

双价杀虫蛋白基因在荧光假单胞菌中的表达及增效^{*}

丁之铨¹ 张 杰¹ 宋福平¹ 黄大昉² 李季伦³

(¹ 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100004 及 ² 中国农业科学院生物技术研究中心 北京 100081)

(³ 中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘 要 利用广宿主质粒载体 pJMS6 α -*lac* 将苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)杀虫晶体蛋白基因 *cry1Ac* 和 *cry2Aa* 基因分别及一起进行克隆,将重组质粒导入能在多种作物上定殖、对植物病菌有良好抑菌和防治作用的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)P303 菌株,分别得到工程菌株 IPP101、IPP201 和 IPP202。PCR-RFLP 和 Southern blot 检测均证明目的基因已经导入了工程菌。SDS-PAGE 电泳显示工程菌中存在明显的 Cry1Ac 蛋白带,透射电镜观察发现含 *cry1Ac* 基因的两个菌株 IPP101 和 IPP202 中杀虫蛋白形成了典型的菱形晶体和蛋白包含体,而在野生 P303 菌株中均无这些结构。这些结果说明,工程菌中 *cry1Ac* 基因得到了很好表达。室内杀虫试验表明:工程菌对棉铃虫初孵幼虫的致死中浓度(LC₅₀),只含 *cry1Ac* 的 IPP101 为 0.00812mL/g 饲料,只含 *cry2Aa* 的 IPP201 为 0.02604mL/g 饲料,含双基因的 IPP202 为 0.00186mL/g 饲料;HD73 为 0.00170mL/g 饲料。*cry1Ac* 和 *cry2Aa* 双基因表达产物具有显著增效作用,共毒系数达 332.8。

关键词: 荧光假单胞菌,杀虫晶体蛋白, *cry1Ac* 基因, *cry2Aa* 基因,增效作用

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2000)06-0573-78

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是自然界最大的生物杀虫剂资源,但天然 Bt 菌株裸露的杀虫晶体蛋白应用后易受紫外线照射而丧失活力,这是 Bt 菌株自身最大的不足之处。除此之外, Bt 菌株杀虫谱较窄、害虫易对其产生抗药性。

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, 简称 Pf)由于分布广泛,对人畜无害,多数对植物有益以及遗传操作简便、试验材料丰富等特点,已成为应用重组微生物研究的理想受体菌。美国 Mycogen 公司已有数个转 Bt 荧光假单胞菌的产品投放市场,其中 MVP 即是含有 *cry1Ac*1'5'端及 Berliner toxin 1715 3'端杂合基因的荧光假单胞菌产品^[1]。Bt 杀虫蛋白基因导入 *P. fluorescens* 的研究涉及到的基因还有 *cryIII*(Mycogen 公司)和 *cryIVB*^[2]等。国内, Bt *cry* 基因在假单胞菌中的表达已有一些报道^[3~5],但由于表达水平、安全性问题,尚处在实验室水平。本文利用广宿主质粒载体 pJMS6 α -*lac* 将克隆在大肠杆菌 *tac* 强启动子下的 *cry1Ac* 全长基因及 *cry2* 加 *cry1Ac* 双基因导入能在多种作物根部定殖、对植物病原真菌有良好抑菌与防治作用的 P303 菌株,构建出杀虫活性强、有可能延缓害虫产生抗性的杀虫遗传工程荧光假单胞菌。

^{*} 本文由国家“863”项目资助(101-03-01-01)

