

# 几株球形芽孢杆菌二元毒素基因的检测及对敏感和抗性尖音库蚊的毒性

袁志明<sup>①</sup> C. Nielsen-LeRoux<sup>②</sup> N. Pasteur<sup>③</sup>  
J. F. Charles<sup>②</sup> R. Frutos<sup>④</sup>

(①中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071; ②巴斯德研究所昆虫病原菌研究室, 法国巴黎 75724;  
③蒙彼利埃第二大学进化科学研究所, 法国蒙彼利埃 34095; ④国际农业发展  
研究中心分子病理和遗传工程研究室, 法国蒙彼利埃 34096)

**摘要** 根据 *Bacillus sphaericus* 2362 二元毒素基因核苷酸序列合成的一组寡聚核苷酸为引物, 通过 PCR 扩增出 1.1 kb 的 DNA 片段作探针检测了 C<sub>3</sub>-41、IAB881、IAB872、BS-197 和 LP1-G 菌株中二元毒素基因。Southern 杂交表明 C<sub>3</sub>-41、IAB881、IAB872 和 BS-197 菌株中 3.5 kb *Hind* III 及 LP1-G 中 4.7 kb *Hind* III 的酶切片段分别带有与探针有高度同源性的二元毒素基因。SDS-PAGE 和 Western 印迹杂交表明所有菌株都能产生 41.9 kD 和 51.4 kD 的毒素蛋白。C<sub>3</sub>-41、IAB881、BS-197 和 2362 的全发酵液和碱抽提液对敏感尖音库蚊 *Culex pipiens* subsp. *pipiens* 幼虫毒性高, 但抗性幼虫几乎无毒; LP1-G 对敏感和抗性蚊幼虫具有相同的中度毒杀作用; IAB872 对敏感幼虫毒性高, 抗性幼虫的毒力同 LP1-G 相似。这两株菌对抗性蚊幼虫的毒性可能是由 Mtx 毒素蛋白所导致的。

**关键词** 球形芽孢杆菌, 抗性, 尖音库蚊, 杀蚊, 毒性, 基因

球形芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus* (简称 Bs) 是一株在自然界中广泛分布的好气芽孢杆菌。目前, 在已发现的 49 个鞭毛血清型中有 8 个血清型 (H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>5</sub>、H<sub>6</sub>、H<sub>9</sub>、H<sub>25</sub> 和 H<sub>48</sub>) 的菌株对蚊幼虫有一定的毒杀作用<sup>[1]</sup>。其中大部分高毒力菌株属血清型 H<sub>5</sub>、H<sub>6</sub> 和 H<sub>25</sub>, 如 2362、1593、2297 和 C<sub>3</sub>-41 等<sup>[2~3]</sup>。它们对库蚊 *Culex* spp. 毒力高, 按蚊 *Anopheles* spp. 次之, 对伊蚊 *Aedes* spp. 毒力低。所有高毒力菌株在其芽孢形成过程中能形成由二元毒素基因编码的 51.4 kD 和 41.9 kD 蛋白组成的伴孢晶体。蚊幼虫取食孢晶混合物后, 晶体在中肠碱性环境和蛋白酶的作用下被降解释放出毒素蛋白, 然后结合到中肠上皮细胞的敏感位点上, 使中肠破坏后导致蚊幼虫死亡<sup>[4]</sup>。而在低毒力菌株中, 如 SS II-1, 还存在编码 100 kD 和 30.8 kD 毒蛋白的 *mtx* 基因<sup>[5]</sup>。在细菌的整个生长发育过程中, *mtx* 基因都能表达产生 Mtx 毒素<sup>[6]</sup>。该毒素的作用机理不详。Southern 杂交实验也证明, 在高毒力菌株 2362、2317-3、1691 和 IAB-59 中, 既存在二元毒素基因, 也存在 *mtx* 基因, 前者表达于细菌芽孢形成期, 后者表达于营养体生长期<sup>[5,7]</sup>。

由于蚊幼虫中肠上皮细胞微绒毛膜上只有一个二元毒素的结合位点, 蚊幼虫易通过其结合位点的改变而对二元毒素产生抗性<sup>[8]</sup>。目前已在法国、印度、巴西和哥伦比亚等地

发现对 Bs 产生抗性的抗性蚊虫品系, 其抗性高达10万倍<sup>[9~10]</sup>, 严重地影响了 Bs 杀虫剂的大面积应用, 因此, 有必要从自然界中不断分离筛选出具有新的杀蚊毒性的新菌株。

