

球形芽孢杆菌 Mtx1 蛋白和苏云金杆菌 Cyt1Aa 晶体蛋白的协同作用

杨艳坤^{1,2} 蔡全信¹ 蔡亚君¹ 闫建平¹ 袁志明^{1*}

(¹ 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(² 郑州大学生物工程系 郑州 450001)

摘 要 采用常规的生物测定方法确定了纯化的球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)的缺失信号肽的 97kDa 营养期杀蚊毒素(Mosquitocidal toxin 1, Mtx1)蛋白和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)27.3kDa 的 Cyt1Aa 晶体蛋白对致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)幼虫的杀虫活性。结果表明 Mtx1 和 Cyt1Aa 不同比例的混合物对致倦库蚊的毒力比单独毒素蛋白高,经统计分析表明两毒素蛋白对目标蚊幼虫具有明显的协同作用。在 LC_{50} 处理浓度下, Mtx1 和 Cyt1Aa 按 3:1 混合的混合物 LT_{50} 值比单独 Mtx1 的提前了 6.36h。表明 Cyt1Aa 和 Mtx1 对致倦库蚊具有协同毒杀作用,提高对目标蚊虫的毒力、缩短半致死时间。该结果为深入研究 Mtx1 和 Cyt1Aa 的杀蚊作用方式奠定了基础,同时为其在蚊虫防治中的应用提供了新的思路和方法。

关键词 :球形芽孢杆菌 ;苏云金芽孢杆菌 ;杀蚊毒素 ;协同作用 ;致倦库蚊 ;Mtx1 ;Cyt1Aa

中图分类号 :Q936 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2007)03-0456-05

球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)是一种自然界中广泛分布的好气芽孢杆菌。由于其对蚊幼虫具有特异性毒杀作用,在世界范围内被成功地应用于疾病媒介蚊虫的生物防治中^[1,2]。

球形芽孢杆菌营养期杀蚊毒素(Mosquitocidal toxin 1, Mtx1)广泛分布在 *B. sphaericus* 有毒菌株中,是一种 100kDa 的可溶性毒素,由 870 个氨基酸组成。这种 100kDa 蛋白可以通过去掉 N-末端信号肽形成 97kDa 蛋白。Mtx1 的合成同芽孢的形成不相关,它合成于细菌的营养体生长阶段^[3]。1992 年,Thanabalu 等^[4]构建了谷胱甘肽 S-转移酶和 Mtx1 的融合蛋白,证明纯化的 Mtx1 对致倦库蚊幼虫具有非常高的毒性。

Cyt1Aa 毒素是来源于苏云金芽孢杆菌以色列亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 *Bti*)一个大小为 27.3kDa 的 δ -内毒素,该蛋白对细胞膜上的不饱和脂肪酸具有亲和性。当 Cyt1Aa 与细胞膜结合后,聚集引起穿孔,而导致细胞的破裂,表现出对细胞的溶解作用。同时,该毒素有更宽的杀虫谱,对某些双翅目昆虫也有毒性^[5,6]。*Bti* 中两个或多个基因体内组合的表达产物或毒素蛋白的体外组合试验证实毒素蛋白间存在明显的协同作用^[7~10]。Cyt1Aa 毒素蛋白在克服昆虫对其它杀虫

晶体蛋白产生的抗性方面发挥了重要的作用^[9,11,12]。同时 Cyt1Aa 和球形芽孢杆菌的二元毒素也存在很强的协同作用^[12,13]。有关 Cyt1Aa 同其它杀虫毒素蛋白之间的协同作用的机理仍不明确,其可能的机制是其溶细胞作用增大在蚊虫中肠上皮细胞上形成孔径而加速膜结构的解体^[14]。

在进行 Cyt1Aa 蛋白和 97kDa Mtx1 毒素蛋白纯化的基础上,进行了两种毒素蛋白对敏感致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)的协同毒杀作用分析和毒力比较,表明两种毒素对目标蚊幼虫具有明显的协同毒杀作用,提高混合物对目标蚊幼虫的毒力,缩短其对目标蚊虫致死时间,该结果为进一步研究 Mtx1 和 Cyt1Aa 对蚊幼虫的毒杀作用机理提供了依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 本研究所用质粒和菌株见表 1。

