

研究报告

Bt9816C 培养上清中杀虫活性成分的研究*

蔡峻^{1**} 关彬¹ 陈月华¹ 任改新^{1,2}(南开大学生命科学学院微生物系 天津 300071)¹ (天津市农业生物技术中心 天津 300071)²

摘要: Bt9816C 的培养上清对棉铃虫和甜菜夜蛾具有很高的杀虫活性。热敏实验表明 β -外毒素和 Zwittermicin A 不是其主要杀虫活性成分。Bt9816C 的无晶体株保留有卵磷脂酶 C 和溶血素活性, 但是不再具有 *vip3A* 基因, 其培养上清也丧失了杀虫活性。SDS-PAGE 结果显示 Bt9816C 培养上清中有 Vip3A 蛋白特征大小的 89 kD 的蛋白, 而其无晶体株正好缺失了该蛋白。以上结果表明 Bt9816C 培养上清中主要的杀虫活性成分是 Vip3A 蛋白。

关键词: Bt9816C, 培养上清, Vip3A 蛋白

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0001-04

Studies on the Primary Toxic Factor of Bt9816C Culture Supernatant

CAI Jun^{1**} GUAN Bin¹ CHEN Yue-Hua¹ REN Gai-Xin^{1,2}(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)¹(Tianjin Agriculture Biotechnology Research Center, Tianjin 300071)²

Abstract: Culture supernatant of Bt9816C had high toxicity against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua*. By heat-sensitivity test, β -exotoxin and Zwittermicin A were excluded from being primary toxic factors. AcrySTALLIFEROUS mutants of Bt9816C (Bt9816C-NP1 and Bt9816C-NP2) cured of its indigenous plasmids no longer possessed *vip3A* gene and toxicity, nevertheless, they still had hemolysin and phospholipase C activity. SDS-PAGE showed that there was a 89 kD protein, which is characteristic size of Vip3A protein, in the culture supernatants of Bt9816C, however, mutants Bt9816C-NP1 and Bt9816C-NP2 just lacked the 89 kD protein. It suggested that Vip3A protein was the primary toxic factor in culture supernatants of Bt9816C.

Key words: Bt9816C, Culture supernatant, Vip3A protein

长期以来, 许多学者认为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 的毒力来源于其伴孢晶体, 因此发酵上清液一般作为废液丢弃^[1]。近年来, 国内外学者均发现上清液是一个蕴含增效物质和杀虫物质的宝库, 这些物质主要包括有: β -外毒素、溶血素、Zwittermicin A、卵磷脂酶 C 和 Vip3A 蛋白等^[2-4]。Bt9816C 是我室分离的一株高效、广谱的 Bt 野生株, 对棉铃虫和甜菜夜蛾都有很高的毒力, 具有很好的开发前景。最近, 我们研究发现其培养上清液对棉铃虫和甜菜夜蛾也具有很好的毒力。为了更好的利用其有效的杀虫成分, 本文对该菌株培养上清液的杀虫活性成分进行了研究。

* 天津市农业生物技术中心科技攻关计划 (No.033122111-1)

天津市自然科学基金资助项目 (No.023608811)

** 联系人 Tel: 022-23505964, E-mail: cj425@eyou.com

收稿日期: 2003-07-18, 修回日期: 2003-09-18

1 材料与方法

1.1 供试菌株

Bt9816C、15A3 和 *E. coli* DH5 α 均为本室保藏菌种。

1.2 菌株培养及上清液杀虫活性测定

将 Bt9816C 接种于 NB 液体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 活化 12 h, 以 2% 接种量转接于 PY 培养基 (蛋白胨 12 g, 酵母粉 24 g, 甘油 4 mL, K_2HPO_4 12.3 g, KH_2PO_4 2.18 g, 定容至 1L)。30 $^{\circ}\text{C}$, 190 r/min, 培养 17 h。取少量培养液镜检, 确保培养细胞均为营养体。其余的培养液在 6,000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 15 min。吸取 3 mL 的上清液与 27 mL 感染饲料 (棉铃虫和甜菜夜蛾的感染饲料见文献 [5]) 混匀, 倒 24 孔生测板两块, 每块板接入 24 头初孵 12 h 未进食、健康活泼棉铃虫或甜菜夜蛾幼虫, 并设两个重复。置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温中饲养, 72 h 后检查其死亡数, 计算死亡百分率。取新鲜制备的 Bt9816C 培养上清液, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min, 再按前述方法与饲料混合, 进行杀虫活性测定。