本研究采用分子生物学方法检测了不同血清型、不同杀蚊谱和不同毒力的几株 Bs 菌株二元毒素基因的存在, 分析了不同菌株所产生的主要蛋白类型, 同时利用生物测定方法考查了不同菌株对敏感和抗性尖音库蚊 *Culex pipiens* subsp. *pipiens* 的毒力。

## 1 材料和方 法

### 1.1 材 料

实验所用的球形芽孢杆菌菌株如表1。所有菌株来源于法国巴斯德研究所昆虫病原细菌室。

表1 不同 *B. sphaericus* 菌株对敏感和抗性尖音库蚊 *Culex pipiens* 的毒性\*

Table1 Toxicities of different *Bacillus sphaericus* strains against susceptible and resistant mosquito larvae

血清型 Serotypes	菌株 Strains	样品类型 Types of samples	敏感幼虫 <i>C. pipiens</i> (Susceptible)		抗性幼虫 <i>C. pipiens</i> (Resistant)		抗性倍数 Resistance-Ratio
			LC <sub>50</sub> **	LC <sub>90</sub>	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>	
H1a	BS-197	FWC	1.893×10 <sup>-5</sup>	4.195×10 <sup>-5</sup>	>10 <sup>-1</sup>	>10 <sup>-1</sup>	>5.2×10 <sup>3</sup>
H1a	BS-197	Toxin	0.7189 μg/mL	2.4132 μg/mL			
H3	IAB881	FWC	3.90×10 <sup>-6</sup>	8.860×10 <sup>-6</sup>	>10 <sup>-1</sup>	>10 <sup>-1</sup>	>2.5×10 <sup>4</sup>
H3	IAB881	Toxin	0.133 μg/mL	0.422 μg/mL			
H3	LP1-G	FWC	4.132×10 <sup>-4</sup>	1.360×10 <sup>-3</sup>	3.95×10 <sup>-4</sup>	9.12×10 <sup>-3</sup>	0.72
H3	LP1-G	Toxin	25.562 μg/mL	255.29 μg/mL			
H5	2362	FWC	1.773×10 <sup>-6</sup>	7.185×10 <sup>-6</sup>	>10 <sup>-1</sup>	>10 <sup>-1</sup>	>5.6×10 <sup>4</sup>
H5	2362	Toxin	0.0855 μg/mL	0.330 μg/mL			
H5	C <sub>3</sub> -41	FWC	1.299×10 <sup>-6</sup>	4.845×10 <sup>-6</sup>	>10 <sup>-1</sup>	>10 <sup>-1</sup>	>7.70×10 <sup>4</sup>
H5	C <sub>3</sub> -41	Toxin	0.0975 μg/mL	0.407 μg/mL			
H48	IAB872	FWC	1.13×10 <sup>-6</sup>	4.182×10 <sup>-6</sup>	8.06×10 <sup>-4</sup>	3.28×10 <sup>-3</sup>	206.7
H48	IAB872	Toxin	0.917 μg/mL	4.109 μg/mL			

FWC (final whole cultures): 全发酵液; Toxin (alkali-solubilized toxin): 碱抽提液毒素;

\* The results at 48hs; 48h 结果; \*\* LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> are calculated as FWC dilution and μg/mL of toxin protein; 全发酵液的稀释倍数和碱抽提液的蛋白浓度

### 1.2 方 法

1.2.1 DNA 操作: 不同 Bs 总 DNA 抽提参照 Delecluse 等<sup>[11]</sup>。DNA 的限制性酶切分析、Southern 印迹转移和杂交参照 Maniatis 等<sup>[12]</sup>。一组寡聚核苷酸引物由 Genset (Paris, France) 合成。PCR 扩增反应条件如下: 95℃ 预培养 5 min, 4℃ 变性 1 min, 42℃ 退火 1 min, 72℃ 复性 2 min, 25 个循环。用 Geneclean Kit 纯化扩增产物, 按 Promega 公司随机引物标记试剂盒标记以制备放射性探针。

**1.2.2 蛋白质分析:** Bs 菌株在 MBS 培养基中, 30℃ 摇床培养至芽孢释放。分别离心收集孢晶混合物, 悬于 1 mol/L NaCl 处理 1 h, 离心, 无菌水洗涤两次后用 0.05 mol/L NaOH 在 30℃ 抽提 1 h, 碱抽提液经 1 mol/L HCl 中和后在 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 中透析过夜。样品保存在 -20℃。碱抽提液中的可溶性蛋白质含量的测定采用 Bradford 法 (Bio-Rad), 以牛血清蛋白为标准品。

