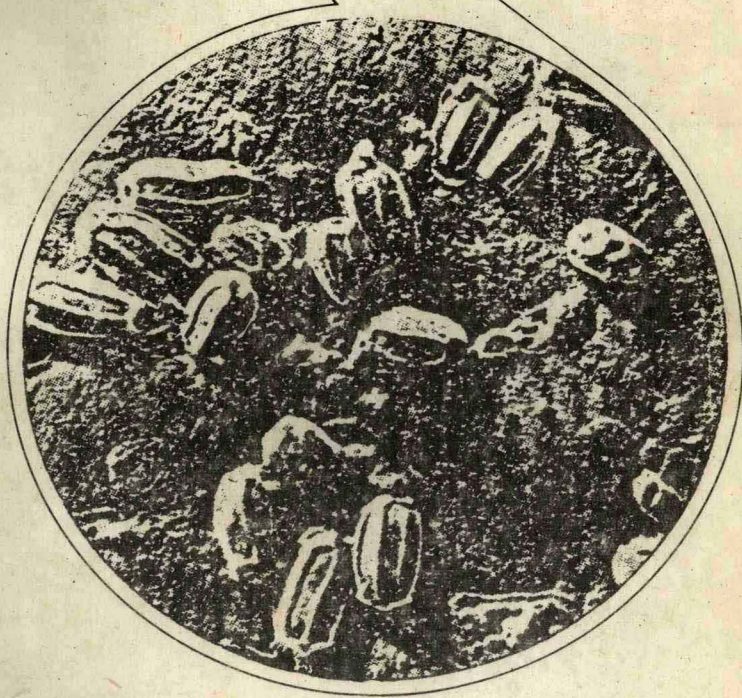
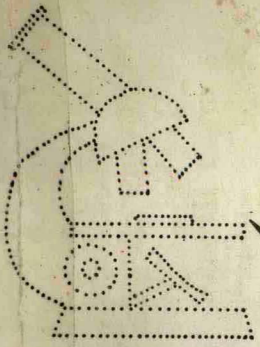


# 杀虫微生物

(第四卷)

《杀虫微生物》编委会  
中国微生物学会农业微生物专业委员会

编



武汉大学出版社

# 杀 虫 微 生 物

(第 四 卷)

《杀 虫 微 生 物》编 委 会 编  
中 国 微 生 物 学 会 农 业 微 生 物 专 业 委 员 会

武 汉 大 学 出 版 社

1994 · 武 汉

(鄂)新登字09号

图书在版编目(CIP)数据

杀虫微生物. 第四卷 / 《杀虫微生物》编委会, 中国微生物学会农业微生物专业委员会编.  
——武汉: 武汉大学出版社, 1994. 12

ISBN 7-307-01910-8

I. 杀…

II. ①杀… ②中…

III. ①微生物防治, 昆虫病毒—植物保护; ②微生物防治, 昆虫细菌—植物保护; ③微生物防治, 昆虫真菌—植物保护; ④微生物防治, 线虫动物—植物保护

IV. S 476

武汉大学出版社出版发行

(430072 武昌 珞珈山)

武汉市洪山区鄂农胶印社印刷

1994年12月第1版 1994年12月第1次印刷

开本: 787×1092毫米 1/16 印张: 16.125

字数: 388千字 印数: 1—500

ISBN 7-307-01910-8/S·22 定价: 22.80元

## 编委会名单

(以姓氏笔画为序)

马天良	龙紫新	孙明	陈世夫	张用梅
张光裕	李荣森	范云六	罗绍彬	庞义
洪华珠	高日霞	梁东瑞	喻子牛	解思泌

## 编者的话

《杀虫微生物》(第四卷)是一部反映杀虫微生物研究最新动态和最新研究成果的论文集。本卷选自于1992年10月31日至11月4日在河南商丘市召开的第五届杀虫微生物学术讨论会上交流的综述报告、研究论文、研究通报和摘要。该论文集反映了我国杀虫细菌、虫生真菌、昆虫病毒、杀虫素等领域在高新技术、分子生物学、生物化学、基本生物学以及在生产应用等方面的研究进展。可供从事农、林、医学害虫微生物防治的科技管理、生产及有关人员参考。由于篇幅有限,大会交流的论文未能全部收入,敬请鉴谅。所收集论文分别由编委审稿:细菌部分由李荣森、罗绍斌和喻子牛同志审阅;病毒、真菌和其他内容由梁东瑞和洪华珠同志审阅。

在本卷的编辑过程中得到了华中农业大学微生物科学技术系、商丘市农药厂、中科院武汉病毒研究所、武汉大学病毒系、山东大学微生物研究所、华东化工学院、山东省卫生防疫站、福建农学院植保系等单位的支持与资助,在此一并致谢。

《杀虫微生物》(第四卷)编委会

## 前 言

中国微生物学会农业微生物专业委员会于1992年10月31日至11月4日在河南商丘市召开了全国第五届杀虫微生物学术讨论会。来自全国23个省、市、自治区的高等院校、科研、生产、管理、出版等81个单位的118名代表出席了会议。

大会收到论文摘要151篇，按其内容编印的《论文摘要》，共分为13个小组，其中细菌组6个，有论文77篇；昆虫病毒组4个，有论文40篇；杀虫真菌和原生生物组，有论文12篇，昆虫病原线虫组，有论文10篇。严毓华等教授作了《我国蝗虫微孢子虫治蝗的进展》、《杆状病毒为载体的基因工程病毒杀虫剂》、《球形芽胞杆菌杀蚊毒素》、《苏云金芽胞杆菌研究和开发利用的新动向》、《大链壶菌灭蚊的研究进展》、《苏云金芽胞杆菌晶体蛋白的分子结构和功能》、《害虫对苏云金芽胞杆菌抗药性的研究现状》、《苏云金芽胞杆菌抗虫植物遗传工程的进展、存在问题及对策》等九个专题报告，其他论文均在分组会上交流。这次学术讨论会完全按国际会议召开的方式组织，采用大会和学术研讨会、报告与讨论相结合，使会议开展得生动活泼，畅所欲言，学术气氛十分活跃。这次会议不仅反映了我国杀虫微生物的研究近况和水平，其中转基因植物培育成功，生物农药大面积防治农林、卫生害虫等显示我国生防科研和推广应用在深度和广度方面步入一个崭新的时期。与会代表通过交流讨论深深感到这是我国两年一度杀虫微生物战线之代表广泛，内容丰富，基础研究与生产应用相结合的经验交流会，是改革开放、促进科研成果转化为生产力的学术讨论会，更是生防战线科研人员，投身经济建设的主战场，推进科技与经济相结合的团结大会。