1.1.2 培养基 :LB 液体培养基 :参照 Maniatis 等^[15]的方法配制。2YT 液体培养基 :1.6% Bactotryptone, 1% 酵母粉,0.5% NaCl。G-Tris 培养基(每 100mL 含):0.8% $CaCl_2 \cdot H_2O$ 1.0mL; 20% $(NH_4)_2SO_4$ 1mL; 20% 葡萄糖 1.0mL; 1mol/L Tris-HCl pH7.5 5.0mL; 5% K_2HPO_4 1.0 mL; G-Tris 盐母液 1mL(含 0.025%

通讯作者。Tel :86-27-87198195 ; Fax :86-27-87198137 ; E-mail : yzm@pentium.whiov. ac. cn

作者简介 杨艳坤(1978 -)男,河北省正定县人,博士研究生,研究方向为微生物分子遗传学。E-mail : yankunyang@163. com

收稿日期 2006-08-30 接受日期 2006-10-13 修回日期 2006-12-01

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Plasmids or strains	Relevant characteristic	Source or reference
pTH21	Plasmid contained <i>mtx1</i> removed signal peptide sequences in pGEX-1 vector , Amp ^r . It was used for the expression and purification of 97kDa Mtx1	Kindly sent by Dr. Colin Berry , UK ^[4]
pMPX2	Plasmid contained <i>p20</i> and <i>cyt1Aa</i> sequences in shuttle vector pBU4. It was used for the expression and purification of Cyt1Aa	Kindly sent by Zhang Bei-hua , China
<i>E. coli</i> DH5α	Genotype : EndA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA(Nal ^r) relA1((lacI ZYA-argF) U169 deoR(phi80dla(lacZ) M15)	In this study
<i>Bti</i> 4Q7	Plasmid cured strain derived from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> and does not carry the genes for insecticidal proteins. The acrySTALLIFEROUS strain was used as the recipient strain in the transformation experiments.	Obtained from the International Entomopathogenic Bacillus Centre (Institut Pasteur , Paris , France)
E-pTH21	<i>E. coli</i> DH5αcontained pTH21	In this study
B-pMPX2	<i>Bti</i> 4Q7 contained pMPX2	In this study

FeSO₄ · 7H₂O ,0.05% CuSO₄ · 5H₂O ,0.05% ZnSO₄ · 7H₂O ,0.5% MnSO₄ · H₂O , 2.0% MgSO₄);酵母粉 0.15g ;pH 7.4。根据试验的要求在培养基中加入 100μg/mL 氨苄青霉素或 15μg/mL 四环素。

1.1.3 主要试剂和仪器 :谷胱甘肽琼脂糖干粉 (Sigma-Aldrich Company , UK)。BioRad Protein Assay kit (BioRad , Herts , UK)。Soniprobe sonicator (Lucas Dawe Ultrasonics Ltd , London , UK)。Beckman Coulter Avanti j-25 Centrifuge (U. S. A)。

1.1.4 供试蚊虫 :SLCq 品系 ,引自湖北省医科院并在本研究室稳定饲养 5 年以上的敏感致倦库蚊品系。致倦库蚊蚊虫成蚊和幼虫均在 26 ± 2℃ 下饲养 ,光周期为 12h :12h (L : D)。幼虫饲养在搪瓷盆中 ,用混合饲料喂养(酵母粉 :小麦粉 = 1 : 2) ,化蛹后移入成蚊笼中 ,羽化的成蚊供给 10% 的糖水 ,雌蚊吸食无菌活小白鼠(购自湖北医科大学动物试验中心)。

1.2 97kDa Mtx1 的纯化

pTH21 在 *E. coli* 中表达为谷胱甘肽 S 转移酶 (Glutathione S-transferase , GST)-97kDa Mtx1 的融合蛋白 ,之后通过谷胱甘肽琼脂糖亲和层析柱纯化。具体方法参见谷胱甘肽琼脂糖干粉产品说明。97kDa Mtx1 蛋白质溶液的浓度采用 Bradford 测定法 ,具体详细步骤见 BioRad Protein Assay kit 说明书。