按常规方法进行样品蛋白质的 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 上的蛋白质通过电转移转移到硝酸纤维膜 (Hybond C Super Amersham) 上。ECL Western Blotting Kit (Amersham) 进行蛋白质的免疫测定。41.9 kD 和 51.4 kD 蛋白的抗血清是利用 2362 菌株的二元毒素抗原制备。

**1.2.3 生物测定:** 实验室饲养的敏感和抗性尖音库蚊 (*Culex pipiens* subsp. *pipiens* Montpellier Strain) 3~4 龄幼虫用于生物测定。其中抗性尖音库蚊 (SPHAE) 是采自法国 Montpellier 经处理的野外蚊幼虫孳生地, 并经实验室筛选所获得的二元毒素有抗性的抗性品系。不同菌株的全酵液和碱抽提液对两种蚊幼虫毒性的生物测定方法和 LC<sub>50</sub> 及 LC<sub>90</sub> 计算参照 Thiery 等<sup>[1]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 二元毒素基因的检测

参照 2362 菌株二元毒素基因的核苷酸序列设计、合成一组位于其 3.5 kb *Hind* III 酶切片段中 1 483~1 501 和 2 572~2 593 核苷酸之间的一组寡聚核苷酸作引物。其中, 寡聚核苷酸 BS-1: 5-GCT AAA TAG GCC TTT ATC CC; BS-2: 5-CCG AAA CCA TTA TAC ATG GG。以 2 362 总 DNA 为模板, 通过 PCR 技术扩增出一条 1.1 kb 的 DNA 片段, 经 r<sup>32</sup>P ATP 标记制备放射性同位素标记探针, 用于 Southern 杂交。

分别以 C<sub>3</sub>-41, IAB881, IAB872, BS-197 和 LP1-G 菌株总 DNA 为模板, 采用相同的扩增反应条件下, 分别可以扩增出一条相同的 1.1 kb 的 DNA 片段 (图 1)。

不同菌株的总 DNA 经 *Hind* III 和 *Eco*RI 酶切降解为 1.0~8.0 kb 的 DNA 片段。Southern 杂交证明 1.1 kb 的探针同 LP1-G 中 4.7 kb *Hind* III 及 C<sub>3</sub>-41、IAB881、IAB872 和 BS-197 菌株中 3.5 kb *Hind* III 酶切片段具有同源性 (图 2)。另外 C<sub>3</sub>-41、IAB881、IAB872 和 BS-197 菌株中 4.2 kb *Eco*RI 片段同探针也具有极高的同源性。

### 2.2 蛋白质分析

通过 12% 的 SDS-PAGE 进行了 Bs 菌株碱抽提液中可溶性蛋白组分的分析, 结果如图 3。所有的样品中都可以检测到 51.4 kD 和 41.9 kD 的两条蛋白带。其中 LP1-G 样品中



图 1 PCR 扩增反应产物

Fig. 1 Product of PCR

M: Marker; Lanes a, b: LP1-G;

Lanes c, d: IAB881; Lanes e,

f: IAB872; Lanes g, h: C<sub>3</sub>-41;

Lane i: BS-197 and Lanes j, k: 2362

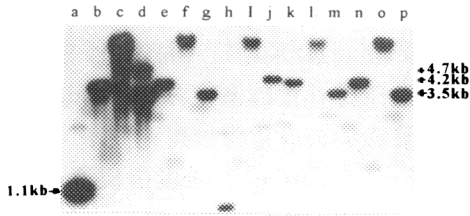


图2 DNA 酶切产物的 Southern 杂交

Fig. 2 Autoradiograph of Southern blots of DNA from different *B. sphaericus* strains, digested by following restriction enzymes:

E: *EcoRI*; K: *Kpn I* and H: *Hind III*

Lane a: Purified 1.1 kb DNA fragment;

Lanes b~d: IAB881; Lanes e~g: IAB872;