1.3 高温-SDS 法消除 Bt9816C 的质粒

将 Bt9816C 接种于 NB 液体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 活化 12 h, 取 500 μL 活化的 Bt9816C, 加入 500 mL 含 0.002% SDS 的 NB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 培养 48 h。取 100 μL 培养液涂布于含 0.004% SDS 的 NB 固体培养基上, 43 $^{\circ}\text{C}$, 培养 48 h, 挑单菌落镜检。将其中的无晶体株挑出, 进行 *vip3A* 基因的检测。

1.4 *vip3A* 基因的 PCR 检测和培养上清的 SDS-PAGE 检测

vip3A 的特异引物设计、PCR 方法及电泳检测按文献 [6] 进行。SDS-PAGE 按文献 [5] 进行。

1.5 卵磷脂酶 C、溶血素和 Zwittermicin A 的检测

将待测菌种接种于卵黄培养基 (蛋黄 25 g, 琼脂粉 15 g, 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 5 g, 定容至 1 L), 30 $^{\circ}\text{C}$, 倒置培养 48 h。菌落周围出现乳白色沉淀斑者, 卵磷脂酶 C 为阳性。在羊血平板上用打孔器打孔, 分别在孔中加入 100 μL 新鲜制备的不同培养上清液, 30 $^{\circ}\text{C}$, 倒置培养, 分别于 12 h, 24 h 观察结果, 菌落周围出现透明溶血环者, 溶血素为阳性。Zwittermicin A 的检测按文献 [7] 进行。

2 结果与分析

2.1 Bt9816C 质粒的消除和 *vip3A* 基因的检测

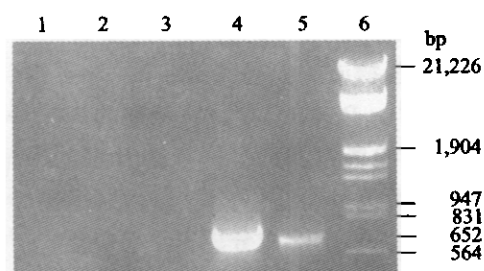


图1 *vip3A* 基因的 PCR 检测

1 H_2O , 2 9816C-NP1, 3 9816C-NP2,

4 9816C, 5 HD-1, 6 $\lambda\text{DNA}/\text{HindIII} + \text{EcoRI}$

应用高温和 SDS 处理 Bt9816C 后, 其中 2 个单菌落只发现有孢子, 未发现晶体存在, 将它们分别命名为 Bt9816C-NP1 和 Bt9816C-NP2。PCR 检测结果显示, Bt9816C 和 *vip3A* 阳性菌株 Bt HD-1 一样, 都具有 652 bp 的 *vip3A* 基因特异扩增带, 而 Bt9816C-NP1 和 Bt9816C-NP2 却不具备该扩增带, 表明它们的 *vip3A* 基因已经被消除 (图 1)。

2.2 培养上清液杀虫活性的检测

Bt9816C 上清液具有很好的杀虫活性，棉铃虫和甜菜夜蛾死亡率均在 97% 以上，但经过 80 ℃，水浴 15 min 处理的上清液已无毒力（表 1）。说明主要的杀虫活性成分是热不稳定的蛋白质，而非热稳定的 β -外毒素和 Zwittermicin A。此外，缺失 *vip3A* 基因的 Bt9816C-NP1 和 Bt9816C-NP2 也丧失了对棉铃虫和甜菜夜蛾的毒力。

