

多位点生物杀虫毒素 BtA 形成的 HPLC 分析

刘波¹, 朱育菁^{1,2}, Cetin Sengonca², 冒乃和¹

(¹福建省农业科学院生物技术研究所, 福州 350003; ²Institute of Phytopathology, University of Bonn, D-53115 Bonn, Germany)

摘要: 基于多位点生物杀虫毒素理论和生物耦合技术, 研制生物杀虫毒素 BtA, 为新生物农药的开发提供了一种新思路、新方法和新手段。将苏云金芽孢杆菌 (*B. t.*) 晶体进行酶解改造, 形成带末端氨基的原毒素; 将阿维菌素的羟基进行激活、衍生化, 形成带羧基的阿维菌素衍生物 (Abamectin-COONa); 再利用氨基-羧基偶联剂 (EDC) 进行两种生物毒素的生物耦合。利用反相液相色谱 (HPLC) 检测不同反应时间的 BtA 生物耦合体系, 以确定生物耦合反应的发生; 通过反应底物两两组合的分析比较, 识别生物耦合产物 BtA 生成的色谱特征, 分析生物耦合产物——多位点生物杀虫毒素 BtA 的产生过程。

关键词: 多位点生物杀虫毒素; BtA; 生物耦合; HPLC

HPLC Analysis on Formation of the Multi-Bioinsecticidal-Toxin BtA

LIU Bo¹, ZHU Yu-jing^{1, 2}, Cetin Sengonca², MAO Nai-he¹

(¹ Biotechnology Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003; ² Institute of Phytopathology, University of Bonn, D-53115 Bonn, Germany)

Abstract: Based on the theory of multi-bioinsecticidal toxin and the technique of bioconjugation, The multi-bioinsecticidal-toxin BtA was worked out in order to provide a new idea and a new method for development of a new type of biocide. The bioconjugation procedure of BtA included: decomposing *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) crystal by DTT into the protoxin with an end amino group; activation and derivation of abamectin to form abamectin-COONa with a carboxylic group; final bioconjugation by using amino-carboxylic conjugator EDC to achieve the substance combination of two biotoxins. In the detecting program, the experiments were carried out with HPLC (High Pressure Liquid Chromatogram) on measuring BtA bioconjugation system at different reaction times to identify the occurrence of bioconjugation reaction, on comparing BtA bioconjugate system with the three reactants and three two-reactant combinations to distinguish bioconjugated product BtA, and on a qualitative analysis of the bioconjugated product BtA. The results proved that a new bioconjugated substance was confirmed to present in BtA bioconjugation system, which was named as multi-bioinsecticidal- toxin BtA.

Key words: Multi-bioinsecticidal-toxin; BtA; Bioconjugation; HPLC

生物农药具有生物活性高、选择性强和残留少等优点, 正逐步补充和替代化学农药的使用^[1,2]。不同类型的生物农药通过对害虫不同位点的作用而达到杀虫效果, 如苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 *B.t.*, 下同) 通过伴孢晶体毒素作用于害虫中肠上皮细胞致死害虫^[3], 而放线菌 (*Streptomyces avermitilis*) 毒素阿维菌素 (abamectin) 通过抑制 γ -氨基丁酸 (GABA) 受体使害虫神经传导受阻^[4]。但是, *B.t.* 存

在杀虫谱窄和杀虫速率慢等两大弱点^[5,6], 而阿维菌素则毒性较强、害虫易产生抗药性^[7]。近年来, 多位点生物杀虫毒素理论的提出和生物耦合技术 (bioconjugate technique) 的应用为开发杀虫速率快、杀虫谱广、毒性低、害虫抗药性产生慢的新生物农药提供了新思路、新方法和新手段^[8,9]。害虫对生物农药产生抗药性的机理是克服了生物农药的位点作用, 使之失效、钝化^[10], 因此害虫在生长过程中对多个位点

收稿日期: 2005-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471175)、国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA244031-2) 和德国国家科学基金项目 (DFG SE 425/4-3)

作者简介: 刘波 (1957-), 男, 福建惠安人, 研究员, 博士, 主要从事生物农药、生物技术研究。Tel: 0591-87884601; Fax: 0591-87884262; E-mail: fzliubo@163.com或laeptb@163.com

作用的克服比对单一位点作用的克服要困难^[11]; 具两个以上作用位点的生物农药(杀虫剂)称为多位点生物杀虫毒素^[12]。生物耦合是通过偶联剂将两种或者两种以上的生物活性物质进行结合, 生成一种新的生物耦合物的过程, 产生的耦合物保持着原生物活性物质各自固有的特性^[13]。生物耦合技术是生物大分子耦合和修饰的重要技术, 在环境净化、特定细胞组分的检测和定位、免疫研究等方面有着广阔的应用前景^[13]。

多位点生物杀虫毒素 BtA 的研究有过许多的报道^[1,5,11,12,14], 它是基于多位点生物杀虫毒素的理论和生物耦合技术, 对两种生物毒素——*B.t.*晶体原毒素和阿维菌素进行结构修饰, 然后再通过氨基-羧基偶联剂 EDC [1-Ethyl-3-(3-dimethyl- amino-propyl carbodiimide hydrochloride)], 实现生物耦合, 生成新的具有多个作用位点的生物耦合物——BtA^[14]。本研究组在以往的试验中已经证实了生物耦合产物与反应底物在紫外分光特性、杀虫谱、杀虫速率与引起小菜蛾死亡症状上存在着显著的差异^[12,14], 研究表明 BtA 对小菜蛾的致死率达 93%, 高于 *B.t.*晶体原毒素和阿维菌素等当量单独作用和复配作用。本试验的目的是利用高效液相色谱(HPLC)分析多位点杀虫毒素 BtA 的形成, 进一步确认多位点生物杀虫毒素 BtA 的色谱特性, 以期为随后的结构分析、理化性质的分析和形成条件的优化打下基础。研究主要内容包括: 检测不同反应时间的 BtA 生物耦合体系以确定生物耦合反应的特征; 进行 BtA 生物耦合体系各反应底物两两组合的分析比较, 识别生物耦合产物 BtA; 对生物耦合产物 BtA 进行定性试验。现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