Lanes h~j: LP1-G; Lanes k~m: BS-197

and Lanes n~p: C<sub>3</sub>-41

发酵液和碱抽提液对敏感蚊幼虫的毒性同2362菌株相当,其LC<sub>50</sub>分别为 $1.299 \times 10^{-6} \sim 3.900 \times 10^{-6}$ 和 $0.0855 \sim 0.133 \mu\text{g/mL}$ ; BS-197毒力略低于2362,其发酵液和碱抽提液的LC<sub>50</sub>分别为 $1.893 \times 10^{-5}$ 和 $0.7189 \mu\text{g/mL}$ ; LP1-G毒力较低,发酵液体和碱抽提液的LC<sub>50</sub>分别为 $4.132 \times 10^{-4}$ 和 $25.56 \mu\text{g/mL}$ 。IAB872对抗性幼虫的毒力比对敏感幼虫的毒力低206.7倍; LP1-G对抗性和敏感幼虫的毒力相同。其它菌株对抗性蚊幼虫几乎无毒。

### 3 讨论

PCR 技术和 Southern 杂交证明, LP1-G 的 4.7 kb *Hind III* 酶切片段和其它菌株的 3.5 kb *Hind III* 酶切片段带有与2362菌株毒素基因同源的毒素基因。不同菌株碱抽提液的 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析也证明所有菌株能产生 41.9 kD 和 51.4 kD 的毒素蛋白多肽,从而证明 C<sub>3</sub>-41、IAB881、IAB872、BS-197 和 LP1-G 同2362菌株一样带有编码蛋白 41.9 kD 和 51.4 kD 的二元毒素基因。

对蚊幼有毒的 100 kD 可溶性 Mtx 蛋白存在高毒力和低毒力的 Bs 菌株中,它合成为 Bs 生长发育过程中,同芽孢的形成不相关。由于多数 Bs 菌株分泌的胞外蛋白酶能降解 Mtx 毒素,因此在其发酵后期检测不到这种毒蛋白的存在。SDS-PAGE 证明 IAB872 和

还含有一条约 49 kD 的蛋白多肽。用稀释 20 000 倍和 41.9 kD 和 51.4 kD 毒素蛋白抗血清对不同样品中蛋白质进行 Western 印迹杂交分析,证明所有样品都含有相同的二元毒素蛋白带。这两种抗血清同 LP1-G 中 49 kD 的蛋白多肽无同源性,未见的杂交带,可能是一种新的蛋白多肽。

### 2.3 杀蚊活性

不同 Bs 菌株对敏感和抗性尖音库蚊的毒性如表 1。C<sub>3</sub>-41、IAB881 和 IAB872 菌株全

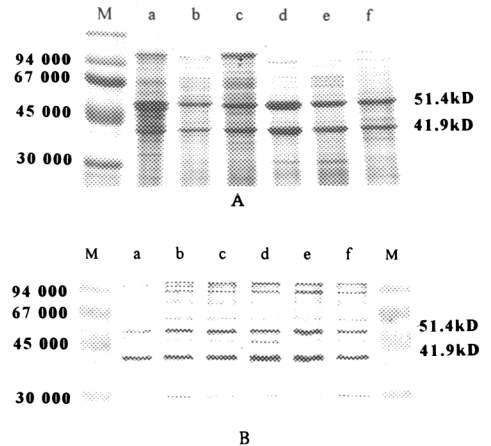


图3 不同 *B. sphaericus* 菌株碱抽提液可溶性蛋白 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析

Fig. 3 Protein analysis of the different

*B. sphaericus* strains

A: SDS-PAGE; B: Western Blotting;

M: Marker; lane a: LP1-G; Lane b: BS-197;

lane c: IAB872; lane d: IAB881; lane e:

C<sub>3</sub>-41 and lane f: 2362

LP1-G 碱抽提液中除含有大量的二元毒素蛋白外, 还含有少量的100 kD 蛋白, Western 印迹分析也表明该蛋白同二元毒素抗血清无同源性, 如图2。另外, 还可发现二元毒素抗血清同110~120 kD 的多肽发生免疫反应, 这些蛋白可能是原毒素。