1.3 Cyt1Aa 晶体的提纯

采用液体双相法分离 Cyt1Aa 晶体。芽孢和晶体完全释放的重组 B-pMPX2 菌株发酵液 ,10000r/min 离心 10min ,沉淀用 0.5mol/L 的 NaCl 离心洗涤一次 ,生理盐水悬浮菌体后进行超声波处理 ,使晶体、芽孢、细胞碎片尽量分散 ,将超声波处理后的悬液进行离心并用生理盐水洗涤沉淀 ,然后按 70mg 沉淀/mL 双蒸水制成悬液 ,在漩涡混合器上不断震荡

混匀 ,同时除去产生的泡沫 ;当悬液中的泡沫不再增加时 ,将悬液转入分液漏斗 ,并按悬液 1% Na₂SO₄ : CCl₄ 为 7 : 6 : 7 的比例分别加入 1% Na₂SO₄ 和 CCl₄ ,充分振荡约 10min 后 ,静置约 8min ,吸出上层水相 , 10000r/min 离心 10min ,沉淀用 5% 的丙酮和双蒸水各洗涤两次 ,所得的沉淀即为提纯的伴孢晶体。将晶体蛋白用低温冷冻干燥仪进行干燥 ,所得干粉 4℃ 存放。Cyt1Aa 的提纯的晶体称量干重 ,悬浮于去离子水中 ,其摩尔浓度可由 Cyt1Aa 的分子量计算得到。

1.4 生物测定

参照 WHO 提供的标准生物测定方法确定纯化蛋白对敏感致倦库蚊的毒力。在一次性卫生杯中加入 100mL 去氯自来水和 25 头 2 ~ 3 龄健康蚊幼虫 ,然后加入不同稀释度的单独和不同比例的纯化 97kDa Mtx1 溶液和 Cyt1Aa 晶体悬浮液。每个处理样品设 5 ~ 6 个稀释度 ,每个稀释度设 2 个重复。以未加任何毒素蛋白的去氯自来水作空白对照。25 ~ 27℃ 下处理 48h ,记录死亡蚊幼虫数 ,并用 Probit 软件计算出不同毒素和不同毒素混合物的 LC₅₀ 和 LC₉₀ 值。

半致死时间(LT₅₀)的测定 :方法同半致死浓度 (LC₅₀)的测定 ,以在生物测定中确定的 LC₉₈ 值剂量处理蚊幼虫 ,每隔 3 个小时记录一次死亡的蚊幼虫数。每个处理设两个平行重复。计算不同处理时间的蚊幼虫的死亡率 ,并进行死亡率的概率分析 ,用 Probit 软件计算出 LT₅₀ 和 LT₉₀ 值。

1.5 协同作用分析

Mtx1 和 Cyt1Aa 之间的协同作用按照 Tabashnik (1992)提出的方法评价^[6]。协同因子 SF (synergism factor)是混合物的理论 LC₅₀ 值与相应混合物的实际

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

LC₅₀ 值的比值。混合物的理论 LC₅₀ 值是通过计算混合物中各组分 LC₅₀ 值的调和平均数得来的。如果理论 LC₅₀ 与实测 LC₅₀ 相同, SF = 1, 则毒素间仅表现为加和作用; 如果协同作用因子 SF > 1, 则表明毒素间存在协同作用; 如果协同作用因子 < 1, 则表明毒素间存在拮抗作用。

2 结果

2.1 Mtx1 的纯化

含有缺失信号肽序列的 *mtx1* 基因的大肠杆菌重组菌株 E-pTH21 在 2YT 培养基中诱导表达, 菌体破碎液经过谷胱甘肽琼脂糖亲和层析柱纯化谷胱甘肽 S-转移酶和 97kDa Mtx1 的融合蛋白(GST-97kDa Mtx1) 融合蛋白经凝血酶酶切, 再次过亲和层析柱纯化, 得到除去游离 GST 的纯化的 97kDa Mtx1 蛋白。经凝胶分析软件初步分析, 完整的 97kDa Mtx1 纯度达到 90% 97kDa Mtx1 蛋白相对全培养物的提纯率是 0.65mg/L。图 1-A 为纯化的 97kDa Mtx1 毒素蛋白 SDS-PAGE 检测结果。