*B.t.*菌株 LSZ9408 (*B.t.* var. *kurstaki*, str. LSZ9408) 由福建省农业科学院生物技术中心从土壤中分离和保存。*B.t.*晶体的提纯采用双相分离法^[15], *B.t.*发酵液:1% Na_2SO_4 : CCl_4 =7:6:7 (体积比), 晶体纯度>95%。晶体降解使用二硫代苏糖醇(dithiothreitol, DTT, 分子量为 154.2), CAS 为 27565-41-9, 北京华美生物工程公司进口分装。阿维菌素原粉(分子量 871.8)由浙江德清拜克生物有限公司生产, 其中 B_{1a} ($\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$, 分子量为 873.1)含量为 90%, B_{1b} ($\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{O}_{14}$, 分子量为 860.1)含量为 10%。阿维菌素的激活使用氢化钠 [Sodium hydride, 氢化钠 (NaH), 分子量为 24.0], CAS 为 7646-69-7。阿维菌素的羧基化衍生使用丁二酸酐

[Butyric anhydride, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO})_2\text{O}$, 分子量为 158.20], CAS 为 106-31-0。偶联剂为零键桥偶联剂 EDC [1-Ethyl-3-(3-dimethyl- amino-propyl carbodiimide hydrochloride)](分子量为 191.7), CAS 为 25952-53-8。HPLC 为 HP1100 (美国安捷伦公司生产), 色谱柱为 C_{18} (4.0 mm×250 mm, 内径 5 μm), 检测器为 VWD。色谱流动相采用上海化学试剂研究所生产的乙腈(色谱纯)。

1.2 多位点生物杀虫毒素 BtA 的制备

1.2.1 *B.t.*晶体原毒素的制备 称取 1 g *B.t.*晶体加入到 100 ml 的 0.1 mol·L⁻¹ Na_2CO_3 -HCl 缓冲液 (pH 9.5) 中, 加入适量 DTT 使其最终浓度达 25 mmol·L⁻¹, 37 °C 下温培 2 h, 4 °C 下 16 000 r/min 离心 10 min^[16], 上清液即为带末端氨基的 *B.t.*晶体原毒素^[16]。用 Lowry 法测定最终蛋白质浓度, 用蒸馏水调节蛋白质浓度至 10 mg·ml⁻¹, 备用。

1.2.2 阿维菌素的羧基化衍生物的制备 称取 2 g 阿维菌素原粉溶解在 100 ml 的甲苯中, 加入 2 g 氢化钠 (NaH), 35 °C 下反应 1 h, 用滤纸滤去未反应的氢化钠 (NaH) 以终止激活反应, 蒸馏滤液去除剩余的甲苯, 以获得激活反应的产物——阿维菌素钠 (abamectin-Na)。在阿维菌素钠中加入 1 g 丁二酸酐, 重新加入甲苯, 调整反应溶液的最终体积为 100 ml。在混合物中加入少量沸石, 111 °C 下回流 2 h, 产生阿维菌素羧基钠 (abamectin-COONa)^[14]。将反应混合物过滤, 去除未反应物和沸石, 蒸馏滤液以去除剩余的丙酮。将反应产物溶解在 100 ml 的乙醇中, 最终浓度为 20 mg·ml⁻¹, 备用。

1.2.3 多位点生物杀虫毒素 BtA 的生物耦合 分别量取 10 ml 在 1.2 和 1.3 中制备的带末端氨基的 *B.t.*晶体原毒素溶液和 abamectin-COONa 溶液, 均匀混合; 加入 383.4 mg 的氨基-羧基偶联剂 EDC, 最终浓度为 0.1 mol·L⁻¹; 生物耦合反应在 25 °C 下进行^[13]。称该反应体系为 BtA 生物耦合体系, 形成的生物耦合物质称为多位点生物杀虫毒素 BtA (简称 BtA)。EDC 与阿维菌素羧基钠反应产生活性酯中间体 (α -酰基异脲中间体), 在 *B.t.*晶体原毒素(亲核剂)存在的情况下, 活性酯与 *B.t.*晶体原毒素形成酰胺键, 生成生物耦合产物 BtA, 并释放一个异脲副产物(图 1)。

1.3 多位点生物杀虫毒素 BtA 形成的 HPLC 分析

HPLC 色谱分析条件: 进样量为 10 μl , 温度为 25 °C, 流动相 A 为纯水, 流动相 B 为乙腈, 流速为 1.0 ml·min⁻¹, 洗脱条件为 20%~80% B / 0~20 min, 检测

