

苏云金芽孢杆菌 *cry1Ab13* 基因的克隆及表达研究*

檀建新¹ 张 杰¹ 宋福平¹ 陈中义¹ 王开梅² 黄大昉^{3**}

(¹ 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100094)

(² 湖北农科院 Bt 研究开发中心 武汉 430074)

(³ 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘 要: BtC005 是我国自行分离的对多种害虫具有毒杀作用的苏云金芽孢杆菌, 经 PCR-RFLP 系统鉴定, 它含有 *cry1Ab* 基因。Southern blot 结果显示: *Pst*I 酶切 C005 质粒所得的 8.5kb 长的 DNA 片段为 *cry1Ab* 基因的阳性杂交带。以 pUCP19 为载体, 克隆了该片段并证明其含有 *cry1Ab* 基因。对其进行亚克隆和测序, 结果表明该基因编码区为 3468bp, 其编码的蛋白含 1155 个氨基酸, 分子量为 130.6kD, 等电点为 pH4.845。该基因已在 GenBank 基因库中注册, Accession number 为 AF254640, 并为国际 Bt 杀虫晶体蛋白基因命名委员会正式命名为 *cry1Ab13*。将 *cry1Ab13* 基因在 Bt 无晶体突变株 *cryB⁻* 中表达, 蛋白质电泳结果表明在 130kD 处有表达带, 并证明 CryAb 对小菜蛾有较高的杀虫活性。

关键词: 苏云金芽孢杆菌, *cry1Ab* 基因, 克隆, 表达, 杀虫活性

中图分类号: Q939.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 01-0040-05

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 对鳞翅目等多种害虫具有高毒杀作用的微生物。它能在芽孢形成的同时, 形成杀虫晶体蛋白 (Insecticidal crystal proteins, 简称 ICPs)。该蛋白由 *cry* 基因编码, 现已有多种 *cry* 基因和 *cyt* 基因被克隆和用于构建杀虫遗传工程菌株^[1] 或转基因植物^[2], 部分工程菌和转基因植物已商品化^[3]。1987 年 Veack 首次报道 *cry1Ab* 基因导入烟草, 转基因烟草在一定程度上免受了烟草天蛾的侵害, 显示了 Bt 基因在转基因植物应用中的巨大潜力^[4]。1996 年郭三堆等将人工合成的调控序列和 *cry1A* (*c*) 基因成功地导入多个棉花栽培品种, 使我国成为国际上第二个独立开发成功转基因抗虫棉并获得知识产权的国家^[2]。目前, 有关高毒力和新型杀虫活性的 *cry* 基因的开发和研究已成为国内外对 Bt 基因研究和利用的热点之一。BtC005 由湖北省农业科学院 Bt 研究与开发中心分离, 对小菜蛾、甜菜夜蛾、棉铃虫等多种鳞翅目害虫具有很强的杀虫活力。本文报道了以该菌为出发菌, 从中分离克隆了 *cry1Ab* 全长基因, 证明该基因具有较高的杀虫活性, 为转基因工程菌和转基因植物的构建提供了高毒力的基因来源。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

本文所用菌株和质粒见表 1。

* 本文由国家“863”项目资助 (101-03-01-01)

** 联系作者: 黄大昉, E-mail: dfh313@public.bta.net.cn

作者简介: 檀建新 (1968-), 男, 河北唐山人, 副教授, 博士, 现在河北农业大学食品科技学院从事微生物学教学和科研工作。参加工作的还有姚 江, 郭 巍, 于 群。

收稿日期: 2001-03-26, 修回日期: 2001-07-25

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Construction and resource
Strains		
SCS110	<i>E. coli</i> strain, <i>RpsI thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	Dr. D. Lereclus
ETG81-	<i>E. coli</i> strain, SCS110 containing <i>cryIAb13</i>	This work
C005	Bt strain, Wild type	Hubei Research and Development Center of Bt
<i>cryB</i> ⁻	Bt strain, AcrySTALLiferous mutant	Dr. Wu Dong
Biot181	Bt strain, <i>cryB</i> ⁻ containing <i>cryIAb13</i>	This work
Plasmids		
pUCP19	Amp ^R	Dr. Schweijer
pUC18	Amp ^R	Lab Store
pBlue SK(+)	Amp ^R	Prof. Li Guoxun
pTG81	pUCP19 carried <i>cryIAb13</i>	This work

