

# 苏云金芽孢杆菌分子伴侣串联基因 *p19-p29* 的克隆 和表达载体的构建\*

余健秀 曾少灵 谢瑞瑜 蒙国基 庞 义\*\*

(中山大学生物防治国家重点实验室 昆虫学研究所 广州 510275)

**摘 要** 根据已知序列设计一对 PCR 引物 (ORF-5S, ORF-3N), 可从 *cry2Aa* 或 *cry2Ac* 操纵子中扩增出包含串联分子伴侣基因 *p19-p29* 的 DNA 片段, 预期大小分别为 1.6kb 和 2.0kb。对 150 株苏云金芽孢杆菌菌株进行 PCR 检测, 从 26 株中获得了大小为 1.6kb 的扩增片段, 但未获得 2.0kb 的片段。这表明 *cry2Aa* 型操纵子 *p19-p29* 基因存在较广泛, 而 *cry2Ac* 型较罕见。将来自  $Y_2$  菌株的 1.6kb 片段回收, 通过一系列亚克隆, 最终构建成一个含有 *p19-p29* 串联基因的 *Bt* 表达载体, 为进一步研究 *p19-p29* 串联基因的功能奠定了基础。

**关键词**: 苏云金芽孢杆菌, *cry2A*, *p19-p29* 基因, 表达载体

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)05-0567-06

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 是一种能够在芽孢期产生多种杀虫晶体蛋白 (ICPs) 的革兰氏阳性菌, 它作为生物杀虫剂已广泛应用于害虫的生物防治<sup>[1]</sup>。在众多的 ICPs 中, 有一类分子量约为 135kD 的 Cry 类蛋白, 如 Cry1Ac 和 Cry1C<sup>[1]</sup>, 能够形成大小约为  $2\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$  的典型双金字塔型大晶体, 这些晶体甚至比它们的芽孢还要大<sup>[1]</sup>。另一类分子量相对较小 (约为 65kD) 的 Cry 类蛋白, 如 Cry2A 和 Cry11A<sup>[1-4]</sup>, 缺乏如 Cry1 类蛋白中富含半胱氨酸的 C-端半部, 不能形成相应的双硫键, 但是在某些分子伴侣的作用下它们同样可以形成晶体<sup>[2,5]</sup>。如 *cry2Aa* 基因编码 Cry2Aa 蛋白, 是 *cry2Aa* 操纵子的远端编码基因, 其上游含有两个开放读码框 *orf1* 和 *orf2*<sup>[4]</sup>, 又名 *p19* 和 *p29* 基因。它们分别编码一个 19kD 和 29kD 的蛋白, 因此也分别称为 P19 和 P29 蛋白。鉴于对这两个蛋白的初步研究, 发现它们也能促进晶体的形成, 推测它们是一类分子伴侣, 所以, 也将它们称为“帮助”蛋白, 或更精确地称为“结晶化”蛋白<sup>[5]</sup>。

类似于 *cry2A* 型操纵子中的 *p19* 基因的序列存在于 *cry2*(SKW)  $\lambda$  *cry2Ac*、*cry9Ca*、*cry11Aa* 和 *cryBP1* 五种基因的上游 (其中只有 *cryBP1* 基因不是 *Bt* 中的基因)<sup>[3,6-9]</sup>, 可见这类 *orf1* 序列的存在具有一定广泛性。*cry2Aa* 及 *cry2Ac* 操纵子中的 *p19* 基因 (*orf1* 基因) 与 *cry11Aa* 操纵子中的 *p19* 基因均编码一个相应的 P19 蛋白, 三个蛋白具有高达 33% 的相似性, 而且在中央区有 50% 的相同氨基酸组成<sup>[9]</sup>。一般认为, 由 *cry2A* 操纵子中的 *p19* 基因编码的 P19 蛋白, 既不是晶体形成所必需的, 自身也不产生任何毒力<sup>[4]</sup>。但是