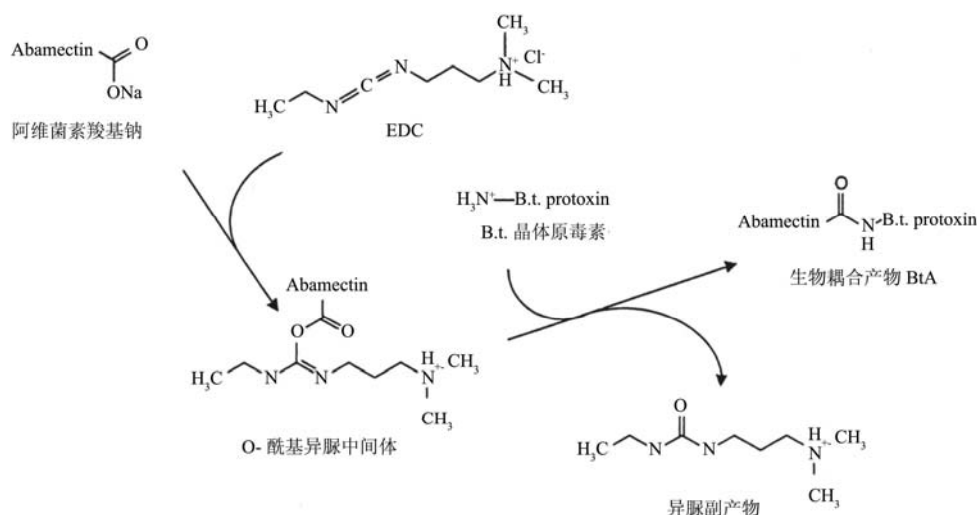


图 1 多位点生物杀虫毒素 BtA 的生物耦合

Fig. 1 The strategy for conjugation of multi-bioinsecticidal-toxin BtA

波长为 254 nm。

1.3.1 多位点生物杀虫毒素 BtA 色谱特性的确定 对 BtA 生物耦合体系每隔 24 h 取样检测, 分析生物耦合体系在不同反应时间的物质变化, 以确定生物耦合反应的发生。分别以同期制备的、相同浓度的 3 种反应底物 (*B.t.* 晶体原毒素、abamectin-COONa 和 EDC) 及底物两两组合 (*B.t.* 晶体原毒素+Abamectin-COONa、*B.t.* 晶体原毒素+EDC 和 Abamectin-COONa+EDC) 的 3 组物质作为对照, 于相同的时间取样进行 HPLC 检测, 分析差异, 确定各反应底物和生物耦合产物的特征色谱峰。

1.3.2 多位点生物杀虫毒素 BtA 的定性分析 为进一步确定生物耦合物质 BtA 的特征峰, 在反应 48 h 的 BtA 生物耦合体系中取 1 ml 样品, 取样 4 次, 1 份备测, 其余 3 份分别加入 1 ml *B.t.* 晶体原毒素、abamectin-COONa 和 EDC, 而后立即进行 HPLC 检测, 观察色谱峰的变化, 进行定性分析^[17]。

2 结果与分析

2.1 多位点生物杀虫毒素 BtA 色谱特性的确定

2.1.1 BtA 生物耦合体系在不同反应时间的物质变化 试验结果表明在 24 h 以后, BtA 生物耦合体系发生了反应, 在峰 1 和峰 4 位置上有反应产物的形成, 产物的量随着反应时间的延长而增加 (图 2)。 *B.t.* 晶体原毒素、Abamectin-COONa 和 EDC 混合后 (0 h) 立即进行 HPLC 检测, BtA 生物耦合体系检测到 5 个

峰 (图 2-A); 25°C 下反应 24 h 后, BtA 生物耦合体系检测到 6 个峰 (从左到右定名为峰 1~峰 6, 下同), 与 0 h 相比, 在保留时间 2 min 左右新出现了峰 1 (图 2-B)。随反应时间的延长, 峰 1 和峰 4 的高度不断升高, 峰 2 和峰 3 的高度不断下降, 峰 5 和峰 6 的高度变化不大 (图 2-C、2-D)。峰 1 的峰高由 24 h 的 189.9 mAU 增加到 120 h 的 1873.1 mAU, 峰 4 的峰高由 0 h 的 15.3 mAU 增加到 120 h 的 97.5 mAU, 表明在峰 1 和峰 4 位置上有反应产物的形成, 物质在不断地增加。峰 2 和峰 3 的峰高分别由 0 h 的 106.1 mAU 和 72.6 mAU 下降至 120 h 的 29.5 mAU 和 11.7 mAU, 表明有物质消耗。

2.1.2 BtA 生物耦合体系与各反应底物的比较 试验结果表明, BtA 生物耦合体系在峰 1 和峰 4 位置出现的反应产物与反应底物之间存在着显著的差异 (图 3)。反应 120 h 的 BtA 生物耦合体系与各反应底物 *B.t.* 晶体原毒素、Abamectin-COONa 和 EDC 的 HPLC 检测结果比较, 可以看出: *B.t.* 晶体原毒素有 3 个色谱峰, 其保留时间为 4~12 min (预备试验表明在 15 min 后不再出现新峰) (图 3-A); Abamectin-COONa 有 3 个峰, 其保留时间为 12~23 min (图 3-B); 溶于乙腈的饱和 EDC 只有 1 个峰, 保留时间为 13.856 min, 和 Abamectin-COONa 色谱峰 1 接近, 峰高仅为 23.1 mAU (图 3-C)。

