

苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry3A* 在 鳞翅目特异菌株中的表达及杀虫特性*

乐超银^{1,2} 刘子铎¹ 曾晓慧¹ 邵宗泽¹ 喻子牛¹

(1 华中农业大学微生物科技系, 农业微生物农业部重点实验室 武汉 430070)

(2 湖北三峡理工学院化工系 宜昌 443003)

提 要:将对鞘翅目昆虫有特异毒性的苏云金芽孢杆菌 *cry3A* 基因电转化到只对鳞翅目昆虫有毒性的苏云金芽孢杆菌野生型菌株 YBT803-1 中, 获得转化了 BMBY-001。SDS-PAGE 分析及镜检结果表明, *cry3A* 基因可在该菌株中高效表达, 但出发菌株中原有的 *cry1Ab*、*cry1Ac* 及 *cry2* 的表达则受到不同程度的影响。生物测定结果显示, 转化子 BMBY-001 对柳蓝叶甲(鞘翅目)具有较高毒力, LC_{50} 为 $0.413\mu\text{L}/\text{mL}$ (浸叶法), 对小菜蛾(鳞翅目)的毒力比野生受体菌 YBT803-1 有所降低, LC_{50} 值为 $3.319\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

关键词:苏云金芽孢杆菌, *cry3A* 杀虫晶体蛋白基因, 野生型受体菌, 小菜蛾, 柳蓝叶甲

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)02-0139-42

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是对昆虫有毒性的一种革兰氏阳性杆状细菌, 它的主要杀虫活性成分是伴胞晶体蛋白, 根据杀虫晶体蛋白氨基酸序列的同源性, 可将它们划分为 17 群 94 亚类^[1], 其中 *cry1* 的表达产物对鳞翅目昆虫有特异毒性, 其蛋白分子量为 130~140kD, 用胰蛋白酶处理可生成 60kD 的毒性核心片段^[2]。*Cry3A* 对鞘翅目昆虫有特异毒性, 该基因编码 73.1kD 的蛋白, 可不依赖芽孢形成晶体^[3], 在昆虫中肠液的作用下, 被降解为 55kD 的毒性多肽^[4]。由于各类基因都具有各自在的杀虫特异性, 因而天然菌株杀虫谱往往较窄, 为了克服这一缺陷, 国内外利用生物工程的方法, 构建了高效、广谱、作用持久的工程菌, 其中一些菌株已制成商品应用到生产实践中^[5], 如 Eco-gen 公司研制的生物杀虫剂 Foil[®] 的有效成分就是通过接合转移将 *cry3A* 和 *cryAc* 基因进行组合形成的工程菌, 对鳞翅目和鞘翅目昆虫均有杀虫作用, 目前已应用到土豆、茄子及其它农作用的生物防治中^[6]。本文将 *cry3A* 基因通过电转化技术转入对鳞翅目害虫具有高毒力的苏云金芽孢杆菌野生型菌株中, 并对其在野生型菌株中的表达以及杀虫活性的变化进行了检测, 以期获得高毒和广谱的工程菌。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

供体质粒: pBMB305 含 *cry3A* 基因, 携带氨苄青霉素抗性。受体菌: 苏云金芽孢杆

* 国家“九五”重点科技攻关项目(96-C01-02-01); “863”资助项目(101-03-01-01)

作者简介: 乐超银(1968-), 女, 湖北三峡理工学院化工系在读博士生, 主要从事苏云金芽孢杆菌工程菌构建工作
收稿日期: 1999-01-12, 修回日期: 1999-07-04

菌 YBT803-1。DNA 分子量标准菌株;HD-2。以上材料均由华中农业大学农业微生物农业部重点实验室芽孢杆菌分子生物学研究室提供。

1.2 培养基

LB 和 LA 培养基,筛选转化子时使用红霉素的终浓度为 25 μ g/mL。

1.3 电转化

参照 Schurter 的方法^[7],转化条件;电压 1000V/cm,电阻 200 Ω ,电容 25 μ F,电击一次。电脉冲仪为 Bio-Rad 公司产品,型号为 165-2075。

1.4 质粒抽提^[8]

1.5 PCR 鉴定

cry1Ab 特异引物序列: 5'-primer 5'-GAATTGCTTTCATAGGCTCCGTC
3'-primer 5'-GGTCGTGGCTATATCCTTCGTGTCACAGC
cry1Ac 特异引物序列: 5'-primer 5'-TCACTTCCCATCCGACACTCTACC
3'-primer 5'-ATCACTGAGTCGCTTCGCA
cry2 特异引物序列: 5'-primer 5'-CAGATACCCTTGCTCGTGTA
TGTTTGACTTTCTC
3'-primer 5'-ATAGGCCCGGTGCTCCACCAGG
cry3A 特异引物序列: 5'-primer 5'-GTCTGGATCCGAAACGTAAGAT
GAAACCTTAG
3'-primer 5'-GCATTGATTTTGATTATTTTCCTCC
ATTTTCTTCCTCCCTTTC

扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 1min, 53 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 25~30 个循环。

1.6 SDS-PAGE 分析^[8]

1.7 生物测定

参照文献[9]方法,用初孵柳蓝叶甲 (*Phyllodecta vulgatissima*) 和三龄小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 进行生物测定。

2 结果和分析

2.1 *cry3A* 基因电转化野生型菌株 YBT803-1

从大肠杆菌中抽提纯化含 *cry3A* 基因的质粒 pBMB3305,用电转化技术转化野生型受体菌 YBT803-1,然后用红霉素抗性平板筛选转化子,获得转化子 BMBY-001,对转化子进行质粒抽提并进行琼脂糖电泳分析,结果见图 1。从图 1 中可看出,转化子 BMBY-001 与出发菌株 YBT803-1 相比较,少了一条 44kb 的带,而多了一条 8.3kb 供体质粒带,表明供体质粒已被转入受体中,并且能正常复制。但在电转化过程中,受体中原有的一个 44kb 的质粒发生丢失,可能与质粒间的不相容性有关,其丢失机理尚待进一步考证。

2.2 转化子基因型的鉴定

PCR 分析结果表明(图 2),BMBY-001 显示有典型的 *cry1Ab* (238bp)、*cry1Ac* (487bp) 和 *cry3A* (595bp) 谱带,而没有 *cry2* (1070bp) 谱带形成,表明 *cry2* 基因可能定位在被丢失的 44kb 质粒上。

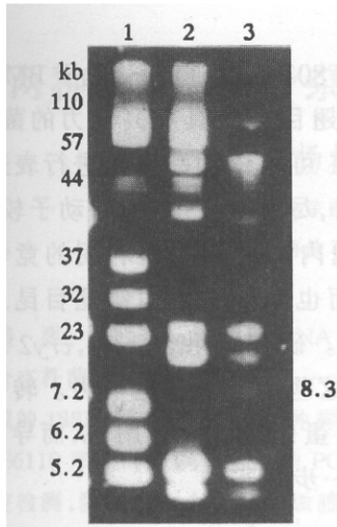


图1 苏云金芽孢杆菌野生菌株 YBT803-1 和转化子 BMBY-001 的质粒带谱

Fig.1 Plasmid spectrum of wild strain YBT803-1 and transformant BMBY-001

1. HD-2; 2. YBT803-1; 3. BMBY-001.

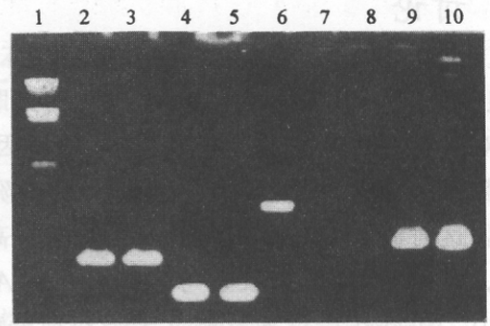


图2 苏云金芽孢杆菌野生菌株 YBT803-1 和转化子 BMBY-001 的 PCR 分析

Fig.2 PCR analysis of wild strain YBT-803 and transformant BMBY-001

1. λ DNA/*EcoRI* + *HindIII*; 2. YBT803-1(*cry1Ac*); 3. BMBY-001(*cry1Ac*); 4. YBT803-1(*cry1Ab*); 5. BMBY-001(*cry1Ab*); 6. YBT803-1(*cry2*); 7. BMBY-001(*cry2*); 8. YBT803-1(*cry3A*); 9. BMBY-001(*cry3A*); 10. *pBMB3305-1(cry3A)*.

2.3 *cry3A* 基因在 YBT803-1 中的表达

对转化子 BMBY-001 表达产物进行 SDS-PAGE 分析,结果(图 3)显示,BMBY-001 能产生大量的 64kD 蛋白质。镜检结果也表明 BMBY-001 除产生少量的菱形晶体外,还能产生大量长斜方形晶体,表现出典型的 *cry3A* 的晶体形态特征,说明 *cry3A* 基因能在该菌中高效表达。但该转化子 130kD 蛋白质的表达量很少,却出现了出发菌株原本不曾有的 73kD 蛋白质,初步推测,可能是 130kD 蛋白质的降解产物。从生物测定结果看出(表 1),BMBY-001 对柳蓝叶甲有较高的毒力,LC₅₀值为 0.431 μ L/mL,但对小菜蛾的 LC₅₀值为 3.319 μ L/mL,约为出发菌株 YBT803-1 毒力(LC₅₀值 1.164 μ L/mL)的三分之一。

