

- 2 Sunnucks P., Wilson A. C. C., Beheregaray L. B., Zenger K., French J. *Mol. Ecol.*, 2000, **9**: 1 699 ~ 1 710.
- 3 丁建松, 曹毅, 童建. 辐射防护通讯, 2004, **24**(5): 27 ~ 31.
- 4 Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. *Proc. Nation. Acad. Sci.*, 1989, **86**: 2 766 ~ 2 770.
- 5 Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. *Genomics*, 1989, **5**(4): 87.
- 6 Hoshino S., Kimura A., Fukuda Y. *Hum. Immunol.*, 1992, **33**(2): 98.
- 7 Liu Q., Feng J., Sommers S. *Genomics*, 1992, **13**(2): 441 ~ 443.
- 8 Jicun Ren. *J. Chromatography B*, 2000, **741**: 115 ~ 128.
- 9 Hiss R. H., Norris D. E., Dietrich C. H., Whitcomb R. F., West D. F. *Insect Mol. Biol.*, 1994, **3**: 171 ~ 182.
- 10 Morel F., Delise R., Renoux M., Touraille S., Ragno M. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1999, **29**: 835 ~ 843.
- 11 Zhang A., Dunn J. B., Marshall Clark J. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1999, **65**: 25 ~ 35.
- 12 Burban C., Petit R. J., Carcreff E., Jactel H. *Mol. Ecol.*, 1999, **8**: 1 593 ~ 1 602.
- 13 Sedlmair D., Gerstmeier R., Einspanier R. *European J. Entomol.*, 2000, **97**: 387 ~ 394.
- 14 Salvato P., Battisti A., Concato S., Masutti L., Patamello T. *Mol. Ecol.*, 2002, **11**: 2 435 ~ 2 444.
- 15 Chen B., Harbach R. E., Butlin R. K. *Med. Veterin. Entomol.*, 2002, **16**: 253 ~ 265.
- 16 Chen B., Butlin R. K., Pedro P. M., Wang X. Z., Harbach R. E. *Med. Veterin. Entomol.*, 2006, **20**: 33 ~ 43.
- 17 Weeto M. M., Koekemoer L. L., Kamau L., Hunt R. H., Coetzee M. *Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hygiene*, 2004, **98**(3): 142 ~ 147.
- 18 Nice C. C., Anthony N., Gelembiuk G., Rateman D., Ffrench-constant C. *Mol. Ecol.*, 2005, **14**: 1 741 ~ 1 754.
- 19 Marquez J. G., Krafur E. S. *Insect Mol. Biol.*, 2003, **12**(2): 99 ~ 106.
- 20 Wohlford D. L., Krafur E. S., Griffiths N. T., Marquez J. C., Baker M. D. *Med. Veterin. Entomol.*, 1999, **13**: 377 ~ 385.
- 21 Marquez J. G., Bangs M. J., Krafur E. S. *Med. Veterin. Entomol.*, 2003, **17**: 429 ~ 435.
- 22 Meneses C. R. V., Cupolillo E., Monteiro F., Rangel E. F. *Med. Veterin. Entomol.*, 2005, **19**: 38 ~ 47.
- 23 Gorochotegui-Escalante N., Lozano-Fuentes S., Bennett K. E., Molina-Cruz A., Beaty B. J. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2005, **35**: 771 ~ 788.
- 24 Stuart J. J., Schulte S. J., Hall P. S., Mayer K. M. *Genome* 1998, **41**: 702 ~ 708.
- 25 Severson D. W., Meece J. K., Lovin D. D., Saha G., Morlais I. *Insect Mol. Biol.*, 2002, **11**(4): 371 ~ 378.
- 26 Ullmann A. J., Piesman J., Dolan M. C., Black W. C. *Insect Mol. Biol.*, 2003, **12**(2): 201 ~ 210.
- 27 Baer C. F., Tripp D. W., Bjorksten T. A., Antolin M. F. *Mol. Ecol.*, 2004, **13**: 1 859 ~ 1 869.
- 28 Mohr K. L., Telbe C. C. *Environ. Microbiol.*, 2006, **8**(2): 258 ~ 272.
- 29 Marquez J. G., Vreysen M. J. B., Robinson A. S., Bado S., Krafur E. S. *Med. Veterin. Entomol.*, 2004, **18**: 288 ~ 295.
- 30 Sharpe R. G., Hims M. M., Harbach R. E., Butlin R. K. *Med. Veterin. Entomol.*, 1999, **13**: 265 ~ 273.
- 31 Hayashi K. *Genet. Anal.*, 1999, **14**: 193 ~ 196.