\* 国家自然科学基金 (39900098) 国家转基因植物专项基金 (J00-A-003) 和广东省自然科学基金资助

\*\* 通讯作者, e-mail: jsl12@zsu.edu.cn

作者简介: 余健秀 (1968 - ) 男, 广东平远人, 中山大学生物防治国家重点实验室副研究员, 主要从事微生物基因工程和分子生物学研究。

收稿日期: 2001-07-24, 修回日期: 2002-03-21

Pelphine 等人将此 *p19* 基因与 *LacZ* 基因串联并获得了表达,证实 *p19* 基因可被翻译成功能蛋白<sup>[11]</sup>。而在枯草芽孢杆菌中,*p19* 蛋白作为帮助蛋白,引发、促进和稳定晶体的形成,一定程度上提高 Cry11Aa 蛋白的合成量<sup>[5]</sup>。因此,*cry2A* 操纵子中 *p19* 基因的功能还有待确定。而已经有实验证明 *p29* 基因(*orf2* 基因)编码的 P29 蛋白能够提高 Cry2 类蛋白的产量和结晶程度<sup>[2,4,12]</sup>。P29 蛋白防止了 Cry2 类蛋白发生水解,通过结晶作用使蛋白形成有序结构。而蛋白本身的产量也因为这种快速有序的结晶作用而大大提高<sup>[2]</sup>。通过二级结构分析,发现 P29 蛋白氨基酸序列中含有 11 个以 15 个氨基酸为重复单元的精确的同向重复序列,并且这一结构可以形成一系列有规则的  $\beta$ -折叠<sup>[13]</sup>,使 P29 蛋白成为一种蛋白支架,促进 Cry2A 蛋白分子的正确组装和结晶。这种蛋白支架不是 Cry2A 蛋白结晶的必要因素,但是,典型晶体的形成却依赖于这种蛋白支架的作用<sup>[1]</sup>。与 P29 蛋白具有类似氨基酸同向重复序列的假单胞菌冰核蛋白(ice-nucleating protein)<sup>[14]</sup>在细菌外膜上提供晶核形成位点,使水在 0℃ 以上也能结冰,最终导致冰晶的形成。两者对结晶过程的促进作用可能存在相同之处。但是,*cry2Aa* 与 *cry2Ac* 操纵子中的 *p29* 基因也存在功能差异。

为了能进一步研究并确定 *cry2A* 型操纵子<sup>[13]</sup>中 *p19-p29* 串联基因的功能,首先设计了引物,通过 PCR 的方法对 150 株 *Bt* 菌株进行了检测。然后,回收其中一个菌株的目标基因片段,对其进行多步克隆,最终构建成一个含 *p19-p29* 串联基因 *Bt* 表达载体。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒**:40 株不同血清型的 *Bt* 标准菌株由法国巴斯德研究所(Institute Pasteur)提供;110 株 *Bt* 菌株从德国和中国的土壤样本中分离得到。用作感受态的大肠杆菌 TG1 为本实验室保存。

**1.1.2 质粒**:用于克隆过程的三种质粒分别为 Promega 公司的 pGEM-T Easy,Invitrogen 公司的 pcDNA2.1 和 *Bt-E. coli* 穿梭载体 pHT3101。

**1.1.3 生化试剂**:内切酶为 Boehringer Mannheim 公司产品,Taq DNA 高保真聚合酶为加拿大真达生物工程公司产品。

**1.1.4 PCR 检测引物**:由上海生工生物工程有限公司合成

ORF-5S 5'-GACTAGTATGAATAATTGGCATATACCGTTTAC-3';

Spe I

ORF-3N 5'-CAATACATTATTCATATGAAATTCCTCCTT-3'。

Nde I

### 1.2 方法

**1.2.1 PCR 扩增及预期片段的检测**:设定扩增循环条件为:94℃ 预变性 5min,然后为 30 个循环,包括 94℃ 变性 30s,48℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,最后 72℃ 10min 的延伸反应。将 PCR 产物置于琼脂糖凝胶电泳中,以溴化乙锭(Ethidium bromide)染色,检测预期大小为 2.0kb 或 1.6kb 的片段是否存在,然后回收目标片段。

**1.2.2 对目标基因片段的克隆**:参考文献 10 中的有关实验方法,完成对 *p19-p29* 基因的克隆和 *Bt* 表达载体 pHY<sub>2</sub>P 的构建。

1.2.3 DNA 序列测定 :由上海基康基因公司完成。

1.2.4 DNA 序列分析 :采用 DNASTAR、DNASIS 软件进行序列分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 PCR 检测结果

*cry2Aa* 和 *cry2Ac* 均是 *cry2A* 型操纵子,其 *p19-p29* 基因具有同源性,前者比后者少 400bp 左右,因此预期的 PCR 产物大小,对 *cry2Aa* 操作子来说是 1.6kb 左右,对 *cry2Ac* 来说则是 2.0kb<sup>[3,4,6]</sup>,但两者都包含各自的 *p19* 和 *p29* 区域。