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基:见文献[5]。

1.2.2 牛肉膏蛋白胨培养基:蛋白胨 5 克,牛肉膏 3 克,葡萄糖 10 克,加蒸馏水定容至 1000 mL。

1.2.3 试剂:dNTP, Taq 酶购自北京鼎国公司,限制性内切酶, T4 DNA 连接酶购自宝生物或 GIBCO 公司, Nick translation 试剂盒购自 Promega 公司, ³²P 标记 dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司。其它化学试剂或生物制剂均为分析纯或电泳纯。

1.2.4 供试虫:小菜蛾 (*Plutella xylostella*), 由中国农业科学院植物保护研究所农药合成组提供。

1.3 方法

1.3.1 大肠杆菌质粒 DNA 的提取、DNA 酶切、片段回收, DNA 连接、转化, Southern blotting, Bt 杀虫晶体蛋白 SDS-PAGE 均参照文献[5]进行。

1.3.2 Bt 质粒 DNA 提取参照文献[6]进行。

1.3.3 PCR-RFLP 体系鉴定 Bt *cry* 基因和阳性转化子的筛选:参照宋福平等^[7]方法进行。

1.3.4 *cryIAb* 基因的测序由北京宝生物公司完成。

1.3.5 转化子 Biot81 杀虫活性的生物测定:活化待测苏云金芽孢杆菌, 以 1% 接种量转接于牛肉膏蛋白胨培养基中, 30℃, 230r/min 培养 36~40h, 离心浓缩后 4℃ 冰箱保存备用。

对小菜蛾的室内杀虫活性的测定采用浸叶法:将甘蓝叶片用清水洗净晾干, 选取鲜嫩一致的甘蓝叶片切成大小相近的块状, 在稀释好的待测样品中浸泡 10s, 晾干, 放入生测瓶中, 每瓶接 2~3 龄幼虫 20 头, 每个处理重复三次, 25℃ 生化培养箱中培养, 于 48h 调查结果。

2 结果和分析

2.1 菌株 C005 质粒 DNA 的 Southern 杂交和 *cryIAb* 基因的定位

提取菌株 C005 的质粒 DNA, 经 PCR-RFLP 方法鉴定发现该菌株含有 *cryIAb* 和 *cry2Ab* 基因。利用已知 *cryIAb* 基因中没有位点的限制性内切酶 *SalI*、*SacI*、*PstI*、*EcoO109I*、

*Bam*HI 完全消化 C005 质粒 DNA, 以 *cry*IAb 基因 PCR 扩增产物为探针进行 Southern 杂交分析。结果表明 *Sac*I、*Pst*I、*Eco*O109I 酶切片段分别在 7kb、8.5kb、4.5kb 有阳性信号, 推测这些 DNA 片段中均可能含有完整的 *cry*IAb 基因, 杂交结果见图 1。

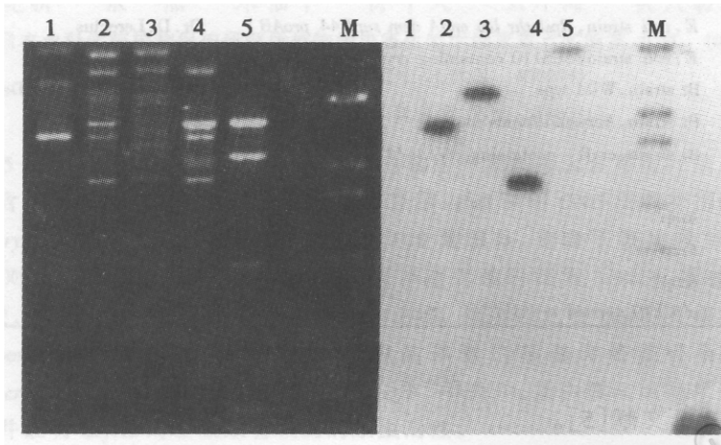


图 1 菌株 C005 质粒酶切分析 (A) 和 Southern blot (B)

Fig. 1 Restriction analysis and Southern blot of plasmid from Bt C005 strain

1. plasmid/ *Sac*I; 2. plasmid/ *Sac*I; 3. plasmid/ *Pst*I; 4. plasmid/ *Eco*O109I; 5. plasmid/ *Bam*HI;

