

# 苏云金芽胞杆菌 YBT-1520 杀虫晶体蛋白基因的属性\*

孙 明 刘子铎 喻子牛

(华中农业大学生命科学技术学院 农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

**摘 要:**通过 Southern 杂交发现高毒力苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*) YBT-1520 菌株含有两个杀虫晶体蛋白基因片段,其 5'末端所在 *Hind*Ⅲ 片段分别为 6.8kb 和 4.6kb,它们对应的基因分别命名为 *cry*218 和 *cry*4.6。经 PCR 鉴定,该菌含有 *cry*1Aa、*cry*1Ab 和 *cry*1Ac 基因,以及 *cry*2 基因,其中 *cry*218 属于 *cry*1Ac。分析了 *cry*218 基因 4190bp 的核苷酸序列,在杀虫晶体蛋白基因分类系统中被命名为 *cry*1Ac10。结合 Southern 杂交和 PCR 结果可判断 3 个 *cry*1A 基因的拷贝数不同,其中 *cry*1Ac 拷贝数最高,YBT-1520 菌株与其它库斯塔克亚种的杀虫晶体蛋白基因所在限制性内切酶位置明显不同。

**关键词:**苏云金芽胞杆菌,杀虫晶体蛋白基因,基因定位,*cry*218 基因

中图分类号:Q812 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2000)04-0365-71

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)在芽胞形成过程中可产生由蛋白质组成的不同类型的伴胞晶体,分别对鳞翅目、双翅目和鞘翅目昆虫以及螨类和动植物寄生线虫具有毒性,因此已被开发成世界上最有效的生物杀虫剂<sup>[1]</sup>。根据鞭毛抗原的差异,可将苏云金芽胞杆菌划分为 69 个血清型<sup>[2]</sup>,从中分离到 28 群 150 多种杀虫晶体蛋白(简称晶体蛋白)基因,这些基因的产物具有不同的杀虫范围和毒力<sup>[3,4]</sup>。

目前,对鳞翅目幼虫高毒力的菌株主要为库斯塔克亚种(*subsp. kurstaki*) HD-1 菌株及其类似菌株,如 Abbott 公司 Dipel 系列制剂的生产菌株 HD-1, Sandoz 公司 Javelin 制剂的生产菌株 NRD-12。在这些菌株中,*cry*1A 基因 5'末端所在的 *Hind*Ⅲ 片段有 6.6kb、5.3kb 和 4.5kb 三种,分别对应于 *cry*1Ac、*cry*1Ab 和 *cry*1Aa 基因<sup>[5]</sup>。HD-1 和 NRD-12 菌株所含的晶体蛋白基因类型相同,且都含这 3 类基因<sup>[6]</sup>。对于 HD-1 来说,*cry*1Aa 基因和 *cry*1Ac 基因位于 110MD 大质粒上,而 *cry*1Ab 位于 44MD 质粒上<sup>[7]</sup>,从而造成晶体蛋白基因拷贝数的差异。在我国,曾分别用蜡螟亚种(*subsp. galleriae*)和中华亚种(*subsp. chinensis*) CT-43 菌株生产“青虫菌”和“双毒制剂”<sup>[8]</sup>。通过遗传诱变获得单个晶体蛋白以及研究伴胞晶体的溶解和晶体蛋白的激活等特征,发现 CT-43 菌株产生 Cry1A、Cry1B 和 Cry2A 三类晶体蛋白<sup>[4]</sup>。我国已从蜡螟亚种<sup>[9]</sup>、库斯塔克亚种<sup>[10]</sup>、以色列亚种(*subsp. israelensis*)<sup>[11]</sup>和拟步行甲亚种(*subsp. tenebrionis*)<sup>[12]</sup>中得到晶体蛋白基因的阳性克隆,但这些基因的类型没有确定。

苏云金芽胞杆菌 YBT-1520 菌株为本室分离的高毒力菌株。该菌株产生 130kD 和

\* 国家 863 计划课题(101-03-01-01)资助

作者简介:孙 明(1966—)男,江西省景德镇市人,华中农业大学生命科学技术学院副教授,博士,主要从事芽胞杆菌的分子生物学研究

收稿日期:1999-03-26,修回日期:1999-10-22

65kD 晶体蛋白,对小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 和棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 的毒力比 HD-1( Dipel-2X )和 NRD-12 菌株高<sup>[13]</sup>。本文分析了该菌株的晶体蛋白基因的属性和 *cry218* 基因的核苷酸序列。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