杀蚊苏云金芽孢杆菌及其晶体蛋白研究进展^{*}

赵新民^{1, 2} 夏立秋^{1**} 王发祥¹ 肇知¹

(1. 湖南师范大学生命科学学院 长沙 410081; 2. 湖南城市学院化学与环境工程系 益阳 413049)

Research progress on mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* and its crystal proteins. ZHAO Xin-Min^{1, 2}, XIA Li-Qiu^{1**}, WANG Fa-Xiang¹, DING Xue-Zhi¹ (1. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Department of Chemistry and Environmental Engineering, Hunan City University, Yiyang 413049, China)

Abstract Ever since the discovery of the first *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain capable of killing mosquito larvae, there are many reports about the occurrence of mosquitocidal strains belonging to different subspecies /

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30670052)。

^{**} 通讯作者, E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2006-03-07, 修回日期: 2006-04-10

serotypes and some new mosquitocidal toxins. Based on the study of the structure of mosquitocidal toxins, the action mode of those toxins could be better understood. Recently, recombinant DNA techniques have been used to improve bacterial insecticide efficiency by remarkably increasing the synthesis of mosquitocidal toxins and by enabling new toxin combinations from different bacteria to be produced within single strain, which promise us a great future in controlling mosquitoes.

Key words *Bacillus thuringiensis*, mosquitoes, crystal protein, research progress

摘要 自从发现苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 具有杀蚊活性以来, 目前已发现多种 Bt 亚种或血清型对蚊虫具有杀虫活性, 同时也发现了一些新的杀蚊晶体蛋白。在对杀蚊晶体蛋白的分子结构进行研究的基础上, 对其的作用机理有了一定的了解。近年来利用 DNA 重组技术显著提高杀蚊晶体蛋白的合成和将不同菌种的杀蚊晶体蛋白进行联合表达, 为有效控制蚊虫危害展示广阔前景。

关键词 苏云金芽孢杆菌, 蚊虫, 晶体蛋白, 研究进展

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 是一种革兰氏阳性细菌, 它在形成芽孢的同时产生晶体包涵体。包涵体主要为 δ 内毒素杀虫晶体蛋白, 被敏感昆虫的幼虫吞食后, 在幼虫肠道碱性环境和蛋白酶的作用下释放出活性毒性蛋白, 活性毒性蛋白与幼虫中肠上皮细胞的特异受体发生结合并形成孔道, 破坏细胞渗透压平衡, 最终导致昆虫死亡^[1]。Bt 的杀虫活性范围主要包括无脊椎动物节肢动物门中的鳞翅目昆虫、双翅目、鞘翅目、直翅目等 9 个目的昆虫^[2]。

大多数 Bt 菌株主要对鳞翅目昆虫有特异杀虫作用。在 1976 年, Goldberg 等发现了 BtONR-60 菌株对蚊虫具有很强的杀虫活性^[3]。这种菌株属于一种新的血清型并被命名为 Bt 以色列亚种 (Bt subsp. *israelensis*), 在它的包涵体中发现了多种杀虫晶体蛋白成分。随后, 出现了大量有关新的杀蚊 Bt 菌株及其晶体蛋白的研究。蚊虫能传播多种疾病, 尤其以疟疾和乙脑危害最为严重, 目前世界上约有 5 亿多人口遭受疟疾的威胁。80 年代 Bt 开始用来控制蚊虫^[4]。目前已对有杀蚊活性的 Bt 菌株中晶体蛋白结构和有关分子作用机理进行了广泛而深入地研究, 并着手利用现代生物技术手段提高杀蚊效果。无疑, 研究高效的 Bt 生物杀虫剂对控制蚊虫具有非常重要的现实意义。

1 杀蚊苏云金芽孢杆菌及其晶体蛋白

1.1 杀蚊苏云金芽孢杆菌

目前已发现大约 30 多种 Bt 亚种或血清型对不同种类的蚊虫具有杀虫活性, 除美国和澳大利亚外, 世界各大洲均发生了具有杀蚊活性的 Bt^[5]。其分离来源包括土壤、沉积物、植物、昆虫、动物粪便和水体。这些菌株属于不同的亚种或血清型, 高毒力菌株不限于 Bt 以色列亚种, 还包括 *canadensis* 亚种、*morrisoni* 亚种、*darmstadtensis* 亚种、*thompsoni* 亚种和 *jegathesan* 亚种, 它们的杀虫活性由高到低。这些杀蚊 Bt 菌株有一个共同特点, 即它们的大质粒具有编码 δ 内毒素包括溶细胞毒素 (cytolytic toxin, Cyt) 基因, 不同菌株之间毒性差异较大, 其原因可能与各种晶体蛋白基因和溶细胞毒素基因存在与否则有关。

