

苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry1Ab16* 的克隆及表达

汤慕瑾 谭 乐 余健秀 袁美姝 庞 义*

(中山大学昆虫研究所生物防治国家重点实验室 广州 510275)

摘 要 通过对已知 *cry1* 类基因以及已发表的 *cry1Ab* 的序列进行分析,分别设计了引物 P1、P2、P3 和 P4,首次从无晶体的芽胞杆菌 AC-11 中扩增到一个苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal protein, ICP) *cry1Ab1* 类基因。测序结果显示该基因与已知的 *cry1Ab1* 基因有 8 个核苷酸不同,编码的蛋白有 7 个氨基酸差异。此基因已登录 GenBank,并命名为新亚型基因 *cry1Ab16* (Ac. NO. AF375608)。Southern 杂交结果进一步证实该基因存在于菌体的质粒上。将 *cry1Ab16* 基因克隆到 *Escherichia coli* 表达载体 pQE30 上并转化 *E. coli* M15。Western 印迹分析表明, *E. coli* M15 表达了 130 kD 的 *Cry1Ab16* 蛋白,但此蛋白不稳定,大部分降解成 65 kD 的蛋白。将表达 *Cry1Ab16* 蛋白的大肠杆菌用涂布法对三龄小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 毒力测定,其 LC_{50} 为 258.3mg/L,对其他夜蛾科害虫的生长发育也有明显的抑制作用。

关键词 :苏云金芽胞杆菌, *cry1Ab16* 基因,克隆,表达

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2003)04-0417-07

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是一种有效的微生物杀虫剂,在害虫的生物防治中占有极其重要的地位,其主要杀虫活性成份是它产生的伴孢晶体,又名杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal proteins, 简称 ICPs)^[1]。杀虫晶体蛋白是单基因表达的产物,至今已发现 *Cry1-Cry40* 及 *Cyt1-Cyt2* 共 42 大群杀虫晶体蛋白基因^[2],其中 *cry1* 类基因编码的杀虫晶体蛋白分子量为 130 ~ 140 kD,对给农业生产带来巨大损失的鳞翅目昆虫具有高特异毒性^[3]。现已有多种杀虫晶体蛋白基因用于构建杀虫遗传工程菌^[4]或转基因植物^[5],部分工程菌和转基因植物已经商品化^[6]。而这些工程菌和转基因植物同样存在昆虫对它们的抗性,寻找新的杀虫晶体蛋白基因成为解决这个问题的途径之一,同时也为构建新型转基因工程菌和转基因植物提供更多的基因素材。

本研究从 AC-11 克隆到一个新的苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白 *cry1Ab* 基因,并在大肠杆菌中进行表达,生物测定结果显示表达产物对鳞翅目幼虫有杀虫活性。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及主要试剂

菌株 AC-11 为本室保存的一株芽胞杆菌,无伴孢晶体;菌株 HD-1 由美国俄亥俄芽胞

基金项目:国家“863 计划”(2001AA214011)广东省自然科学基金研究团队项目

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-20-84037472 E-mail: ls12@zsu.edu.cn

作者简介:汤慕瑾(1977-),女,江西景德镇人,2000 级博士研究生。E-mail: tmj1113cn@yahoo.com.cn

收稿日期:2002-11-08,修回日期:2003-04-15

杆菌菌种保藏中心惠赠。pGEM-T *Easy* 载体购自 Promega 公司 ;*Taq* DNA 聚合酶、长片段 PCR 扩增试剂盒(Expand™ Long Template PCR System)、Western 印迹试剂盒[BM Chromogenic Western Blotting Kit(Ap Mouse/Rabbit)]、Southern 印迹试剂盒(DIG DNA Labeling and Detection Kit)购自 Roche 公司 ;The DC Protein Assay 试剂盒购自 Bio-Rad 公司 , ρ × His 表达系统试剂盒(The QIAexpression™)和 Ni-NTA 碱性磷酸酶偶联抗体购自 Qiagen 公司。

