

# 苏云金芽胞杆菌鮎泽亚种 HD-133 *cry1D* 和 *cry1Ab* mRNA 含量及稳定性研究\*

张利莉<sup>1,2</sup> Arthur Aronson<sup>3</sup> 喻子牛<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 华中农业大学农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

(<sup>2</sup> 塔里木农垦大学植物科学技术学院 阿拉尔 843300) (<sup>3</sup> 美国 Purdue 大学生物系 IN 47906)

**摘 要** 苏云金芽胞杆菌鮎泽亚种菌株 HD-133 含有代表性的三种 *cry1* 类基因 *cry1Ab*, *cry1C* 和 *cry1D*, 它们的表达量却明显不同。通过 Northern 杂交检测了菌株 HD-133 中基因 *cry1D* 和 *cry1Ab* 的 mRNA 含量及其稳定性。结果表明: 基因 *cry1D* mRNA 的形成比基因 *cry1Ab* 的 mRNA 滞后 3h, 且基因 *cry1D* 形成 mRNA 的量很低, 产生过程很平稳, 在芽胞形成中期比 *cry1Ab* mRNA 低 3.7 倍; *cry1Ab* mRNA 含量在芽胞形成前期高于后期, 在后期仍能大量持续稳定地转录。*cry1D* mRNA 的半衰期为 18min, 而 *cry1Ab* mRNA 的半衰期为 14min。尽管 *cry1D* mRNA 比 *cry1Ab* mRNA 的半衰期更长, 但 *cry1D* 和 *cry1Ab* 转录时间和转录量的差异是导致其表达量差异的重要原因。

**关键词** 苏云金芽胞杆菌, 杀虫晶体蛋白基因, mRNA 含量, mRNA 稳定性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)03-0335-06

苏云金芽胞杆菌在形成芽胞的同时产生杀虫晶体蛋白并以伴胞晶体形式在母细胞中积累。目前分离到 150 多种杀虫晶体蛋白基因<sup>[1]</sup>, 其中 *cry1* 类基因的产物对给农业生产带来巨大损失的鳞翅目昆虫具有高特异性毒力。鮎泽亚种菌株 HD-133 含有基因类型上有代表的三种 *cry1* 类基因 *cry1Ab*, *cry1C* 和 *cry1D*, 并且其染色体上还有类 *cry1Aa* 基因<sup>[2-5]</sup>。Mas-son 等<sup>[5]</sup>利用高压液相色谱法测定了菌株 HD-133 晶体中纯化的三种蛋白的含量分别为 Cry1Ab 60%, Cry1C 37% 和 Cry1D3%, Cry1D 与 Cry1Ab 相差 20 倍。已知 *cry1Ab*, *cry1C* 和 *cry1D* 基因都位于拷贝数相当的质粒上, *cry1Ab* 基因位于 45MD 质粒, *cry1C* 和 *cry1D* 相距 1-2kb 位于 110MD 质粒上, 它们共同形成一个复合的伴胞晶体<sup>[6]</sup>。晶体蛋白中 *cry1D* 和 *cry1Ab* 的差异是否由于两者在转录水平 mRNA 含量及 mRNA 的稳定性不同所致? 故利用合成的与 *cry1D*, *cry1Ab* 基因互补的寡核苷酸为探针, 测检菌株 HD-133 *cry1D* mRNA 和 *cry1Ab* mRNA 的差异, 以揭示其表达的差异。国内外尚无此方面的研究报道。

菌株 HD-133 是防治对商业用菌株库斯塔克亚种 HD-1C (*Dipel*) 具有抗性的印度谷螟 (*Plodia interpunctea*) 有特效的菌株之一<sup>[2,7,8]</sup>, 又含有基因类型上有代表的三种 *cry1* 类基因, 研究其表达调控既具有理论价值又具有重要的应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

苏云金芽胞杆菌 HD-133 是鮎泽亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 野生型菌株,

\* 国家“九五”攻关项目子课题(101-03-01-01)

作者简介 张利莉(1963-), 女, 河南省商丘市人, 现工作于新疆塔里木农垦大学植物科学技术学院, 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 2001-08-20, 修回日期 2001-11-30 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

含有三个原毒素基因, *cry1Ab* 位于 45MD 的质粒上, *cry1C* 和 *cry1D* 位于另一个 110MD 的质粒上, 由美国 Purdue 大学 A. Aronson 教授提供。