概括近两年的科研成果有下列几个方面：

细菌杀虫剂。近年来，苏云金芽胞杆菌和球形芽胞杆菌资源的发掘与高毒杀虫、杀蚊幼菌株的筛选取得了新成绩，分离出苏云金杆菌300多个有毒株，球形芽胞杆菌有330株，其中苏云金杆菌高毒菌株Tm13-14、CT-43等对鞘翅目、鳞翅目、双翅目均有杀虫活性，还发现了几个新亚种；苏云金杆菌抗虫植物基因工程的研究获得了很大的进展，苏云金杆菌基因已转入水稻、烟草、棉花和杨树中，已获得人工合成的cry基因，在田间有抗虫活性的抗虫植物新品种不久即将问世。近年来微生物杀虫剂的产品迅速增长，仅苏云金杆菌年产量已近万吨，杀蚊剂年产稳定在200吨左右。苏云金杆菌16000IU/mg的粉剂已在国内投产应用并开始出口创汇；高效的BSC3-41杀蚊菌及制剂受到世界卫生组织的重视和好评，我国B.S的生产应用走在世界的前列。值得注意的是Bt生产不能一哄而起，害虫对微生物毒素及制剂的抗药性不容忽视，今后必须加强研究以找出有效对策。

昆虫病毒。昆虫病毒已从基础理论步入田间应用阶段，科技队伍不断壮大，新的病毒不断发现和开发，许多新的生物技术已应用于病毒；目前国内已发现病毒达230株，其中25株已经进入开发和应用；棉铃虫、菜青虫、斜纹夜蛾、松毛虫、杨尺蠖、茶毛虫、木毒蛾、天幕毛虫、舟蛾、山楂粉蝶、小菜蛾、银纹夜蛾、黄地老虎等10多株昆虫病毒已由实验室进入商品生产阶段，应用面积达10万多公顷，同时还有所创新，昆虫病毒与杀虫真菌、细菌、昆虫激素等复合，开展了病毒-微生物复合生物杀虫剂的新型生物农药研制，一药多用、取长补短

短, 提高效果, 这为病毒杀虫剂的扩大应用开辟了新的途径。随着遗传工程研究的步步深入, 人工重组病毒和病毒复合剂的研究获得新的进展, 它将克服野生株的弱点, 在较短的时间内杀死目标昆虫, 成为高效广谱的新一代病毒杀虫剂。近年来生物工程的应用, 打破了昆虫杆状病毒的传统应用方法和范筹, 昆虫杆状病毒工程研究取得了长足进展, 在世界上首次人工合成病毒后期启动子, 并成功用于表达外源基因。已用杆状病毒载体系统生产乙型肝炎表达抗原 $\beta$ -半乳糖酶等医药, 这将为我国昆虫病毒研究, 带来新的生机。

杀虫真菌及杀虫抗生素。杀虫真菌的应用日益扩大, 大链壶菌的应用研究已经起步, 这为防治卫生害虫开辟了新的途径, 绿僵菌的研究继续深化, 开展了白僵菌的血清学特性和块状耳霉的高产毒素突变株选育的研究, 真菌杀虫剂的生产有了新的发展, 载体培养生产白僵菌的工艺研究显示了可观的经济效益和广阔的应用前景。在杀虫素方面南昌霉素 A 的发酵工艺和检测技术进一步完善提高, 可望不久进入大规模商品化生产和应用。

微孢子虫。我国微孢子虫的研究步步深入, 蝗虫微孢子虫的生产规模已达到年生产防治 13 公顷面积的能力。与此同时已分离到的蝗虫微孢子虫和甜菜夜蛾的微孢子虫, 并对其形态特征、生活及致病特性等方面进行了研究, 对东亚飞蝗的半人工合成饲料的研究获得了成功。

1993 年是世界“人类环境”宣言发表 20 周年, 各国首脑参加的“全球与环境发展”大会, 强调了大会主题是一个地球、一齐关心、共同分享; 保护环境必须优先考虑。

为了推动我国杀虫微生物学的发展, 会议决定《第六届全国杀虫微生物学术讨论会》于 1995 年在广州中山大学召开。

《杀虫微生物》第四卷必将给该学科的发展留下一个深深的影响。

中国微生物学会农业微生物产业委员会

喻子牛

解思泌

1993. 10.

# 目 录

前言..... (1)

## 第一部分 综 述

昆虫杆状病毒基因工程 ..... 庞 义 (1)  
苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白的分子结构与功能 ..... 刘子铎等 (8)  
微生物-病毒复合生物杀虫剂的研究开发与生产应用 ..... 梁东瑞 (12)  
害虫对苏云金杆菌制剂抗药性的研究现状 ..... 崔云龙 (18)  
遗传工程杆状病毒杀虫剂的研究概况 ..... 彭建新等 (21)  
苏云金杆菌 $\beta$ -外毒素的活性作用及评价 ..... 左广胜等 (26)