苏云金芽胞杆菌 YBT-1520( 鞭毛抗原血清型 H3abc )由本室分离并收藏,HD-1 和 NRD-12 菌株分别从美国的苏云金芽胞杆菌商品制剂 Dipel-2X 和 Javelin 中分离,HD-73 由美国农业部 Dulmage 博士提供,以上菌株均为库斯塔克亚种。大肠杆菌 TG1 由剑桥大学生化系 Ellar 博士提供,pXI93 含 *cry1Ab* 基因,由加州大学 Riverside 分校吴栋博士提供,pOS1000 含库斯塔克亚种 HD-244 菌株的 *cry1Ac* 基因,由美国俄亥俄州立大学生化系 D.H.Dean 教授提供,pBMB201 为全长 *cry218* 基因所在的 *Bam*HI-*Hind*Ⅲ 片段克隆于 pUC19 中<sup>[14]</sup>。

### 1.2 DNA 操作

有关大肠杆菌质粒 DNA 的提取,DNA 的酶切、连接和电泳,Southern 转移等基本操作均按文献[15]进行。

### 1.3 探针标记和杂交检测

采用 Boehringer Mannheim 公司的“DIG DNA Labeling and Detection Kit”试剂盒标记探针和检测杂交结果。

### 1.4 苏云金芽胞杆菌质粒的提取

采用类似大肠杆菌质粒提取的碱裂解法<sup>[15]</sup>,但使用 BP 培养基(0.3% 牛肉膏,0.5% 蛋白胨,0.5% NaCl,pH7.2)于 30℃ 培养菌体。

### 1.5 聚合酶链反应(PCR)

利用 PCR 反应鉴定晶体蛋白基因的类型,反应程序为 94℃ 1 min,52℃ 2 min,72℃ 3 min,25 个循环。鉴定 *cry1* 基因和 *cry2* 基因的混合引物及其序列见文献[16,17]。

### 1.6 序列分析

利用美国 USB 公司 Sequenase Version 2.0 DNA 序列分析试剂盒,采用链终止法,部分测序使用自动测序仪(ABI 377,Perkin Elmer)。

## 2 结果

### 2.1 YBT-1520 菌株中晶体蛋白基因的鉴定

**2.1.1 Southern 杂交分析** 以 *cry1Ab* 基因(来源于 pXI93)5'-末端的 726bp *Eco*RI 片段为探针,与 YBT-1520 菌株的 *Hind*Ⅲ 酶切质粒进行 Southern 杂交,发现有一条 6.8kb 的强杂交带和一条 4.6kb 的弱杂交带,所设对照与文献报道<sup>[5]</sup>一致,即 HD-73 菌株只有 6.6kb 带,HD-1 菌株有 6.6,5.3 和 4.5kb 三条带(图 1-A)。表明 YBT-1520 菌株至少含有两个 *cry1A* 基因,本文暂将它们对应的基因分别命名为 *cry218* 和 *cry4.6*。

当 *cry218* 基因被克隆后<sup>[14]</sup>,用该基因 3'-末端所在的 648bp *Hind*Ⅲ-*Kpn*Ⅰ 片段为探针,与 YBT-1520 菌株质粒的 *Kpn*Ⅰ-*Bst*Ⅰ 和 *Kpn*Ⅰ-*Pst*Ⅰ 酶切产物杂交,杂交也有强

带和弱带之分,强带分别为 5.3kb、3.7kb 和 3.3kb,弱带分别为 2.1kb、3.3kb 和 2.1kb(图 1-B),与 *cry218* 基因内部 *Kpn* I -*Pst* I 片段为 389bp(见序列分析)相一致。