1.2 供试昆虫

小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 和其他鳞翅目昆虫 ,由本室饲养^[7]。

1.3 Bt 总质粒 DNA 的提取

参照文献 [8] 进行。

1.4 聚合酶链式反应

引物由上海生物工程公司合成(表 1),设计依据见“ 2.1 ”、“ 2.2 ”和“ 2.5 ”三节。常规 PCR 反应条件 :94℃3min ,94℃30s ,50℃30s ,72℃1min ,35 个循环 ,72℃10min。长片段 PCR 反应条件 :94℃3min ,94℃10s ,50℃30s ,68℃2.5min ,10 个循环 ,94℃10s ,50℃30s ,68℃2.5min ,20 个循环 ,每个循环增加 20s ,68℃8min。

表 1 PCR 引物及其扩增产物
Table 1 Primers and amplified products of PCR

Primers	Sequences	Products
P1	5'AGGACCAGGATTTACAGGAGG3'	1.4kb , the conserved sequence
P2	5'GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC3'	of <i>cry1Ab</i> gene
P3	5'CCTGCAGGTCAACACCCTGGGTCAA3'	3.6kb , <i>cry1Ab</i> gene containing
P4	5'CTTATTCTCCATAAGGAGTAATTCCACGCTA3'	ORF and its promoter
P5	5'GGATCCATGGATAACAATCCGAACATC3'	3.5kb ,ORF of <i>cry1Ab</i> gene with
P6	5'CTGCAGTTATTCTCCATAAGGAGTAATTCC3'	<i>Bam</i> H I at 5' end and <i>Pst</i> I at 3' end

The restriction sites included in the oligonucleotide sequences , for use during the cloning experiences , are underlined.

1.5 Southern blot

参照 DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明书进行。

1.6 DNA 序列的测定

由上海基康公司完成。

1.7 重组质粒的构建

质粒抽提、酶切反应、电泳鉴定、DNA 片段回收、连接反应和大肠杆菌的转化均按分子克隆实验手册进行^[9]。

1.8 外源基因在 *E. coli* M15 中的表达

将重组菌株 M15(含有外源基因)在液体 LB 培养基(含 100 mg/L Amp 和 50 mg/L Kan)中 ,37℃ 200 r/min 振荡培养过夜。以 1 : 20 的比例转接到新鲜 LB 液体培养基中 ,37℃ , 200 r/min 振荡培养。IPTG 进行诱导表达。在诱导前以及诱导后 1 ~ 4h 各收集 1 mL 菌体 , 离心并重悬于 2 × SDS 样品缓冲液中 , 冷冻备用。

1.9 Western 印迹分析

Western 印迹参照 QIAexpression™说明书进行。

1.10 表达产物的透射电镜观察

收集经 IPTG 诱导 4h 后的重组菌株菌液 ,离心 ,沉淀用双蒸水反复洗涤 3 次 ,最后悬于适量体积的双蒸水。将处理好的样品滴于铜网上 ,负染 ,置于透射电子显微镜下观察。

1.11 蛋白定量

参照试剂盒 The DC Protein Assay 说明进行菌体总蛋白浓度测定。用 ImageMaster VDS 分析软件(Amersham Pharmacia Biotech)确定目的蛋白占总蛋白的百分比。

1.12 生物测定

收集经 IPTG 诱导 4h 后的重组菌株菌液 ,用无菌双蒸水稀释至适当浓度 取 400 μ L 涂布于鲜嫩较一致、大小相似的小白菜叶上 ,饲喂三龄小菜蛾幼虫 ,置于 25℃ 培养箱内(箱内放一水杯) ,每隔 24、48 和 72 h 记录死虫数。每个样品设 6 个测试浓度 ,每个浓度试虫为 30 头 ,设 3 次重复 ,空载菌株 M15(即将表达载体 pQE30 转化到 M15 中)作空白对照。利用本实验室研制的昆虫毒力测定分析软件^[10]进行 LC_{50} 值计算。