对 150 株苏云金芽孢杆菌菌株进行了 PCR 检测,共有 32 株可检测出大小为 1.6kb 的扩增产物,检出率达 21.3%,说明 *cry2Aa* 操纵子基因广泛存在于 *Bt* 中。但在这 150 株样品中,未获得一个大小为 2.0kb 的特异扩增产物,说明 *cry2Ac* 操作子内的分子伴侣串联基因 *p19-p29* 在 *Bt* 中比较罕见。迄今为止,只 Wu 等人发现此 *cry2Ac* 操纵子基因<sup>[3]</sup>。

### 2.2 1.6kb 片段的序列分析

对  $Y_2$  菌株来源的 PCR 产物 1.6kb DNA 片段进行了序列测定。结果表明,这个片段是预期的,与来源于库斯塔克亚种 HD-1 菌株的 *orf1-orf2* DNA 序列<sup>[13]</sup>(GenBank Accession No. M23727)相比同源性达 99.8%,只有 3 个碱基的差异(图 1)。与 HD-1 的序列相比,在

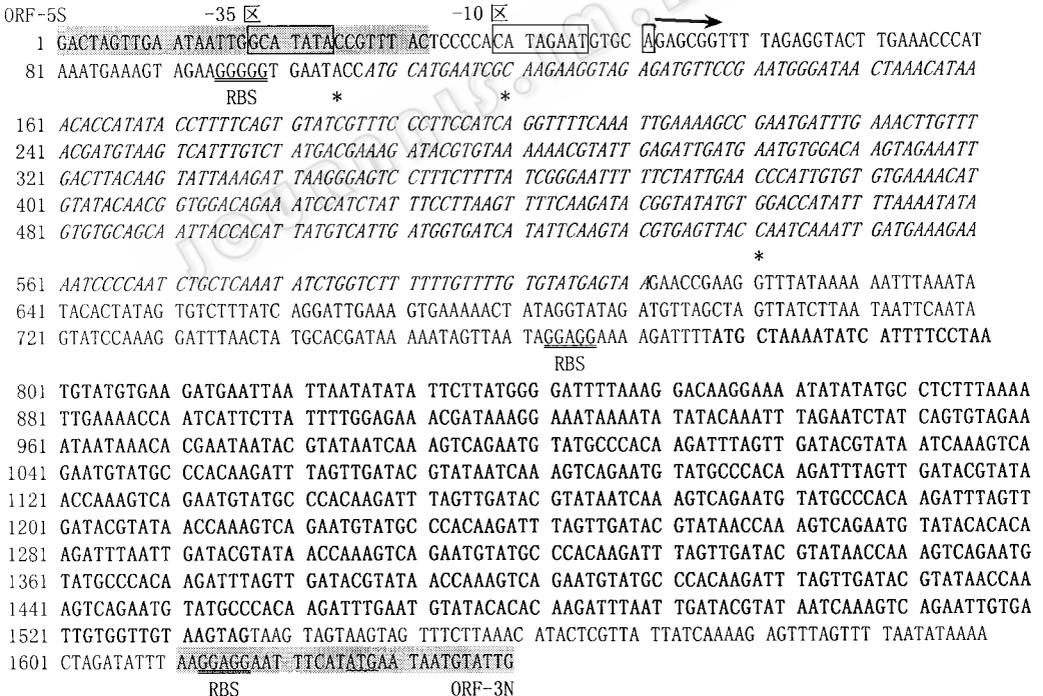


图 1 1.6kb 片段的 DNA 序列分析

Fig.1 Sequence analysis of the 1.6kb DNA fragment containing *orf1* and *orf2* gene

The pair of primers ORF-5S(1~32) and ORF-3N(1611~1640) are shaded, -35 and -10 regions of the promoter are boxed, the transcription start is boxed with an arrow, RBS sites are double-underlined, the three mutant nucleotides are showed with "\*" *orf1* gene (108~611) is italic, *orf2* gene is blacked and the start code ATG of *cry2Aa* is emphasized with wave lines.