在 BtA 生物耦合体系中检测到 6 个峰, 保留时间分别为 1.886 min (峰 1)、3.446 min (峰 2)、9.404 min

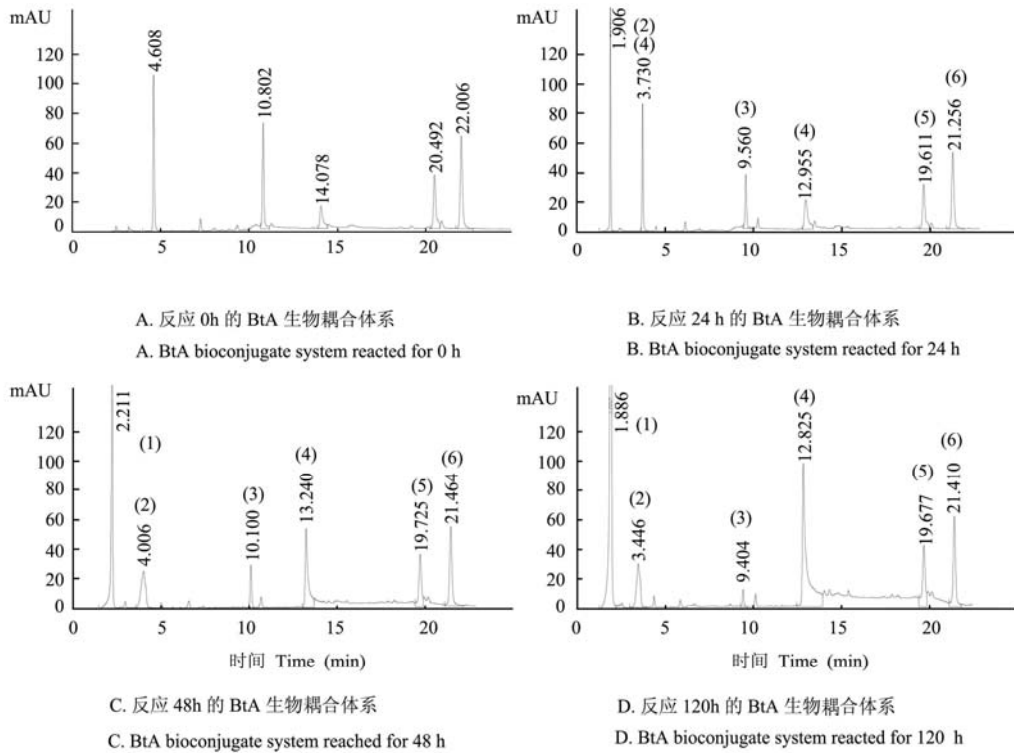


图 2 BtA 生物耦合反应体系在不同反应时间的液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatographs of BtA bioconjugation system at different reaction times

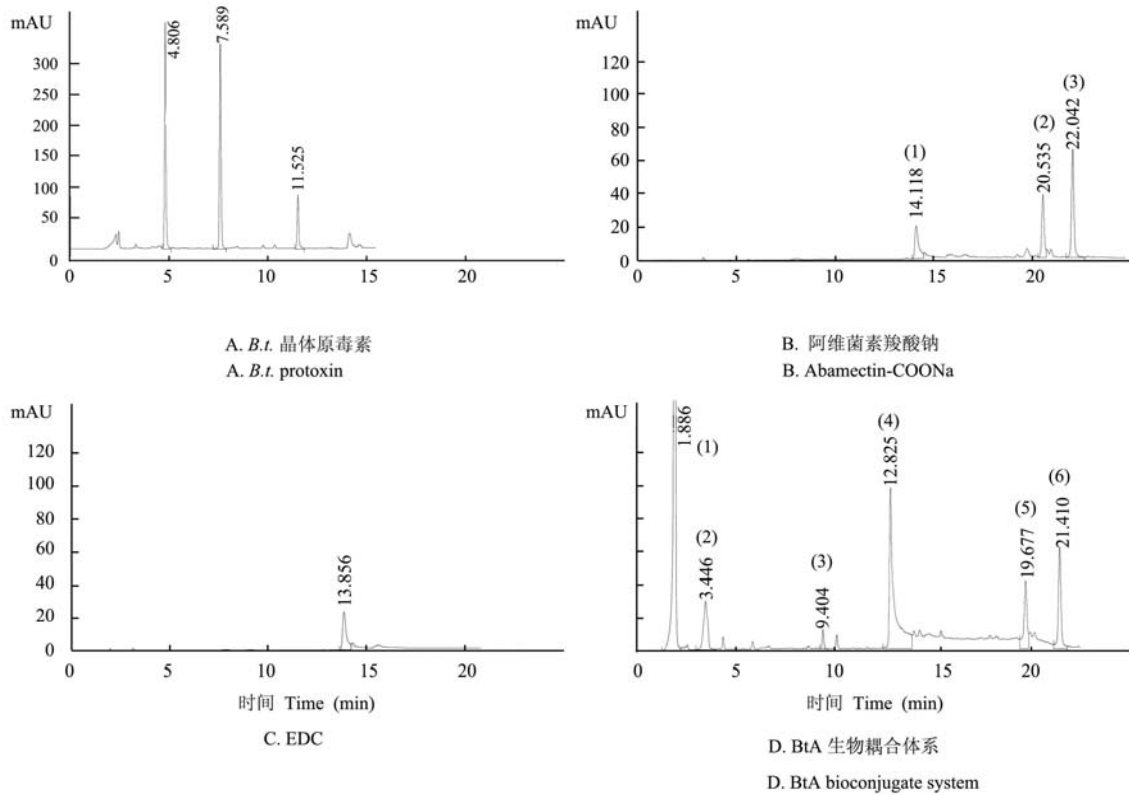


图 3 BtA 生物耦合体系与各反应底物的液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatographs of BtA bioconjugation system and the three reactants