## 第二部分 研究报告

苏云金杆菌 Tm13-14 菌株晶体毒素及毒力特性 ..... 闫 冰等 (33)  
灭蚊芽胞杆菌的筛选 ..... 戴经元等 (42)  
苏云金杆菌 10 个亚种的质粒 DNA 图谱分析和 DX 杀蚊晶体毒素蛋白基因在  
质粒上的定位 ..... 龙紫新等 (46)  
中国 Bt-ken-Ag 菌株与晶体蛋白突变型菌株生理及遗传特性分析 ..... 陈月华等 (49)  
从大肠杆菌克隆株中分离杀虫晶体蛋白的方法 ..... 刘子铎等 (54)  
苏云金芽胞杆菌不同类型晶体蛋白抗原的制备 ..... 孙 明等 (57)  
苏云金杆菌 10 个亚种伴胞晶体蛋白组成及对昆虫的毒力 ..... 赵文玲等 (60)  
苏云金杆菌制剂紫外线防护剂的研究 ..... 崔云龙等 (64)  
苏云金杆菌发酵动力学研究 ..... 马天良等 (66)  
苏云金杆菌制剂防治兔球虫病的试验 ..... 陈少莲等 (72)  
影响孑孓灵制剂灭蚊效果的因素 ..... 喻隆声等 (75)  
抗药性和耐昆虫消化液的苏云金杆菌突变株的诱变筛选 ..... 冯书亮等 (78)  
球形芽胞杆菌 C3-41 对中华按蚊幼虫的室内毒力及野外防治试验 ..... 陈宗胜等 (82)  
一种细菌灭蚊幼剂双菌协同发酵的研究 ..... 陈世夫等 (85)  
B·S2362 与 BtH<sub>14</sub> 混用灭蚊幼虫的室内和野外试验 ..... 管玉霞等 (87)  
中国 Bt-ken-Ag 菌株培养条件的研究 ..... 梁凤来等 (90)  
苏云金杆菌 HD-1 菌株“空胞”现象及其高毒力菌株的选育 ..... 顾真荣等 (98)  
不同苏云金杆菌 (H-14) 制剂控制流水沟蚊幼虫实施方法的比较 ..... 袁方玉等 (103)  
苏云金杆菌原生质体制备的新方法 ..... 张增艳等 (106)  
对苏云金杆菌库斯塔克亚种 Bt4 菌株的研究 ..... 王安福等 (110)  
苏云金杆菌与棉酚的协同作用对棉铃虫生存发育的影响 ..... 王琛柱等 (114)  
苏云金杆菌悬浮乳剂防治玉米螟施药技术探讨 ..... 徐加生等 (118)



德昌松毛虫 CPV 多角体及病毒粒子形态构成分析 .....	胡远扬等 (122)
AcMNPV 感染银纹夜蛾和马尾松毛虫的病症和病理观察 .....	陈其津等 (126)
德昌松毛虫质型多角体病毒的主要理化特性研究 .....	张珈敏等 (131)
文山松毛虫核型多角体病毒的生物学特性及理化性质研究 .....	刘彦文等 (136)
棉铃虫病毒杀虫剂新剂型——乳悬剂的应用试验 .....	张光裕等 (143)
德昌松毛虫质型多角体病毒林间应用技术及防效 .....	苏志远等 (147)
Western Blot 分析小菜蛾颗粒体病毒粒子囊膜的相关蛋白 .....	张文军等 (151)
利用银纹夜蛾为替代寄主增殖 AcMNPV 的研究 .....	陈其津等 (154)
蓖麻蚕 NPV 的增殖及其 DNA 分子克隆 .....	朱逊锋等 (157)
苜蓿丫纹夜蛾 NPV 对银纹夜蛾幼虫的毒力测定 .....	陈绮丽等 (161)
菜青虫颗粒体病毒的保藏与活性研究 .....	朱应等 (163)
文山松毛虫核型多角体病毒毒力的生物测定 .....	刘彦文等 (165)
甜菜夜蛾微孢子虫的研究 (I)	
——微孢子虫的形态、生活史、寄主及传播 .....	陈广文等 (168)
载体吸附培养生产白僵菌分生孢子的研究 .....	朱金国等 (173)
应用昆虫病原线虫防治家蝇的研究 I. 家蝇对病原线虫的敏感性 .....	徐洁莲等 (179)
应用昆虫病原线虫防治黑穗状醋栗透翅蛾的研究 .....	赵奎军等 (183)
泰山 1 号线虫大量繁殖工艺研究 .....	李素春等 (186)
大蜡螟幼虫被病原线虫感染后血淋巴的生理生化变化 .....	徐洁莲等 (189)
多索线虫的研究 .....	李福春等 (193)

### 第三部分 研究简报

苏云金杆菌液体深层发酵工艺改进 .....	刘序章等 (197)
灭蛆细菌 YC-92009 菌株的分离与筛选 .....	蔡信之等 (199)
球形芽胞杆菌和苏云金杆菌以色列亚种两菌混合发酵液的灭蚊效果 .....	郝延玉等 (201)
苏云金杆菌防治小菜蛾的高效菌株筛选 .....	刘耀泉等 (203)
苏云金杆菌伴胞晶体摄影 .....	刘耀泉等 (207)
苏云金杆菌杀虫效果与虫态及中肠 pH 的相关性探讨 .....	蒋时察等 (210)
苏云金杆菌乳剂防治韭菜芽蛆、花生蛴螬试验研究初报 .....	隋广义等 (213)
德昌松毛虫质型多角体病毒宿主域研究 .....	吴加林等 (215)
在桂林发现的豆野螟病毒的形态结构 .....	叶爱珍等 (218)
生物杀蚜素防治瓜蚜试验初报 .....	隋广义等 (220)
温度对苏云金杆菌芽胞和毒力的影响 .....	袁志明等 (222)
白僵菌杀虫范围的试验初报 .....	刘素兰等 (225)

### 第四部分 论文摘要

PCR 法鉴定苏云金杆菌杀虫晶体蛋白新基因 .....	陈亚华等 (229)
对库蚊、伊蚊和按蚊幼虫高效芽胞杆菌的筛选 .....	罗曦霞等 (230)
2, 4-D 诱导苏云金芽胞杆菌 CT-43 菌株进入小麦细胞的初步研究 .....	张剑冰等 (231)
在云南发现的几种昆虫病毒资源 .....	梁东瑞等 (232)



一株蜀柏毒蛾核型多角体病毒的分离 .....	梁 会等 (233)
奇威生物杀虫剂中试生产研究 .....	梁东瑞等 (234)
小菜蛾杆状病毒杀虫剂研究初报 .....	梁东瑞等 (236)
松毛虫菌毒复合杀虫剂的生产应用 .....	梁东瑞等 (237)
对棉铃虫、斜纹夜蛾高效苏云金芽胞杆菌的筛选 .....	罗曦霞等 (238)

# 昆虫杆状病毒基因工程

庞义

(中山大学昆虫学研究所 生物防治国家重点实验室 广州 510275)

随着分子生物学和生物技术的迅速发展,昆虫杆状病毒已成为近年来最热门的研究对象之一。主要是因为杆状病毒可以作为高水平表达外源基因的载体且具有许多独特的优点,而利用基因工程技术改良杆状病毒杀虫剂也有着广阔的前景。本文就昆虫杆状病毒的基因工程作一简要述评。