由于 C<sub>3</sub>-41、IAB881、BS-197和2362含相同二元毒素基因, 其杀蚊谱相似。其杀蚊毒性方面的差异可能是由于各菌株间生理性差异所导致二元毒素基因表达量的不同决定的。其它作者的研究表明, 蚊幼虫通过中肠上皮细胞毒蛋白敏感结合位点的改变而对 Bs 二元毒素产生抗性<sup>[7,8,13]</sup>。因此对2362菌株有抗性的幼虫对其它 Bs 菌株也有抗性。IAB872对敏感幼虫毒性强, 其对抗性幼虫的低毒性可能是由 Mtx 导致的。我们进行了 LP1-G 二元毒素基因在苏云金杆菌以色列亚种 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 中的克隆和表达。由于该二元毒素基因核苷酸序列的变异, 其表达产物对敏感和抗性幼虫均无毒性 (结果另文发表)。而且生物测定也表明该菌株对敏感和抗性蚊幼都有相同的毒力, 因此, 我们认为 LP1-G 菌株对蚊幼虫的毒性是由100 kD 的 Mtx 蛋白或49 kD 蛋白引起的。

**致谢** 法国巴斯德研究所 A. Delecluse 博士, V. M. Juarez-Perez 博士, M. M. Lecadet 博士和中国科学院武汉病毒研究所张用梅研究员对本研究给予支持, 在此一并致谢。

## 参 考 文 献

- 1 Thiery I *et al.* New mosquitocidal strains from Ghana belonging to serotypes H3, H6 and H48 of *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, 37: 718~722
- 2 Davidson E W. A review of the pathology of bacilli infecting mosquitoes, including an ultrastructure study of larvae fed *Bacillus sphaericus* 1593 spores. *Dev. Ind. Microbiol.*, 1981, 22: 69~81
- 3 张用梅等. 两株高毒力球形芽孢杆菌的分离. *杀虫微生物*, 1987, 1: 98~101
- 4 Singh G J P. Gill S S. An electron microscope study of the toxin action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 1988, 52: 237~247
- 5 Thanabalu T *et al.* Cloning, sequence and expression of a gene encoding a 100 kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SS II-1. *J. Bacteriol.*, 1991, 173: 2 776~2 785
- 6 Ahmed H K *et al.* Regulation of mosquitocidal toxin synthesis in *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 43: 310~314
- 7 Charles J F *et al.* *Bacillus sphaericus* toxin; Molecular biology and mode of action. *Ann. Rev. Entomol.*, 1996, 41: 451~472
- 8 Nielsen-LeRoux C, Charles J F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to specific receptor on brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 221: 285~290
- 9 Rao D R *et al.* Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi. India. *J. Mosq. Control Assoc.*, 1995, 11: 1~5
- 10 Silva-filha M H *et al.* Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field treated population of *Culex quinquefasciatus*. *J. Entomol.*, 1995, 88: 525~530
- 11 Delecluse A *et al.* Deletion by in vivo recombination shows that 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* not essential for mosquitocidal activity. *J. Bacteriol.*, 1991, 173: 3 374~3 381
- 12 Maniatis T *et al.* *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982

# DETECTION OF THE BINARY TOXIN GENES OF SEVERAL *BACILLUS SPHAERICUS* STRAINS AND THEIR TOXICITIES AGAINST SUSCEPTIBLE AND RESISTANT *CULEX PIFIENS*

Yuan Zhiming<sup>①</sup> C. Nielsen-LeRoux<sup>②</sup> N. Pasteur<sup>③</sup>

J. F. Charles<sup>②</sup> R. Frutos<sup>④</sup>

① Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071;

② Bacteries Entomopathenes, Institut Pasteur, Paris France 75724;

③ Institut des Sciences de l'Evolution, Montpellier I, Montpellier, France 34095;

④ BIOTROP-IGEPAM, CIRAD, Montpellier, France 34096)

**Abstract** Using synthetic oligonucleotides designed on the basis of the binary toxin gene sequence of 2362, a 1.1 kilodalton DNA fragment has been prepared as a probe to study the toxin genes of several *Bacillus sphaericus* strains. The 3.5kb *Hind* III DNA fragments of C<sub>3</sub>-41, IAB881, IAB872 and BS-197 as well as the 4.7kb *Hind* III DNA fragment of LP1-G are homologous to the probe. The 51.4 and 41.9 kilodalton binary toxin can be detected by SDS-PAGE and Western Blotting. The results of the bioassay showed that C<sub>3</sub>-41, IAB881, BS-197 and the reference strain 2362 have a high potency against susceptible *Culex pipiens* subsp. *pipiens* and no potency against the resistant mosquito larvae from France (SPHRAE). IAB872 and LP1-G have medium toxicity against the resistant larvae.

**Key words** *Bacillus sphaericus*, resistance, *Culex pipiens* subsp. *pipiens*, mosquitocidal, toxicity, gene