2 结果

2.1 利用引物 P1、P2 进行 PCR 扩增及其产物的克隆

根据目前已知 cry1 类基因 ,对其保守区序列进行分析 ,设计引物 P1、P2。以 AC-11 煮沸处理后的上清裂解液为模板 ,PCR 扩增得到与预期大小相符的 1.4 kb 左右的片段(图 1)。回收 PCR 扩增片段 ,与 pGEM-T Easy 载体连接后 ,转化 *E. coli* TG1。挑选若干个白色转化子提取质粒 ,用 *Eco*R I、*Pst* I、*Bst* IX 进行酶切鉴定。pGEM-T Easy 载体大小为 3.0 kb ,多克隆位点上有两个 *Eco*R I 位点 ,1 个 *Pst* I 位点和 1 个 *Bst* IX 位点。由酶切结果(图 2)可知 ,该片段中有两个 *Eco*R I 位点 ,无 *Pst* I、*Bst* IX 位点。初步分析所得重组质粒(pG1b)含有的克隆片段为 cry1Ab 基因片段。

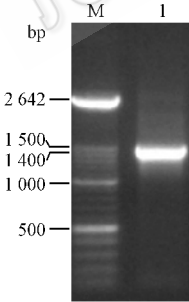


图 1 用引物 P1、P2 对 AC-11 菌株进行 PCR 扩增的电泳图

Fig.1 PCR products amplified from AC-11 with P1/P2 primers
M. Ladder marker ; 1. PCR product.

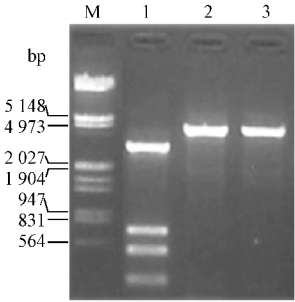


图 2 重组质粒 pG1b 的限制性内切酶分析图

Fig.2 Restriction analysis of the recombinant plasmid pG1b
M. Lambda DNA/ *Hind* III + *Eco* R I ; 1. pG1b/ *Eco* R I ;
2. pG1b/ *Pst* I ; 3. pG1b/ *Bst* IX .

2.2 利用引物 P3、P4 进行长片段 PCR 扩增及其产物的克隆

根据已发表的 cry1Ab 序列 ,设计扩增 cry1Ab 全长基因的专一性引物 P3、P4。以菌株 AC-11煮沸处理后的上清裂解液为模板 ,PCR 扩增得到与预期大小相符的 3.6 kb 左右的片段(图 3)。回收扩增片段 ,克隆至 pGEM-T Easy 上 ,得到质粒 nG1R 酶切鉴定后测序。

2.3 *cry1Ab16* 基因的序列分析

此 *cry1Ab* 类基因已在国际基因库 EMBL/GenBank 中登记 ,登记号为 AF375608 ,并命名为 *cry1Ab16*。该基因编码区长 3468bp ,由 DNA 序列推导的氨基酸数目为 1155 ,其蛋白质分子量大约为 130 kD。与已发表的 *cry1AbI*(Accession No. M13898)基因序列比较有 8 个核苷酸不同 ,相应 有 7 个氨基酸残基不同 ,分别为 :Gln¹⁵⁴→Arg ,Ala¹⁶⁵→Val ,Ser¹⁷⁶→Leu , Leu⁸⁸⁵→Val ,Gly¹⁰¹³→Glu ,Asp¹⁰²⁹→Ala ,Lys¹¹²¹→Arg。

2.4 Southern 杂交

选取 HD-1 为阳性对照。分别提取菌株 AC-11 以及 HD-1 的总质粒 DNA ,用 *EcoRV* 酶切 ,并进行琼脂糖凝胶电泳 ,以质粒 pG1B 中 941bp 的 *EcoRV* 片段为探针进行 Southern 杂交。结果显示 AC-11 和 HD-1 菌株一样 ,有 940bp 的杂交信号(图 4)。这进一步证实了 ,菌株 AC-11 中的确含有 *cry1Ab* 基因 ,且基因存在于质粒上。

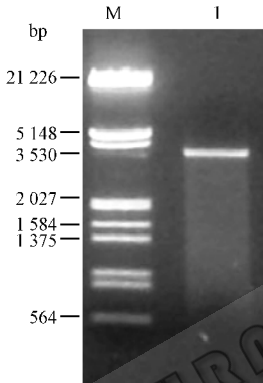


图 3 用引物 P3、P4 扩增 *cry1Ab* 全长基因的 PCR 扩增电泳图

Fig.3 PCR amplification of *cry1Ab* gene with P3/P4 primer
M. Lambda DNA/*Hind*Ⅲ + *EcoR*Ⅰ ;
1. PCR product from AC-11.