## 1.2 培养基

G. Tris 培养基见文献 [9]。

## 1.3 探针标记

*cry1D* Oligonucleotide 代号为 621C 序列为: 5' ATAGCACTTTCAGCAGCAG 3' *cry1A* Oligonucleotide 代号为 956F, 序列为: 5' CAGAAGAATTGCTTTTCATAGGCTCCGT 3'。取等量的 1300pmol *cry1D* 和 *cry1Ab* 寡核苷酸, 加入 10 $\mu$ L ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP (3 000ci/mmol, 10.0mci/mL), 在 T4 多核苷酸激酶作用下进行探针标记。并按文献 [10] 过柱纯化被标记的探针。取纯化的 <sup>32</sup>P 探针 1 $\mu$ L 于 3~4mL toluene (omnifluor) 中, 用闪烁计数器测定样品的放射性强度。

## 1.4 RNA 的提取

1% 接种量接种 HD-133 于 G·Tris 培养液中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至稳定生长期, 镜检细胞内芽孢开始形成时第一次取样, 每隔 3 小时取样一次, 每次 30mL, 并立即进行以下处理。4 $^{\circ}$ C 下离心 (8 000r/min, 8min), 弃去上清, 加入 15 mL NaAc buffer (0.05mol/L NaAc, 0.1mol/L NaCl, 0.001mol/L Na<sub>2</sub>-EDTA, pH5.5), 洗涤菌体一次。用 8mL NaAc buffer 与 2mL 10% SDS 临时混合后, 立即悬浮菌体沉淀于 French Pressuer cell (FPC) 中, 再加入 1mL Bentonite (即皂土 30mg/mL Bentonite 溶于 0.03mol/L Tris pH7.6 中), 并充分搅匀。利用 French<sup>®</sup> Pressuer cell 仪高压破碎细胞。并收样于 5mL 苯酚:氯仿中, 立即混匀。4 $^{\circ}$ C 离心 (8 000r/min, 8min), 取上清, 加入二倍体积预冷的无水乙醇, 勿混匀, 用带小钩的玻璃棒搅起 DNA, 然后置冰上 20min。4 $^{\circ}$ C 离心 (8 000r/min, 15min), 小心弃去上清, 室温下干燥沉淀, 贮存于 -70 $^{\circ}$ C 备用, 或直接完成下列步骤。用 1mL MgCl<sub>2</sub> buffer (0.01mol/L Tris, 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, pH7.6) 溶解沉淀, 并加入 30 Units DNase (无 RNase) 在 37 $^{\circ}$ C 下酶解 30min。酚抽: 加入 1mL 苯酚:氯仿 1:1 (V/V) 混匀, 离心 (7 000r/min, 7min)。取上清, 加入 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠 (pH5.5) 和 2 体积的预冷的 100% 乙醇, 置冰上 20min。离心 (8 000r/min, 15min), 并干燥沉淀。溶解沉淀于 500 $\mu$ L 双蒸水中, 并测定 RNA 浓度: 取 10 $\mu$ L 样品 RNA 至 1mL 双蒸水中, 测定 A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub> 值 (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> = 1.8~2.0 为宜), 并按下列公式计算 RNA 浓度。

$$[\text{RNA}] = \frac{A_{260} \times 100}{20} \text{ (mg/mL)}$$

## 1.6 RNA 分析——Northern 杂交

**1.6.1** 在含有甲醛的凝胶上进行 RNA 电泳: 1% 琼脂糖凝胶的制备: 1g 琼脂糖, 加放 72mL 0.1% DEPC 水 (1mL DEPC 即焦碳酸二乙酯于 999mL 蒸馏水中, 在磁式搅拌器上搅拌过夜, 灭菌 1~2h), 微波至溶化, 然后加入 10mL 10 $\times$  MOPS buffer (3-(N-玛琳代)丙磺酸, 0.5mol/L MOPS, 0.01mol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH7.0, 用处理过的 DEPC 水配制) 再加入 18mL 37% 甲醛。样品处理: 取 18~20 $\mu$ L 上样 buffer (21 $\mu$ L 10 $\times$  MOPS, 56 $\mu$ L 37% 甲醛, 105 $\mu$ L 甲酰胺, 1 $\mu$ L 2.5% 溴酚蓝) 加入样品 RNA (均为 50 $\mu$ g) 和 RNA marker, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 并立即置于冰上。电泳: 采用电泳 buffer (50mL 10 $\times$  MOPS buffer, 90mL 37% 甲醛, 360mL DEPC 水) 先预电泳 3min, 然后再按顺序加入不同时期经上述处理的 RNA 样品, 并重复上样一次, 以便用于分别与 *cry1Ab* 和 *cry1D* 探针杂交。RNA marker 中加入 0.5 $\mu$ L EB 以便检测。