## 一、以杆状病毒为表达载体的基因工程

### 1. 杆状病毒表达系统的优点

过去对许多有意义的基因表达产物的大量生产,通常是以微生物为受体的。近年来,由于以真核生物为受体的表达系统在经济上具有潜在的优越性而日益受到重视。以昆虫杆状病毒(主要是 NPV)为载体,昆虫和昆虫细胞为受体的表达系统,是正在开拓的最有前途的基因工程领域之一<sup>[1-3]</sup>。它的优点在于:①对外源基因容纳量大(估计可达 100kb);②对人、畜和植物安全;③病毒基因组能提供多个可插入外源基因而对病毒复制本身不受影响的非必须区(例如后期表达的多角体基因和 p10 基因,同时提供极强的启动子 promoter),使植入的外源基因能高水平表达;④由于具有多角体这个特异性标记,因而更便于重组病毒的挑选;⑤能大规模低成本地饲养寄主昆虫,从而获得大量有重要经济价值或研究价值的外源基因表达产物;⑥在虫体或培养的昆虫细胞中合成外源基因产物,具有翻译后的修饰作用,即糖基化或磷酸化,因而合成蛋白较稳定,并具有天然蛋白的活性,这是细菌表达系统所没有的。

### 2. 构建转移载体 (transfer vectors) 和重组病毒 (recombinant viruses)

由于杆状病毒基因组太大(约 130kb),其中有许多相同的酶切位点,因此难以在离体情况下将外源 DNA 直接拼接到它的基因组中,而是需要通过野生型病毒(wild typeviruses)包括修饰过的基因工程病毒的 DNA和含有外源基因的转移载体 DNA共转染昆虫细胞而实现重组,即细胞内同源重组。这些转移载体属于高拷贝质粒(plasmids),含有杆状病毒某一基因及其启动子序列,外源基因则插在启动子下游。

转移载体质粒在胞外通过限制性核酸内切酶和连接酶剪接组建,并在大肠杆菌里大量增殖。将提取的转移载体质粒 DNA 与野生型病毒 DNA 共转染昆虫细胞时,两者可在病毒 DNA 序列阅读框内重组,夹在其中的外源基因则转移到病毒基因组代替病毒的这一基因。

为了易于辨认和筛选重组病毒,构建转移载体时可考虑多带一个启动子的标记基因<sup>[5]</sup>。到目前为止,已构建的转移载体大多是通过多角体和 p10 启动子来启动外源基因表达的。多角体基因和 p10 基因都是迟表达的基因,有着极强的启动子,这两个基因对于病毒在细胞中的复制都是非必须的。正因为它们在病毒感染周期中表达十分迟,因此允许生产那些对细胞有毒性从而对病毒复制不利的外源基因产物。

利用其他病毒启动子以在早期表达外源基因亦已引起注意。例如,碱性蛋白启动子具有高水平表达  $\beta$ -半乳糖苷酶的能力<sup>[6]</sup>,这可能是由于感染早期的细胞处于一种较佳的代谢状态,使外源基因表达和蛋白积累过程比感染后期的细胞更有效。构建转移载体时,如将迟启

动子与早期启动子串连, 则有可能会延长外源基因的表达和使表达产物达到更高的水平。

无包涵体的重组病毒较易失去活性, 且难以经口服感染寄主昆虫。利用 p10 启动子或在多角体基因上游的相反方向再插入一个多角体启动子, 这样构建的转移载体与不产多角体的病毒 DNA 共转染昆虫细胞, 可得到既产多角体又可以表达外源基因的重组病毒<sup>[7,8]</sup>。王珣章等模拟 AcNPV 多角体基因经人工合成启动子, 反方向插入于多角体蛋白基因上游, 构建了系列含双多角体启动子的转移载体<sup>[6-10]</sup>, 用人工合成启动子重组的粉纹夜蛾核型多角体病毒 (TnNPV), 不但产多角体, 且外源基因的表达水平显著提高<sup>[10-12]</sup>。这可能是由于人工合成启动子提早启动之故。

王珣章等还构建了一个可同时运载两个外源基因的含双基因启动子的 AcNPV 转移载体, 使重组病毒感染的细胞或幼虫同时合成两种外源蛋白成为可能<sup>[13]</sup>。

转移载体与病毒 DNA 共转染细胞, 病毒的重组频率一般达 1% 左右, 而利用线形病毒 DNA 与转移载体共转染, 重组频率可达 30%<sup>[14]</sup>。我们的实验结果显示重组频率高达 50% 以上 (庞义等, 未发表资料)。重组病毒的纯化和挑选, 一般通过病毒空斑法, 根据重组病毒的特征和标记进行挑选, 此外还有终点稀释法和斑点杂交法等。谢伟东等则建立了一个利用 TK 缺失突变细胞系及药物压力选择重组病毒的系统<sup>[16]</sup>。

目前用于重组的亲本病毒均为多粒包埋的核多角体病毒, 即一个囊膜可同时包裹一个至多个病毒核衣壳, 但由于释放至细胞外的病毒粒子均是通过核膜而获得囊膜的, 核衣壳单个存在, 所以尽管重组频率有较大差别, 重组病毒还是可以纯化的<sup>[1]</sup>。

利用异源病毒的多角体转移载体, 也可实现病毒的重组而将外源基因导入病毒基因组中<sup>[16,17]</sup>, 这是因为不同病毒多角体序列之间有着极高的同源性之故, 但重组频率会相对降低, 有时也可能会“插错位”而得不到需要的重组病毒。

### 3. 重组病毒的遗传稳定性

在多角体及 p10 基因部位插入外源基因, 重组病毒一经纯化, 在遗传上是稳定的<sup>[1,18]</sup>。含人工合成启动子的双多角体启动子重组病毒, 在遗传上也是稳定的<sup>[10-12]</sup>, 但含两个天然多角体启动子的重组病毒, 在连续多次通过离体昆虫细胞后表现出一定程度的不稳定, 这可能是因为两个多角体序列之间同源重组所致<sup>[19]</sup>。重组病毒与同种野生型病毒共同感染培养的细胞或寄主昆虫, 并经多次传代后, 重组病毒数量比例下降, 野生型病毒数量比例上升, 并逐渐占绝对优势<sup>[16,20]</sup>。