M. λ DNA/ *Eco*130I (19.3, 7.7, 6.2, 4.2, 3.5, 2.7, 1.9, 1.5kb).

2.2 *cry*IAb 全长基因的克隆

菌株 C005 质粒 DNA 经 *Pst*I 完全酶切, 电泳, 回收 8.5kb 的酶切片段, 与经 *Pst*I 酶切的克隆载体 pUCP19 连接, 转化大肠杆菌 SCS110, 得到的转化子用 Kun2^[2]引物对 PCR 扩增筛选, 得到三个阳性克隆, 其所含重组质粒分别命名为 pTG71、pTG81、pTG97。 *Pst*I 酶切这三种重组质粒均得到 8.5kb 和 4.5kb 两种片段, 表明三个克隆的片段大小一致, 它们的 Kun2/Kun3 PCR 扩增产物的 RFLP 分析结果见图 2, 说明这三个重组子均含有 *cry*IAb 基因。

2.3 *cry*IAb 基因的亚克隆和测序

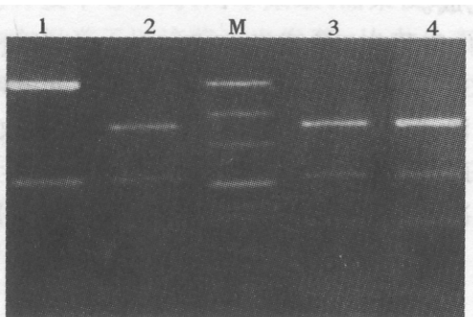


图 2 阳性克隆 PCR-RFLP 分析

Fig. 2 RFLP patterns of amplified products from positive clone

M. pUC Mix Marker; 1. pTG81 PCR product of Kun2/ *Pst*I + *Xba*I;
2 ~ 4. pTG81, pTG71, pTG97 PCR product of Kun3/ *Pst*I + *Eco*RI.

选择重组质粒 pTG81 进行亚克隆, 选用 *Pst*I、*Kpn*I、*Xba*I、*Eco*O109I 酶切 pTG81, 回收大小不同的 DNA 片段分别与载体 pUC18、pBluescript SK(+) 连接转化 SCS110, 得到四个亚克隆, 其重组质粒 pTG81-1, pTG81-2, pTG81-3, pTG81-4, 分别进行序列测定。结果表明该基因编码区长 3468bps, 由 DNA 序列推导的氨基酸为 1155 个, 其蛋白质分子量为 130.6kD, 电点为 pH4.845。该基因已在国际基因库 EMBL/GenBank 中注册, 登

记号为 Accession Number AF254640(该基因全序列可依此查询,本文从略),序列比较表明:该基因与 *cry1Ab1* ~ *cry1Ab9* 基因有极高的同源性(同源性在 98.5% 以上),该基因以被 Bt 基因国际命名委员会正式命名为 *cry1Ab13*。

2.4 *cry1Ab13* 基因的表达

将含 *cry1Ab13* 基因的 8.5kb 长的 *Pst*I 酶切片段与穿梭表达载体 pHT316 连接并转化大肠杆菌 SCS110 和 Bt 无晶体突变株 *cryB⁻*, SDS-PAGE 电泳结果表明 *cry1Ab13* 基因在大肠杆菌和无晶体突变株 *cryB⁻* 中均能表达 130.6kD 蛋白,结果见图 3。

2.5 转化子 BiotI81 杀虫活性的测定

cry1Ab13 基因转化 Bt 无晶体突变株 *cryB⁻* 所得的转化子 BiotI81,培养后离心收集培养物,以出发菌株 C005 和 *cryB⁻* 作为阳性和阴性对照,饲喂小菜蛾,结果表明 *cry1Ab13* 基因编码的毒蛋白在 Bt 无晶体突变株中得到了良好的表达,并具有很强的杀虫活性。结果见表 2。

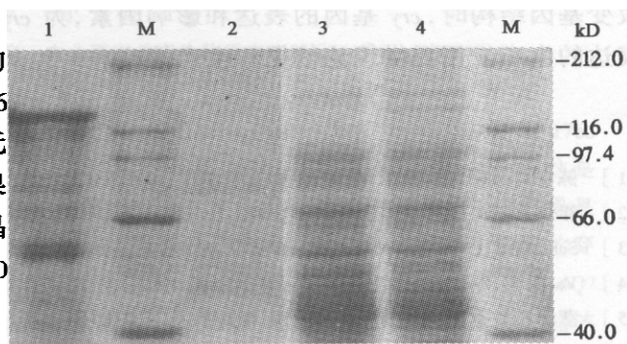


图 3 *cry1Ab13* 基因在 SCS110 和 *cryB⁻* 中的表达

Fig. 3 Expression of *cry1Ab13* gene in SCS110 and *cryB⁻*

1. BiotI81; 2. *cryB⁻*; 3. SCS110; 4. ETG81-S; M. protein markers.

表 2 转化子 BiotI81 对小菜蛾的室内杀虫活性(48h)