1.2 杀蚊晶体蛋白

Bt 以色列亚种具有很强的杀蚊活性^[6], 主要有 4 种蛋白, 即 Cyt1A, Cry4A, Cry4B 和 Cry11A, 其分子量分别为 27.3, 128, 134 和 72 kDa。Bt *jegathesan* 亚种包涵体中有 6 种主要蛋白^[7], 其分子量分别为 80, 74 ~ 70, 65, 37, 26 和 16 kDa, 其中 80 kDa 蛋白与 Bt 以色列亚种 Cry11Aa 有 58% 同源性, 命名为 Cry11Ba, 它是这 6 种蛋白中毒性最强的成分; 26 kDa 蛋白成分与 Bt 以色列亚种 Cyt2Ba 有 68% 的同源性, 命名为 Cyt2Bb。Bt *medellin* 亚种的包涵体含有

4 种主要蛋白成分^[8], 其分子量分别为 94, 70 ~ 68, 30 和 28 kDa, 其中 94 kDa 蛋白与 Cry11Ba 有 83% 的同源性, 命名为 Cry11Bb。从 *Bt madellin* 亚种中还发现了一种新的溶细胞毒素 Cyt2Bc^[9], 其分子量为 29.7 kDa, 它与 Cyt2Ba 有 91.5% 的同源性。此外, 还在 *Bt fukuokaensis* 亚种中发现了一种 86 kDa 的 Cry20Aa 杀蚊晶体蛋白^[10]。Rosso 等还从 *Bt jegathesan* 亚种中发现 2 种新的杀蚊晶体蛋白基因^[11], 即 *cry19A* 基因和 *orf2* 基因, 前者编码 60 kDa 蛋白, 含有 5 个保守序列区, 而后者编码的蛋白质其氨基酸组成与 Cry4 的 C 末端相似。在 *Bt serovar higo* 菌株中发现了 98 kDa 的 Cry27A、71 kDa 的 Cry10A 和 78 kDa 的 Cry19B 3 种杀蚊晶体蛋白^[12, 13]。

目前发现的具有杀蚊活性的 *Bt* 晶体蛋白主要有两类, 一类为特殊的内毒素即溶细胞毒素, 另一类为通常的内毒素晶体蛋白。前者主要包括 Cyt1A, Cyt2Ba, Cyt2Bb 和 Cyt2Bc, 后者主要是 Cry2Aa, Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11A, Cry11Ba, Cry11Bb, Cry19A, Cry19B, Cry20Aa 和 Cry27A。

2 杀蚊晶体蛋白的结构研究

对 Cry1Aa, Cry2Aa 和 Cry3Aa 的结构已经有较多的研究, 但对杀蚊晶体蛋白的研究并不多。Cry2Aa 对鳞翅目和双翅目昆虫均有杀虫作用, 然而 Cry2Aa 与 Cry1Aa 及 Cry3Aa 只有大约 20% 的序列同源性。Boonsem 等对杀蚊晶体蛋白 Cry4Ba 的结构和毒理作用进行了详细研究^[14]。Cry4Ba 对伊蚊 *Aedes* 和按蚊 *Anopheles* 都有较好的杀虫效果, 它以原毒素形成合成, 分子量为 130 kDa, 通过肠道蛋白酶水解后为 60 ~ 60 kDa 的片段, 然后再进一步降解为 46 ~ 48 kDa 和 16 ~ 18 kDa 2 种片段。总体说来, Cry4Ba 含有 5 个保守序列区构成核心区并与 Cry3Aa 和 Cry1Aa 核心区相似。除此之外, Cry4Ba 还有如下结构特点: 在结构域 I 中只有长的、两性的螺旋 $\alpha_3 \sim \alpha_7$, 而 N 端螺旋 $\alpha_1 \sim \alpha_2$ 对毒性不是必需的, 它在结晶过程被水解掉。 α_3 含有 39 个氨基酸, 它是 Cry4B 中最长的螺旋, 也是所有已知

晶体晶体蛋白中最长的 α 螺旋。在结构域 II 中, Cry4Ba 结构域 II 的顶端环状结构是最短的, 没有其它晶体晶体蛋白结构域 II 的那种 β -带状伸展结构。在结构域 III 方面, C 端残基形成一个小的螺旋 α_9 , 它位于结构域 III 内部折叠区边缘上方, 其疏水面朝向结构域 III 环上其它疏水侧链的方向, 可能是蛋白水解活性作用于原毒素 C 末端的一个遗迹。Cry4Ba 结构域 III 与其它晶体蛋白相比, 都有 3 个保守序列区, Cry4Ba 有一个较长的 $\beta_9 \sim \beta_{20}$ 环将结构域 II 连接起来, 但它的长度、方向和氨基酸序列都有所不同。一般认为结构 III 与整个晶体蛋白的正确折叠和受体识别相关。

