

苏云金芽胞杆菌营养期杀虫蛋白 Vip 与 Cry 蛋白的协同作用*

蔡启良 刘子铎 孙明 喻子牛**

(华中农业大学生命科学技术学院 教育部暨农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

摘要: 将构建的营养期杀虫蛋白基因 *vip83* 表达质粒 pBMB2328 和含杀虫晶体蛋白基因 (*cry1Ac10* 或 *cry1Ca*) 质粒同时电转化无质粒突变株 BMB171 并双抗筛选。经 PCR 特异引物扩增验证, 分别得到含 *cry1Ac10* 和 *vip83*、*cry1Ca* 和 *vip83* 的双基因重组菌 BMB2830-171 和 BMB2882-171。用单基因重组菌作对照, 分别测定了营养期杀虫蛋白 Vip83 与杀虫晶体蛋白 Cry1Ac10 和 Cry1Ca 两组蛋白对 3 种重要鳞翅目害虫毒力。经统计分析, 结果表明两组杀虫蛋白 Vip83 与 Cry1Ac10 和 Vip83 与 Cry1Ca 之间对棉铃虫均存在拮抗作用, 对甜菜夜蛾协同作用不明显; 但对小菜蛾前者协同作用不明显, 而后者则有增效作用, 其共毒系数为 32.6。双基因的遗传稳定性检测表明这种正负协同关系具有一定的分子遗传稳定性, 可为高效广谱工程菌的构建提供依据。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, 营养期杀虫蛋白, 杀虫晶体蛋白, 协同作用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0043-06

THE SYNERGISM OF VEGETATIVE INSECTICIDAL PROTEIN VIP AND CRY PROTEIN FROM *BACILLUS THURINGIENSIS*

CAI Qi-Liang LIU Zi-Duo SUN Ming YU Zi-Niu

(Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Ministry of Education & Agriculture,
College of Life and Science Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: In this paper, vegetative (*vip83*) and crystal (*cry1Ac10* and *cry1Ca*) insecticidal protein genes from *Bacillus thuringiensis* were simultaneously electroporated into the plasmid-free strain BMB171. By the means of the specific PCR detection, the recombinant strains BMB2830-171 contained *cry1Ac10* and *vip83*, and BMB2882-171 had *cry1Ca* and *vip83*, were obtained respectively. Under the control of recombinant strains with one gene, bioassay of the synergism between vegetative Vip83 and crystal Cry1Ac10 (or Cry1Ca) insecticidal proteins to three important *Lepidopteran* pests were done. The results, by analysis of statistic bio-soft, showed that the synergia relation of vegetative Vip83 and crystal Cry1Ac10 insecticidal protein toxic to *Heliothis armigera* was counteracted, while *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua* unobservable. There was no synergistic action between Vip83 and Cry1Ca insecticidal proteins with *Spodoptera exigua* as tested insect. But their cooperation to *Heliothis armigera* was minus, and the counterpart to *Plutella xylostella* plus, whose co-toxicity factor is 32.6. The experiment of bi-gene genetic stability also suggested that the synergia effect had certain molecular genetic stability in the same cell. This performance can be contributed to construct high-effect and wide-spectrum engineered strain.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Vegetative insecticidal protein, Crystal insecticidal protein, Synergism

苏云金芽胞杆菌是一种已被广泛应用的有效杀虫微生物,迄今已发现了十几种生物

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970423)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39970423)

国家高技术研究发展计划项目 (“863”项目)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA21401, 2001AA212301)

** 联系人 E-mail: yzn@public.wb.hb.cn

收稿日期: 2002-11-06, 修回日期: 2003-03-20

活性成分^[1],其中新发现的营养期杀虫蛋白(Vegetative insecticidal protein, Vip)是一种不同于传统杀虫晶体蛋白(Crystal insecticidal protein, Cry)的胞外蛋白^[2]。这种杀虫蛋白普遍地存在于苏云金芽胞杆菌野生型菌株中,并对某些鳞翅目害虫具有较杀虫晶体蛋白高的杀虫毒力。对解决实际应用中杀虫晶体蛋白制剂虫谱窄,以及缓解最近发现的昆虫抗药性等问题具有重要意义。但是,目前对于如何正确使用营养期杀虫蛋白和杀虫晶体蛋白,尤其是在针对某种害虫的制剂生产中关于营养期杀虫蛋白与不同杀虫晶体蛋白的配比问题,以达到最佳杀虫并避免昆虫抗性产生效果等方面,尚未有相关资料报道。

