3 ± 2.1
	LB	0.1 ± 0	*
	CK	0.0	
2nd	LS1	11.2 ± 0	90.7 ± 6.6
	LB	8.4 ± 2.2	2.2 ± 1.2
	CK	0.0	

* The weight was not tested. The same as in the following tables.

对棉铃虫的测定结果见表 3。LS1 菌株对初孵和 2 龄棉铃虫的生长有较好的抑制作用。经 LS1 菌株营养期杀虫蛋白处理后的初孵幼虫虽未死亡, 但基本不生长, 而对照组生长正常。与无菌水对照相比, LS1 菌株营养期杀虫蛋白对 2 龄幼虫体重增长的抑制率为 78.7% ± 6.6%, 且也表现出了一定的拒食作用。

2.3 BtLS1 菌株营养期杀虫蛋白发酵特性分析

由表 4 中数据可见, LS1 菌株营养期胞外蛋白和胞内蛋白对甜菜夜蛾的活性差异显著, 胞外蛋

2.2 BtLS1 菌株营养期杀虫蛋白活性

从表 2 中可见, BtLS1 菌株营养期杀虫蛋白对初孵和 2 龄甜菜夜蛾幼虫的致死活性均不明显, 但对其生长的抑制作用明显, 96 h 后对初孵和 2 龄幼虫体重增长的抑制率分别为 95.3% ± 2.1% 和 90.7% ± 6.6%, 而无菌水对照处理组生长良好, LB 培养基对照组生长好于无菌水对照。实验中同时发现对照组饲料全部被吃光, 而处理组饲料未见明显减少, 表明营养期杀虫蛋白对该试虫可能还存在一定的拒食作用。

白对试虫生长的抑制作用不明显, 因而未测定其体重增长抑制率, 而胞内可溶性蛋白对试虫体重增长的抑制率达到了 45.1%, 对照组正常。由此推断该类蛋白在 Bt 野生菌株发酵液中以胞内可溶性物质形式为主。

2.4 Vp3A-LS1 基因克隆及序列分析

以 LS1 菌株质粒 DNA 为模板, PCR 扩增得到了约 2.3 kb 的目标片段, 经 PCR 及酶切检测得到了构建正确的转化子, 命名为 DSV113 重组质粒, 命名为 pSV113。对该序列进行网上 Blast 比对分

Table 3 Bioactivity of vegetative insecticidal protein from Bt LS1 against *H. armigera* (16 h)

Instar	Treatment	Corrected lethal rate(%)	Inhibiting rate of weight(%)
1st	LS1	22.1 ± 1.4	*
	HD1	10.4 ± 2.2	*
	LB	0.1 ± 0	*
	CK	0	
2nd	LS1	11.2 ± 0	78.7 ± 6.6
	HD1	10.4 ± 2.2	66.3 ± 8.4
	LB	0.1 ± 0	8.5 ± 1.3
	CK	0	

Table 4 Bioactivity of extracellular and intracellular VIPs from Bt LS1 isolate against *S. exigua* (16 h)

Treatment	Mean lethal rate(%)	Corrected lethal rate(%)	Inhibiting rate of weight(%)
CK	9.7	0	
LB	9.7	0	
Extracellular protein	9.7	0	*
Intracellular protein	12.6	5.2	45.1

析, 证实克隆的序列为 *vip3A* 基因, 命名为 *Vip3A-LS1*, 提交 GenBank 注册登记, 登录号为 DQ016968, Bt 命名委员会命名该基因为 *Vip3A a22*, 该基因与其他同源基因的相似性为 98.7% ~ 99.8%, 该序列推断的蛋白与同类蛋白在第 206、284、291、406、419、464、510 和 742 位氨基酸存在差异。

3 讨论

营养期杀虫蛋白是一类对鳞翅目夜蛾科害虫和鞘翅目害虫具有广谱和特异杀虫活性的新型蛋白, 其发现为苏云金杆菌的进一步开发利用提供了更广阔的前景。本研究以分子鉴定 *vip3A* 阳性菌株 Bt LS1 为材料, 对 Bt 菌株营养期杀虫蛋白活性进行了系统研究, 发现该蛋白对二龄甜菜夜蛾和棉铃虫均表现出很强的生长抑制作用, 且处理组饲料利用率明显低于对照组 (灭菌水), 推断该营养期杀虫蛋白对试虫可能存在拒食作用; 明确了营养期杀虫蛋白在该菌株发酵液中以胞内可溶性物质为主。所得结果为 Bt 菌株中营养期杀虫蛋白的生物活性及发酵特性研究提供了基础资料。利用体重增长抑制率检测杀虫活性大小, 为测定直接杀虫活性低、但又有很好的间接杀虫活性的毒素提供了新的研究方法。筛选得到了高效营养期杀虫活性菌株 Bt LS1。利用基因克隆技术得到了 *Vip3A-LS1* 基因, 序列分析表明, *Vip3A-LS1* 基因在碱基组成上不同于其他已知基因, 推测该蛋白