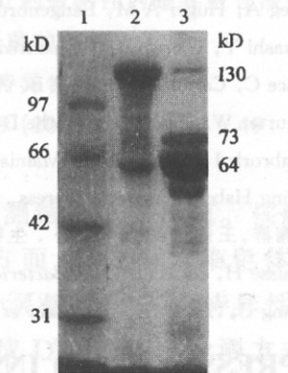


图3 YBT803-1 与 BMBY-001 杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of wild strain YBT803-1 and transformant BMBY-001

1. Marker; 2. YBT803-1; 3. Transformant BMBY-001.

表 1 苏云金芽孢杆菌野生菌株 YBT803-1 和转化子 BMBY-001 对昆虫的毒力

Table 1 Toxicity of wild strain YBT803-1 and transformant BMBY-001

Insect	Strain	Regressive equation	Relative coefficient/(r)	LC ₅₀ /(μ L/mL)
<i>Phyllodecta vulgatissima</i>	YBT803-1			not toxic
	BMBY-001	$y = 8.8782 + 1.1461x$	0.9870	0.4132
<i>Plutella xylostella</i>	YBT803-1	$y = 9.0422 + 1.3736x$	0.9924	1.1647
	BMBY-001	$y = 9.5873 + 1.8378x$	0.9734	3.3189

3 讨论

本文将 *cry3A* 基因转化到野生型苏云金芽孢杆菌 YBT803-1 中,得到转化子 BMBY-001,可高效表达 *cry3A* 基因产物,成为既对鳞翅目又对鞘翅目昆虫具有高毒力的菌株。但对鳞翅目的毒力低于出发菌株,其原因可能是因为 *cry3A* 可不依赖芽孢而进行表达形成晶体,该基因的转录在细胞营养生长阶段就开始了,所以,尽管 *cry3A* 的启动子较弱,但表达时间相对较长,其表达量也就很高^[10]。由于对细胞内能量和原料利用的竞争作用,*cry3A* 早期大量表达可能影响 *cry1A* 基因的表达,故而也就降低了对鳞翅目昆虫的毒力。协同作用也是影响苏云金芽孢杆菌毒力的因素之一。研究结果表明^[1],*cry2* 基因与其它基因如 *cry1*、*cry4* 或 *cytA* 基因共存时,可大大增强这些基因的表达能力。转化子 BMBY-001 丢失了一个含 *cry2* 基因的质粒,即失去了 Cry2 蛋白的协同作用,从而导致了 *cry1* 基因的产物和对小菜蛾毒性的降低,真实原因有待进一步证实。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白及其基因的研究及利用. 见:李卓楝等主编. 生命科学和土壤学中几个领域的研究进展. 北京:农业出版社,1993. 170~179.
- [2] Whiteley H R, Schnept H E. *Ann Rev Microbiol*, 1986, **40**:549~576.
- [3] Seker V, Thompson D A, Maroney M J, et al. *Proc Natl Acad Sci UAS*, 1987, **84**:7036~7040.
- [4] Krieg A, Huger A M, Langenbruch G A, et al. *Z Ang Entomol*, 1983, 500~508.
- [5] Takashi Y, Gary K D. *Advanced Engineered Pesticides*, 1993, 3~42.
- [6] Bruce C, Calton C, Gaworn B. *Advanced Engineered Pesticides*, 1993, 43~62.
- [7] Schurter W, Geiser M, Mathe D, et al. *Mol Gen Genet*, 1989, **218**:171~181.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2nd edition). New York: Cold Spring Harbour Laboratory press, 1989.
- [9] 沈鞠群,王锦举,喻子牛,等. 生物防治通报(增刊),1990,12~16.
- [10] Agaisse H, Lereclus D. *J Bacteriol*, 1995, **177**(21):6027~6032.
- [11] Chang C, Yu Y M, Dai S M, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**:815~821.

EXPRESSION AND INSECTICIDAL CHARACTERISTICS OF *cry3A* IN LEPIDOPTERA-SPECIFIC *BACILLUS THURINGIENSIS*

Yue Chaoyin^{1,2} Liu Ziduo¹ Zeng Xiaohui¹ Shao Zongze¹ Yu Ziniu¹

(1 Department of Microbial Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

(2 Department of Chemical, Sanxia University, Yichang 443003)

Abstract: The *cry3A* gene coding Coleoptera-specific protein was transformed into a wild strain YBT803-1 by electroporation, A transformant BMBY-001 was obtained. SDS-PAGE analysis demonstrated that *cry3A* could express 64kD protein in BMBY-001. However, the expression of *cry1Ab* and *cry1Ac* were effected. Bioassay showed that BMBY-001 was not only highly toxic to *Phyllodecta vulgatissima* larva (LC₅₀ 0.413 μ L/mL) but also toxic to *Plutella xylostella* (LC₅₀ 3.319 μ L/mL).

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *cry3A* gene; Wild strain; *Plutella xylostella*, *Phyllodecta vulgatissima*