105nt 处多了一个 A 碱基,对此我们已重复多次测序。这个变异发现在 RBS 和起始密码子 ATG 之间,可能在一定程度上会影响蛋白翻译功能。另两个变异发生在 ORF1 内,引起 2 个氨基酸残基的不同:Y<sub>2</sub> 菌株的 DNA 序列在 120nt 处为 C 碱基,而来源于 HD-1 的为 G 碱基,相应地氨基酸残基由 Glu→Gln;来源于 Y<sub>2</sub> 菌株的 DNA 序列在 541nt 处为 C 碱基,而来源于 HD-1 的为 A 碱基,相应地氨基酸残基由 Gln→Pro。来源于 Y<sub>2</sub> 菌株的 P19 蛋白(ORF1)的二级结构和来源于 HD-1 菌株的 P19 蛋白相比,基本架构走势及转角大小、方向上有很大的差异,这种变化是由氨基酸残基 Glu→Gln 的改变所致。这种变化是非常关键的,并足以引起二级结构基本架构走势的完全改变。

### 2.3 Bt 表达载体 pHY<sub>2</sub>P 的构建

构建策略见图 2 说明。

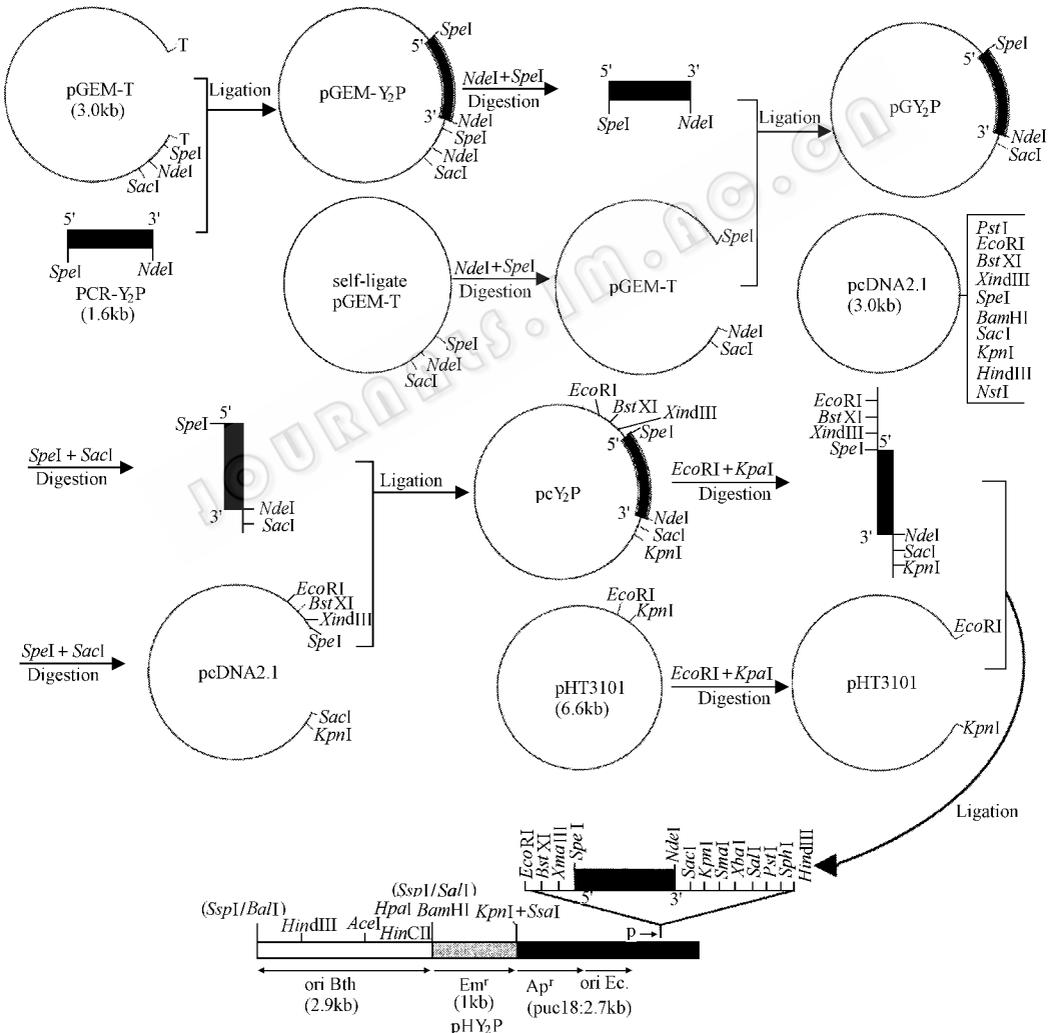


图 2 Bt 表达载体 pHY<sub>2</sub>P 的构建策略

Fig. 2 Construction of Bt expression vector pHY<sub>2</sub>P

回收以 *Bt* 菌株  $Y_2$  为模板的 PCR 产物中的 1.6kb 片段, 将其克隆到载体 pGEM-T Easy 上, 得重组质粒 pGEM- $Y_2$ P (图 3 第 2 列)。对这个重组质粒进行序列测定, 结果表明 1.6kb DNA 片段的序列是正确的<sup>[13]</sup>。为了得到唯一连接方向的重组质粒, 用 *Spe* I 和 *Nde* I 酶解质粒 pGEM- $Y_2$ P, 与经 *Spe* I 和 *Nde* I 双酶解的自连载体 pGEM-T Easy 连接, 得质粒 pGY<sub>2</sub>P (图 3 第 3 列)。然后再从质粒 pGY<sub>2</sub>P 中酶切出含 *p19-p29* 基因的 *Spe* I -*Sac* I 片段, 亚克隆到载体 pcDNA2.1 的相应位点上, 得质粒 pcY<sub>2</sub>P (图 3 第 4 列)。最后, 再从质粒 pcY<sub>2</sub>P 中酶切得到含 *p19-p29* 基因的 *Eco*R I 和 *Kpn* I 片段, 亚克隆到 *Bt-E. coli* 穿梭载体 HT3101 相应位点上, 从而构建成 *Bt* 表达载体 pHY<sub>2</sub>P (图 3 第 5 列)。