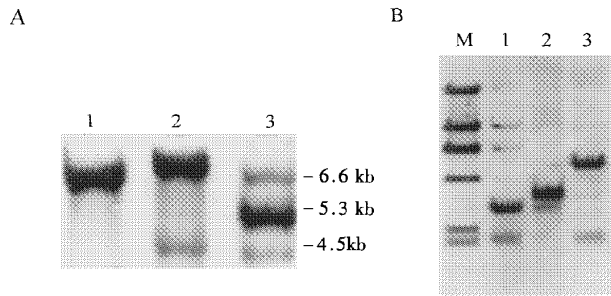


图 1 苏云金芽胞杆菌 YBT-1520 菌株质粒 DNA 的 Southern 杂交图

Fig.1 Southern hybridization to plasmid DNA of YBT-1520 strain

A. The 726bp *Eco*RI fragment in *cry1Ab* gene used as probe. 1. HD-73/*Hind* III ;2. YBT-1520/*Hind* III ;3. HD-1/*Hind* III .B. The 648bp *Kpn* I - *Hind* III fragment in *cry218* used as probe , hybridized to digested plasmid DNA of YBT-1520 strain. M.  $\lambda$ DNA/*Hind* III ;1. *Kpn* I -*Pst* I 2. *Pst* I 3. *Kpn* I .

**2.1.2 PCR 鉴定** 用 *cry1* 基因寡核苷酸(鉴定)引物混合物<sup>[16]</sup>作 PCR 分析,*cry218* 基因的扩增产物大小为 487bp,对应于 *cry1Ac* 基因。核苷酸序列分析(见后)证实了这一点。YBT-1520 菌株的质粒可扩增出 3 种产物,即 724bp、487bp 和 238bp。它们分别对应于 *cry1Aa*、*cry1Ac* 和 *cry1Ab* 基因。当模板粗提物浓度为 50ng/ $\mu$ L 时,3 个基因的特异性片段可扩增出来,而当浓度分别为 5ng/ $\mu$ L 和 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L 时,却只能扩增出 724bp 和 487bp 两个片段,*cry1Ab* 基因对应的片段扩增不出来(图 2)。

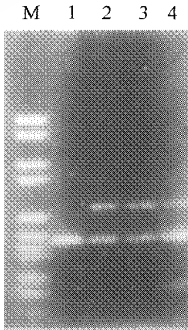


图 2 苏云金芽胞杆菌 YBT-1520 菌株晶体蛋白基因的 PCR 扩增电泳图

Fig.2 Agarose electrophoresis of PCR products amplified with the primer mixture for *cry1* gene

M. Molecular weight Marker VI (2176 ,1766 ,1230 ,1033 ,653 ,517 ,453 ,394 ,298 ,234 ,220 and 154bp ,Boehringer Mannheim); 1. Cloned *cry218* gene as the template; 2 ~ 4. Plasmid extract of YBT-1520 as the template , the concentration is 0.5ng/ $\mu$ L , 5ng/ $\mu$ L and 50ng/ $\mu$ L , respectively.

为了进一步确证 YBT-1520 菌株含有 3 个 *cry1A* 基因,利用 *cry1Aa*、*cry1Ab* 和 *cry1Ac* 基因特异性的 PCR 引物分别扩增 YBT-1520 菌株质粒 DNA 粗提物,并用 HD-1 菌株作对照,发现 YBT-1520 菌株和 HD-1 菌株可扩增出相同的产物(未列照片)。从而进一步说明 YBT-1520 菌株与 HD-1 菌株一样含有 3 个 *cry1A* 基因。

用 *cry2* 基因寡核苷酸(鉴定)引物<sup>[17]</sup>通过 PCR 从 YBT-1520 菌株和 HD-1 菌株的质粒中均可扩增出 1070bp 产物(未列照片),说明 YBT-1520 菌株与 HD-1 菌株一样含有 *cry2* 基因。

2.2 核苷酸序列分析

分析了 *cry218* 基因所在的 4190bp 核苷酸序列(图 3),其 GenBank/EMBL 注册号为 AJ002514。在苏云金芽胞杆菌晶体蛋白基因库中被命名为 *cry1Ac10*<sup>[3]</sup>。其编码区位于 388 至