作者简介:丁之铨(1965-)男,浙江省新昌县人,中国农业科学院植物保护研究所助理研究员,博士,主要从事遗传工程微生物及环境微生物研究

收稿日期:2000-01-03,修回日期:2000-04-06

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 :见表 1。

表 1 菌株和质粒一览表
Table 1 Strains and Plasmids

Name	Characterization	Source
Strain		
DH5α	Receptior strain of <i>E. coli</i>	This lab
P303	Pf strain with root-colonizing and antifungal activity	Prof. Yufa Peng
HD73	Bt wild type strain , <i>cry1Ac1</i> ⁺	This lab
IPP101	P303(pJBT1283)	This study
IPP201	P303(pJBT2007)	This study
IPP202	P303(pJBT2008)	This study
Plasmid		
pJMS6α- <i>lac</i>	<i>Pseudomonas</i> cloning vector Km ^r 4.1kb	Dr. Romer(Spain)
pHZ1255	<i>cry1Ac</i> cloned on pKK223 – 3 Amp ^r 8.1kb	Re[6]
pXB32	Tet ^r <i>cry2Aa</i> ⁺ 10kb	Dr. Ba(America)
pOS22	<i>cry1Ac</i> ⁺ Amp ^r 7.0kb	This lab
pJBT1283	<i>cry1Ac</i> cloned on pJMS6α- <i>lac</i> Km ^r 7.9kb	This study
pJBT2007	<i>cry2Aa</i> cloned onpJMS6α- <i>lac</i> Km ^r <i>cry2Aa</i> ⁺ 8.1kb	This study
pJBT2008	<i>cry1Ac</i> + <i>cry2Aa</i> cloned on pJMS6α- <i>lac</i> 11.9kb	This study

1.1.2 培养基 :LB 培养基参照文献 [7] ;D6 培养基 :蔗糖 30g ,甘油 1.0mL ,蛋白胨 5g ,酵母粉 5g (NH₄)₂SO₄ 3.0g ,NaNO₃ 1.0g ,MgSO₄ · 7H₂O 2.0g ,K₂HPO₄ 1.0g ,NaCl7.5g ,CaCO₃ 2.0g ,用水定容至 1000mL ,pH7.2。

1.1.3 试剂 :PCR 引物 K5un2/K3un2、K5un3/K3un3 参考文献 [8] 合成 ,S5un2/S3un2 由本实验室宋福平设计 ,上海生工生物工程有限公司合成 ;dNTP、Taq 酶等购自北京鼎国生物技术发展中心 ;Nick translation 试剂盒购自 Promega 公司 ,³²P 标记 dCTP 购自北京市亚辉生物医学工程公司 ,硝酸纤维素膜为 Amersham 公司产品。

1.1.4 抗生素 :氨苄青霉素(Amp) 卡那霉素(Km) 四环素(Tet)保存及使用参照文献 [7] 进行 ;利福平(rif)20mg/mL 酒精溶液保存 ,使用浓度 100μg/mL。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒构建 :用碱裂解法^[7]和酸酚法^[9]从 *E. coli* 中提取质粒。大肠杆菌感受态细胞制备、DNA 转化见文献 [7] ;P303 感受态细胞制备 :P303 于 LB 中 28℃、220r/min 振荡活化过夜 ,1% 接种量转接于 10mL LB 流体培养基中 ,振荡培养 5h ,冰浴放置 30min ,离心收集菌体 ,用 5mL 预冷的 0.1mol/L MgCl₂ 处理 1min、加 5mL 预冷的 0.05mol/L CaCl₂ 处理 30min ,离心 ,菌体用 1mL 预冷的 0.05mol/L CaCl₂ 悬浮。

1.2.2 荧光假单胞菌 P303 感受态转化 0.1~1μg DNA 与 200μL 感受态细胞混匀 ,冰浴置 30min 42℃ 热激 60s ,冰浴中放置 5min ,加 800μL LB 液体 ,28℃、100r/min 振荡 1h ,涂布于含相应抗生素的 LB 平板上 28℃ 培养约 40h。

1.2.3 液体培养 :pf 菌在 LB 液体中 28℃ 振荡过夜 ,以 1% 接种量接于新鲜含卡那霉素

的 LB 液体培养基(P303 菌不加卡那霉素) 28℃ 振荡 24~30h ;Bt 先在 LB 液体上 30℃ 振荡培养过夜 ,以 1% 接种量转接于新鲜的 1/2 LB 液体培养基中 ,于 30℃ 振荡 60h。