### 4. 外源基因的表达

美国学者 Smith 等人首先利用 AcNPV 多角体蛋白启动子的构建转移载体, 将人  $\beta$ -干扰素基因插入 AcMNPV 基因组的多角体启动子下游, 获得不产生多角体的重组病毒, 成功地在感染草地夜蛾离体细胞中合成人  $\beta$ -干扰素, 据报道,  $10^5$  个细胞最高可生产  $5 \times 10^5$  单位的干扰素<sup>[21]</sup>。在日本, 以家蚕 NPV 为载体, 用家蚕幼虫生产人  $\alpha$ -干扰素, 一头幼虫的血淋巴可生产多至  $5 \times 10^7$  单位 (约  $50 \mu\text{g}$ ) 的干扰素<sup>[22]</sup>, 每头幼虫就是一个“小工厂”。在过去短短几年中, 国内外许多实验室纷纷利用杆状病毒为载体, 通过重组的 NPV 在昆虫细胞或虫体中表达在医药上或研究上有重要价值的蛋白质。我们利用粉纹夜蛾核多角体病毒 TnMN-PV 为表达载体, 插入人乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 基因, 在重组病毒感染的草地夜蛾细胞、粉纹夜蛾幼虫和蓖麻蚕预蛹中获得高水平表达, 免疫电镜下观察到典型的乙型肝炎表面抗原 22nm 颗粒, 每克蓖麻蚕预蛹可产 HBsAg 蛋白  $1.6 \mu\text{g}$ , 粗提物可作病人临床检测用<sup>[23]</sup>。

重组病毒连续多次通过培养的昆虫细胞, 外源基因表达水平会降低, 但数次通过敏感寄

主幼虫后, 表达水平又会提高<sup>[15]</sup>。

## 二、应用基因工程技术改良病毒杀虫剂

早于 1973 年, 联合国粮农组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 就建议在农业害虫综合防治中推广应用对昆虫专性的杆状病毒杀虫剂<sup>[24]</sup>。但是, 杆状病毒寄主范围较窄, 杀死害虫时间太长, 在生物防治应用中常常造成作物不可忍受的经济损失<sup>[25]</sup>。由于这些缺点, 病毒杀虫剂的商品生产和推广应用受到很大限制, 甚至处于停滞不前的状态。杆状病毒杀虫剂的基因工程, 就是应用基因工程技术, 通过病毒基因组中插入对昆虫专性的各种酶、激素或毒素的编码基因 (表 1)。同时, 通过异源病毒重组或修饰病毒本身基因, 也有可能改变病毒的杀虫谱或加速杀虫效果。

表 1 重组杆状病毒及外源基因表达产物的杀虫效果

插入基因	病 毒	作用方式	杀虫效果	参考文献
利尿激素	BmNPV 多角体 (-)	控制水平衡	LD <sub>50</sub> 减少 20%	[26]
保幼激素酯酶	AcNPV 多角体 (-)	水解保幼激素, 促使脱皮	体重减少, 而 LT <sub>50</sub> 和 LD <sub>50</sub> 无减少	[27]
蝎子 <i>Androctonus australis</i> 虫毒素-1	AcNPV 多角体 (-)	麻痹	无	[28]
蝎子 <i>Androctonus australis</i> 神经毒素	AcNPV 多角体 (+)	麻痹	ST <sub>50</sub> 明显减少	[29]
螨类 <i>Pyemotes tritici</i> 神经毒素	AcNPV 多角体 (-)	麻痹	感染后两天内麻痹	[30]
苏云金杆菌 Btk δ-内毒素	AcNPV 多角体 (-)	溶解中肠细胞	产生前毒素蛋白, LT <sub>50</sub> /LD <sub>50</sub> 无减少	[31]
苏云金杆菌 Bta CryIA (b) 毒素	AcNPV 多角体 (+/-)	溶解中肠细胞	产生前毒素蛋白, 无改良效果	[32]
苏云金杆菌 Btm CryIVD 毒素	AcNPV 多角体 (-)	溶解中肠细胞	产生杀蚊前毒素蛋白, 无改良效果	[4]

### 1. 插入激素和酶基因

昆虫正常的生理代谢受到它本身激素和酶的控制。如果存在过量的昆虫专性激素和酶, 就可破坏虫体的正常代谢和调节功能, 致使昆虫停食和加速死亡。

(1) 激素 昆虫具有控制水平衡的能力以适应环境的变化, 昆虫的水平衡是通过利尿激素 (diuretic hormone) 来调节的。虫体内表达过量的利尿激素会导致昆虫失水和死亡。Maeda 根据一种天蛾 *Manduca sexta* 幼虫的利尿激素氨基酸序列合成了利尿激素基因, 并插入家蚕核多角体病毒 (BmNPV) 基因组中, 获得不产多角体的重组病毒。这种重组病毒经注射感染家蚕幼虫, 试虫的存活时间比野生型病毒感染的对照组缩短 20%, 这说明重组病毒的杀虫效率有所提高<sup>[26]</sup>。

(2) 酶 昆虫保幼激素酯酶 (juvenile hormone esterase, JHE) 会水解和钝化早期末龄幼虫中的保幼激素, 使之停止取食和开始脱皮。Hammock 等人构建了含 JHE 基因的首蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 并使之得到表达。但用这种重组病毒感染粉纹夜蛾幼虫时, 发现只对一龄幼虫有效并使其减少取食, 同时发现, 病毒在虫体内表达 JHE 的水平远比在离体培养细胞中为低。由此推测大龄幼虫本身可产生高水平的保幼激素, 这些保幼激素能抑制病毒表达的促早熟的 JHE 的活性<sup>[27]</sup>。实际上, 寄主昆虫可以停止合成它本身的蛋白而补偿由

于感染重组病毒而导致这种蛋白的过量表达, 同样, 寄主昆虫也可以增加一种蛋白的合成而抑制相应激素和酶蛋白的表达。除非重组病毒表达的外源蛋白达到相当高的水平, 否则难以克服昆虫的这种自身调节的作用。

## 2. 插入昆虫专性毒素基因

在重组杆状病毒中利用各种昆虫专性毒素, 可以克服与昆虫调节有关的问题。到目前为止, 已有几种毒素基因被成功地插入 AcNPV 基因组中, 包括苏云金杆菌内毒素基因, 蝎子和蟻类的神经毒素基因 (表 1) 及蜘蛛神经毒素基因 (庞义等, 未发表资料)。