1.6.2 转膜并干燥 使用 BA-85 硝酸纤维素膜按文献 [10] 方法进行转膜。

1.6.3 杂交 按文献 [10] 计算  $T_m$  值及其杂交温度 得出 621C 的  $T_m$  值为 45℃ 故杂交温度为 40℃ 956F 的  $T_m$  值为 55℃ 故杂交温度为 50℃。将杂交膜一分为二在杂交温度下分别加入 15mL 杂交液(0.25mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ,1mmol/L EDTA ,1% 酪蛋白 ,7% SDS ,pH7.5) 预杂交 4h 然后加入等量( $5 \times 10^6$  cpm)已标记的 621C 和 956F 分别在 40℃ 和 50℃ 杂交温度下杂交过夜。洗膜 用 Wash buffer(0.02mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ,1mmol/L EDTA ,1% SDS ,pH7.5) 室温下洗膜三次 每次 10min 然后凉干。为消除外源性 RNA 酶解的污染 所有玻璃制品、塑料制品和电泳槽均按文献 [10] 方法进行处理。

1.6.4 放射自显影 分别将杂交膜固定 并将 X 光胶片置于其上 加用增感屏 于黑暗处放射自显影 2~5d 用自动显影机冲洗 X 胶片 观察并分析结果。

## 1.7 mRNA 稳定性检测

1.7.1 RNA 的提取 1% 接种量接种 HD-133 于 2L 的三角瓶内装 400mL G·Tris 培养液中 ,30℃ 下振荡培养。培养至在相差显微镜下观察到已有 50% 的细胞含“一半灰一半白”(phage gray—phage white) 即达到芽胞形成中期时 第一次取样 100mL 于 -70℃ 下冷冻的灭菌的内装 25mL G·Tris 培养基的离心管中 并立即冰浴。在剩下的 300mL 菌悬液中加入利福平(溶解在 50% 乙醇中 10mg/mL 贮备液)至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  混匀后 立即置 30℃ 下振荡培养。培养 10min 20min 30min 分别取样 100mL 同前处理。RNA 的提取同上。

1.7.2 Northern 杂交 :*cry1D* RNA 样品上样量为 100 $\mu\text{g}$  ,*cry1Ab* RNA 样品上样量为 50 $\mu\text{g}$  在变性胶中依次点样 电泳、转膜、干燥并分别杂交 放射自显影 96h 和 24h 后 根据 X 光胶片对应时间的杂交信号强度得出 mRNA 的剩余百分率 计算其半衰期。

## 2 结果和分析

### 2.1 HD-133 菌株 *cry1D* mRNA 和 *cry1Ab* mRNA 含量的检测

提取 HD-133 芽胞形成过程中不同时期的总 RNA 以  $^{32}\text{P}$  标记的 *cry1D* 和 *Cry1Ab* 特异寡核苷酸为探针进行 Northern 杂交(图 1)。从 Northern 杂交信号可以看出 :*cry1D* 的 mRNA 产生较晚 ,*cry1Ab* mRNA 产生较早 ,*cry1D* mRNA 比 *cry1Ab* mRNA 产生滞后 3h。

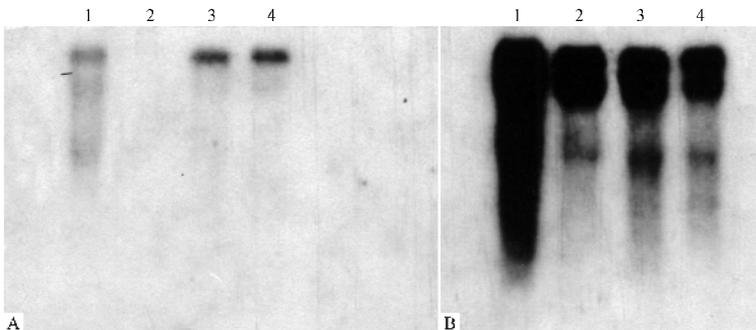


图 1 HD-133 菌株 *cry1D*(A) 和 *cry1Ab*(B) mRNA Northern 印迹分析

Fig.1 Northern blot of RNA(50 $\mu\text{g}$  per lane) of *cry1D*(A) and *cry1Ab*(B) prepared from sporulating cells in HD-133 strain 1. RNA control for *cry1D* gene or *cry1Ab* gene ; 2. RNA from incubated 13h ; 3. RNA from incubated 16h ; 4. RNA from incubated 19h.