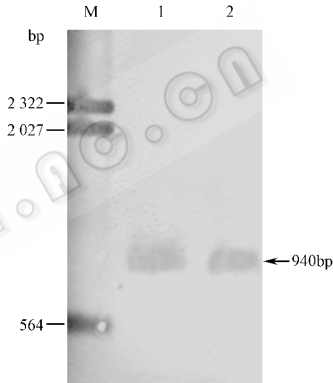


图 4 菌株总质粒 *EcoRV*酶切产物的 Southern 杂交

Fig.4 Southern blot of total plasmids DNA digested with *EcoRV*
M. Lambda DNA/*EcoR*Ⅰ ; 1. Total plasmids DNA of AC-11 ; 2. Total plasmids DNA of HD-1.

2.5 含 *cry1Ab16* 基因的大肠杆菌表达质粒 pQCT 的构建

使用 pQE30 载体为大肠杆菌表达载体 ,它能在 *E. coli* M15 中表达 N-端带 6 个组氨酸标记的融合蛋白。为了实现 *cry1Ab16* 基因在 pQE30 载体上的融合表达 ,设计引物 P5 和 P6 用于扩增 *cry1Ab16* 基因的编码区(引物的 5'和 3'端添加了 *Bam*HⅠ和 *Pst*Ⅰ内切酶位点)。按长片段 PCR 扩增条件进行 PCR 扩增 ,得到与目的片段大小相符的 3.5kb 左右片段(只含基因编码区)。回收 PCR 扩增得到的 3.5kb 片段 ,经中间载体 pGEM-T *Easy* 载体 ,克隆至 pQE30 载体上 ,得到表达质粒 pQCT。

2.6 *cry1Ab16* 基因的表达

SDS-PAGE(图 5-A)显示 ,在 130 kD 左右出现一条蛋白带 ,与 *Cry1Ab16* 分子量相符 , Western blot(图 5-B)能检测到。此蛋白不稳定 ,大部分降解成大小约为 65 kD 的蛋白。

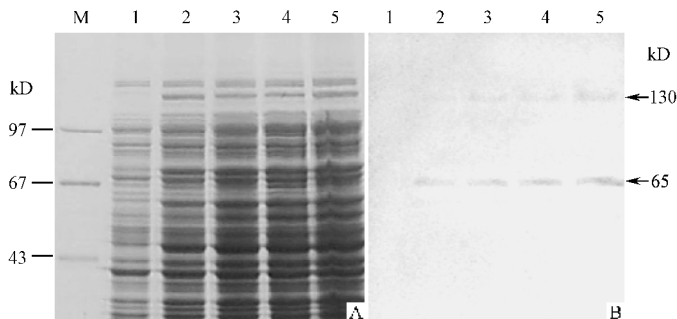


图 5 在大肠杆菌 M15 中表达的 Cry1Ab16 SDS-PAGE (A) 及 Western 杂交 (B) 结果

Fig.5 Expressed Cry1Ab16 in *E. coli* M15 pQCT was analyzed by SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

M. Molecular weight markers ; 1. M15 pQCT without IPTG induction ;

2. M15 pQCT cultivation induced with IPTG for 1h 3. M15 pQCT cultivation induced with IPTG for 2h ;

4. M15 pQCT cultivation induced with IPTG for 3h 5. M15 pQCT cultivation induced with IPTG for 4h.

2.7 电镜观察

IPTG 诱导 4h 后的重组菌株 M15 pQCT 为样品进行透射电镜观察(图 6)。电镜观察显示 :M15 pQCT 中有明显的包涵体形成。

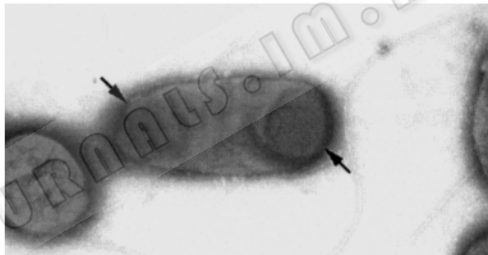


图 6 大肠杆菌 M15 pQCT 的透射电镜 (20000 ×)

Fig.6 Transmission electron micrographs of *E. coli* M15 pQCT (20000 ×)

Section of induced cells M15 pQCT , magnification , arrows indicated the inclusion bodies.