(峰 3)、12.825 min (峰 4)、19.677 min (峰 5) 和 21.410 min (峰 6), 峰高分别为 1873.1 mAU、29.5 mAU、11.7 mAU、97.5 mAU、41.5 mAU 和 61.1 mAU, 其中, 峰 1 为新峰, 是 3 种反应底物皆不具有的峰。在 BtA 生物耦合体系色谱图中, *B.t.* 晶体原毒素的相应色谱峰的 3 个峰值分别降低了 91.92%、99.5% 和 86.52%; 峰 4 处在 abamectin-COONa 色谱的峰 1 与 EDC 色谱峰的相应位置上, 但其峰高上升到 97.5 mAU; 峰 5 和峰 6 处于 abamectin-COONa 色谱的峰 2 和峰 3 的相应位置上, 峰高有轻微的下降 (图 3-D)。结果表明: 与 3 种反应底物相比, BtA 生物耦合体系色谱的峰 1 为新峰, 峰 4 物质的保留时间与 abamectin-COONa 色谱的峰 1 和 EDC 色谱峰的保留时间接近, 但峰高比后两者的峰高总和 47.9 mAU 还大 49.6 mAU, 峰 1 和峰 4 的变化表明有生物耦合产物的形成; 在 BtA 生物耦合体系色谱图中保留时间为 3~12 min 的相应位置上, *B.t.* 晶体原毒素的相应色谱峰值明显降低, 表明 *B.t.* 晶体原毒素被消耗。

2.1.3 BtA 生物耦合体系与反应底物组合的比较

BtA 生物耦合体系色谱峰 1 和峰 4 的分析表明: 在 BtA 生物耦合体系中有反应产物形成。由于 BtA 生物

耦合有 3 种底物——*B.t.* 晶体原毒素、abamectin-COONa 和 EDC, 因此新出现的反应产物有可能同时存在着是由其中 2 种底物反应产生的物质, 以及由 3 种底物同时反应形成生物耦合产物; 因此, 有必要对 BtA 生物耦合体系与反应底物的两两组合进行比较分析。

试验结果表明: 在 BtA 生物耦合体系峰 4 位置上的变化与各反应底物两两组合后产生的结果有着显著的差异 (图 4)。反应 120 h 后, *B.t.* 晶体原毒素+abamectin-COONa 组合的色谱图显示: *B.t.* 晶体原毒素和 abamectin-COONa 保持着原有的特征峰, 表明了在没有 EDC 参与反应的条件下, 两者组合没有起反应 (图 4-A)。abamectin-COONa+EDC 组合的色谱图与 abamectin-COONa 的色谱图接近, 说明 EDC 的色谱峰与 abamectin-COONa 的峰 1 相重叠 (图 4-B)。*B.t.* 晶体原毒素+EDC 组合的色谱图中, 出现 3 个大峰和 3 个小峰; 与 *B.t.* 晶体原毒素色谱图相比, 保留了 *B.t.* 晶体原毒素的特征峰, 但出现了与 BtA 生物耦合体系色谱峰 1 相同的峰; 相应于 BtA 生物耦合体系色谱峰 4 的位置上, 出现了峰高为 31.3 mAU 的小峰, 但比 BtA 生物耦合体系的峰 4 低 66.2 mAU (图 4-C)。结

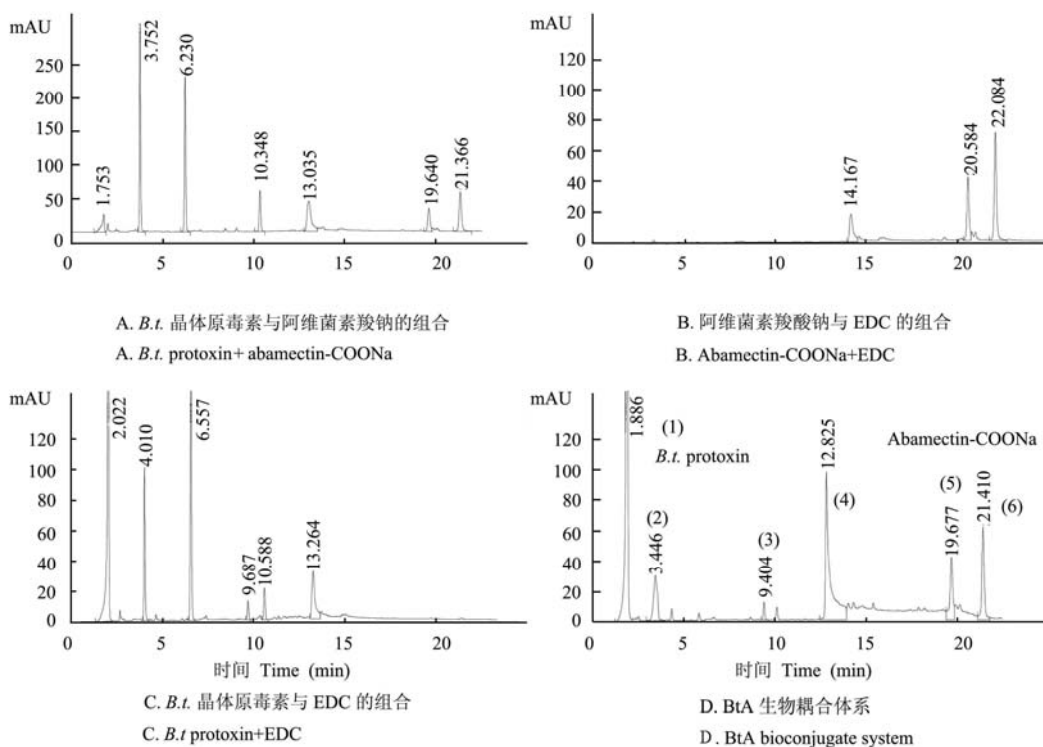


图 4 BtA 生物耦合体系与各反应底物组合的液相色谱图

Fig. 4 HPLC chromatographs of BtA bioconjugation system and three two-reactant combinations

果表明: 与 3 种反应底物相比, BtA 生物耦合体系在峰 1 和峰 4 上呈现出差异 (见 2.1.2), 其中峰 1 的变化在 *B.t.* 晶体原毒素+EDC 组合中检测到, 3 种反应底物同时发生反应形成的生物耦合产物在 HPLC 检测中主要表现为峰 4 上的变化; 因此, 峰 4 (保留时间约为 12.825 min) 是多位点生物杀虫毒素 BtA 的 HPLC 特征峰 (图 4-D)。