与同类蛋白可能有多个氨基酸不同^[4, 5, 7, 8], 由此推测 464 位氨基酸可能处于活性功能区。说明将分子鉴定和生物活性筛选相结合可以快速得到新的营养期杀虫蛋白基因。

目前对该类蛋白结构与功能的研究才刚刚开始, 尚不能解释清楚 *vip3A* 同源蛋白间杀虫谱产生差异的原因及机理, 相信随着对该类基因与蛋白研究的进一步深入, 将会得出合理的解释。有关营养期杀虫蛋白对其他目重要害虫活性的研究尚未见报道, 随着研究的深入, 有望得到高活性和特异杀虫活性的新菌株和新基因。该类基因为构建高效广谱的 Bt 工程菌和转基因植物提供了新的杀虫基因资源, 也可作为 Bt 制剂抗性管理的策略之一, 因而进一步研究开发该类基因具有重要的现实意义和良好的应用价值。

参考文献:

- [1] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5389-5394.
- [2] CAI Qi-liang (蔡启良), LIU Zi-duo (刘子铎), YU Zi-niu (喻子牛). 苏云金芽孢杆菌生物活性成分研究进展 [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, 9(2): 207-212.
- [3] CHEN Jian-wu (陈建武). Studies on *vip3A* Genes from *Bacillus thuringiensis* (苏云金芽孢杆菌 *vip3A* 基因研究) [D]. Guangzhou (广州): Zhongshan (Sun Yeh-sen)

- University (中山大学), 2002
- [4] CHEN JW, SUN F, TANG LX, et al Expression of *Bacillus thuringiensis* Full length and N-Terminally Truncated vip184 Gene in an AcrySTALLIFEROUS Strain of Subspecies *Kurstaki* [J]. *World J Microbiol & Biotechnol*, 2003, 19: 883-889.
- [5] DOSS V A, KUMAR K A, JAYAKUMAR R, et al Cloning and Expression of the Insecticidal Protein (vip3V) Gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli* Protein [J]. *Expr Purif*, 2002, 26: 82-88
- [6] Lu et al Vip3A22 [DB/OL]. 2005 [2007]. http://www.biol.sus.ac.uk/home/Neil-Crickmore/Bt_ (*Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature).
- [7] CAIQI-liang (蔡启良), LU Zi-duo (刘子铎), SUN Ming (孙明), et al 苏云金芽孢杆菌营养期杀虫蛋白基因的克隆及表达分析 [J]. *Chin J Biotech (生物工程学报)*, 2002, 18 (5): 578-582.
- [8] LU Rong-mei (刘荣梅), ZHANG Jie (张杰), GAO Ji-guo (高继国), et al 苏云金芽孢杆菌营养期杀虫蛋白基因 vip 3A 的研究 [J]. *High Technology Letters (高技术通讯)*, 2004, (9): 39-42.
- [9] YU C G, MULLIS M A, WARREN G W, et al The *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein vip 3A Lyses Midgut Epithelium Cells of Susceptible Insects [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(2): 532-536
- [10] LEEM K, Walters F S, Hart H, et al The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein vip 3A Differs from that of CryIAb Endotoxin [J]. *Appl Environ Microbiol* Aug, 2003, 69(8): 4648-4657.
- [11] ZHU C, RUAN L, PENG D, et al Vegetative Insecticidal Protein Enhancing the Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Kurstaki* against *Spodoptera exigua* [J]. *Lett in Appl Microbiol*, 2006, 42 (2): 109-114.
- [12] ZENG Xiao-hui (曾晓慧), ZHANG Hong-yu (张宏宇), YU Zhi-ni (喻子牛), et al 苏云金芽孢杆菌对甜菜夜蛾幼虫毒力的生物测定方法 [J]. *Chin J Biol Control (中国生物防治)*, 1998, 14(4): 172-175.

(Ed. TANG J)