结构域 I 与 II 之间有 2 个盐桥和 5 个氢键; I 与 III 之间有 6 个氢键, 1 个未被确认的盐桥和 1 个疏水作用区; II 与 III 之间有 1 个盐桥和 15 个氢键。将 Cry4Ba 与 Cry2Aa 和 Cry3Aa 的结构进行比较, 它们在结构域 I 之间差异最小, 至少在 $\alpha_3 \sim \alpha_7$ 的比较中是这样, 说明虽有不同的特异性但可能有同一个形成孔的作用方式。结构域 II 是差别最大的地方。Cry4Ba 结构 II 与 III 的接触面积与 Cry2Aa 和 Cry3Aa 相类似, 结构域 I 与 III 的接触面积比 Cry2Aa 大得多, 与 Cry1Aa 和 Cry3Aa 相近。I 与 II 的接触面积由于 α_1 的缺失, 故比 Cry1Aa 和 Cry3Aa 小, 但仍比 Cry2Aa 大得多。

溶细胞毒素的结构与一般的晶体蛋白不同, 它没有 3 个结构域, 而只包含一个结构域, 2 个外层 α -螺旋发夹结构缠绕一个混合的 β 折叠, 预示溶细胞毒素可能具有不同的作用方式。

3 杀蚊晶体蛋白作用机理

研究晶体蛋白作用机理的关键之一是其作用受体。Charles 等发现以色列亚种晶体蛋白作用伊蚊的肠道上皮细胞所导致的组织病理学变化与鳞翅目昆虫中的情况相似, 说明虽有不同 *Bt* 亚种或不同的靶昆虫, 但杀蚊晶体蛋白与其他内毒素的作用机理可能是一致的^[15]。

已从埃及伊蚊中肠中鉴定出 2 种氨肽酶 N 受体^[16], 研究表明对双翅目有特异毒性的

Cry4Aa 和对鳞翅目和双翅目有双重特异毒性的 Cry1C 都可以识别尖音库蚊 *Culex pipiens* 上皮细胞表面的同一结合位点, 不过其结合特征却有差异^[17]。Cry2Aa 与 Cry4Ba 对双翅目昆虫的作用是通过作用于不同的中肠表面受体或是同一受体上不同的特异部位来实现的, 它们对同种蚊虫的不同毒性在于对不同受体或受体的不同的特异部位的识别^[14]。利用免疫组织化学方法, 发现 Cry11Bb 是结合在埃及伊蚊和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 中肠上皮细胞顶部微绒毛上并认为是其最初作用部位^[18]。

根据 Cry4Ba 的结构特点, 提出了 Cry4Ba 杀蚊作用的分子机理^[14] 如下。

Cry4Ba 的 α_1 和 α_2 在结晶过程被蛋白酶水解, 形成一个以外部螺旋围绕 α_5 螺旋为中心的裂隙, 使得 α_3 的限制减少。而 α_7 被结构域 II 稳定住, 同时导致晶体蛋白疏水面的暴露并与邻近分子发生对称性的结合, 发生寡聚化, 也使 $\alpha_4 \sim \alpha_5$ 螺旋发夹得以从中螺旋束中分开, 有利于形成插入^[19]。Cry4Ba 和其它 Cry 晶体蛋白的结构域 I 螺旋结构同样具有较大的亲水性, 但 $\alpha_4 \sim \alpha_5$ 环有较大的疏水性。形成孔的“伞状模型”(umbrella mode) 认为螺旋成对即 $\alpha_4 \sim \alpha_5$ 插入膜中, 其余螺旋则象伞骨一样在膜的表面打开^[20]。定点突变还表明 $\alpha_4 \sim \alpha_5$ 环区域的 166 位极性天冬酰胺和 170 位芳香酪氨酸的作用是: 前者与水形成氢键有利稳定环的结构或调节离子经过通道, 后者与膜上的磷脂头部结合形成稳定的寡聚孔结构 (oligomeric pore structure)^[21]。目前这一理论有较多的实验支持。