1	TTACAATTCA	AGATGAATTG	CAGGTAAATG	GTTCTAACAT	GTATAAGTGT	AAGTATTTC	ACATTACCAC	AAATTCTCAA	TTTGTTATATG
91	TAAAAATAGA	AAAGTGGATT	TTATATATAA	GTATAAAAAG	TAATAAGACT	TTAAAATAG	TTAAGCGGAAT	ACAAACCCCT	AATGCAATGG
181	TTAAACATCT	TAAAGTCTAA	AGCATGTGTA	ATGGGGGAGA	AGCAAGTAGA	TTGTTAACAC	CCTGGGCTCAA	AAATTGATAT	TTAGTAAATAT
270	TAGTTGCAGT	TTGTGCATTT	TTTCATAAGA	TGAGTCATAT	GTTTAAATTT	TGATTAATGA	AAACACGATAT	TATATATCAAT	TGAATTTGGTA
361	TCCTTAATAA	AGAGATGGAG	GTAACCTATG	GAAACAACAT	CGAACATCAA	GTAGTGCATT	CTCTTAATAT	TTTAAAGTAA	CCCTGACAGTA
450	GAAGTATTAG	GTGGAGAAAG	AATAGAAACT	GGTTACACCC	CAATCGATAT	TTCTTTGTGC	CTAACGCAAT	CTTTCTTTGAG	TGAATTTGTT
541	CCCGGCTGCT	GATTGTGTTT	AGGACTAGTT	GATATAATAT	GGGGAATTTT	TGGTCCCTCT	CAATGGGACG	CATTCTTGCT	ACAAATTTGAA
631	CAGTTAATTA	ACCCAAGAAT	AGAAGAATTC	GCTAGGAACC	AAGCCATTTC	TAGATTAGAA	GGACTAAGCA	ATCTTTATCA	AATTTACGCA
721	GAATCTTTTA	GAGAGTGGGA	AGCAGATCCT	ACTAATCCAG	CATTAAAGAA	AGAGATGGCT	ATTCAATTCA	ATGCATGAA	CAGTGCCTCT
811	ACAAACCGTA	TTCCCTTTTT	TGCAGTTCAA	AATATATCAAG	TTCCCTTTTT	ATCMGRTAT	GTTCAGGCTG	CAAAATTTACA	TTTATCGATT
901	TTGAGAGATG	TTTCAGTGT	TGGACAAGG	TGGGATTTG	ATGCCGGAC	TATCAATAGT	CGTATTAATG	ATTTAACTAG	GCTTATTGGC
991	AACTATAAGV	ATTATGCTGT	ACGCTGGTAC	AATACGGGAT	DAGAACGTGT	ATGGGGACCG	GATTCCTAGAG	ATTGGGTAAG	GTATAGTCAA
1081	TTTAGAAGAG	AATTAACTAT	AACCTGATTA	GATATCGTGT	CTCTGTTCCC	GAATTTATGAT	AGTAGAAGAT	ATCCAATTGC	ACAGCTTTCC
1171	CAATTAAACAA	GAGAAATTTA	TACAAAACCA	GATTATAGAAA	ATTITGTATGG	TAGTITTTGGA	GGCTCGGCTC	AGGGCAGTAGA	AAGAAGATT
1261	AGGAGTCCAC	ATTGTAGTGA	TATACTTAAC	AGTATAACCA	CTTATACCGA	TGCTCATAGG	GGTATTATT	ATGCTGTCAGG	GCATCAATAA
1351	ATGGCTTCTC	CTGTGCGTTT	TTCCGGGCCA	GAATTCACGT	TTCCGCTATA	TGGAAGCAATG	GGAAATCGAC	CTCCACAACA	ACGTATCTGT
1441	GCTCAACTAG	GTACAGGCGT	GTATAGAAC	TTATCGTCCA	CTTTATATAG	AAGACCTTTT	AATATAGGGA	TAAATATCA	ACAACTATCT
1531	GTTCTTGACG	GGACAGAATT	TGCTTATGGA	ACCTCCTCAA	ATTTGCCATC	CGCTGTATAC	AGAAAAGACG	GAACGGTAGA	TTCCGCTGGT
1621	GAAATACCCG	CACAGAAATA	CAACGTGCA	CCTAGGCAAG	GATTTAGTCA	TGCAATTAGC	CATGTTTCAA	TGTTTGCTTC	AGGCTTTAGT
1711	AATAGTACTG	TAAGTATAAT	AAGAGCTCCT	ATGTTCTCTT	GGATACATCG	TAGTGTGCGA	TTTAAATAA	TAAATGCATC	GGATAGTATT
1801	ACTCAATCC	CTGCAGTGAA	GGGAACACTT	CTTTTAAATG	GTCTGTAAAT	TTACGAGACA	GGATTTACTG	GTGGGGACTT	AGTTAGATTA
1891	AATAGTAGTG	GAAATAVAC	TCAGAAATAGA	GGGTATATTG	AGSIVTCAAT	TCACITCOCA	TCGCAATCTA	CCAGATATCG	AGTTCGTGTA
1981	CGGTATGCTT	CTGTAGACCC	GATTCAACCT	AACGTTAATT	GGGGTAATTC	ATCCATTTTT	TTCCAATACG	TACCACGTAC	AGCTAGCTCA