2.2 多位点生物杀虫毒素 BtA 的定性分析

试验结果表明, 在 3 组的定性分析试验中, 各色谱峰的变化存在着显著的差异 (图 5)。在反应 48 h 的 BtA 生物耦合体系 (图 5-A) 中, 加入 *B.t.* 晶体原毒素后, 峰 2 的峰高迅速地由 31.9 mAU 增加至 178.9 mAU, 其它峰的峰高未见明显增加 (图 5-B), 表明峰 2 为 *B.t.* 晶体原毒素的主要特征峰; 在反应 48 h 的 BtA

生物耦合体系中, 加入 abamectin-COONa 后, 峰 5 和峰 6 的峰高分别由 11.9 mAU 和 18.2 mAU 升高至 48.3 mAU 和 81.2 mAU, 其它峰的峰高未见明显增加 (图 5-C), 表明峰 5 和峰 6 为 abamectin-COONa 的主要特征峰; 在反应 48 h 的 BtA 生物耦合体系中, 加入 EDC 后, 峰 1 的峰高由 101.1 mAU 增加至 211.7 mAU, 其它峰的峰高未见明显增加 (图 5-D), 表明峰 1 为 EDC 的主要特征峰, 这与前面所测的溶于乙腈的 EDC 色谱峰的保留时间有所不同, 估计与 BtA 生物耦合体系另有 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-HCl}$ 缓冲液有关。比较 BtA 生物耦合体系色谱图的 6 个峰和 3 组定性分析的色谱峰, BtA 生物耦合体系的峰 4 基本保持不变, 可以进一步确定峰 4 为生物耦合的产物——多位点生物杀虫毒素 BtA 的特征峰。

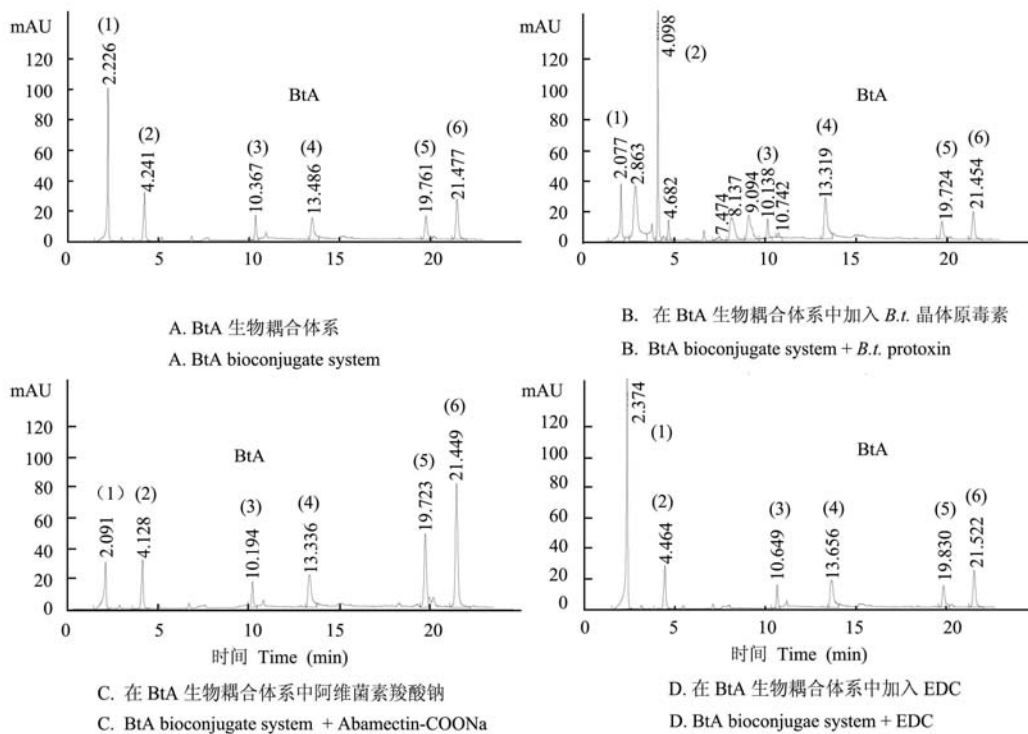


图 5 多位点生物杀虫毒素 BtA 的定性分析

Fig. 5 Qualitative analysis of multi-bioinsecticidal-toxin BtA

3 讨论

B.t. 伴胞晶体由二聚体亚单位多肽组成, 多肽链中的半胱氨酸基大多都处在分子表面, 可与相邻的亚单位形成二硫键, 这些共价键在体外可由碱溶液 (pH 9.5 以上) 或由昆虫肠液和二硫苏糖醇 (DTT) 等还原剂

打开, 使晶体解体形成带末端氨基的毒素蛋白, 即 *B.t.* 晶体原毒素^[16]。

对阿维菌素进行结构修饰, 可进一步提高其安全性和活性, 降低毒性。最成功的例子是对阿维菌素 B_1 组分 C-22 和 C-23 位双键进行选择性地还原, 形成伊维菌素 (22,23-二氢阿维菌素 B_1); 伊维菌素较阿维菌

素具有更高的安全性,从而可大规模商业生产^[19]。阿维菌素的改造使得其生物活性得到了极大的提高,该系列中最具活性的衍生物是 4"-外-甲氨基-4"-脱氧阿维菌素 B₁^[20]。对阿维菌素结构修饰主要包括羟基的修饰、螺缩酮的修饰、配基(内酯环)的修饰和六氢苯并呋喃环的修饰^[21]。本研究中将阿维菌素的羟基进行激活、衍生化,形成带羧基的阿维菌素衍生物。