2.2 Cyt1Aa 晶体的提纯

Cyt1Aa 蛋白晶体按照方法提纯, 冻干粉称重,

根据 Cyt1Aa 的分子量计算其摩尔数。图 1-B 为纯化的 Cyt1Aa 晶体蛋白 SDS-PAGE 检测结果。本试验采用 600mL 液体 LB 培养基发酵 B-pMPX2, 经提纯、冷冻干燥, 得到 0.18g 干粉。晶体相对于全培养物的提纯率为 0.03%。

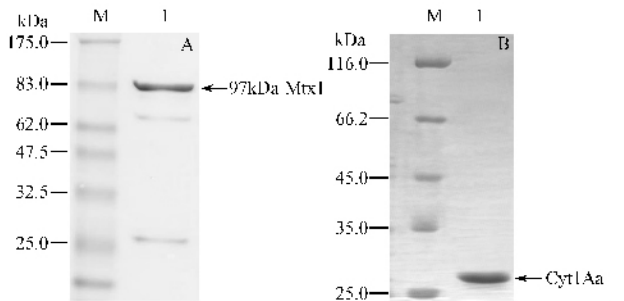


图1 纯化 Mtx1 蛋白(A)和 Cyt1Aa 蛋白(B)的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of Purified Mtx1 (A) and Cyt1Aa protein (B).

2.3 杀蚊毒力测定

将提纯得到 97kDa Mtx1、Cyt1Aa、以及两种蛋白按摩尔数不同比例的混合物进行对敏感致倦库蚊的生物测定(表 2)。

表 2 97kDa Mtx1、Cyt1Aa 及混合物对敏感致倦库蚊的毒力

Samples	Toxicity against susceptible <i>C. quinquefasciatus</i>			SF	
	LC ₅₀	LC ₉₀	LC ₉₈	LC ₅₀	LC ₉₀
97kDa Mtx1	45.29 (36.91 ~ 55.27)	186.6 (134.2 ~ 293.3)	438.1 (281.2 ~ 863.0)	\	\
Cyt1Aa	116.5 (96.07 ~ 142.3)	454.1 (332.3 ~ 718.2)	1031 (662.5 ~ 2018)	\	\
Mixture1	43.81 (35.98 ~ 55.19)	169.3 (118.2 ~ 293.2)	382.2 (232.2 ~ 836.4)	1.22	1.29
Mixture2	35.88 (30.43 ~ 42.78)	105.5 (81.52 ~ 152.5)	201.9 (141.6 ~ 342.1)	1.82	2.51
Mixture3	20.19 (17.14 ~ 23.91)	59.61 (47.36 ~ 82.05)	114.3 (82.81 ~ 182.0)	4.14	5.61

* . ng/mL ; Mixture1. 97kDa Mtx1 :Cyt1Aa = 3:1 ; Mixture2. 97kDa Mtx1 :Cyt1Aa = 1:1 ; Mixture3. 97kDa Mtx1 :Cyt1Aa = 1:3 .

单独的 Cyt1Aa 毒素和 97kDa Mtx1 对 3 ~ 4 龄致倦库蚊幼虫的 LC₅₀ 值分别为 116.5ng/mL 和 45.29ng/mL。当 97kDa Mtx1 和 Cyt1Aa 按照不同比例混合后, 混合物的 LC₅₀ 值明显降低, 其中当 97kDa Mtx1 和 Cyt1Aa 按照 1:3 的比例混合后, 混合物的毒力最高, 其 LC₅₀ 值为 20.19ng/mL, 混合物的毒力是 Mtx1 毒力的 2.24 倍。在不同比例混合情况下, LC₅₀ 及 LC₉₀ 的协同因子均大于 1, 其随 Cyt1Aa 比例的增加而增加。表明 Cyt1Aa 和 Mtx1 之间存在协同作用, 且协同效果随着 Cyt1Aa 的用量增加而增加。