pHY<sub>2</sub>P 的特点是在 *p19-p29* 基因下游加入了 8 个限制性酶切位点: *Nde* I, *Sac* I, *Kpn* I, *Sma* I, *Xba* I, *Sal* I, *Pst* I, *Sph* I。

由于两个分子伴侣 *p19* 和 *p29* 的确切功能还有待确定, 推测它们可能作为一种蛋白支架, 从两个方面帮助非 *Cry*1 类蛋白分子形成晶体: (1) 确保新合成的蛋白分子的正确折叠; (2) 防止蛋白分子的异常集结, 促进蛋白的结晶作用。而本研究中构建的含有 *p19-p29* 基因的 *Bt* 表达载体, 对含后 *p19-p29* 基因功能的研究有着深远的意义。通过插入其他已知功能基因, 研究 *p19-p29* 基因对它们所起作用的影响, 从而推导该串联基因自身的功能, 认清 *cry2A* 操纵子内的分子伴侣基因 *p19-p29* 的遗传背景及功能, 运用合适的分子伴侣基因构建高效高产的 *Bt* 工程菌, 提高杀虫晶体蛋白的产物及晶体形成率, 从整体上提高苏云金芽孢杆菌防治害虫的效能, 将是实现生物防治的一大途径。本实验室已利用这个 *Bt* 表达载体的多克隆位点连接了 *cry2Ba7* 基因, 并在 *Bt* 晶体缺陷型菌株 4Q7 中获得了 *Cyt2Ba7* 约 29kD 蛋白的表达 (图 4), 具体研究以另文详细报道。

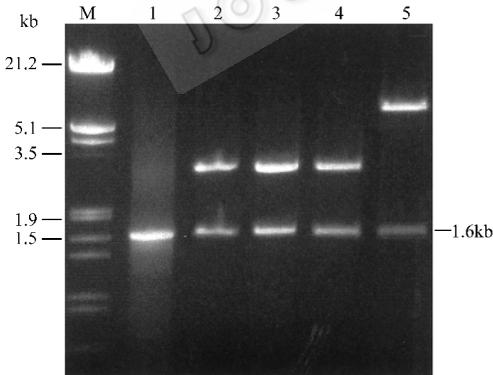


图 3 PCR 产物检测和克隆过程中各重组质粒的电泳分析

Fig.3 Identification of the PCR products and restriction analysis of recombinant plasmids

M.  $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*R I ; 1. PCR product ; 2. pGEM-TY<sub>2</sub>P/*Eco*R I ; 3. pGY<sub>2</sub>P/*Spe* I + *Sac* I ; 4. pcY<sub>2</sub>P/*Eco*R I + *Kpn* I ; 5. pHY<sub>2</sub>P/*Eco*R I + *Pst* I .