EDC 是一种水溶性碳化二亚胺类化合物,普遍地用于生物活性物质的耦合。它介导的是两种分子间直接的耦合,也就是说一种分子中的原子是被共价地附着于另一种分子的原子上,中间没有介入交联剂或间隔基,因此它又被称为零键桥偶联剂^[13]。已被应用于蛋白质的链接^[22]、免疫抗原的制备^[13]、微粒表面的修饰^[13]和 ATP 酶的分析^[23]等等。本研究对 *B.t.* 晶体进行还原改造,形成带末端氨基的 *B.t.* 晶体原毒素;将阿维菌素的羟基进行激活、衍生化,形成阿维菌素羧酸钠;最后利用零键桥偶联剂 EDC 实现生物耦合^[13,14]。

Liu and Sengonca^[14]用紫外分光检测的结果表明:*B.t.* 晶体原毒素在 280 nm 有 1 个特征吸收峰;阿维菌素在 245 nm 有 1 个特征吸收峰,经氢氧化钠(NaH)激活后在 354~600 nm 范围内出现吸收峰,进一步加入了丁二酸酐衍生化形成的阿维菌素羧酸钠在 354~600 nm 范围表现显著性的变化,但是在激活和衍生化反应过程中,阿维菌素的特征峰基本保持不变,保证了阿维菌素的生物活性;将原毒素和阿维菌素衍生物在偶联剂 EDC 的作用下进行生物耦合反应,生成生物耦合物 BtA,在 345~600 nm 波长之间,吸收峰发生了较大的变化,阿维菌素的特征峰基本不变,形成了左边为阿维菌素特征峰,右边为原毒素耦合峰的特征波形。室内生物测定结果表明生物耦合产物——多位点生物杀虫毒素 BtA 对小菜蛾三龄幼虫的 LT₅₀ 为 35.27 h,比 *B.t.* 晶体原毒素和羧基化阿维菌素少 21.16 h 和 10.14 h;BtA 除了与 *B.t.* 晶体一样对小菜蛾幼虫具有杀灭毒力外,还对桃蚜和黄曲条跳甲分别有 93.75%和 89.33%的防治效果^[12,14]。从 BtA 杀死的小菜蛾死亡症状上看,伴胞晶体和原毒素使小菜蛾的死亡症状表现为黑色,阿维菌素和阿维菌素衍生物使小菜蛾的死亡症状表现为黄色,BtA 化学耦合物使小菜蛾的死亡症状表现为头部黑色,腹部黄色^[14]。与对照化学农药相比,BtA 对小菜蛾具有较高的毒力,对其捕食性天敌捕食螨、草间小黑蛛、花蝽和七星瓢虫毒力较低^[24]。HPLC 检测结果证实了前人研究生物耦合产物 BtA 的紫外分光检测结果。生物耦合技术可

成功地运用于多位点生物杀虫毒素的合成,而多位点生物杀虫毒素可提高生物农药的杀虫速率、扩大杀虫谱,在害虫抗药性的治理中会起到重要的作用^[12]。生物耦合物 BtA 的 HPLC 色谱特征的成功测定,对于进一步研究 BtA 形成条件,产物提纯,结构分析,理化性质奠定了基础,关于 BtA 形成条件,产物提纯,结构分析,理化性质的研究将另文报道。

4 结 论

4.1 BtA 生物耦合反应体系

BtA 生物耦合反应体系构成:10 ml *B.t.* 晶体原毒素溶液,10 ml Abamectin-COONa 溶液,均匀混合;加入 383.4 mg 的氨基-羧基偶联剂 EDC,最终浓度为 0.1 mol·L⁻¹;在 25℃下反应 24 h,形成耦合物质 BtA,作为多位点生物杀虫毒素。

4.2 BtA 生物耦合物的色谱特征

BtA 生物耦合体系色谱特征:反应体系有 6 个峰,峰 1 为 EDC 特征峰;峰 2 和峰 3 为 *B.t.* 晶体原毒素的特征峰;峰 4 为生物耦合产物 BtA 的特征峰;峰 5 和峰 6 为 Abamectin-COONa 的特征峰。

4.3 生物耦合技术可成功地运用的意义

B.t. 原毒素与阿维菌素衍生物的生物耦合的成功,将两种生物毒素连接成单体双毒素的结构,为生物毒素的利用开辟了新途径,使得多位点生物杀虫毒素的合成改造简单化、实用化,对于提高生物农药的杀虫效果和杀虫速率、扩大杀虫谱具有重要意义,对于害虫抗药性的控制将起到重要的作用。

References

- [1] Liu B, Sengonca C. Biotechnological development of GCSC-BtA as a new type of biocide. Göttingen: Cuvillier Verlag Göttingen, 2004: 249.
- [2] 张锡贞,张红雨. 生物农药的应用与研究现状. 山东理工大学学报, 2004, 18(1): 96-100.
Zhang X Z, Zhang H Y. Current status in research and application of biopesticides. *Journal of Shandong University of Technology (Science and Technology)*, 2004, 18(1): 96-100. (in Chinese)
- [3] Glare T R, O'Callaghan M. *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, LTD, 2000: 350.
- [4] 吴青君,张文吉,张友军,徐宝云,朱国仁. 表皮穿透和 GABAA 受体不敏感性在小菜蛾对阿维菌素抗性中的作用. 昆虫学报, 2002, 45(3): 336-340.
Wu Q J, Zhang W J, Zhang Y J, Xu B Y, Zhu G L. Cuticular penetration and desensitivity of GABAA receptor in abamectin