虽然已有人研究不同杀虫晶体蛋白之间对不同昆虫的毒力协同作用,并利用不同晶体蛋白间的正协同作用,构建了对特定昆虫高毒力的工程菌。但对于同一细胞内营养期杀虫蛋白与杀虫晶体蛋白之间的协同关系,国内外尚未见报道。只有真正的了解同一细胞内营养期杀虫蛋白与不同杀虫晶体蛋白之间的协同关系,才能有效地人工构建某种基因型的特异高毒力工程菌,从而达到良好的防治效果。

本文以同一菌株中不同杀虫蛋白的协同作用为研究对象,特异地在同一细胞中同时转入不同的营养期杀虫蛋白基因与杀虫晶体蛋白基因,以单基因双质粒工程菌为平行对照,采用生物统计软件分析结果,测定了营养期杀虫蛋白 Vip83 与杀虫晶体蛋白 Cry1Ac10 和 Cry1Ca 之间对 3 种重要鳞翅目害虫——棉铃虫 (*Heliothis armigera*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 和甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 的毒力协同关系,并对其遗传稳定性进行了初步分析。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

本实验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

| 菌株和质粒 | 特 性 | | 来 源 |
|---|--------|---|-----------------------------------|
| Plasmids | | | |
| pDG1726 | 3.9kb | Plasmid containing Sp gene | Geurout-fleury (1995) |
| pBMB1205 | 6.4kb | Plasmid containing ori44 origin | Wu Lan (2000) |
| pHT315 | 6.6kb | Shuttle vector between E.coli and B.t.; Ap ^r , Em ^r | D. Lereclus, Pasteur Institute |
| pBMBBK-304 | 10.4kb | Plasmid with cry1Ac10 gene and ori1030 origin; Ap ^r , Em ^r | Sun Ming (unpub- lished) |
| pBMB827-IRS | 11.6kb | Plasmid with cry1Ca gene and ori1030 origin; Ap ^r , Em ^r | Sun Ming (unpub- lished) |
| pBMB8601 | 7.0kb | Plasmid which gene vip83 inserted into pUC19 by XbaI; Ap ^r | Cai Qiliang (2002) |
| pBMB2326 | 6.6kb | E.coli-Bt shuttle vector with ori44 inserted into pDG1726 by EcoRI; Ap ^r , Sp ^r | This study |
| pBMB2328 | 11kb | Plasmid which gene vip83 inserted into pBMB2326 by SphI and BamHI sites; Ap ^r , Sp ^r | This study |
| Strains (<i>Bacillus thuringiensis</i>) | | | |
| BMB171 | | subsp. kurstaki, YBT1463-derived, cry- mutated strain | Li Lin (1999) |
| BMB2330-171 | | BMB171 strain with plasmids pBMB2326 and pBMBBK-304 | This study |
| BMB2382-171 | | BMB171 strain with plasmids pBMB2326 and pBMB827-IRS | This study |
| BMB2831-171 | | BMB171 strain with gene vip83 and pHT315 | This study |
| BMB2830-171 | | BMB171 strain with gene vip83 and cry1Ac10 | This study |
| BMB2882-171 | | BMB171 strain with gene vip83 and cry1Ca | This study |

1.2 培养基

菌株的培养采用 LB 培养基。E. coli 菌株在 37℃ 培养, Bt 菌株在 28℃ 培养。抗生素终浓度分别为: 氨苄青霉素, 100 μg/mL; 红霉素, 25 μg/mL; 壮观霉素, 50 μg/mL。

1.3 PCR 分析

扩增条件参见文献 [5], 基因 *vip83* 的扩增采用 30 个循环, 变性温度 94℃, 1 min; 退火温度 50℃; 延伸温度 72℃, 2 min; 复性时间 1 min。所用的引物见表 2。

表 2 本实验所用特异引物

| 基因 | 引物序列 | 产物大小 |
|-----------------|--|---------|
| <i>vip83</i> | upstream: 5' -TGTTACAAAAACAGCTGAA-3' | 2400bps |
| | downstream: 5' -GATGGATCCGGATCTTACTT-3' | |
| <i>cryIAc10</i> | upstream: 5' -TCACTTCGCATCGACATCTACC-3'; | 487bps |
| | downstream: 5' -ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTGACTTCTC-3' | |
| <i>cryICa</i> | upstream: 5' -CCTTATAGGAGGTGGTAAC-3'; | 333bps |
| | downstream: 5' -GGTGTCCAGATCTTTGAAC-3' | |