利用原子力显微镜技术和园二色光谱技术研究 Cry4Ba 在人工平板双分子层脂膜上的行为, 发现 Cry4Ba 通过活化产生 65 kDa 晶体蛋白, 它包括 45 kDa 和 20 kDa 产物, 后者含晶体蛋白的 N 端, 并证实 20 kDa 多肽为 5 个螺旋 $\alpha_1 \sim \alpha_5$, 其三维结构与其他晶体蛋白的三维结构相似, 可在膜上形成离子通道, 其形成孔的能力与全长 Cry4Ba 相比是相当的, 说明 $\alpha_1 \sim \alpha_5$ 具有

整个晶体蛋白形成孔的全部活性^[22]。Cry4Ba 插入不是以单分子形式进行, 而是以一种自组装结构形式 (self-assembled), 当 Cry4Ba 自发插入无受体的双分子层脂膜时, 形成一种四面折叠对称的孔结构, 说明它可能是四聚体状态的晶体蛋白^[23]。

那么, 晶体蛋白对多种蚊虫的特异性是如何产生的呢? 通过比较分析, 结构域 II 是 Cry 晶体蛋白中变化最大的部位, 特别是顶环可以起到适应不同受体识别的作用, 最近将 Cry4Ba 结构域 II 环的氨基酸残基与其亲缘性较近的 Cry4Aa 进行交换^[24]。环 3 的突变, 导致对致倦库蚊毒性的增强, 而环 1 和环 2 的突变反而将自身原有的伊蚊和按蚊毒性丧失掉了。这些结果有力支持了 Cry4Ba 结构域 II 的环结构区域, 特别是环 1 和环 2 是伊蚊和按蚊毒性特异性决定部位的假设。

溶细胞毒素 Cyt1A 常用来增强与其它晶体蛋白的杀蚊协同性和延缓昆虫抗性的产生, 还用来扩宽杀虫谱, 原因是 Cyt1A 与其它晶体蛋白在氨基酸序列和毒理作用方面完全不同, 它对一些脊椎动物和无脊椎动物细胞有很高的溶解性, 对细胞膜脂质部分的非饱和脂肪具有亲和力和, 它可能以形成孔的形式发挥作用。也有人认为它的作用机理是去污剂模式^[25] (detergent-like mode), 即通过结合特异的脂肪酸, 搅乱膜结构。

4 重组表达杀蚊蛋白

目前生物工程技术主要是利用球状芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus* (Bs) 的二元毒素 (binary, Bin) 和 Bt 以色列亚种的晶体蛋白和溶细胞毒素的杀蚊特性。

二元毒素主要由 2 部分组成, 即 51.4 kDa 的结合结构域和 41.9 kDa 的晶体蛋白结构域, 它们在单个伴胞体中共结晶, 消化后产生 43 kDa 和 39 kDa 2 种蛋白, 它们通常与昆虫幼虫中肠微绒毛 (microvilli) 的一种 α -糖苷酶受体结合, 导致中肠溶解^[26]。

由于 Bt 晶体蛋白、Bs 的二元毒素和溶细胞

毒素的生化特性及毒理学差异, 将它们的优势进行联合, 建立重组杀蚊菌株研究已成为热门。目前改良重组杀蚊菌株有 2 个基本战略: (1) 将 Bs 晶体蛋白基因引入到 Bt 以色列亚种中。(2) 将 Bt 以色列亚种相关的杀蚊基因引入杀蚊活性高的 Bs 菌株中。

4.1 将 Bs 二元毒素基因转入 Bt 以色列亚种

将 Bs1593 的二元毒素基因克隆到穿梭载体 pBU4, 构成 pGSP10, 再将其转化到 Bt 以色列亚种 4QS-72 菌株中, 重组 Bt 以色列亚种菌株除含原有的晶体蛋白外, 还含有 51.4 kDa 和 41.9 kDa 二元毒素。但重组子对埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、库蚊和按蚊的毒性与亲本 Bt 以色列亚种和 Bs 菌株相比没有提高^[27]。作者认为是在上述实验中采用 Bs 启动子, 而在质粒中没有增强因子, 电镜观察显示 Bt 以色列亚种转化子中只有很小的二元毒素晶体产生, 所以不能显著提高毒性。Park 等将 Bs 二元毒素基因转入能够正常合成 Cyt1A 的 Bt *morrisoni* 亚种, 导致对库蚊杀蚊毒性提高 9 倍, 对埃及伊蚊的毒性没有提高, 而将二元毒素和 Cyt1A 联合在能够正常合成全套内毒素的 Bt *jegathesan* 亚种中表达, 对库蚊杀蚊毒性提高 17 倍, 对埃及伊蚊的毒性提高 3.2 倍^[28]。如果只将二元毒素单独转入 Bt *jegathesan* 亚种中, 对埃及伊蚊的毒性没有提高。说明 Cyt1A 对其它内毒素的毒性有协同增效作用。