根据 Northern 杂交信号密度扫描结果显示 :*cry1D* mRNA 含量低 ,且相对平稳。而 *cry1Ab* mRNA 培养 13h 后比培养 19h 后杂交信号强 0.4 倍。此结果与 Masson 等<sup>[5]</sup>所进行的 HD-133 菌株的斑点杂交一致。同时 *cry1Ab* mRNA 在 19h、芽胞已大量形成并均位于细胞中时仍有很强的杂交信号 ,依然保持较高的 mRNA 含量。当培养 16h 和 19h ,*cry1D* mRNA 比 *cry1Ab* mRNA 量分别低 3.7 倍和 2.5 倍。

可见在 HD-133 菌株中 *cry1D* 与 *cry1Ab* mRNA 的转录时间和转录量的如此差别 ,是导致 *cry1D* 比 *cry1Ab* 表达量低的原因之一。

## 2.2 HD-133 菌株 *cry1D* 和 *cry1Ab* mRNA 稳定性的检测

在 HD-133 菌株中 ,*cry1D* mRNA 含量远远低于 *cry1Ab* mRNA 含量 ,这是否因为它们的稳定性不同所致 ? 为此进行了 mRNA 稳定性的检测。mRNA 稳定性结果如图 2。

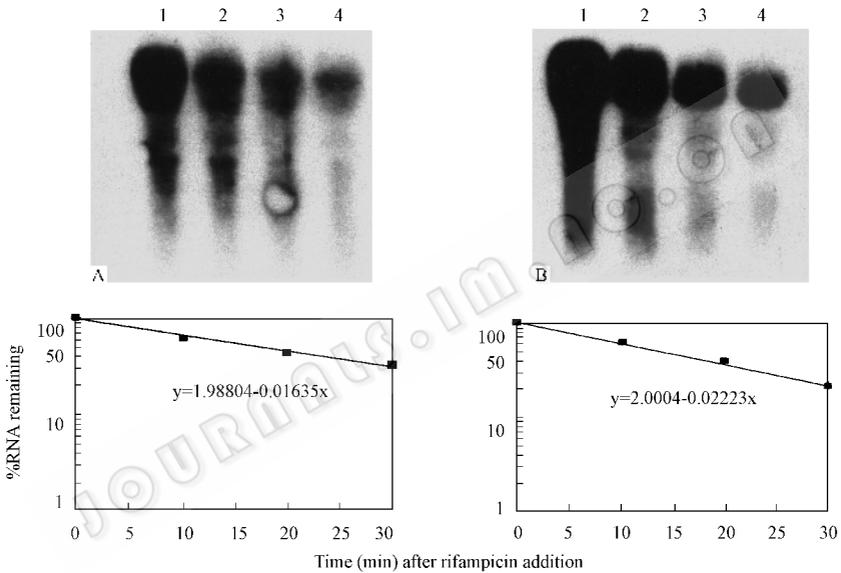


图 2 HD-133 菌株中 *cry1D* mRNA (A) 和 *cry1Ab* mRNA (B) 的稳定性

Fig.2 The stability of mRNA of *cry1D* (A) and *cry1Ab* (B) in HD-133 strain

1 2 3 and 4 show Northern blot analysis of mRNA extracted from mid-sporulation cells at 0 ,10 20 and 30 min respectively , after addition of rifampicin ; 100 $\mu$ g RNA in each sample were hybridized with the *cry1D* probe and exposed for 96h ; 50 $\mu$ g RNA in each were hybridized with the *cry1Ab* probe and exposed for 24h.