2.3 溶血素、卵磷脂酶 C 和 Zwittermicin A 的检测

Bt9816C 以及它的两个质粒消除株 9816C-NP1 和 9816C-NP2 的培养上清液均不能形成抑菌圈，说明它们的培养上清中均不含 Zwittermicin A 或者 Zwittermicin A 含量极低（图 2）。在卵黄培养基上，Bt9816C 以及它的两个质粒消除株 9816C-NP1 和 9816C-NP2 的菌落周围都有大小相当的白色沉淀环，表明它们都能分泌卵磷脂酶 C。而阴性对照 Bt15A3 的菌落周围无白色沉淀环（图 3）。

表 1 Bt9816C 及其无晶体株培养上清的杀虫活性检测

菌 株	死亡率 (%)	
	棉铃虫	甜菜夜蛾
对照 (PY 培养基)	0.7 ± 0.7	2.2 ± 1.2
9816C	97.5 ± 2.5	99.3 ± 0.7
9816C (热处理)	3.2 ± 0.8	1.8 ± 1.3
9816C- NP1	0	0
9816C- NP2	3.2 ± 1.7	7.0 ± 1.7

表中数据为 3 次试验结果的平均值 ± 标准误差

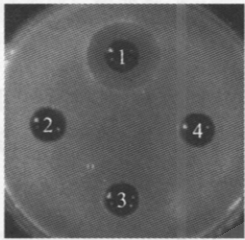


图 2 Zwittermicin A 的检测分析

1 Ampicillin, 2 9816C-NP1, 3 9816C-NP2, 4 9816C

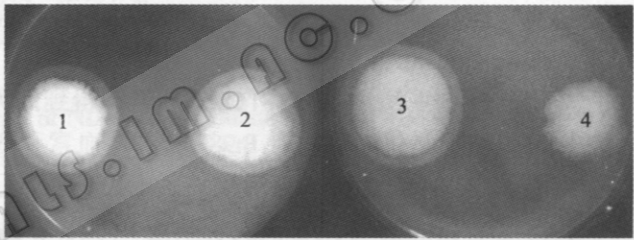


图 3 Bt9816C 及其无晶体株磷脂酶 C 的检测分析

1 9816C-NP1, 2 9816C-NP2, 3 9816C, 4 15A3

在羊血平板上，Bt9816C 以及 9816C-NP1 和 9816C-NP2 的培养上清液都能形成明显的溶血环，并且溶血环的大小无明显差异。说明 9816C-NP1 和 9816C-NP2 产生溶血素的能力未受明显影响（图 4）。

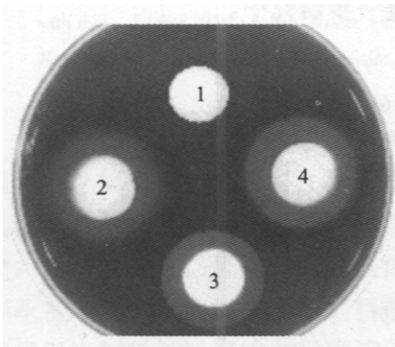


图 4 Bt9816C 及其无晶体株溶血素的检测分析

1 PY 培养基, 2 9816C-NP1, 3 9816C-NP2, 4 9816C

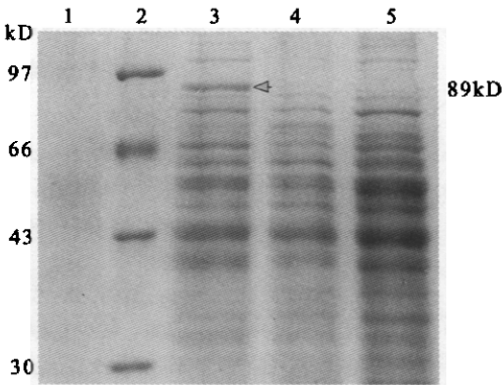


图 5 Bt9816C 及其无晶体株培养上清的 SDS-PAGE

1 PY 培养基, 2 蛋白分子量标准, 3 9816C, 4 9816C-NP1, 5 9816C-NP2

2.4 培养上清的 SDS-PAGE

培养上清 SDS-PAGE 结果见图 5。Bt9816C 存在一条明显的 89 kD 的蛋白带, 而 9816C-NP1 和 9816C-NP2 其他蛋白带与 9816C 基本相同, 却正好缺失了 89 kD 的蛋白带。