2.4 杀蚊速度测定

将 Mtx1、Cyt1Aa、及其摩尔比为 3:1 的混合物, 以 LC₉₈ 值处理浓度处理敏感致倦库蚊, 计算不同处理时间蚊虫的死亡率(图 2)。

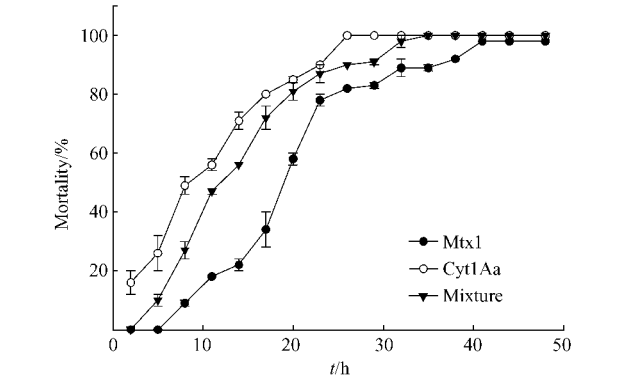


图2 Mtx1、Cyt1Aa 及其混合物在 LC₉₈ 处理浓度下的毒力变化曲线

Fig.2 The curve of Mtx1, Cyt1Aa and their mixture toxicity against susceptible *C. quinquefasciatus* at LC₉₈ .

在 LC₉₈ 处理浓度下, 单独的 Mtx1 毒素处理的蚊

幼虫在 3h 后开始出现卷尾、集聚等现象 ,8h 后开始出现死亡 ,14 个小时之后死亡数开始急剧上升 ,26h 之后死亡率达到 80% 以上 ,同时死亡速率开始平缓。单独的 Cyt1Aa 在处理 2 个小时 ,蚊幼死亡率已经达到了 18% ,之后持续上升 ,到 17h 之后死亡率便达到了 80% ,比单独的 Mtx1 毒素提前 9 个小时 ,26h 之后死亡率已经是 100%。两种毒素按 Mtx1 : Cyt1Aa = 3 : 1 混合后 ,蚊幼很快出现聚集现象 ,5h 蚊幼死亡率达 10% ,之后持续上升 ,20h 死亡率达 80% ,比单独的 Mtx1 毒素要提前 6 个小时 ,至 35 个小时死亡率达到 100% ,总体致死速率明显高于单独 Mtx1 毒素的情况。

为了更科学直观地反映蚊虫死亡率和时间的关系及 LT₅₀ 值的计算 ,将图 2 中死亡率随时间的变化做回归分析 ,计算分析得到各个样品的半致死时间 (表 3)。

表 3 97kDa Mtx1、Cyt1Aa 及 3 : 1 混合物在 98% 浓度下对敏感致倦库蚊蚊幼的 LT₅₀、LT₉₀

Table 3 The probit analysis of LT₅₀ and LT₉₀ of 97 kDa Mtx1 , Cyt1Aa and their mix (3 : 1) toxicity against susceptible *C. quinquefasciatus* in the dilution of 98% mortality

Sample	Toxicity against susceptible <i>C. quinquefasciatus</i>		SF
	LT ₉₀ at 95% confidence	LT ₅₀ * at 95% Confidence	LT ₅₀ LT ₉₀
97kDa Mtx1	18.02 (16.93 ~ 19.07)	33.24 (31.00 ~ 36.08)	\ \
Cyt1Aa	7.481 (5.852 ~ 9.038)	20.33 (16.90 ~ 25.73)	\ \
Mix * *	11.69 (10.99 ~ 12.37)	24.02 (22.61 ~ 25.69)	1.14 1.19

* , Hours ; * * , 97kDa Mtx1 : Cyt1Aa = 3 : 1 .