根据 *cry1D* 和 *cry1Ab* 特异性探针杂交信号强度 ,得到不同时间 mRNA 的剩余率。由此计算出 *cry1D* mRNA 的半衰期为 18min ,*cry1Ab* mRNA 的半衰期 14min。可见 ,两者均具有很长的半衰期 ,稳定的 mRNA。这一结果与 Glatro 和 Rapoport<sup>[11]</sup>报道的编码晶体蛋白基因的 mRNA 平均半衰期长达 10min 吻合 ,因为 *cry1* 类基因都具有较强的低抗 3'-5' 核酸外切酶降解能力的类似的反向重复序列的终止子结构以 mRNA 内部缺乏内核酸酶的切割作用位点<sup>[12]</sup>。结果还显示 *cry1D* mRNA 比 *cry1Ab* mRNA 更稳定 ,可能与 *cry1D* 基因的 5'-不翻译区(5'-UTR)以及 *cry1D* 基因结构本身有关。

### 3 讨论

从 *cry1D* mRNA 和 *cry1Ab* mRNA 产生的时间看, *cry1D* mRNA 明显滞后于 *cry1Ab* mRNA 的产生。 *cry1D* 和 *cry1Ab* 都是由  $\sigma^E$  和  $\sigma^K$  RNA 聚合酶识别而启动转录, 那么两者在产生时间上不应有差异。 据此推测是否还可被其它的  $\sigma$  因子识别而启动转录? 在枯草芽胞杆菌中, SpoOA 调节蛋白在芽胞形成中起关键作用<sup>[13]</sup>。 苏云金芽胞杆菌芽胞形成的时空调节非常类似于枯草芽胞杆菌, 并且两者的 SpoOA 蛋白同源<sup>[14]</sup>。 Bti 的 *cry4A* 和 *cry11A* 在过渡期依赖于含  $\sigma^H$  的 RNA 聚合酶的转录, 并且在这些基因启动子的上游含有与枯草芽胞杆菌非常类似的“OA”box 序列 TGNCGAA, 可被 SpoOA 蛋白结合, 而抑制 *cry* 基因的转录<sup>[15]</sup>。 分析 *cry1Ab*, *cry1D* 的启动子序列, 也有 *cry11A* 类似的与  $\sigma^E$  重叠的  $\sigma^H$  识别的序列, 并且在 *cry1D* 和 *cry1Ab* 基因启动子的上游序列, 同样有“OA”box 序列(如图 3), 并位于这些基因相似性区域前几个碱基。

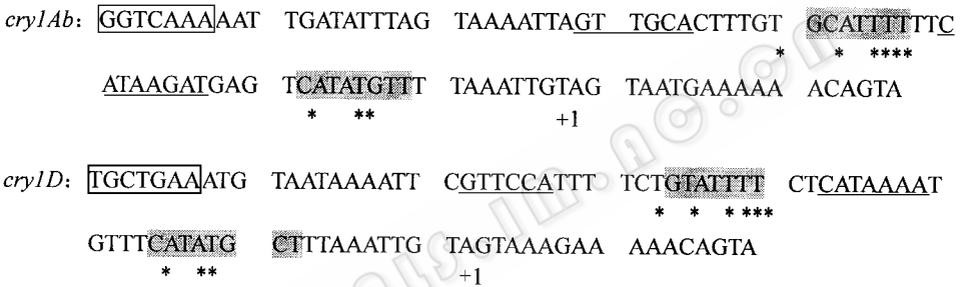
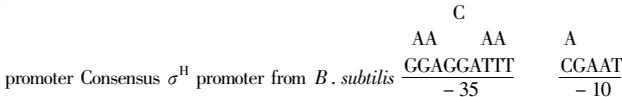


图 3 菌株 HD-133 中 *cry1Ab* 和 *cry1D* 基因启动子区域序列

Fig. 3 *cry1Ab* and *cry1D* genes promoter regions in HD-133 strain

Shaded base indicates Btl promoter; Underline indicates Bt II promoter; Box indicate OA box; Consensus

OA box form *B. thuringiensis* TGTCGAA; Asterisks indicate the consensus sequence of *B. subtilis*  $\sigma^H$