最近, 有人使用 Bt 启动子和一些能够提高 Bt 合成毒素的遗传因子来表达 Bs 二元毒素和 Bt 以色列亚种晶体蛋白, 提高杀蚊毒性^[29]。首

先构建 2 个质粒, 每一个含有不同的在 Bt 以色列亚种中表达的选择性标记物, p45S1 含有 Bs 二元晶体蛋白操纵子, 该操纵子受 *cyt1A* 启动子和 STAB/SD 序列控制, 还含有受 *cyt1Ac* 启动子控制的 *cyt1A* 基因和 20 kDa 分子伴侣蛋白基因。第 2 个质粒 (pPFT11Bs-cy) 含受 *cyt1A* 启动子和 STAB/SD 序列控制的 *cyt11B* 基因, 先将第一种质粒转入到无晶体 Bt 以色列亚种 4Q7 菌株中, 得到转化子, 然后将第 2 种质粒转入到这个转化子。显微镜和 SDS-PAGE 分析表明双转化子产生了大量的 *Cry11B*、*Bin* 和 *Cyt1A*。生测表明: 双转化子对 4 龄库蚊幼虫的毒性比 Bt 以色列亚种高出 4 倍, 比 Bs2362 高出 6 倍, 但对埃及伊蚊的毒性比 Bt 以色列亚种低。而将二元毒素基因转入到产生正常全套晶体蛋白的 Bt 以色列亚种之中, 即可表达 *Cry4A*+*Cry4B*+*Cry11A*+*Cyt1A*+*Bin*, 其对库蚊毒性比野生的 Bt 以色列亚种(亲本)或 Bs2362 高出 10 倍, 但对伊蚊毒性没有明显提高。

4.2 将 Bt 以色列亚种毒素基因转入 Bs

大多数重组子以 Bt 以色列亚种或其它相关杀蚊虫亚种的晶体蛋白基因和溶细胞毒素基因导入 Bs, 使用较多的是 Bs2297, 但令人遗憾的是目前大多数 Bs 重组子所表现的毒性要么只相当于亲本(即 Bt 以色列亚种和 Bs)要么毒性更低且不稳定(见表 1)。中国科学院武汉病毒研究所用基因工程方法改良 Bs 杀蚊菌, 基因工程菌含有多种杀蚊毒素, 提高了杀灭抗性蚊虫的效果^[34]。

表 1 Bt 毒素基因转入芽孢杆菌后 Bs 重组子的杀蚊效果

Bt 毒素基因	含二元毒素基因 Bs 菌株	方法	杀蚊效果	参考文献
<i>cyt11A</i> + <i>cyt1A</i>	Bs2362	pPL603E 原生质转化法	对埃及伊蚊毒性比亲本 Bs2362 高出 10 倍, 与 Bt 以色列亚种相当。	[30]
<i>cry4B</i>	Bs1593 和 Bs2297	原生质转化法	对埃及伊蚊毒性比亲本高出 100 倍, 与 Bt 以色列亚种相当, 对致倦库蚊和按蚊的毒性与亲本相当。	[31]
<i>cyt11A</i>	Bs2297	pH75601, 整合到染色体上	对埃及伊蚊毒性比亲本 Bs2297 高很多, 对致倦库蚊的毒性与亲本相当。	[32]
<i>cyt1Ab1</i>	Bs2297	pMK3, 电转	对埃及伊蚊和尖音库蚊的毒性没有提高, 但对具有 Bs 抗性的尖音库蚊和致倦库蚊可大幅度的恢复敏感性(10~20 倍)。	[33]

4.3 其他方法

为了获得更好的杀蚊效果,采取了多种现代生物技术手段,主要包括基因重组、结构域转换、定点突变、寻找新的宿主和提高表达效率等。Abdullah 等将 Cry4Ba 结构域 II 上 3 个环上小段变化序列与另一种晶体蛋白的同位置进行替换,结果毒性得到了提高^[24]。Park 等将 Bt jegathesan 亚种的 *cy11B* 基因转入 Bt 以色列亚种中,重组菌株对 4 龄致倦库蚊的毒性为亲本的 2 倍,但对 4 龄埃及伊蚊的毒性则无明显提高^[35]。张蓓华等 Bs 营养体时期合成但表达量低的另一种杀蚊毒素 Mtx1 在 Bt 以色列亚种中进行了表达,但效果也不是很理想^[36]。

此外,在利用枯草杆菌(*B. subtilis*)表达以色列亚种的晶体蛋白,利用柄杆菌(*Caulobacter*)和蓝绿菌(*Cyanobacteria*)表达二元毒素和 Cry4B,利用杆状病毒携带 *cy4D* 基因进行表达等方面已经做了很多有意义的尝试^[37]。