单独 Cyt1Aa 的 LT₅₀ 是 7.48h ,单独 Mtx1 的 LT₅₀ 是 18.02h ,Cyt1Aa 和 Mtx1 混合后 ,LT₅₀ 提前为 11.69h ,比单独 Mtx1 的 LT₅₀ 提前了 6.33h ,协同因子在 LT₅₀ 及 LT₉₀ 时均大于 1。表明 Cyt1Aa 可以和 Mtx1 协同作用 ,缩短对敏感致倦库蚊毒杀的半致死时间。

3 讨论

3.1 Cyt1Aa 对 Mtx1 杀蚊毒力的影响

表 2 中的数据显示 ,所有比例混合下 ,协同因子都大于 1 ,说明 Cyt1Aa 可以和 Mtx1 协同作用。97kDa Mtx1 : Cyt1Aa = 1 : 3 时的毒力是单独 97kDa Mtx1 时的 2.14 倍 ,97kDa Mtx1 : Cyt1Aa = 3 : 1 时的毒力是单独 97kDa Mtx1 时的 2.03 倍 ,表明 Cyt1Aa 在较高浓度的时候与 97kDa Mtx1 表现出的协同作用较低浓度时明显 ,协同因子值也较大。

3.2 Cyt1Aa 对 Mtx1 杀蚊速度的影响

如图 2 及表 3 所示结果 ,Cyt1Aa 虽然 LC₅₀ 值高于 Mtx1 ,但是在 LC₉₈ 处理浓度下 ,Cyt1Aa 对蚊幼的

毒杀速度明显快于 Mtx1 (提前了 10.54h)。这可能是 Cyt1Aa 对无脊椎动物和脊椎动物细胞的直接溶细胞作用引起的。这种特异性并不是很强的溶细胞作用 ,使得在高浓度 Cyt1Aa 存在的情况下 ,蚊幼虫肠道细胞快速穿孔而引起蚊幼虫很快死亡。

Mtx1 需要在蚊幼虫肠道中碱性环境和蛋白酶的作用下切割成 N-末端、C-末端多肽 ,再对靶细胞识别 ,发挥 ADP-核糖基转移酶活性 ,最终对蚊幼虫表现出致死现象^[4]。整个过程需要一定的时间 ,所以最初的一段时间 Mtx1 对蚊幼虫没有造成明显的致死作用 ,但是在 14 个小时之后 ,单独加有 Mtx1 的样品中 ,蚊幼虫死亡率急剧上升 ,说明 Mtx1 此时开始发挥作用。这可能是作用机制的不同所引起的杀蚊速率的差别。

当两种毒素蛋白混合之后 ,蚊幼虫出现卷尾、集聚的现象明显提前 ,在 5 个小时时开始出现死亡 ,比单独使用 Mtx1 毒素的情况下要提前 3 个小时 ,经过协同因子分析 ,确定 LT₅₀ 的提前归因于 Cyt1Aa 毒素和 Mtx1 毒素的协同作用。这说明 Cyt1Aa 和 Mtx1 发挥协同作用 ,加快了杀蚊速度。

总之 ,通过在纯化蛋白水平上的研究 ,表明 Mtx1 和 Cyt1Aa 的协同作用 ,可以提高对目标蚊虫的毒力和致死速度。这为 Mtx1 和 Cyt1Aa 的进一步研究提供了依据 ,并为 Mtx1 和 Cyt1Aa 在蚊虫控制中的应用提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] WHO. Microbial pest control. IPCS News : The newsletter of the international programme on chemical safety. 2000 ,12 2.

[2] Lanzaro CC. Mosquito Control Research Annual Report. Callifornia : University of Callifornia , 2004 ,11 - 17.

[3] Thanabalu T , Hindley J , Jackson-Yap J , et al. Cloning , sequencing , and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *J Bacteriol* , 1991 ,173 (9) 2776 - 2785.

[4] Thanabalu T , Hindley J , Berry C. Proteolytic processing of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *J Bacteriol* , 1992 ,174 (15) 5051 - 5056.

[5] Thomas WE , Ellar DJ. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxin : effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo* . *J Cell Sci* ,1983 ,60 (1) :181 - 197.

[6] Thomas WE , Ellar DJ. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. *FEBS Lett* ,1983 ,154 (2) 362 - 368.