3 讨论

1993 年, 崔云龙等报道 Bt HD-1 菌株的培养上清到发酵后期时具有一定的杀虫活性, 并且杀虫活性随着菌体自溶率的升高成正比例增大, 其中主要的杀虫物质是一种与 Cry 蛋白同源的蛋白, 分子量大小约为 60 kD^[1]。在本研究中, Bt9816C 的培养上清在发酵早期所有的菌体都未自溶时即有杀虫活性。另外, Bt9816C 的培养上清中的杀虫活性物质是 89 kD 的蛋白, 显然两者不是同一物质。

一些 Bt 菌株在发酵早期即可分泌对鳞翅目、双翅目等昆虫有不同程度的毒杀作用的 β -外毒素^[2]。此外, 国内外学者均在一些 Bt 菌株的培养上清中发现了一种称为 Zwittermicitin A 的化合物, 虽然 Zwittermicitin A 本身对于昆虫没有毒性, 但是可以增加苏云金芽孢杆菌杀虫剂的杀虫活性, 延缓害虫对苏云金芽孢杆菌杀虫剂的抗性^[3,4]。已有研究表明 β -外毒素是一种腺嘌呤核苷酸类似物, Zwittermicitin A 是一种氨基多元醇, 两者都具热稳定性。而 Bt9816C 的培养上清具热不稳定性, 说明它的杀虫活性成分不是 β -外毒素和 Zwittermicitin A。

应用高温-SDS 法消除 Bt9816C 的质粒, 得到的无晶体株 9816C-NP1 和 9816C-NP2 杀虫活性消失, 但是仍然保留有 Bt9816C 的溶血素和卵磷脂酶 C 活性, 这表明溶血素和卵磷脂酶 C 与 Bt9816C 上清杀虫活性关系不大。

1996 年, Estruch 等人首次发现某些 Bt 菌株在芽孢形成前的营养期生长阶段, 可分泌产生一种杀虫蛋白, 大小约为 89 kD, 他们称之为 Vip3A 蛋白^[8]。该蛋白与任何已知的蛋白没有同源性, 其杀虫机理也与 Cry 蛋白完全不同, 是一种全新的杀虫物质。本文研究发现 Bt9816C 也有 *vip3A* 基因, 但其无晶体突变株 9816C-NP1 和 9816C-NP2 却不具备的 *vip3A* 基因。同时, SDS-PAGE 结果显示 Bt9816C 明显存在的 89 kD 的蛋白带, 在 9816C-NP1 和 9816C-NP2 中正好缺失。综合以上结果可知, Vip3A 蛋白是 Bt9816C 培养上清中主要的活性杀虫成分。这也是国内首次报道 Vip3A 蛋白在 Bt 菌株培养上清中发挥杀虫作用。有关其 Vip3A 蛋白的基因和性质正在进一步研究中。

参考文献

- [1] 崔云龙, 冈部宗一, 浅野昌司. 微生物学报, 1993, 33 (1): 62 ~ 68.
- [2] 李荣森, 罗绍彬, 张用梅, 等. 微生物防治害虫. 北京: 科学出版社, 1983. 164 ~ 175.
- [3] 关 雄, 吴燕榕, 李今煜, 等. 福建大学学报, 2001, 30 (3): 293 ~ 296.
- [4] 李 青, 吴继星. 中国生物防治, 1997, 13 (4): 166 ~ 168.
- [5] 陈月华, 任改新, 吴卫辉, 等. 微生物学报, 2002, 42 (2): 169 ~ 174.
- [6] Rice W C. Letters in Applied Microbiology, 1999, 28: 378 ~ 382.
- [7] 喻子牛. 微生物农药及其产业化. 北京: 科学出版社, 2000. 86 ~ 91.
- [8] Estruch J J, Warren G W, Mullins M A, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93 (11): 5389 ~ 5394.