(1) 苏云金杆菌毒素 苏云金杆菌  $\delta$ -内毒素亦称伴胞晶体毒素, 在芽胞形成期产生, 不同亚种的苏云金杆菌产生的  $\delta$ -内毒素具有不同的组分和杀虫谱, 这些毒素的作用机制还未完全明了, 但已知可导致中肠细胞崩解, 幼虫停止取食并较快死亡。经基因工程途径成功地插入杆状病毒并在昆虫细胞获得表达的苏云金杆菌毒素基因有 Kurstaki 亚种的  $\delta$ -内毒素基因, aizawa 亚种的 CryIA (b) 基因和 morrisoni 亚种 (PG-14) 的 CryIVD 基因 (表 1)。这些基因经重组杆状病毒在离体昆虫细胞和虫体中的表达产物与苏云金杆菌产生的晶体蛋白有共同的抗原性, 部分融合蛋白在细胞质中形成晶体结构, 经敏感昆虫口服生物测定证明均具有高度的杀虫活性。然而, 重组病毒对寄主昆虫并无改进杀虫效果, 甚至起到相反的作用<sup>[31]</sup>, 这是因为, 上述几例所克隆和表达的苏云金杆菌  $\delta$ -内毒素基因, 均是编码较大分子量蛋白的完整基因序列。事实上, 这些较大分子量的蛋白, 正如苏云金杆菌本身产生的伴胞晶体蛋白一样, 只是一种前毒素 (protoxin), 不能直接作用于昆虫细胞, 而只有经敏感寄主昆虫的胃液或在虫体外经适当的蛋白酶降解成较低分子量的多肽才显示出毒性。庞义等人曾将编码杀蚊蛋白的 CryIVD 完整基因的 5' 端去掉一小段, 结果表达产物完全失去杀虫毒性, 尽管表达产物的酶解物显示仍保留着 CryIVD 蛋白的主要多肽<sup>[4]</sup>。因此, 精确测定和定位毒性多肽的编码序列, 合成或克隆这些序列, 然后导入杆状病毒基因组, 应是继续研究的方向。(但是, 如果带有毒素基因的重组病毒很快将寄主杀死, 那么如何生产和积累这种重组病毒似乎就成了问题, 研究一种在特定条件下不表达毒素基因的重组病毒 (例如对温度或某种药物敏感) 可能是解决这一问题的办法)

(2) 神经毒素 目前被认为最有应用前途的是对昆虫专性的神经毒素。这类毒素可迅速将昆虫麻痹, 使之停止取食和危害作物, 而病毒可以继续增殖, 最后杀死寄主。在某些种类的蝎子、蟻和蜘蛛的毒液中含有这类神经毒素。

Stewart 等人构建了一株含有阿尔及利亚蝎 *Androctonus australis* Hocht 神经毒素编码基因且产生多角体的重组杆状病毒 AcNPV, 为利于合成蛋白的分泌, 还在该基因的 5' 端插入 AcNPVgp67 信号肽的编码序列。经粉纹夜蛾幼虫生物测定, 重组病毒感染组存活 50% 的时间 ( $ST_{50}$ ) 为 85h, 而野生型病毒组则为 113h; 在甘蓝叶上试验, 重组病毒感染组比野生型病毒感染组叶子的损失减少 50%。由于这种重组病毒产多角体, 因而生产和应用是有前途的<sup>[23]</sup>。

Tomalski 和 Miller 将一种蒲氏蟻 *Pyemotes tritici* 的神经毒素 TXP-1 编码的基因插入 AcNPV 得到一种不产多角体的重组病毒, 在大蜡螟幼虫中注射这种重组病毒, 两天内可引起麻痹和停食, 但由病毒感染而引起死亡的时间则与野生型病毒相同。同一报道还称已构建了含上述毒素基因且产多角体的重组病毒, 并通过口服感染导致寄主昆虫麻痹<sup>[30]</sup>。但也有的神经毒素在杆状病毒中的表达得不到期望的结果。例如, Carbonen 等人将一种蝎子 *Buthus epeus* 的虫毒素-1 编码基因克隆于 AcNPV 基因组中, 重组病毒感染细胞的提取物并无麻痹活性, 推测这是由于这种毒素蛋白不稳定或不正确折叠而引起活性丧失的<sup>[26]</sup>。

最近,庞义等人在 AcNPV 基因组中插入一种昆虫专性的蜘蛛神经毒素编码基因,也得到类似结果(未发表资料)。

### 3. 异源病毒重组

杆状病毒基因组含有许多大小不等、功能各异的基因,包括至少 30 个病毒结构蛋白的编码基因<sup>[32]</sup>,结构排列庞大而复杂,一种病毒的 DNA 还含有多个重复序列,异种病毒 DNA 间也有许多同源序列。通过两种异源杆状病毒对一种昆虫的共感染,或将它们的 DNA 共转染培养细胞,常常可得到交换不同序列的重组病毒,从而改变病毒的性能。有人用 AcMNPV 和 RoMNPV 共感染大蜡螟幼虫,得到有异于两种亲本病毒的重组病毒<sup>[34]</sup>;这两种病毒同时感染 TN-368 细胞,分析从空斑分离的病毒 DNA,发现 7% 的病毒发生了重组<sup>[35]</sup>。将大蜡螟 NPV 和 AcMNPV 混合感染大蜡螟幼虫,也产生高水平的病毒重组子<sup>[35]</sup>。用一种病毒 DNA 的整体酶切片段或其中一个片段与一种完整的病毒 DNA 共转染细胞,重组频率更高<sup>[34]</sup>。

最近,Mori 等人利用家蚕 BmN 细胞系和草地夜蛾细胞系对 AcMNPV 进行重组,这两个细胞系分别对 AcMNPV 和 BmNPV 不敏感,病毒不复制因而也不形成多角体。用 AcMNPV DNA 和经 BamHI 消化的 BaNPV DNA 对 Sf21 细胞进行共转染,子代病毒在 BmN 单层细胞上进行空斑分离纯化,得到一株扩大了寄主范围的重组病毒,这株病毒可感染 Sf21 细胞、BmN 细胞、家蚕幼虫,并产生多角体<sup>[37]</sup>。