[7] Wu D , Johnson JJ , Federici BA. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis* . *Mol Microbiol* ,1994 ,13 (6) :

- [8] Chilcott CN , Ellar DJ. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *J Gen Microbiol* ,1988 ,**134**(9) :2551 – 2558.
- [9] Wirth MC , Park HW , Walton WE , *et al.* Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl Environ Microbiol* ,2005 ,**71**(1) :185 – 189.
- [10] Perez C , Fernandez LE , Sun J , *et al.* *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2005 ,**102**(51) :18303 – 18308.
- [11] Wirth MC , Georgiou GP , Federici BA. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito , *Culex quinquefasciatus*. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 ,**94**(20) :10536 – 10540.
- [12] Li T , Sun F , Yuan Z , *et al.* Coexpression of cyt1Aa of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with *Bacillus sphaericus* binary toxin gene in acrySTALLIFEROUS strain of *B. thuringiensis*. *Curr Microbiol* , 2000 ,**40**(5) :322 – 326.
- [13] Park HW , Bideshi DK , Federici BA. Recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* producing Cyt1A , Cry11B , and the *Bacillus sphaericus* binary toxin. *Appl Environ Microbiol* ,2003 ,**69**(2) :1331 – 1334.
- [14] Dervyn E , Poncet S , Klier A , *et al.* Transcriptional regulation of the cryIVD gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol* ,1995 ,**177**(9) :2283 – 2291.
- [15] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2ed. USA : ColdSpring Harbour Laboratory Press ,1989.
- [16] Tabashnik BE. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol* ,1992 ,**58**(10) :3343 – 3346.

The synergism between Mtx1 from *Bacillus sphaericus* and Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* to *Culex quinquefasciatus*

YANG Yan-kun^{1,2} , CAI Quan-xin¹ , CAI Ya-jun¹ , YAN Jian-ping¹ , YUAN Zhi-ming^{1*}

(¹ Wuhan Institute of Virology , Chinese Academy of Sciences , Wuhan 430071 , China)

(² Bioengineering Department , Zhengzhou University , Zhengzhou 450001 , China)

Abstract : Mosquitocidal toxin 1 (Mtx1) was synthesized during vegetative phase of *Bacillus sphaericus* and it had been proved to have higher activity to *Aedes* spp. larvae and Binary toxin (Bin) resistance *Culex* larvae. The truncated 97kDa Mtx1 with a deletion of the signal peptide and the Cyt1Aa crystal protein , a 27.3kDa δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) , were purified from *Escherichia coli* and *B. thuringiensis* recombinant strains respectively. Both purified toxins had high toxicity against *Culex quinquefasciatus* larvae. Bioassay result revealed the purified Mtx1 toxin had high toxicity against the target mosquito larvae , with LC₅₀ of 45.2ng/mL. However , the mixture of Mtx1 and Cyt1Aa exhibited higher toxicity against the mosquito larvae , with a lowest LC₅₀ value of 20.19ng/mL at the ratio of 1:3. (Mtx1 :Cyt1Aa). The calculated synergistic factor of different mixtures suggested a strong synergistic effect between Cyt1Aa toxin and Mtx1. Furthermore , the presence of Cyt1Aa in the mixture could induce early larval mortality , enhancing the activity of Mtx1 to the target mosquito larvae. The synergistic effect of Cyt1Aa on mortality of Mtx1 to mosquito larvae might be caused by the damage of the larval midgut-hemocoel barrier induced by the activated Cyt1Aa toxin , which enhanced the specific pathogenesis of Mtx1 on mosquito larvae. It is suggested that the co-application of Mtx1 and Cyt1Aa in future will be integrated for mosquito management.

Keywords : *Bacillus sphaericus* ; *Bacillus thuringiensis* ; Mosquitocidal toxin ; synergism ; *Culex quinquefasciatus* ; Mtx1 , Cyt1Aa

* Corresponding author. Tel : 86-27-87198195 ; Fax : 86-27-87198137 ; E-mail : yzm@pentium.whiov.ac.cn

Received : 30 August 2006 / Accepted : 13 October 2006 / Revised : 1 December 2006