2071	TTAGATAATC	TACATCAAG	TGATTTTGGT	TATTTTGAAA	GTGCCAATGC	TTTITACTCT	TCATTAGGTA	ATATAGTAGG	TGTTAGAAAT
2161	TTTAGTGGGA	CTGSCAGGAT	GATAAATAGC	AGATTTGAAT	TTATTCAGT	TACTGCAACA	CTCGAGGCTG	AATATAGTCT	GGAAAGACCG
2251	CAGAAGCGGG	TGAATGCGCT	GTTTACGTCT	ACAAAACCAAC	TAGGCTTAAA	AACAAMATGA	ACGGATTATC	ATATTGATCA	AGTGCCAAT
2341	TTAGTTACGT	ATTATTCGGA	TGAATTTTGT	CTGATGAAA	LCGGAGAATT	GTCCGAGAAA	GTCAAACATG	CGAAGGACT	CAGTGTAGAA
2431	CGCAATTATC	TCCAAGATTC	AAATTTCAAA	GACATTAATA	GGCAACACAGA	ACGTGGGTGG	GGCGGAAGTA	CAGGAGATTAC	CATCCAAGGA
2521	GGGATGACG	TATTTAAGA	AAATTTACGC	ACACTATCAG	GTACCTTTGA	TGAGTCTAT	CCCAATATT	TGTATCAAAA	AATCGATGAA
2611	TCAAAATTTAA	AAGCCTTTAC	CCGTTATCAA	TTAAGAGGCT	ATATCGAAGA	TAGTCAAGAC	TTAGAAMTCT	TTTAAATGCG	CTACAATGCA
2701	AAACATGAAA	CAGTAAATGT	GCAGGCTAGC	GGTTCCTTAT	GGCCGCTTTC	AGCCCAAGDT	CCAAATCGGA	AGTGTGGAGA	GGCGAATCGA
2791	TGCGCGCCAC	ACCTTGAATG	GAATCTGTAC	TGATTTGTT	CGTGTAGGGA	TGGAAGAAAG	TTGCGCCATC	ATTCCGATCA	TTTCTCCTTA
2881	GACATGTATG	TAGGATGTAC	AGACTTAAAT	GAGGACCTAG	GTGTATGGGT	GATCTTTAAG	ATTAAGACGC	AAGATGAGCA	CGCAAGACTA
2971	GGGAATCTAG	AGTTTCTCGA	ACAGAAACCA	TTAGTAGGAG	AAGCGCTAGC	TCGTGTGAAA	AGAGCGGAGA	AAAAAGGAG	ACAGAAACCT
3061	GAAAATTTGG	EATFGGAAAC	AAATATCGTT	TATAAAGAGG	EAAAAGAAT	TGTATAGTCT	TTATTGTGAA	ACTCTCAATA	TGATCAATTA
3151	CAAGCGGATA	CGAATATTGC	CATGATTTAT	CGCGCAGATA	AGCTGTITCA	TAGCATTCGA	GAACTTATC	TGCTGTGAGT	GTCTGTGATT
3241	CGGGGTGTCA	ATCGCGGTAT	TTTTFGAEE	TTAGAAGGCG	GTATTTTAC	TGCATTTCTC	CTATATGATG	CGAGAAATGT	CATTAAAAAT
3331	GGTGATTTTA	ATAATGGCTT	ATCTGCTGCG	AACGTGAAAG	GGCATGTAGA	TGTAGAAGAA	CAAAACAACC	AACGTTCCGT	CCTGTGTGTT
3421	CGGGAATGGG	AAGCAAGAAT	GTCAAGAAG	TTCTGTGCT	GTCCGGGTGC	TGCTATATTC	CTTGCTGTCA	CAGCGTACAA	GKGGGATAT
3511	GGAGAAGGTT	CGGTAAACAT	TCATGAGATC	GAGAACAATA	CAGCAAGACT	GAACTTATGC	AACTCGCTAG	EAGAGGAAT	CTATCCAAAT
3601	AACACGGTAA	CGTGTAAATG	TTATACGTGA	AATCAAGAG	ATACCGGAG	TGCGTACACT	TCTCGTAATC	GAGGATATAA	CGAAGCTCCT
3691	TCCGTACCAG	CTGATTATGC	GTCACTCTAT	GAAGAAAAAT	CGTATACAGA	TGGACGAAGA	GAGAATCTCT	GTGAATTTAA	CAGAGGCTAT
3781	AGGGATTACA	CGCCACTACC	AGTTGGTTAT	GTGACAAAA	AATTAGAATA	CTTCCGAGAA	ACCGATAACG	TATGGAATTA	GATTGGAGAA
3871	ACGGAAGGAA	CATTATCGT	GGACAGCGTG	GAATTACTCC	TTATGGAGGA	ATAGTCTCAT	GCAAATACAG	GTTTAAATAT	CGTTTTCAAA
3961	TCAATTGCTC	AAGAGCAGCA	GTACAAATAG	ATAAGTAAAT	TGTTTAAAT	AAAAACGCGAC	ATCACTTCCA	TGAAACCGGA	GCTGATGCGG
4051	TTTACTATATG	TTATTTTCTA	TGATATACAT	AACTTAAATCA	AACTTAAATCA	AGCAGAGATA	TTTCAACCTA	TCGATGAAAA	TATCTCTGCT
4141	TTTCTTTTTT	TTATTTGGTA	TATGCTTTAC	TTGTAATCGA	AAATAAAGCA				