1.2.4 PCR-RFLP 分子检测 :提取质粒后分别用引物 K5un3/K3un3 扩增 *cry1Ac* 5'端 , K5un2/K3un2 扩增 *cry1Ac* 3'端 ,产物用限制酶切(5'端产物用 *Pst* I + *EcoR* I 切 ,3'端产物用 *Pst* I + *Xba* I 切)电泳鉴定。用引物 S5un2/S3un2 扩增 *cry2* ,扩增产物用 *Hinc* II 和 *Msp* I 双酶切后电泳鉴定^[10]。

1.2.5 SDS-PAGE 蛋白电泳样品处理 :取 500μL 菌液超声波破碎 30s(B. Braun U Lab-sonic 230V ,*T*_{间隔} = 0.5s) ;取 100μL 加入 25μL 新配 0.5mol/L NaOH 25℃ 作用 5min ,加 65μL 3× 样品缓冲液(925μL 上样缓冲液 + 75μL β- 巯基乙醇) ,100℃ 煮沸 5min。离心除去沉淀。加样 25μL。

1.2.6 工程菌株中杀虫蛋白晶体观察 :钼铅染色 ,日立 H-500 透射电镜下观察。

1.2.7 工程菌对棉铃虫的杀虫活性测定 :将待测菌液用 LB 液体培养基稀释到一定浓度 ,与人工饲料混匀 ,分装于经消毒的 24 孔细胞培养板中 ,每孔接入一头棉铃虫初孵幼虫 ,每处理 48 头 ,置 25℃ 光照箱 ,48、72、96 和 120h 分别调查。以 LB 培养液为阴性对照 ,P303 为工程菌阴性对照 ,计算校正死亡率。用“ POLO ”程序计算致死中浓度 LC₅₀。计算含双价基因工程菌中两个基因表达产物的共毒系数^[11]。

2 结果

2.1 重组质粒及工程菌的构建

2.1.1 重组质粒构建 :pJMS6α-*lac* 和 pHZ1255 分别用 *Bam*HI 酶切 ,*T*₄ DNA 连接酶连接 ,转化 *E. coli* DH5α 菌株 ,在涂有 IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上用蓝白筛选法选取白色重组克隆 ,选取 Km^r 和 Amp^s 重组克隆 ,提取质粒酶切鉴定 ,命名为 pJBT1283 ;质粒 pJMS6α-*lac* 和 pXB32 分别用 *Bam*HI、*Pst*I 双酶切 ,*T*₄DNA 连接酶连接 ,转化 DH5α 菌株 ,用蓝白筛选法选取白色重组克隆 ,选取 Km^r 和 Tet^s 重组克隆 ,提取质粒酶切鉴定 ,命名为 pJBT207 ;pJBT2007 与 pHZ1255 用 *Bam*HI 酶切后回收的 3.8kb 片段连接 ,得到 pJBT2008。

2.1.2 工程菌构建 :将 pJBT1283、pJBT2007 和 pJBT2008 通过 CaCl₂ 法转化导入 P303 菌株 ,提取质粒酶切鉴定后 ,将正确的转化子分别命名为 IPP101、IPP201 和 IPP202。试验中发现 pJBT1283 导入 P303 后丢失了其中一个 *Bam*HI 切点。任意挑选 5 个转化子检测 ,均失去了一个 *Bam*HI 切点 ,再回转 *E. coli* 此位点也未恢复。

2.2 工程菌株中目的基因的分子检测

采用 PCR-RFLP 和 Southern blot 进行了 DNA 分子检测。结果与预期一致。Southern blot 检测结果见图 1。从 IPP101、IPP202 中检测到 *cry1Ac* ,IPP201 和 IPP202 中检测到了 *cry2Aa*。说明 *cry1Ac* 全长基因和 *cry2Aa* 基因已导入 P303 菌株。也从侧面说明 pJBT1283 导入 P303 后虽然丢失其中一个 *Bam*HI 切点 ,但 *cry1Ac* 全长基因并未受影响。