2.8 cry1Ab16 表达产物的生物测定

生物测定结果显示 cry1Ab16 表达产物虽不能使鳞翅目的棉铃虫、银纹夜蛾、斜纹夜蛾以及甜菜夜蛾死亡 ,但对它们的生长发育有明显的抑制作用。Cry1Ab16 蛋白对小菜蛾 3 龄幼虫具较高毒力 , LC_{50} 为 258.3 mg/L(表 2)。

表 2 Cry1Ab16 蛋白对小菜蛾幼虫的生物测定结果

Table 2 Bioassay of Cry1Ab16 proteins against *Plutella xylostella* larvae

LC_{50} (mg/L)	95% fiducial limits (mg/L)	LD-P regression linear equation
258.3	196.2 ~ 338.9	$y = 2.5813 + 1.8893x$

3 讨论

苏云金芽胞杆菌和蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)在形态特征及生化反应上有不少相

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

似之处,两者的分类在相当长一段时期存在争议。目前认为,两者的主要鉴别特征是苏云金芽胞杆菌产生伴孢晶体,而蜡状芽胞杆菌不产生伴孢晶体^[11]。菌株 AC-11 是本实验室分离的一株芽胞杆菌,由于不产生伴孢晶体,所以不能确定为苏云金芽胞杆菌。但是在蜡状芽胞杆菌中存在苏云金杆菌的杀虫晶体蛋白,目前还未见报道。推测 AC-11 是一株无晶体突变的苏云金芽胞杆菌,可能由于在自然条件下,某些质粒的丢失或是晶体蛋白基因表达的沉默,导致菌株不产生伴孢晶体。

利用大肠杆菌表达载体 pQE30,能在大肠杆菌 M15 中表达 N 端标记 6 × His 的融合蛋白。经 1mmol/L IPTG 诱导后, *cry1Ab16* 在大肠杆菌中表达预期 130kD 大小的蛋白,但所表达的蛋白部分被降解为 65kD 左右的蛋白,其大小相当于 130kD 原毒素在体外胰蛋白酶水解激活的产物^[12]。因为利用 Ni-NTA 碱性磷酸酶偶联抗体能检测到降解带,所以降解应发生在 C 末端。

自从 Wabiko 等^[2]发现 *cry1Ab1* 基因至今,已有 15 个此亚类基因(*cry1Ab1* ~ 15)被克隆。本研究克隆得到的 *cry1Ab16* 与上述的 *cry1Ab* 类基因的核苷酸同源性高达 95% 以上,与已发表的 *cry1Ab1* 基因序列相比较,有 8 个核苷酸不同,而相应的 *Cry1Ab16* 与 *Cry1Ab1* 蛋白序列则有 7 个氨基酸残基不同。从氨基酸残基的变化来看,有 3 个在 N-端的毒力核心片段,其余 4 个位于 C-端。对 *Cry1Ab16* 与 *Cry1Ab1* 蛋白 N-端部分氨基酸疏水性进行比较,结果显示在氨基酸残基发生变化的位置,疏水性有明显的不同。值得注意的是,蛋白质的疏水性会影响其折叠,进而影响其结构和功能。*Cry* 蛋白的 C-端通常富含半胱氨酸残基,且与该 ICP 的晶体化密切相关,*Cry1Ab16* 蛋白 C-端氨基酸的改变可能引起蛋白稳定性的降低^[13]。