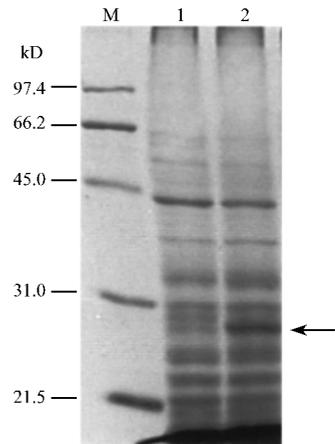


图 4 利用 *Bt* 表达载体 pHY<sub>2</sub>P 表达 *cry2Ba7* 基因的蛋白电泳分析

Fig.4 Analysis of *cyt2Ba7* expression under *Bt* expression vector pHY<sub>2</sub>P

M. Protein marker ; 1. 4Q7 (pHY<sub>2</sub>P) ; 2. 4Q7 (pHY<sub>2</sub>P) containing *cyt2Ba7* .

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Hofte H , Whiteley H R. *Microbiol Rev* , 1989 **53** :242 ~ 255.
- [ 2 ] Ge B , Bideshi D , Moar W J , et al. *FEMS Microbol Lett* , 1998 **165** :35 ~ 41.
- [ 3 ] Wu D , Cao X L , Bai Y Y , et al. *FEMS Microbol Lett* , 1991 **81** :31 ~ 36.
- [ 4 ] Crickmore N , Ellar D J. *Mol Microbiol* , 1992 **6** :1533 ~ 1537.
- [ 5 ] Agaisse H , Lereclus D. *J Bacteriol* , 1995 **177** ( 2 ) :6027 ~ 6032.
- [ 6 ] Sasaki J , Asano S , Hashimoto N , et al. *Curr Microbiol* , 1997 **35** :1 ~ 8.
- [ 7 ] Liang Y , Dean D H. *Mol Microbiol* , 1994 **13** ( 4 ) :569 ~ 575.
- [ 8 ] Zhang J B , Hodgman T C , Krieger L , et al. *J Bacteriol* , 1997 **179** :4336 ~ 4341.
- [ 9 ] Dervyn E , Poncet S , Klier A , et al. *J Bacteriol* , 1995 **177** :2283 ~ 2291.
- [ 10 ] 萨姆布鲁克 , E F 弗里奇 , T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [ 11 ] Delattre D , Rang C , Lecoince N , et al. *Curr Microbiol* , 1999 **39** :9 ~ 13.
- [ 12 ] Yoshisue H , Yoshida K , Sen K , et al. *Biophys Biotechnol Biochem* , 1992 **56** ( 9 ) :1429 ~ 1433.
- [ 13 ] Widner W R , Whiteley H R. *J Bacteriol* , 1989 **171** :865 ~ 974.
- [ 14 ] Kajava A , Lindow S E. *J Mol Biol* , 1993 **232** :709 ~ 717.

## Cloning of the Molecular Chaperone Gene *p19-p29* from *Bt* and Construction of the *Bt* Expression Vector\*

Yu Jianxiu   Zeng Shaoling   Xie Ruiyu   Meng Guoji   Pang Yi\*\*

( State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China )

**Abstract** : The primer pair ( ORF-5S , ORF-3N ) designed according to the known sequence can amplify a DNA fragment , containing molecular chaperone genes *p19* and *p29* , in size of 1.6kb from the *cry2Aa* operon or of 2.0kb from the *cry2Ac* operon. 150 *Bacillus thuringiensis* ( *Bt* ) strains were detected by PCR with the primer pair. With a blankness of the 2.0kb fragment , the expected 1.6kb fragment was acquired from 26 *Bt* strains. These results showed that the genotype of *cry2Aa* operon widely existed in *Bt* and that *cry2Ac* was rare. The 1.6kb PCR product from strain Y<sub>2</sub> was recovered. After several steps of sub-cloning , it was at last inserted into the shuttle vector pHT3101 , resulting in an expression vector pHY<sub>2</sub>P with multiple clone sites.

**Key words** : *Bacillus thuringiensis* , *cry2Aa* , Gene *p19-p29* , Expression vector

\* Supported by the national Natural Science Foundation of China ( 39900098 ) , the State Special Funds for Transgene Plan ( J00-A-003 ) and Natural Science Foundation of Guangdong Province.

\*\* Correspondence author