Gonzalez 等人以缺失多角体的 AcMNPV 为亲本病毒,以共转染方法插入克隆的草地夜蛾核型多角体病毒(SfMNPV)的多角体基因,得到 AcMNPV/SfMNPV 杂交株,杂交多角体比两种野生型都小,且包埋的病毒粒子也较少<sup>[38]</sup>。我们曾用不产多角体的 TnMNPV DNA 与斜纹夜蛾 NPV、蓖麻蚕 NPV 及甜菜夜蛾(*Squodoptera crigua*) NPV 的 DNA 共转染草地夜蛾细胞,结果均可获得多角体显性的子代病毒(庞义等,未发表资料)。利用异源病毒转移载体,还可以把外源基因导入病毒基因组中<sup>[16,17]</sup>。在挑选重组病毒过程中还常常得到一些遗传不稳定的重组子<sup>[15]</sup>。有时则得到一些性状特别而又遗传稳定的重组子或变异株。我们在重组病毒中分离出一株形成特大多角体的粉纹夜蛾多角体病毒,这株病毒无论感染培养的细胞或是粉纹夜蛾幼虫,每个感染细胞核中只形成一个多角体,多角体的大小占核的 80% 以上,比正常多角体大 10~20 倍,经多次传代,特性不变,目前正在对这株病毒进行进一步的研究(林广云等,未发表资料)。

可惜的是,有关这些重组病毒的杀虫效能极少有人报道。

已用于害虫防治实践的另一亚组杆状病毒,即 D 亚组的椰子犀金龟病毒(*Oryctes virus*),由于没有包涵体包埋,病毒粒子在野外容易失去活性。Crawford 曾企图通过基因工程途径在这种病毒基因的非必须区插入 AcMNPV 的多角体基因,但未获得成功<sup>[39]</sup>。

### 4. 修饰病毒本身的基因

在杆状病毒基因组中,某些基因决定了该种病毒对寄主的选择(即专化性)、入侵、复制等功能,有的基因表达产物则影响寄主的正常代谢。所以,修饰病毒本身的基因,会直接影响病毒的杀虫谱和杀虫效能。虽然到目前为止还没有几例成功的报道,但随着对有关基因结构和功能的逐步明了,用遗传操纵技术修饰某些基因,是有可能得到期望的结果的。

例如,已知由 gp64 基因编码的杆状病毒 64KDa 膜蛋白对病毒的附着和进入细胞起着重要作用<sup>[40,42]</sup>,这种附着可能与寄主细胞表面存在的特异结合蛋白(binding protein)有关。最近有人将 AcMNPV 的 gp64 基因与专性杀甲虫的苏云金杆菌晶体毒素基因融合,并在大肠杆菌中获得表达,表达产物不但可以杀甲虫,也可以杀鳞翅目幼虫(N. Sivasubramanian, 学术

报告)。由此推测,用不同受体细胞表面结合蛋白与病毒膜蛋白融合,或两种病毒的膜蛋白融合,都有可能改变寄主范围。

杆状病毒 p34 基因也是病毒复制的非必须区,它的功能尚未明了,但用插入失活法破坏这一基因后病毒多角体外周不存在膜状结构,而病毒感染性却有所提高(J. Vlak, 学术报告)。

AcMNPV 基因组中一个编码 57KDa 多肽的 egt 基因,表达产物可阻碍寄主的正常脱皮,缺失这一基因后,可缩短感染幼虫的寿命<sup>[43]</sup>。

## 5. 安全性

基因工程病毒杀虫的研究和应用,必须充分考虑和评估它对人类和环境的安全性。

在自然界中,生物体的突变是时常发生的,杆状病毒也不例外。研制基因工程病毒杀虫只不过是按照人们的意志,通过现代生物学技术对昆虫病毒进行有目的的人工突变而已。当然,自然突变和人工突变的机理是不同的,且后者还涉及到在杆状病毒基因组中导入各种外源基因。但一般而言,没有病毒复制即没有病毒基因表达,外源基因也不表达<sup>[44,45]</sup>。因此,寄主范围和是否复制是衡量重组病毒安全性的重要标志。重组病毒是有可能改变寄主范围的,重组病毒也可能与寄主中的潜伏病毒之间发生基因交换而使后者活化,在释放重组病毒前,明确了解它的寄主范围及其遗传稳定性是十分重要的。1986 年,英国第一次在野外释放用于实验的人工重组杆状病毒<sup>[46]</sup>。

今后的世界,由人类创造和释放的遗传工程生物体将越来越多,我们既要估计到它可能存在的潜在危险性,预防于未然,也要大胆创造,使之造福人类。

## 参 考 文 献

1. Miller, D. W. et al. In "Genetic Engineering", Plenum Publ. Corp, New York, 1986, 8: 277-298
2. Miller, L. K. Ann. Rev. Microbiol., 1988, 42: 177-199.
3. Luckow, V. A. and Summers, M. D. Bio/Technology, 1988, 6: 47-55.
4. Pang, Y. (庞义) et al. J. Gen. Virol., 1992, 73: 89-101.
5. 王南章等, 中山大学学报(自然科学版), 1980, 28 (4): 114-116.
6. Hill-perkins, M. S. and Possee, R. D. J. Gen. Virol., 1990. 71: 791-976.
7. 龙策新等, 生物化学与生物物理学报, 1992.
8. Wang, X (王南章) et al. Gene, 1991, 100: 131-137.
9. 王南章等, 中山大学学报(自然科学版), 1990, 29 (3): 136-141.
10. 王南章等, 中国科学(B辑), 1992 (1): 39-46.
11. 邓日强等, 中山大学学报(自然科学版), 1990, 29 (3): 136-141.
12. 何代芬等, 中国病毒学, 1992, 7: 381-368.
13. 王南章等, 病毒学报, 1992, 8: 283-286.
14. Kiss, P. A. et al. Nucl. Aci. Res., 1990, 18: 5667-5672.
15. Xie, W. (谢伟东) et al. J. Cell Sci., 1991, 100: 243-247.
16. 庞义等, 中山大学学报(自然科学版), 1987 (2): 104-106.
17. 巫爱珍等, 生物工程学报, 1990, 6: 277-281.
18. Pang, Y. (庞义) et al. In "Recent Advances in Biotechnology and Applied Biology The Chinese University Press. Hong Kong. 1988, 637-648.
19. Emery, V. C. and Bishop, D. H. L. Protein Engineering, 1987, 1: 359-366.