2.3 工程菌中 Bt 杀虫蛋白的 SDS-PAGE 检测

以 HD73 为 *Cry1Ac* 蛋白阳性对照 ,野生荧光假单胞菌 P303 菌株为阴性对照 ,结果在含 *cry1Ac* 基因的两个菌株 IPP101 和 IPP202 中都检测到了与 HD73 *cry1Ac* 基因表达

产物大小一致的 133kD 杀虫蛋白电泳带 ,阴性对照 P303 中没有此带 ,在只含 *cry2Aa* 基因的 IPP201 菌株中 ,未观察到与阴性对照 P303 有明显不同的蛋白带(图 2)。

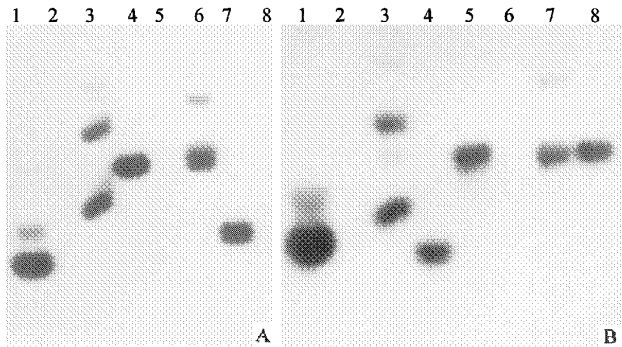


图 1 Southern blot 分子检测结果

Fig.1 Patterns of Southern blot of *cry1Ac*

A : *cry1Ac* 1. pOS22/B1 + H3 2. Blank 3. pJBT1283 4. pJBT1283/B1.
5. pJMS6a-*lac* 6. pJBT2008 7. pJBT2008/B1 8. pJBT2007 – B1.

B : *cry2Aa* 1. pXB32/P1 + B1 2. Blank 3. pJBT2007 4. pJBT2007/P1 + B1 ;
5. pJBT2007/B1 6. pJMS6a-*lac*/B1 7. pJBT2008 8. pJBT2008/B1.

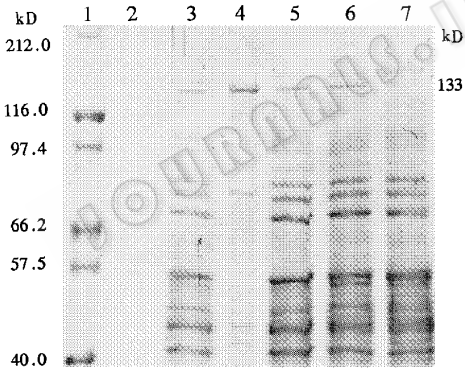


图 2 工程荧光假单胞菌中 *cry* 基因表达产物的 SDS-PAGE 检测

Fig.2 SDS-PAGE analysis of *cry* gene product of engineered Pf

1 Marker ; 2 blank ; 3 P303 ; 4 HD73 ; 5 IPP101 ; 6 IPP202 ; 7 IPP201.

2.4 工程菌中 Bt 杀虫蛋白晶体的观察

以 HD73 菌株为阳性对照 ,野生荧光假单胞菌 P303 菌株为阴性对照 ,观察 IPP101 和 IPP202 的细胞切片 ,结果在 IPP101 和 IPP202 中均观察到了菱形蛋白晶体。除晶体外细胞内还有很多深颜色杀虫蛋白包含体 ,而在 P303 菌株中未观察到有任何类似结果 ,见图 3。IPP201 由于杀虫蛋白表达量小未作电镜观察。

2.5 工程菌的杀虫活性

工程菌对棉铃虫杀虫活性见表 2(表中采用的是 72h 调查死亡率后再计算出的数据)。可以看出 ,所有工程菌株对棉铃虫均有毒杀活性。只有 *cry2Aa* 基因的 IPP201 菌株活性较低 ,带有 *cry1Ac* 基因的 IPP101 菌株活性较高 ,而带有两个基因的工程菌株 IPP202 则毒杀活性显著高于只有单一基因的两个菌株。在含双价基因的 IPP202 中 ,*cry1Ac* 基因和 *cry2* 基因表达产物的共毒系数为 332.8。根据农药混配中的划分标准 ,共毒系数显著大于 100 ,具有增效作用^[11]。