图 3 苏云金芽胞杆菌 YBT-1520 菌株中 *cry218(cry1Ac10)* 基因的核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of *cry218(cry1Ac10)* gene of YBT-1520 strain (The putative ribosome-binding site is underlined)

3924 核苷酸,编码由 1178 个氨基酸残基组成的 133.3kD 蛋白质。

同时分析了 *cry218* 基因上游 *Bam*HI 位点所在的 225bp 核苷酸序列。经比较,该序列与插入序列 IS231B 中的序列完全一致<sup>[18]</sup>。

### 3 分析和讨论

#### 3.1 杀虫晶体蛋白基因的类型

PCR 扩增显示,YBT-1520 菌株含有 *cry1Aa*、*cry1Ab* 和 *cry1Ac* 基因,且 *cry218* 属 *cry1Ac* 那么 *cry4.6* 是 *cry1Aa* 还是 *cry1Ab* 呢?从 648bp 探针杂交的弱带大小判断,其 *Kpn*I 为 2.1kb,而在 *cry1Ab* 基因 3'-末端有两个 *Kpn*I 位点,其大小为 1482bp<sup>[3]</sup>,因此 *cry4.6* 不应是 *cry1Ab*。综合 PCR 和 Southern 杂交结果,可判断 *cry4.6* 基因可能属于 *cry1Aa*。这一分析与基因拷贝数分析的结果是一致的。

由于 *cry1Aa* 和 *cry1Ab* 基因的 3.6kb 编码区内都没有 *Pst*I 位点,而与 648bp 探针却杂交出 3.3kb *Pst*I 带,因此 *cry4.6* 基因与典型 *cry1Aa* 基因仍有限制性酶切位点的差异。至于 *cry4.6* 基因是否是一类新基因尚待将其克隆并序列分析后再定。

#### 3.2 杀虫晶体蛋白基因的拷贝数分析

上述 PCR 结果表明 YBT-1520 菌株有 3 个 *cry1A* 基因,而 Southern 杂交只显示出强弱不同的两条杂交带,说明这 3 个基因具有不同的拷贝数。YBT-1520 菌株含有至少 7 个质粒(未列照片),且由于实验中以质粒 DNA 为对象,所以这 3 个基因很可能位于不同的复制单位(或质粒)上,其中 *cry218* 基因所在的复制单位拷贝数相对其它两个基因来说最高。