20. Huang, Y. - S. et al. , J. Gen. Virol. 1991, 3: 3653-3360.
21. Smith, G. E. et al. Mol. Cell. Biol. 1983, 3: 2156-2165.
22. Maceda, S. et al. Nature, 1985, 315: 592-594.
23. 龙繁新等, 生物工程学报, 1991, 7: 37-446.
24. WHO. Technical Report Series, Geneva 1973, 531.
25. 庞义, 昆虫病理学, 广东科技出版社, 1993.
26. Marda, S. Biochem. Biophys. Res. Commn. 1990, 165: 1177-1183.
27. Hammock, B. D. et al Nature, 1990, 344: 458-461.
28. Carbonell, L. F. et al. Gene, 1988, 73: 409-418.
29. Stewart, L. M. et al. Nature, 1991, 352: 85-88.
30. Tomalski, M. D. and Miller, L. K. Nature, 1991, 352: 82-85.
31. Merryweather, A. t. et al. J. Gen. Virol. , 1990, 71: 1535-1544.
32. Martens, J. W. M. et al. Appl. Enivir. Microbiol. 1990, 56: 2764~2770.
33. Kelly, D. C. J. Gen Virol. , 1982, 63: 1-13.
34. Croizier, G. et al. J. Gen Virol. , 1988, 69: 177-185.
35. Summers, M. D. J. Virol. , 1980, 34: 693-703.
36. Croizier, G. and Quiot, J. M. Ann. Virol. , 1981, 132: 3-18.
37. Mori, H. et al. J. Gen. Virol. , 1992, 73: 1877-1880.
38. Gonzalez, M. A. et al. Virology, 1989. 170: 160-175.
39. Crawford, A. M. J. Gen. Virol. , 1989, 70: 1017-1024.
40. Volkman, L. E. In " The Molecular Biology of Baculoviruses" Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 131. Spring  
- Verlag, New York. 1986, 103-118.
41. Charlton, C. A. and Volkman, L. E. Virology, 1986, 154: 214-218.
42. Blissard, G. W. and Rohrmann, G. F. Virology, 1989, 170: 527-555.
43. O'Reilly, D. R. and Miller, L. K. J. Virol. , 1990, 64: 1321-1328.
44. Pennock, G. D. Mol. Cell Biol. , 1984, 4: 399-406.
45. 庞义等, 首届全国昆虫病毒学学术会议论文摘要汇编. 武昌, 1989. 86.
46. Newmark, P. Natrue, 1986, 320: 2.

# 苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白的分子结构与功能

刘子铎 洪玉枝 孙明 喻子牛

(华中农业大学农业部农业微生物重点开放性实验室  
芽胞杆菌分子生物学研究室 武汉 430070)

本文综述了苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白(简称 ICPs)的结构与功能。研究表明,苏云金芽胞杆菌伴胞晶体以分子量为 27kDa~140kDa 的原毒素,大小为 1 $\mu$ m 的晶体被合成,分子间靠二硫键盐键维系并稳定其构象。这些伴胞晶体在昆虫中肠被溶解,再经过蛋白酶水解修饰,ICPs 的一级结构发生变化从而空间结构随之改变,正是由于这些空间结构的不同变化,使不同 ICPs 表现为不同的特异性及杀虫活力。但在分子水平上如何行使其杀虫功能,并不十分清楚,为了弄清分子结构对其功能的影响,不少学者对此进行了较为深入的研究,对整个作用过程,如晶体的溶解性,原毒素的水解激活,活性毒素的受体结合及膜穿孔有了新的认识,这对毒素基因的人工改造、转基因植物、工程菌的构建都有直接的指导意义。

## 一、苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白的一级结构与功能

近几年来,为了在分子水平上弄清杀虫晶体蛋白的作用机理,对不同来源苏云金芽胞杆菌的不同杀虫晶体蛋白进行了一级结构分析,从中获得了一些与功能相关的信息。

### 1. 不同杀虫晶体蛋白的一级结构及其相关性

苏云金芽胞杆菌 ICPs 的一级结构主要由相应基因序列推导出的。自 1985 年苏云金芽胞杆菌 ICPs 第一个基因被序列化以来,相继有 40 多种 ICPs 一级结构以同样的方法被测出<sup>[1]</sup>。从这些 ICPs 的整体结构看,原毒素蛋白的一级结构可分为毒性区和非毒性区两大区域。

毒性区域定位在原毒素蛋白的 N-半端<sup>[2,3]</sup>,C-半端对毒性不起作用,但所有 C-半端的氨基酸序列有高度的保守性,大部分半胱氨酸都定位在 C-半端,推测与伴胞晶体的形成和伴胞晶体结构的稳定性有关。在 N-半端的毒性中心片段里,又分为五个序列保守区,它们的序列在大多数 ICPs 中都保持高度恒定,因此推测这类 ICPs 在功能上可能具有类似的空间构象。自 1989 年 Hofte 和 Whiteley 把 ICPs 基因依不同杀虫谱和氨基酸序列的同源性进行分类以来,现已分成七类 29 个亚类<sup>[4,5]</sup>,它们在一级结构上有相关性。例如,对鳞翅目昆虫有特异毒性的 CryI 基因编码的蛋白,除了 CryIB 和 CryIC 外,它们之间有 62% 以上的同源性;对双翅目昆虫有毒性的 CryIVA 和 CryIVB 编码的 ICPs 之间有 44% 以上的同源性。然而,对线虫有毒的 CryVI 基因和具溶血作用的 CytA 基因编码的 ICPs,在一级结构上是独立的。有意思的是尽管 CryIIA 和 CryIIB 有 73% 以上的同源性,CryIE 和 CryIB 有 53% 以上的同源性,而它们的杀虫谱却绝然不同。

### 2. 杀虫晶体蛋白的一级结构与杀虫特异性

所谓杀虫特异性,包含以下两种含义:第一,ICPs 的特异性受昆虫中肠细胞膜高亲和力受体的制约,第二,ICPs 的特异性取决于不同昆虫中肠液或蛋白水解酶的特异性<sup>[6,7]</sup>,即使