Table 2 Insecticidal activity of C005, BiotI81 and *cryB⁻* to *P. xylostella* (48h)

Strains	Times of dilution	No. of larvae		Corrected mortality / %
		Infested	Survival	
Bt C005	50 ×	60	0	100
	200 ×	60	3	95
BiotI81	50 ×	60	0	100
	200 ×	60	0	100
Bt <i>cryB⁻</i>	1 ×	60	60	0

3 讨论

菌株 C005 是我国自己分离的 Bt 菌株,生物活性测定表明其对小菜蛾具有显著的毒杀作用。对鳞翅目害虫有较强毒杀作用的 *cry* 基因多为 *cry1* 和 *cry2* 类基因,利用 PCR-RFLP *cry* 基因鉴定体系,我们发现在该菌株中存在 *cry1Ab* 和 *cry2Ab* 基因(结果未显示),表明这两个基因编码的杀虫晶体蛋白 *cry1Ab* 和(或) *cry2Ab* 对小菜蛾有强烈毒杀作用。从菌株 C005 克隆得到的 *cry1Ab13* 基因的表达和生测结果证明至少该基因编码的毒蛋白 *cry1Ab13* 对小菜蛾具有高毒力, *cry1Ab13* 基因的克隆,在 GenBank 注册登记,不但为“*cry* 基因家族”增添了新成员,而且为构建新型转基因工程菌和转基因植物,提供良好的基因素材。

人们已证明 Cry1Ab 毒蛋白对小菜蛾、烟草天蛾有较强的杀虫活性,并证明这与其毒蛋白结构有关(Chen^[1], Rajamohan^[9]),本试验结果表明, *cry1Ab13* 不但能在 Bt 无晶体突变

株 cryB⁻ 中表达,而且在大肠杆菌中也得到表达,说明该基因除具有完整的 ORF 之外,还应带有自己的启动子,甚至可能带有其它顺式作用元件。如果这些推测成立,我们还可以利用其作为一般模式,研究在不同宿主细胞中、在不同基因长度下以及利用定点诱变技术改变基因结构时, cry 基因的表达和影响因素,为 cry 基因表达的理论研究和 cry 基因高效表达的生产应用提供理论依据和生产策略。

参 考 文 献

- [1] 陈中义,张 杰,曹景萍,等.生物工程学报,1999,15(2):215~220.
- [2] 崔洪志,郭三堆.中国农业科学,1996,29(1):93.
- [3] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. Microbiol and Molecular Biology Review, 1998, 62(3):775~806.
- [4] Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, et al. Nature, 1987, 328:33~37.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆(第二版).北京:科学出版社,1996.
- [6] Narva K E, Payne J K, George E, et al. USP5236843.
- [7] 宋福平,张 杰,黄大昉,等.中国农业科学,1998,31:13~18.
- [8] Chen X J, Curtiss A, Alcantara E, et al. J Biol Chem, 1995, 270:6412~6419.
- [9] Rajamohan F, Alcantara E, Lee M K, et al. J Bacteriol, 1995, 17:2276~2282.

The Study on Cloning and Expression of Bt cry1Ab13 Gene*

Tan Jianxin¹ Zhang Jie¹ Song Fuping¹ Chen Zhongyi¹ Wang Kaimei² Huang Dafang³

(¹ Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China)

(² Hubei Research and Development Center of Bt, Wuhan 430074, China)

(³ Biotechnology Research Institute, CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: *B. thuringiensis* strain C005 with high insecticidal activity to several kinds of pests, screened from China, was identified that it contained cry1Ab gene by PCR-RFLP. Southern blotting showed that a 8.5kb positive band of plasmid DNA digested with *Pst*I contained cry1Ab gene. The gene was cloned from Bt C005 and the results of sequence analysis showed that cry1Ab13 gene contained a 3468bp open reading frame, encoding a 130.6kD protein composing 1155 amino acids. The IE point of Cry1Ab13 protein was pH4.845. The cry1Ab gene has been registered in GenBank (Accession number is AF254640) and named as cry1Ab13 as a novel gene by International Nomenclature Committee of Bt δ -endotoxin genes. SDS-PAGE analysis indicated that 130kD protein of Cry1Ab13 was expressed in a Bt acrySTALLIFEROUS mutant cryB⁻ and bioassay results proved that the transformant BiotI81 containing cry1Ab13 gene had high toxicity to *Plutella xylostella*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, cry1Ab gene, Clone, Expression, Insecticidal activity

* Supported by project of Chinese National Programs for High Research and Development (101-03-01-01)