PCR 显示 YBT-1520 菌株含有 *cry1Ab* 基因,但当模板浓度较低时扩增不出来,而 Southern 杂交也鉴定不出来,说明该基因的拷贝数很低。3 个 *cry1A* 基因在 726bp 探针和 648bp 探针范围内的同源性分别为 94.6%~97.9%和 95.7%~99.1%(根据核苷酸序列计算),而且探针均采用六个核苷酸的随机引物进行标记,因此,探针与目标 DNA 的同源性差异不致引起杂交信号强弱的差异。

在对照中,HD-1 菌株中的 *cry1Aa* 和 *cry1Ac* 基因的杂交带亮度相似,但比 *cry1Ab* 基因的杂交带亮度低。这与前两个基因位于同一个较大的质粒上,而 *cry1Ab* 位于另一个较小的质粒上相一致<sup>[7]</sup>。

因此,可初步认为 *cry218* 基因的拷贝数最高,*cry4.6*(可能为 *cry1Aa*)基因的拷贝数次之,另一个可能为 *cry1Ab* 的基因拷贝数最低。

#### 3.3 杀虫晶体蛋白基因所在的位置

**3.3.1 *cry218* 基因所在的位置:**从以上核苷酸序列分析和 Southern 杂交的结果可以看出,在 *cry218* 基因编码区内只有一个靠近 3'-末端的 *Hind*III 位点,同时在该位点上游 6.4kb 和 6.8kb 处分别有一个 *Bam*HI 位点和 *Hind*III 位点。而在 HD-1 和 HD-73 菌株中,*cry1Ac* 基因中相应的这两个距离却都是 6.2kb 和 6.6kb<sup>[5,18]</sup>(图 1-A)。由于在该 *Hind*III 位点上游 648bp 和 1037bp 处分别有一个 *Kpn*I 和 *Pst*I 位点,那么在该 *Kpn*I 位点下游 5.3kb 和 3.3kb 处应该分别有一个 *Kpn*I 和 *Pst*I 位点(图 1-B)。将 *cry218* 基因与 HD-73 和 HD-244 菌株中的 *cry1Aa* 基因比较时发现,它们 3'-端所在的 *Pst*I 片段分

别为 3.7k $\text{b}$ (图 1-B)、5.6kb 和 5.5k $\text{b}$ (未列照片)。说明 *cry218* 基因(即 *cry1Ac10*)与其它 *cry1Ac* 基因所在的限制性内切酶片段明显不同。

**3.3.2 *cry4.6* 基因所在的位置** :对 *cry4.6* 基因来说,其 5'末端所在的 *Hind* III 片段为 4.6k $\text{b}$ (图 1-A),与典型 *cry1Aa* 基因和 *cry1Ab* 基因所对应的片段的大小不同<sup>[5]</sup>;3'末端所在的 *Kpn* I 片段和 *Pst* I 片段分别为 2.1kb 和 3.3k $\text{b}$ (图 1-B)。

**3.3.3 与插入序列 IS231 的关系** :*cry218* 基因上游 *Bam* HI 和 *Hind* III 位点处于插入序列 IS231B 中,与 HD-73 菌株一样<sup>[18]</sup>。该序列位于 IS231B 的一个阅读框架(ORF)内,但方向与 *cry218* 基因相反,本文分析的 225bp 序列对应 304~523bp。

### 3.3 *cry218* 基因的地位

在新的杀虫晶体蛋白基因分类系统中,*cry218* 基因被命名为 *cry1Ac10* 基因<sup>[3]</sup>。这是我国第一个进入 GenBank/EMBL 数据库且被正式命名的晶体蛋白基因。10 个 *cry1Ac* 基因在阅读框架内的差异主要集中在一个很小的范围,即在 1365、1368、1389、和 1407 位置上要么是 C、T、G 和 C,要么是 A、G、T 和 T。

综上所述,YBT-1520 菌株的晶体蛋白基因所在的限制性内切酶位置和在复制单位上的分布方式均与典型菌株不同,其中属于 *cry1Ac10* 的 *cry218* 基因的拷贝数最高。在现有晶体蛋白基因中对棉铃虫毒力最高的是 *cry1Ac* 基因<sup>[19]</sup>,而 YBT-1520 菌株中 *cry218* 基因拷贝数最高,也许是它毒力很高的主要原因。