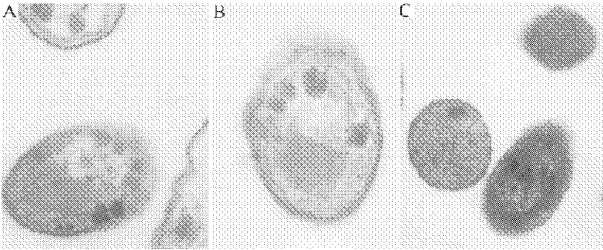


图 3 工程菌株中的杀虫蛋白晶体

Fig. 3 Crystals of insecticidal protein expressed in Engineered Pf
A. IPP101 ;B. IPP202 ;C. P303.

表 2 工程菌株对锦铃虫的室内杀虫活性
Table 2 Insecticidal activity of engineered
Pf to *H. armigera*

Samples	LC ₅₀ /(mL/g)
LB	—
P303	—
HD73	0.00170
IPP101	0.00812
IPP201	0.02604
IPP202	0.00186

3 讨论

3.1 *cry1Ac* 基因的表达

通过蛋白凝胶电泳证明导入荧光假单胞菌的 *cry1Ac* 基因得到了较高表达 ,IPP101、IPP202 中观察到典型的杀虫蛋白晶体结构 ,进一步证明目的基因在工程菌中得到较高表达。本实验室曾分别用 *Pseudomonas-E. coli* 穿梭载体 pUCP18/19 和 Tn5 转座子系统将源于 HD-1 菌株的 *cry1Ac* 基因 5'端导入本文用的 P303 菌株 ,外源基因得到了表达 ,但工程菌对棉铃虫幼虫活性较差^[3~4]。本文采用了 pPS10 质粒的衍生质粒载体 pJMS6α-*lac*^[12] 将克隆在 *E. coli tac* 强启动子下的 *cry1Ac* 全长基因导入 P303 后得到的工程菌株 IPP101 比用 pUCP18/19 构建的工程菌 PT415 对棉铃虫初孵幼虫杀虫活性提高近 3 倍(数据未显示)。推测在 PT415 中 *cry1Ac* 基因利用的是 Bt 自身的启动子 ,在革蓝氏阴性菌中得不到最好表达 ,同时 ,缺少全长基因 3'端而影响整个杀虫蛋白的整体结构和碱溶解性等 ,而结构完整性和碱溶解性对杀虫蛋白毒性发挥具有关键作用^[13~14]。

3.2 *cry2Aa* 基因的表达

cry2Aa 基因在 P303 菌株中得到表达 ,但 SDS-PAGE 未检测到特异蛋白带 ,可能因表达量较低 ,或因 *cry2Aa* 基因在一个 DNA 大片段上 ,可能与其它基因一起表达形成了融合蛋白。*cry2Aa* 是一类对鳞翅目昆虫和双翅目昆虫都有活性的基因 ,对小菜蛾有较强的毒杀作用。由于 P303 菌株能在多种蔬菜上定殖 ,进一步研究其表达调控以增强其在假单胞菌中的表达 ,将为构建防治蔬菜害虫的高效生防菌奠定基础。

3.3 *cry1Ac* 基因和*cry2Aa* 基因产物的增效作用

工程菌株 IPP202 中 ,双基因表达产物共毒系数达到 332.8。根据混配农药的划分标准 ,共毒系数大于 120 即说明两种药有增效作用。表明本试验中的两个基因表达产物具有很强的增效作用。以往对离体情况下 Bt 某些 Cry 蛋白的增效作用有一些研究 ,但是尚未见到工程菌中两个基因组合后而增效的报道^[15~16]。由于具有这种增效作用 ,可望通过不同基因的相互组合构建效力更高、可能延缓害虫产生抗性的杀虫微生物。*cry1Ac* 基因导入 P303 后有酶切位点丢失现象 ,表明重组质粒在 P303 中结构有不稳定现象 ,可能由于 DNA 重组等导致该质粒某一特定区域发生变化 ,但重复多次未发现影响活性。

参 考 文 献

[1] Gilroy T E. European Patent Application ,331470 A2 ,1992.