菌株 AC-11 的蛋白电泳及 Western 印迹显示,在菌体中 *cry1Ab16* 基因没有可见的表达,说明 *cry1Ab16* 基因可能是一个沉默的 ICP 基因。推测原因可能有两个:其一,虽然测序结果显示 *cry1Ab16* 基因含有与 *cry1Ab1* 基因相同的上游序列,也有一套启动子 *BtI* 和 *BtII*,但可能由于未知因素阻碍了 *cry1Ab16* 基因的转录;其二,*cry1Ab16* 基因结构本身的原因,在本实验中,曾试图用各种方法,但都没有得到此基因的 3'-末端的终止序列,因此可能由于 *cry1Ab16* 基因缺少 3'-末端的茎环结构,使 mRNA 不稳定,易被核酸酶降解而无法翻译成蛋白质。此外,也有可能 *Cry1Ab16* 蛋白已合成,但不稳定,被菌体内蛋白酶降解了。进一步研究这些沉默基因的沉默机理,诱导和增强沉默基因的表达,对扩大 Bt 菌株的杀虫谱,增强菌株毒力,构建高效广谱杀虫 Bt 工程菌均具有现实的意义。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] <http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil-Crickmore/Bt/toxins2.html>.
- [3] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(3): 807 ~ 813.
- [4] 陈中义, 张杰, 曹景萍, 等. 杀虫防病基因工程枯草芽孢杆菌的构建. *生物工程学报*, 1999, **15**(2): 215 ~ 220.
- [5] Perlak F J, Deaton R W, Armstrong T A, et al. Insect resistant cotton plants. *Biotechnology*, 1990, **8**(10): 939 ~ 943.
- [6] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Molec Biol Rev*, 1998, **62**: 775 ~ 806.

- [7] Li G H , Liang D R , Meng X L , *et al.* A practical artificial diet for the diamondback moth. *Wuhan Univ Nat Sci* , 1996 , **1** (1) : 125 ~ 128 .
- [8] Kalman S , Kiehne K L , Libs J L , *et al.* Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* . *Appl Environ Microbiol* , 1993 , **59** (4) : 1131 ~ 1137 .
- [9] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . 2nd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .
- [10] 陈其津 李广宏 林扬帆 . 杀虫剂毒力测定数据的快速运算与分析 . 中山大学学报论丛 , 2001 , **21** : 39 ~ 43 .
- [11] Heimpel A M , Angus T A . On the taxonomy of certain entomogenous crystalliferous bacteria . *J Insect Pathol* , **2** (4) : 311 ~ 319 .
- [12] Whiteley H R , Schnepf H E . The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis* . *Annu Rev Microbiol* , 1986 , **40** : 549 ~ 576 .
- [13] Yu J X , Xie R Y , Tan L , *et al.* Expression of the full-length and 3'-spliced *cry1Ab* gene in the 135kD crystal protein minus derivative of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis* . *Curr Microbiol* , 2002 , **45** : 133 ~ 138 .
- [14] 龙繁新 庞 义 . 昆虫细菌病 . 见 蒲蛰龙主编 . 昆虫病理学 . 广东 广东科技出版社 , 1994 . 217 ~ 338 .

Cloning and Expression of ICP *cry1Ab16* Gene of *Bacillus thuringiensis*

Tang Mujin Tan Le Yu Jianxiu Yuan Meijin Pang Yi *

(State Key Laboratory for Biocontrol , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China)

Abstract : With two pairs of primers designed on the basis of the sequence of *cry1* and *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* (Bt) , a novel insecticidal crystal protein *cry1Ab* gene of Bt was amplified from bacillus strain AC-11 by using Long Template PCR System . Southern blot further confirmed that the novel gene existed in plasmid of the strain . The amplified fragment was sequenced and compared with *cry1Ab1* gene in EMBL/GenBank . The results showed that eight nucleotides and seven amino acid residues were different from that of *cry1Ab1* , suggesting that it was a new *cry1Ab* gene , which was designated *cry1Ab16* in GenBank (Accession No . AF375608) . The *cry1Ab16* gene was cloned into the *E. coli* expression vector pQE30 , creating the recombinant plasmid pQCT , which was then transformed into *E. coli* M15 . Western blot analysis showed that Cry1Ab16 protein , induced by IPTG was expressed in the strain M15 (pQCT) with the molecular mass of approximate 130 kD , but Cry1Ab16 was unstable and was mostly degraded into about 65 kD protein . Bioassay showed that the LC_{50} of Cry1Ab16 against the third instar larvae of *Plutella xylostella* with a spreaded method was 258.3 mg/L , and it could also inhibit the growth of *Spodoptera* larvae .

Key words : *Bacillus thuringiensis* , *cry1Ab16* gene , Clone , Expression

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA214011) ; Natural Science Foundation of Guangdong Province

* Corresponding author . Tel : 86-20-84113860 ; Fax : 86-20-84037472 ; E-mail : js12@zsu.edu.cn

Received date : 11-08-2002

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>