## 参 考 文 献

- [1] Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, et al. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998 **62**: 775~806.
- [2] Lecadet M M, Frachon E, Dumanoir V C, et al. *J Appl Microbiol*, 1999 **86**: 660~672.
- [3] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, et al. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998 **62**: 807~813.
- [4] 孙明, 喻子牛. *微生物学报*, 1996 **36**(4): 303~306.
- [5] Kronstad J W, Whiteley H R. *Gene*, 1986 **43**: 29~40.
- [6] Masson L, Prefontaine G, Peloquin L, et al. *Biochem J*, 1990 **269**: 507~512.
- [7] Aronson A I. *Mol Microbiol*, 1993 **7**: 489~496.
- [8] 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990.
- [9] 王智勇, 吴柏华. *微生物学报*, 1990 **30**(4): 249~253.
- [10] 田颖川, 蔡发兴, 王瑛. *生物工程学报*, 1989 **5**(1): 11~18.
- [11] 华学军, 范云六. *微生物学报*, 1992 **32**(5): 314~319.
- [12] 李小刚, 李荣森. *生物工程学报*, 1994 **10**(2): 103~108.
- [13] 孙明, 戴经元, 罗曦霞, 等. *中国病毒学*, 1996 **11**: 42~45.
- [14] 孙明, 吴岚, 刘子铎, 等. *农业生物技术学报*, 1996 **4**: 293~298.
- [15] J 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯主编(金冬雁, 黎孟枫等译). *分子克隆实验指南*, 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [16] Kalman S, Kiehne K L, Libs J L, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1993 **59**: 1131~1137.
- [17] Asano S, Bando H, Iizuka T. *J Seric Sci Jpn*, 1993 **62**: 223~227.
- [18] Mahillon J, Seurinck J, Delcour J, et al. *Gene*, 1987 **51**: 187~196.
- [19] Palidam M. *J Invertebr Pathol*, 1992 **59**: 109~111.

## CHARACTERIZATION OF THE INSECTICIDAL CRYSTAL PROTEIN GENES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* YBT - 1520<sup>\*</sup>

Sun Ming Liu Ziduo Yu Ziniu

( College of Life Science and Technology ,Huazhong Agricultural University ;

Key Laboratory of Agricultural Microbiology ,Ministry of Agriculture ,Wuhan 430070 )

**Abstract :** The insecticidal crystal protein genes of highly toxic *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 were analyzed. Southern hybridization and PCR analysis indicated that this strain bears *cry1Aa* , *cry1Ab* , *cry1Ac* and *cry2* genes. The copy number of three *cry1A* genes is different and *cry1Ac* gene ( here named *cry218* ) is the highest. The restriction location of three genes is different from that in typical strains , such as HD-1 and HD-73 strains. 4190bp nucleotide sequence of *cry218* gene was determined and this gene was named *cry1Ac10* in the recently published gene nomenclature.

**Key words :** *Bacillus thuringiensis* , Insecticidal crystal protein gene , Restriction location , *cry218* gene

<sup>\*</sup> Project of Chinese National Programs for High Technology Research and development ( 101 - 03 - 01 - 01 )

### 《微生物学报》承接广告业务

《微生物学报》创刊于 1953 年 , 双月刊 , 双月 4 日出版 , 由中国微生物学会和中科院微生物研究所主办。他是我国微生物学领域唯一的综合性学报级刊物。主要报道我国普通微生物学 , 工业、农业、医学、兽医微生物学 , 病毒学 , 免疫学和生物工程等方面的研究论文、研究简报和短篇综述等。

本刊历史悠久 , 发行量大 , 内容涵盖面广 , 深受国内外科研工作者、高等院校师生和企事业科研管理人员的欢迎。他是我国自然科学核心期刊 , 被国内外一些重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

凡与微生物学及其各分支学科有关的试剂、药品、仪器、设备 , 以及生物工程产品等均欢迎在本刊刊登广告 , 服务热情 , 信守协议 , 保证质量 , 价格合理 , 竭诚为广大用户服务。

联系电话 ( 010 ) 62630422 邮编 : 100080

通讯地址 北京市海淀区中关村中科院微生物研究所内《微生物学报》编辑部