[2] Waalwijk C , Dulemans A , Matt C. *FEMS Microbiol Lett* ,1991 **77** :257~264.

[3] 张光焰 张 杰 彭于发 等. 中国农业科学 ,1995 **28** :8~13.

[4] 张 杰 彭于发 赵建周 等. 农业生物技术学报 ,1995 **3** (2) :51~57.

[5] 刘子铎 汤江武 喻 凌 等. 微生物学报 ,1998 **38** (1) :1~5.

[6] 杨闰英 胡志浩 邓子新 等. 生物工程学报 ,1998 **14** (2) :119~124.

[7] Maniatis T , Frisch E F , Sambrook J. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. NY :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.

[8] Kuo W S , Chak K F. *Appl Environ Microbiol* ,1996 **62** :1369~1377.

[9] Kieser T. *Plasmids* ,1984 **12** :19~36.

[10] 宋福平 张 杰 黄大昉 等. 中国农业科学 ,1998 **31** (3) :13~18.

[11] 韩丽娟 顾中言 王 强 等. 农药复配与复配农药. 南京 :江苏科学技术出版社 ,1994.

[12] Nieto C E , Tresguerres F , Sanchez N , *et al.* *Gene* ,1990 **87** :145~149.

[13] Aronson A I , Han E S , Mcgaughey W , *et al.* *Appl Environ Microbiol* ,1991 **57** :981~986.

[14] Wabiko H , Yasuda E. *Microbiol* ,1995 **141** :629~639(Corrigendum 1269).

[15] Poncet S , Delecluse A , Klier A. *et al.* *J Invert Pathol* ,1995 **66** :131~135.

[16] Tabashnik B E. *Appl Environ Microbiol* ,1992 **58** (10) :3343~33.

EXPRESSION AND SYNERGISM OF TWO CRY INSECTICIDAL PROTEIN GENES IN *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* *

Ding Zhiquan¹ Zhang Jie¹ Song Fuping¹ Huang Dafang² Li Jilun³

(¹ State Key Lab for Biology of Plant Diseases and Insect Pests , Institute of Plant Protection , CAAS , Beijing 100094)

(² Research Center for Biotechnology , CAAS , Beijing 100081)

(³ Department of Microbiology , China Agricultural University , Beijing 100094)

Abstract : Several engineered *Pseudomonas fluorescens*(Pf) strains were constructed mainly based on a *Pseudomonas* plasmid pJMS6 α -lac and two insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* , cry1Ac and cry2Aa , and the host Pf strain , P303 , which was with highly antifungal activity to some plant disease fungi and colonizing ability on a wide range of plants. The DNA introduction was confirmed by PCR-RFLP and Southern blot. The 132kD insecticidal protein was detected in IPP101 and IPP202 by SDS-PAGE and rhombic insecticidal protein crystals of them were observed through electromicroscope , also indicating that cry1Ac gene was highly expressed. The results of insecticidal bioassay indicated that IPP101 was more toxic than IPP201 , and IPP202 was the most toxic among the 3 strains. LC₅₀ to the neonates of cotton boll worm(*Helicoverpa armigera*) were 0. 02604 , 0. 00812 and 0. 00186mL/g feed , consecutively. In IPP202 , two gene products showed significant synergism , with the co-toxicity coefficient of 332. 8.

Key words : *Pseudomonas fluorescens* , Insecticidal crystal protein , cry1Ac gene , cry2Aa gene , Synergism

* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (101-03-01-01)