- resistant *Plutella xylostella* L. *Acta Entomologica Sinica*, 2002, 45 (3): 336-340. (in Chinese)
- [5] Sengonca C, Liu B. Effect of GCSC-BtA biocide on population dynamics of cabbage pests and their natural enemies from fields in the southeastern China. *Journal of Pest Science*, 2002, 75: 46-50.
- [6] Chattopadhyay A, Bhatnagar N B, Bhatnagar R. Bacterial insecticidal toxins. *Critical Reviews in Microbiology*, 2004, 30 (1): 33-54.
- [7] 李慧冬, 张 强, 罗万春. Avermectins 系列农药应用现状及前景. 植物保护, 2003, 29 (1): 55-57.
- Li H D, Zhang Q, Luo W C. Current and prospective application of Avermectins. *Plant Protection*, 2003, 29 (1): 55-57. (in Chinese)
- [8] Tabashnik B E, Cushing N L, Finson N, Johnson M W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 1990, 83: 1 671-1 676.
- [9] 黄大昉. 生防微生物生物技术研究与发展. 植物保护, 2003, 29 (5): 3-4.
- Huang D F. The research and development of microbial biotechnology for biological control. *Plant Protection*, 2003, 29 (5): 3-4. (in Chinese)
- [10] 谭声江, 陈晓峰, 李典谟. 昆虫对 Bt 毒素的抗性机理研究进展. 昆虫知识, 2001, 38 (1): 12-17.
- Tan S J, Chen X F, Li D M. Research progresses on mechanism of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Entomological Knowledge*, 2001, 38 (1): 12-17. (in Chinese)
- [11] Sengonca C, Liu B. Influence of mixed biocide GCSC-BtA on the pupa and the adult stages of *Apanteles plutella* Kurd (Hym. Braconidae) and its host, *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Plutellidae). *Journal of Pest Science*, 2001, 74: 145-149.
- [12] 刘 波, 朱育菁, Sengonca C, 冒乃和, 林抗美, 阮传清. 害虫抗药性治理策略—多位点杀虫毒素的研究. 农药, 2004, 43(11): 492-496.
- Liu B, Zhu Y J, Sengonca C, Mao N H, Lin K M, Ruan C Q. Control strategy of insect pest resistance to insecticides by using multiple toxins insecticide. *Pesticide*, 2004, 43(11): 492-496. (in Chinese)
- [13] Hermanson G T. *Bioconjugate Techniques*. London: Academic Press, 1996: 671.
- [14] Liu B, Sengonca C. Conjugation of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* with abamectin of *Streptomyces avemitilis* as a new type of biocide GCSC-BtA in control of agricultural insect pests. *Journal of Pest Science*, 2003, 76: 44-49.
- [15] Hofte H, Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Review*, 1989, 53: 242-255.
- [16] 刘 波, 苑宝玲, Sengonca C, 葛慈斌. 高效生物杀虫剂耦合技术的研究. 中国生物防治, 2000, 16 (Suppl.): 28-34.
- Liu B, Yuan B L, Sengonca C, Ge C B. Study on the technique for conjugation of *Bacillus thuringiensis*-crystal toxin with avermectin. *Chinese Journal of Biological Control*, 2000, 16 (Suppl.): 28-34. (in Chinese)
- [17] 汪正范. 色谱定性定量. 北京: 化学工业出版社, 2000: 13.
- Wang Z F. *Qualitative and Quantitative Analysis of Chromatogram*. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 13. (in Chinese)
- [18] Sengonca C, Liu B. Effects of GCSC-BtA biocide on abundance and diversity of some cabbage pests as well as their natural enemies in southeastern China. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2003, 110: 484-491.
- [19] 范琳玉, 余安国, 李贤均, 胡家元, 李瑞祥. 阿维菌素催化选择加氢合成伊维菌素研究. 分子催化, 2003, 17 (1): 6-9.
- Fan L Y, Yu A G, Li X J, Hu J Y, Li R X. Selective hydrogenation of Avermectin to Ivermectin in biphasic catalytic system. *Journal of Molecular Catalysis (China)*, 2003, 17 (1): 6-9. (in Chinese)
- [20] 毕富春, 徐风波. 高效液相色谱法定量分析甲氨基阿维菌素苯甲酸盐. 农药科学与管理, 2002, 23 (3): 31-33.
- Bi F C, Xu F B. Quantitative analysis of Emamectin Benzoate by HPLC. *Pesticide Science and Administration*, 2002, 23 (3): 31-33. (in Chinese)
- [21] 廖联安, 李正名, 方红云, 赵卫光, 陈明德, 范志金, 刘桂龙. 5-阿维菌素 B_{1a} 酯的合成及生物活性. 高等学校化学学报, 2002, 23(9): 1 709-1 714.
- Liao L A, Li Z M, Fang H Y, Zhao W G, Chen M D, Fan Z J, Liu G L. Synthesis and bioactivity of 5-Avermectin B_{1a} esters. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2002, 23(9): 1 709-1 714. (in Chinese)
- [22] Zhu Y C, Oppert B, Kramer K J, McGaughey W H. cDNAs for a chymotrypsinogen-like protein from two strains of *Plodia interpunctella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 27: 1 027-1 037.
- [23] Yasuda R, Noji H, Yashida M, Kinoshita K, Itoh N. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase. *Nature*, 2001, 410: 698-904.
- [24] Liu B, Sengonca C. Investigations on side-effects of the mixed biocide BtA on different predators of *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Plutellidae) in southeast China. *Journal of Pest Science*, 2002, 75: 57-61.

(责任编辑 王红艳)