5 结语与展望

虽然还没有发现特别有效的新的杀蚊 Bt 及其晶体蛋白,也没有改造出比野生的 Bt 以色列亚种对 3 种主要蚊虫都具有明显效果的重组子。但通过多种尝试已经在某一方面已经取得了不少进展。Bt 生物杀虫剂由于含有不同作用模式的多种晶体蛋白,除了有可靠的杀蚊虫效果外,与化学农药相比,生物杀虫剂还有蚊虫不容易产生抗性的优势。目前已出现商业化的重组 Bt 杀蚊制剂。当然,在 Bt 生物杀虫剂制剂的制备和使用方面还有待进一步研究。最近在 *E. coli* 中表达对埃及伊蚊和致倦库蚊具有协同作用的 Cry4Ba/Cyt2Aa2^[38] 取得了令人满意的效果。随着新的杀虫蛋白的发现和对其作用分子机制的不断了解以及现代生物技术手段的运用,我们有理由相信在不久的将来能够发现或者设计出更加有效的杀蚊晶体蛋白而造福于人类。

参 考 文 献

1 Hofte H., Whitekey H. *Microbiol. Rev.*, 1989, **53**(2): 242 ~

- 2 Crickmore N., Zeigler D. R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., *et al. Mol. Biol. Rev.*, 1998, **62**(3): 807 ~ 813.
- 3 Goldberg L. J., Mangalit J. *Mosq. News*, 1977, **37**(3): 355 ~ 358.
- 4 李洁, 张应阔, 钱万红. 昆虫知识, 1997, **34**(2): 109 ~ 111.
- 5 Bakaraman A. J. *Vet. Bone. Dis.*, 2005, **42**(3): 81 ~ 86.
- 6 Ibarra J. E., Federici B. A. *J. Bacteriol.*, 1986, **165**(2): 527 ~ 533.
- 7 Ragni A., Thierry L., Delecluse A. *Curr. Microbiol.*, 1996, **32**(1): 48 ~ 52.
- 8 Restrepo N., Gutierrez D., Patino M. M. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 1997, **92**(2): 257 ~ 262.
- 9 Juarez-Perez V., Guerchicoff A., Rubinstein C., Delecluse A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**(3): 1 228 ~ 1 231.
- 10 Lee H. K., Gill S. S. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(12): 4 664 ~ 4 670.
- 11 Delecluse A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(11): 4 449 ~ 4 455.
- 12 Saitoh H., Hwang S. H., Park Y. S., Higuchi K., Mizuki E., *et al. Syst. Appl. Microbiol.*, 2000, **23**(1): 25 ~ 30.
- 13 Hwang S. H., Saitoh H., Mizuki E., Higuchi K., Ohba M. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1998, **21**(2): 179 ~ 184.
- 14 Boonsem P., Davis P., David J., Li J. *J. Mol. Biol.*, 2005, **348**(2): 363 ~ 382.
- 15 Charles J. F., de Barjac H. *Entomophaga*, 1981, **26**(2): 203 ~ 212.
- 16 Pootarakit K., Angsuthanasombat C., Panyim S. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2003, **36**(5): 508 ~ 513.
- 17 Kamauchi S., Yamagawa M., Esaki M., Otake K., Sakai H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, **67**(1): 94 ~ 99.
- 18 Ruiz L. M., Segura C., Trujillo J., Orduz S. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 2004, **99**(1): 73 ~ 79.
- 19 Hodgman T. C., Ellar D. J. *J. DNA Sequ. Map.*, 1990, **1**(2): 97 ~ 106.
- 20 Gazit E., La Rocca P., Sansom M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**(21): 12 289 ~ 12 294.
- 21 Kanintronkul Y., Sramala I., Katzenmeier G., Panyim S., Angsuthanasombat C. *Mol. Biotechnol.*, 2003, **24**(1): 2 411 ~ 2 420.
- 22 Puntheeranurak T., Uwawithya P., Potvin L., Angsuthanasombat C., Schwartz J. L. *Mol. Membr. Biol.*, 2004, **21**(1): 67 ~ 74.
- 23 Pornwiroon W., Katzenmeier G., Panyim S., Angsuthanasombat C. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2004, **37**(3): 292 ~ 297.
- 24 Abdullah M. A., Alzate O., Mohammad M., McNall R. J., Adang M. J., *et al. Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**(9): 5 343 ~ 5 353.
- 25 Butko P., Huang F. M., Pusztai-Carey M., Surewicz W. K. *Biochemistry*, 1997, **36**(42): 12 862 ~ 12 868.
- 26 Darboux I., Pauchet Y., Castella C., Sliva-Filha M. H., Nielsen-LeRoux C., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**(9): 5 830 ~ 5 835.
- 27 Bourgouin C., Delecluse A., De La Torre F., Szulmajster J. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**(2): 340 ~ 344.