1.4 双基因遗传稳定性检测

参照文献 [6] 操作以无抗性液体培养基 LB 培养, 每 8h 转接一次, 再 12h 转接一次, 共转接 4 次, 每次稀释涂皿再点种, 将重组菌 BMB2830-171 和 BMB2882-171 分别同时转接到双抗平板 (红霉素和壮观霉素)、双单抗 (红霉素或壮观霉素) 平板和无抗性平板, 每个平板点种 100 个, 观察菌落生长情况。共重复 2 次, 求平均值。在单抗和无抗性平板菌落生长数为对照情况下, 以双抗平板菌落数生长数为纵坐标, 时间为横坐标作双基因遗传稳定曲线。

1.5 生物测定

参照文献 [3、7], 用棉铃虫、小菜蛾和甜菜夜蛾 3 龄幼虫进行生物测定。供试虫数为 10 头/样品, 每个样品 3 个平行, 共重复 3 次。所得数据采用生物统计软件 Origin 进行分析, 并计算回归方程。

1.6 协同作用共毒系数计算

参照文献 [8] 进行。采用 Mansour 等提出的共毒计算公式:

$$\text{共毒系数} = 100 \times (\text{实测死亡率} - \text{预期死亡率}) / \text{预期死亡率}$$

其中, 实测死亡率为杀虫蛋白混合后所观察到的校正死亡率, 预期死亡率则为各杀虫蛋白的理论死亡率之和, 理论死亡率根据各杀虫蛋白的毒力回归方程计算出在混合物中的相应浓度的死亡率。共毒系数值大于 20 为增效作用, 小于 -20 为拮抗作用, 介于 -20 至 20 之间为协同关系不明显。本文所得共毒系数值是双基因毒力回归方程中浓度为 LC_{50} 的计算结果。

2 结果与分析

2.1 单基因双质粒 Bt 工程菌 BMB2330-171、BMB2382-171 和 BMB2831-171 的构建

为在同一细胞内研究营养期杀虫蛋白与杀虫晶体蛋白的协同作用, 本文利用了能与苏云金芽孢杆菌常用的 pHT 系列载体中 *ori1030* 复制子并存的复制子 *ori44*¹⁹, 将不同筛选标记的壮观霉素抗性基因连接到复制子 *ori44* 得到载体 pBMB2326 (见图 1, 2)。利用 *Bam*HI 和 *Sph*I 双酶切, 将营养期杀虫蛋白基因 *vip83* 亚克隆至载体 pBMB2326, 得到重组质粒 pBMB2328 (见图 1, 3)。再将质粒 pBMB2328 与杀虫晶体蛋白基因通用载体 pHT315、

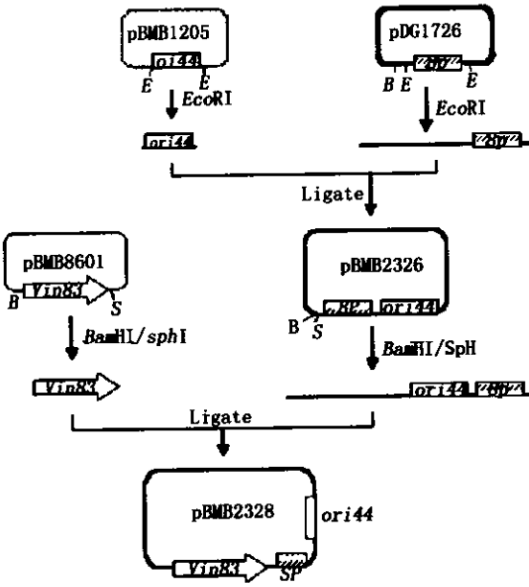


图1 重组质粒 pBMB2326 和 pBMB2328 的构建

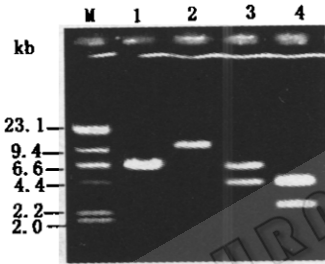


图3 重组质粒 pBMB2328 酶切图谱

M λ DNA/*Hind*III (top to bottom, 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.2, 2.0, and 0.56kb, respectively), 1 pBMB2326/*Sph*I, 2 pBMB2328/*Sph*I, 3 pBMB2328/*Sph*I + *Bam*HI, 4 *Sph*I + *Bam*HI.