*cry1D* 的 OA box 为 TGCTGAA, 与一致序列吻合程度高, 且离 Bt II 启动子 - 35 区只有 14 个碱基。而 *cry1Ab* 的 OA box 为 GGTCAAA 与一致序列吻合程度较低, 且离启动子较远。Poncet<sup>[15]</sup>报道, 在 *cry11A'*-*lacZ* 融合表达中, 当缺失“OA”box, 则导致表达提前 2h, 即当 OA box 存在时, 使其表达滞后。故推测 *cry1D* 基因的 OA box 可被 SpoOA 蛋白有效地结合而抑制了 *cry1D* 基因的转录, 尤其是在芽胞形成早期。这可能是在 HD-133 菌株中, *cry1D* mRNA 的滞后于 *cry1Ab* mRNA 的原因。关于 *cry1D* 基因的 OA box 是否可被 SpoOA 蛋白结合而抑制转录以及 *cry1D* 基因是否可被  $\sigma^H$  RNA 聚合酶识别而启动转录等问题仍有待于进一步研究。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, et al. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62 ( 3 ) 808 ~ 813.

[ 2 ] Aronson A I, Han E-S, McGaughey W, et al. *Appl Environ Microbiol* 1991, 57: 981-986 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 3 ] Chak K F , Ellar D J. *J. Gen Microbiol* ,1987 **133** :2921 ~ 2931.
- [ 4 ] Hofte H , Van Rie J , Jansens S ,et al. *Appl Environ Microbiol* ,1988 **54** :2010 ~ 2017.
- [ 5 ] Masson L , Erlandson M , Puzstal-carey M ,et al. *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** ( 12 ) :4782 ~ 4788.
- [ 6 ] Aronson A I. *FEMS Microbiol Lett* ,1994 **117** :21 ~ 28.
- [ 7 ] Morris O N , Trottier M , Converse V , et al. *J Econ Entomol* ,1996 **89** :359 ~ 365.
- [ 8 ] Trottier M R , Morris O N. *J Invert Pathol* ,1988 **51** :242 ~ 249.
- [ 9 ] Aronson A I , Angelo W , Holt S C. *J Bacteriol* ,1971 **106** :1016 ~ 1025.
- [ 10 ] 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.
- [ 11 ] Glatton M F , Rapoport G. *Biochimie* ,1972 **54** :1291 ~ 1301.
- [ 12 ] Agaisse H , Lereclus D. *J Bacteriol* ,1995 **177** ( 21 ) :6027 ~ 6032.
- [ 13 ] Baldus J M , Green B D , youngman P ,et al. *J Bacteriol* ,1994 **176** :296 ~ 306.
- [ 14 ] Lereclus D , Agaisse H , Gominet M , et al. *Bio Technology* ,1995 **13** :67 ~ 71.
- [ 15 ] Poncet S , Dervyn E , Klier A ,et al. *Microbiology* ,1997 **143** :2743 ~ 2751.

## Study on Amount and Stability of *cry1D* and *cry1Ab* mRNA in *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* \*

Chang Lili<sup>1 2</sup> Arthur Aronson<sup>3</sup> Yu Ziniu<sup>1</sup>

( <sup>1</sup> Huazhong Agricultural University , Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Ministry of Agriculture , Wuhan 430070 ,China )

( <sup>2</sup> College of Plant Science and Technology , Tarim University of Agricultural Reclamation , Alar , Xinjiang 843300 ,China )

( <sup>3</sup> Department of Biological Science Purdue University , West Lafayette , IN47906 ,USA )

**Abstract** : *cry1Ab* , *cry1C* and *cry1D* are three typical *cry1* class genes encoding protoxins in *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* strain HD-133. The expression of *cry1D* is obviously different from that of *cry1Ab* in this strain. Amount and stability of *cry1D* and *cry1Ab* mRNA in HD-133 were investigated. Northern blotting analysis showed that *cry1D* mRNA was more stable than *cry1Ab* mRNA , however , *cry1D* mRNA formed later 3h and less 3.7 times than *cry1Ab* mRNA during the mid-phase of sporulation. Halve lives of *cry1D* mRNA was 18min ,but halve lives of *cry1Ab* mRNA was 14min. Moreover , *cry1Ab* mRNA could keep stable and large amount during the post-phase of sporulation. This suggested that difference of transcriptional efficiency and initiate time might be main reason for the difference of expression of *cry1Ab* and *cry1D*.

**Key words** : *Bacillus thuringiensis* , Insecticidal crystal protein gene , Amount and stability of mRNA

\* Supported by Chinese National Programs for Science and Technology Development( 101-03-01-01 )