- 28 Park H. W., Bideshi D. K., Federici B. A. *J. Mal. Entomol.*, 2005 **42**(3): 337~341.
- 29 Park H. W., Bideshi D. K., Federici B. A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003 **69**(2): 1 331~1 334. 43.
- 30 Bar E., Leiman-Hurwitz J., Rahamim E., Keynan A., Sandler N. *J. Invertebr. Pathol.*, 1991, **57**(2): 149~158.
- 31 Trisrisook M., Pantuwatana S., Bhumiratana A., Panbangred W. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**(6): 1 710~1 716.
- 32 Poncet S., Bernard C., Dervyn E., Cayley J., Klier A., *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(11): 4 413~4 420.
- 33 Thierry L., Hamon S., DeCluse A., Ordiz S. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**(10): 3 910~3 916.
- 34 孙钊, 袁志明, 李田勇, 蔡全信, 张用梅. 微生物学通报, 2001, **28**(5): 61~64.
- 35 Park H. W., Delecluse A., Federici B. A. *J. Invertebr. Pathol.*, 2001, **78**(1): 37~44.
- 36 张蓓华, 刘海洲, 刘 铭, 闫建平, 袁志明. 微生物学通报, 2003, **30**(1): 49~52
- 37 Porter A. G., Davidson E. W., Liu J. W. *Microbiol. Rev.*, 1993, **57**(4): 838~861.
- 38 Promdonkoy B., Promdonkoy P., Panyim S. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, **252**(1): 121~126

白蚁防治技术^{*}

曹 莉¹ 赵瑞华^{2,3} 陈镜华¹ 韩日畴^{1**}

(1. 广东省昆虫研究所 广州 510260 2. 中国科学院华南植物园 广州 510650;

3. 中国科学院研究生院 北京 100047)

Advances in the control techniques of termites. CAO Li¹, ZHAO Rui-Hua^{2,3}, CHEN Jing-Hua¹, HAN Ri-Chou^{1**}
(1. *Guangdong Entomological Institute*, Guangzhou 510260, China; 2. *South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences*, Guangzhou 510650, China; 3. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100047, China)

Abstract Termites are dangerous social insects. The present paper reviews the advances of the control techniques of the termites based on the detection and observation, physical control, chemical control, biological control and the application of termite pheromones. The future prospect on the termite research and application is also outlined.

Key words termite, control techniques, social insect

摘 要 白蚁是破坏性很强的社会性昆虫。文章从白蚁的探测和监测、物理防治、化学防治、生物源物质防治和白蚁信息素的利用技术 5 个方面综述白蚁防治技术的最新研究进展。同时展望白蚁未来的研究领域。

关键词 白蚁, 防治技术, 社会性昆虫

据 Wilsom 统计, 全世界有白蚁 2 200 种, 现可能已达 3 000 种^[1]。白蚁独特的取食特性使地球上几乎所有物品都可遭受白蚁的侵害。在我国白蚁危害每年造成的损失高达 15 亿元^[2], 美国每年仅花费于预防和防治白蚁的费用便有 10 亿美元^[3]。

白蚁营巢居社会性群体生活, 群体防卫功能使其对天敌和其它环境因子的抗逆能力大为增强, 而隐蔽活动的习性又加大了研究和防治的难度^[4]。过去化学药物防治是白蚁预防和防治的主要措施。随着人类环保意识的增强和《关于持久性有机污染物(POPs)的斯德哥尔摩公约》的签署, 长期以来使用的无机杀虫剂和有机氯杀虫剂正逐渐被淘汰^[3,5], 世界各国的白蚁

研究和防治人员正在寻找对环境友好而有效的白蚁绿色防治技术^[6,7]。目前, 白蚁的防治技术主要包括五大类, 根据不同的目的、场合和白蚁种类选择使用, 而且这些技术可以相互组配, 以便有效地控制白蚁的危害。本文综述了世界上目前使用的或具有应用前景的白蚁防治技术, 为这类技术的研究和应用提供参考。

1 白蚁的探测和监测技术

白蚁的探测和监测是白蚁预防和治理过程

* 广东省成果启动项目资助(2004B60202002)。

** 通讯作者, E-mail: richou-han@163.net

收稿日期: 2006-04-07, 修回日期: 2006-06-21, 接受日期: 2007-

02-09