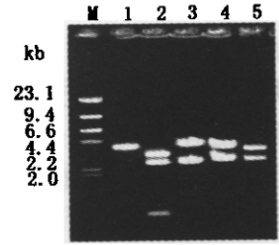


图2 质粒 pBMB2326 酶切图谱
M λ DNA/*Hind*III (top to bottom, 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.2, 2.0, and 0.56kb, respectively), 1 pDG1726/*Eco*RI, 2 pBMB2326/*Kpn*I + *Hind*III, 3 pBMB2326/*Hind*III, 4 pBMB2326/*Eco*RI, 5 pBMB1205/*Eco*RI.

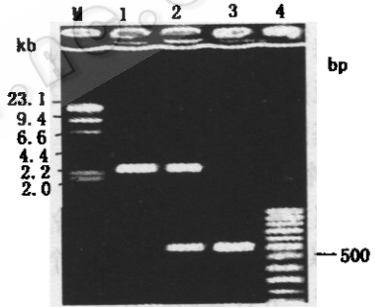


图4 PCR 扩增图谱

M λ DNA/*Hind*III (top to bottom, 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.2, 2.0, and 0.56kb, respectively), 1 BMB2831-171/*vip83*PCR, 2 BMB2830-171/*vip83* + *cry1Ac10*PCR, 3 BMB2331-171/*cry1Ac10*PCR, 4 100bp ladder.

含 *cry1Ac10* 基因质粒 pBMBBK-304 和 *cry1Ca* 基因质粒 pBMB827-IRS 与载体质粒 pBMB2326 同时电转化无质粒突变株 BMB171, 分别获得单基因双质粒 Bt 工程菌 BMB2831-171、BMB2330-171 和 BMB2382-171 (见图 4, 5)。

2.2 含营养期杀虫蛋白和杀虫晶体蛋白双基因重组菌的构建

将重组质粒 pBMB2328 与携带杀虫晶体蛋白基因 *cry1Ac10* 质粒 pBMBBK-304 和含杀虫晶体蛋白基因 *cry1Ca* 质粒 pBMB827-IRS 同时电转化受体菌 BMB171, 分别得到双基因重组菌 BMB2830-171 和 BMB2882-171。特异引物 PCR 扩增结果表明了, 在重组菌 BMB2882-171 和 BMB2830-171 分别同时含有 *vip83/cry1Ca* (见图 5) 和 *vip83/cry1Ac10* 基因 (见图 4)。

2.3 生物活性测定

在无晶体突变株 BMB171 作为平行对照的情况下, 分别将工程菌 BMB2830-171、

BMB2330-171、BMB2882-171、BMB2382-171 和 BMB2831-171 培养 48h 发酵后, 将发酵液稀释一定倍数, 以甜菜夜蛾、棉铃虫和小菜蛾为供试昆虫进行生物活性测定。根据每种重组菌的半致死浓度 LC_{50} 值, 分别根据 Mansour 等 (1966) 提出公式计算得到杀虫蛋白 Vip83 和 Cry1Ac10、Vip83 和 Cry1Ca 之间的共毒系数值 (见表 3, 4), 结果表明了杀虫蛋白 Vip83 和 Cry1Ac10 之间对棉铃虫存在拮抗作用, 对甜菜夜蛾和小菜蛾的协同作用不明显; 而杀虫蛋白 Vip83 和 Cry1Ca 之间对棉铃虫亦有拮抗作用, 对甜菜夜蛾也是协同作用不明显, 但对小菜蛾则有增效作用, 其共毒系数为 32.6。

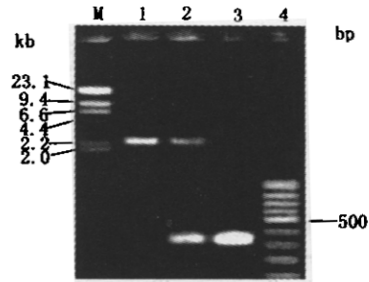


图5 PCR扩增图谱

M λ DNA/*Hind*III (top to bottom, 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.2, 2.0, and 0.56kb, respectively), 1 BMB2831-171/*vip83* PCR, 2 BMB2882-171/*vip83* + *cry1Ca* PCR, 3 BMB2382-171/*cry1Ca* PCR, 4 100bp ladder.

表3 营养期杀虫蛋白 Vip83 与杀虫晶体蛋白 Cry1Ac10 对鳞翅目昆虫的协同关系

| 供试昆虫 | 基因工程菌 | 回归方程 | 相关系数 | LC_{50} 值 (μ L/mL) | LC_{50}^{12} 浓度 死亡率 (%) | 共毒系数 |
|----------------------------|-------------|------------------------------|------|---------------------------|---------------------------|-------|
| <i>Plutella xylostella</i> | BMB2830-171 | $Y_{12} = 3.00 + 1.99X_{12}$ | 0.99 | 10.10 | 50.0 | 17.1 |
| | BMB2831-171 | $Y_1 = 3.15 + 1.23X_1$ | 0.97 | 31.52 | 16.2 | |
| | BMB2330-171 | $Y_2 = 2.84 + 2.18X_2$ | 0.96 | 9.79 | 26.5 | |
| <i>Spodoptera exigua</i> | BMB2830-171 | $Y_{12} = 2.00 + 1.98X_{12}$ | 0.97 | 32.76 | 50.0 | 16.3 |
| | BMB2831-171 | $Y_1 = 2.92 + 1.22X_1$ | 0.98 | 50.23 | 27.5 | |
| | BMB2330-171 | $Y_2 = 1.86 + 1.75X_2$ | 0.99 | 61.95 | 15.5 | |
| <i>Heliothis armigera</i> | BMB2830-171 | $Y_{12} = 3.51 + 1.03X_{12}$ | 0.96 | 28.12 | 50.0 | -22.4 |
| | BMB2831-171 | $Y_1 = 3.01 + 1.24X_1$ | 0.95 | 40.12 | 28.6 | |
| | BMB2330-171 | $Y_2 = 3.42 + 1.06X_2$ | 0.93 | 30.56 | 35.8 | |

注: 1 表示 Vip83, 2 是 Cry1Ac10, 12 表示 Vip83 和 Cry1Ac10。

表4 营养期杀虫蛋白 Vip83 与杀虫晶体蛋白 Cry1Ca 对鳞翅目昆虫的协同关系

| 供试昆虫 | 基因工程菌 | 回归方程 | 相关系数 | LC_{50} 值 (μ L/mL) | LC_{50}^{12} 浓度 死亡率 (%) | 共毒系数 |
|----------------------------|-------------|------------------------------|------|---------------------------|---------------------------|-------|
| <i>Plutella xylostella</i> | BMB2882-171 | $Y_{12} = 2.96 + 2.18X_{12}$ | 0.95 | 8.60 | 50.0 | 32.6 |
| | BMB2831-171 | $Y_1 = 3.15 + 1.23X_1$ | 0.97 | 31.52 | 14.2 | |
| | BMB2382-171 | $Y_2 = 3.12 + 1.83X_2$ | 0.97 | 10.65 | 23.5 | |
| <i>Spodoptera exigua</i> | BMB2882-171 | $Y_{12} = 3.69 + 1.28X_{12}$ | 0.97 | 10.47 | 50.0 | 14.7 |
| | BMB2831-171 | $Y_1 = 2.92 + 1.22X_1$ | 0.98 | 50.23 | 11.4 | |
| | BMB2382-171 | $Y_2 = 3.18 + 1.89X_2$ | 0.97 | 9.14 | 32.2 | |
| <i>Heliothis armigera</i> | BMB2882-171 | $Y_{12} = 3.36 + 1.09X_{12}$ | 0.97 | 32.21 | 50.0 | -25.6 |
| | BMB2831-171 | $Y_1 = 3.01 + 1.24X_1$ | 0.95 | 40.12 | 31.1 | |
| | BMB2382-171 | $Y_2 = 3.04 + 1.33X_2$ | 0.92 | 29.70 | 36.1 | |

注: 1 表示 Vip83, 2 是 Cry1Ca, 12 表示 Vip83 和 Cry1Ca。

2.4 双基因重组菌的遗传稳定性检测

为检测所构建的双基因重组菌 BMB2830-171 和 BMB2882-171 中营养期杀虫蛋白基因与杀虫晶体蛋白基因在无抗性条件下, 是否能较长时间稳定遗传, 以便于更有利于生产应用。本文采用方法 1.4 的步骤, 检测了传代 40h 后, 重组菌中的双质粒维持率。结果表明在传代 40h 后, 重组菌 BMB2830-171 和 BMB2882-171 的双质粒维持率仍均在 65% 左右 (见图 6)。这说明两种重组菌中双基因即使在没有抗性选择压力条件下, 仍能较

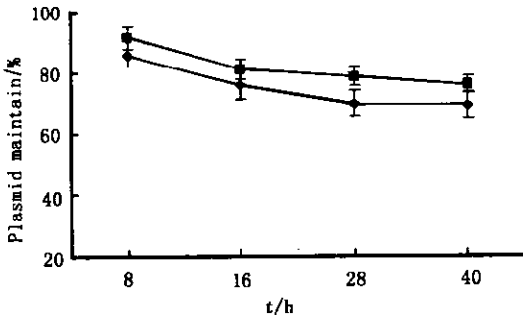


图6 双基因重组菌 BMB2830-171 与 BMB2882-171 的遗传稳定性检测
◆ BMB2830-171, ■ BMB2882-171

长时间的稳定遗传, 可适合于生产应用。

3 讨论

人为地采用了不同杀虫蛋白的基因型组合形式, 研究了营养期杀虫蛋白与不同杀虫晶体蛋白的协同作用。以小菜蛾为供试昆虫时, 营养期杀虫蛋白 Vip83 与杀虫晶体蛋白 Cry1Ca 之间表现出明显的增效作用, 与 Cry1Ac10 之间协同关系不明显, 这说明了不同杀虫晶体蛋白与营养期杀虫蛋白的协同作用不同。而杀虫蛋白 Vip83 与 Cry1Ca 之间对小菜蛾、

棉铃虫和甜菜夜蛾 3 种昆虫表现出不同的协同关系, 提示了不同虫种对营养期杀虫蛋白与杀虫晶体蛋白之间的协同作用影响很大。并印证了为何天然菌株中缺失某个基因后, 菌株杀虫毒力反而提高的现象^[10]。所以, 构建营养期杀虫蛋白基因与杀虫晶体蛋白基因工程菌时, 应具体问题具体分析, 以达到提高工程菌的杀虫毒力。

由于营养期杀虫蛋白存在于多数苏云金芽胞杆菌中, 并具有的高度保守性^[4], 说明了营养期杀虫蛋白与不同杀虫晶体蛋白之间的毒力活性的正负协同关系, 可能可以解释为什么天然菌株中, 有的杀虫毒力高, 而有的几乎没有毒力? 因此, 深入研究营养期杀虫蛋白与不同杀虫晶体蛋白之间的毒力活性关系, 尤其是营养期杀虫蛋白基因缺失体的改造, 有望找到工程菌低毒力的原因。对高效广谱工程菌的生产与应用, 具有相当重要的实际指导意义。

致谢 承蒙华中农业大学丘道寿博士后和林晓燕硕士的帮助, 特此表示感谢。

参考文献

- [1] 蔡启良, 刘子铎, 喻子牛. 应用与环境生物学报, 2003, 9 (2): 207 ~ 212.
- [2] Estruch J J, Warren G W, Mullins M A, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 5389 ~ 5394.
- [3] 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌制剂的生产和应用, 北京: 农业出版社, 1993.
- [4] 蔡启良, 刘子铎, 孙明, 等. 生物工程学报, 2002, 18 (5): 578 ~ 582.
- [5] 刘子铎, 李林, 孙明, 等. 武汉大学学报, 1997, 44: 13 ~ 15.
- [6] Sanchis V, Agaisse H, Chauvaux J, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (2): 779 ~ 784.
- [7] 曾晓慧, 喻子牛, 胡萃. 昆虫天敌, 1999, 21 (1): 38 ~ 42.
- [8] Mansour N A, Eldefrawi M E, Topozada A, *et al.* J Econ Entomol, 1966, 59 (2): 307 ~ 311.
- [9] 吴岚, 孙明, 喻子牛. 微生物学报, 2000, 40 (3): 264 ~ 269.
- [10] 鲁松清, 刘子铎, 喻子牛. 遗传学报, 2000, 27 (9): 839 ~ 844.
- [11] Gurrout-Fleury A-M, Shazand K, Frandsen N, *et al.* Gene, 1995, 167: 335 ~ 336.
- [12] Arantes O, Lereclus D. Gene, 1991, 106: 115 ~ 119.
- [13] 李林, 喻子牛. 应用与环境微生物学报, 1999, 5 (4): 395 ~ 399.