

苏云金芽孢杆菌 *cry2Aa* 操纵元蛋白对 杀虫蛋白晶体形成作用的研究

姚 江^{1,2} 张 杰¹ 陈中义¹ 李长友¹ 黄大昉^{1,3*}

(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 连云港师范高等专科学校 连云港 222000)

(³ 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘 要 利用重叠 PCR 的方法,通过两次 PCR 扩增,分别获得 *cry2Aa10* 操纵元的 *orf1*、*orf1 + orf2* 与 *cry2Ab5* 基因的融合片段。融合片段经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切与 pHT315 连接,分别构建了基因融合片段的原核表达载体 pFU(*orf1 + 2Ab*) 和 pFU(*orf1 + orf2 + 2Ab*)。电转化 Bt 无晶体突变株 4Q7 后,扫描电镜下可观察到典型的方形晶体,通过 SDS-PAGE 可检测到 60kD 大小的蛋白表达带。结果表明,*cry2Ab5* 可在 *cry2Aa10* 的启动子帮助下有效转录和表达,并在 *orf2* 产物帮助下形成蛋白晶体。

关键词 苏云金芽孢杆菌, *cry2Aa10* 操纵元, *cry2Ab5* 基因, ORF2 蛋白, 晶体形成
中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)01-0115-04

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)能在营养期或芽孢形成期合成杀虫蛋白并组合成晶体内含物^[1]。在探索 Bt 晶体形成机制的诸多研究中,已经发现 *cytA* 和 *cry2Aa* 两种杀虫基因产物需要与一种帮助蛋白基因产物共同作用,才能形成晶体内含物^[2,3]。Bt 杀虫蛋白基因 *cry2Aa* 与 *orf1* 和 *orf2* 共同组成一个操纵元结构,并共用位于 *orf1* 上游启动子进行转录,其中帮助蛋白 ORF2 起到一种分子伴侣的作用^[3-5]。另有报道 *cry2Ab* 一般在 Bt 中不表达,也不形成晶体,推测主要原因是 *cry2Ab* 基因上游没有启动子和帮助蛋白基因^[4-6]。

研究针对从 Bt 菌株 Ly30 中分离获得的 *cry2Aa10* 和 *cry2Ab5* 基因(姚江,未发表资料),通过重叠 PCR,实现 *cry2Aa10* 操纵元启动子和帮助蛋白基因(*orf1*、*orf2*)与 *cry2Ab5* 基因的融合,并观察其对 *cry2Ab5* 基因表达和晶体形成的作用。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

菌株和质粒见表 1。

1.2 培养基、试剂与耗材

细菌培养基为 LB 培养基^[6]。DNA 限制酶、T4 DNA 连接酶购自 Gibco BRL(LTI)公司, Bt *cry* 基因特异扩增引物由上海生物工程公司合成, *Taq* plus DNA 聚合酶购自上海生物工

程公司。抗生素购于经科生物工程公司, 氨苄青霉素使用浓度为 150 μ g/mL, 红霉素使用浓度为 50 μ g/mL。DNA-Spin-column 回收柱购于 Sigma 公司, 其它试剂为市售分析纯商品。

1.3 PCR 扩增

运用 DNA Clone 软件分析 *cry2Aa10* 操纵元和 *cry2Ab5* 基因的全序列, 确定 *cry2Aa10* 操纵元启动子、*orf1*、*orf2* 以及 *cry2Ab5* 基因的起始和末端序列。依据重叠 PCR 原理, 设计引物扩增启动子与基因的融合片段 *orf1 + cry2Ab* 和 *orf1 + orf2 + cry2Ab* 以及无启动子融合 *orf2 + cry2Ab*, 并在引物两端分别引入不同的酶切位点, 如 *Bam*H I(双下划线)、*Eco*R I(单下划线)等。*cry2Ab* 基因和 *cry2Aa* 操纵元 *orf1* 融合设计的重叠引物序列如下:

cry2Aa 操纵元上游引物 Ya2A5: 5'-CGCGGATCCGGATAACGT-GACTCG-3,

*Bam*H I

cry2Ab 基因的下游引物 L2Ab3: 5'-CCGGAATTCAAACTTTA-ATAAAGTGGTG-3

*Eco*R I

重叠引物 Ya2A3-ORF1: 5'-CTCATACAAAAAC AA-GAAAGACC-3

Yb2A5-ORF1: 5'-GTTTTGTCTATGAG ATGAATAG-TATTG-3

基金项目 国家转基因植物产业化专项资助项目(J99-A-033)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62817545; Fax: 86-10-62894642; E-mail: dfh313@public.bta.net.cn

作者简介 姚江(1963-)男,江苏灌云人,博士,副教授,主要从事 Bt 分子生物学研究。E-mail: Jiangyao@sina.com

其他作者 宋福平,刘旭光,檀建新。

收稿日期 2003-02-11, 修回日期: 2003-05-29

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Name	Characterization	Origin
Escherichia coli		
DH5 α	SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96	This Lab
SCS110	RpsI thr leu endA dcm supE44 proAB	Dr. D. Lereclus
BL21(DE3)	hsdS gal(λ cIts857 ind1 Sam7 ini5	This lab
EKLy2Ab	BL21 containing pEKLy2Ab	This work
HFU(2Ab + orf1)	DH5 α containing pHFU(2Ab + orf1)	This work
HFU(2Ab + orf1 + orf2)	DH5 α containing pHFU(2Ab + orf1 + orf2)	This work
Bacillus thuringiensis		
Bt cry B ⁻	acrystalliferous mutant strain	Prof. Pang Yi
HTLy2Aa-160	Bt Cry B ⁻ (cry2Aa10)	This work
HTFU(2Ab + orf1)	Bt Cry B ⁻ containing pHFU(2Ab5 + orf1)	This work
HTFU(2Ab + orf1 + orf2)	Bt Cry B ⁻ containing pHFU(2Ab5 + orf1 + orf2)	This work
HTFU(2Ab + orf2)	Bt Cry B ⁻ containing pHFU(2Ab5 + orf2)	This work
Plasmids		
pHT315	Amp ^R Er ^R E. coli-B. thuringiensis shuttle vector	Dr. D. Lereclus
HTLy2Aa-160	pHT315 carrying cry2Aa10 gene	This work
pEKLy2Ab	pET21 - b carrying cry2Ab5 gene	This work
pHFU(2Ab + orf1)	pHT315 carrying 2Ab + orf1 fusion gene	This work
pHFU(2Ab + orf1 + orf2)	pHT315 carrying 2Ab + orf1 + orf2 fusion gene	This work
pHFU(2Ab + orf2)	pHT315 carrying 2Ab + orf2 fusion gene	This work

对 cry2Ab 基因与 orf1 + orf2 的融合,除 L2Ab3 和 Ya2A5 外,设计的重叠引物为:

Ya2A3 5' - CAATACACTATTGAT ATAAAAATTCCTCC-3

Y2Ab5 5' - ATGAATAGTGTATFG AATAGC-3

对 cry2Ab 基因与 orf2 融合,除重叠引物 Ya2A3、Y2Ab5 和 L2Ab3 外,设计了 orf2 上游引物 Yb2A5-ORF2 5'-CGCGGATC-CATAGATGTTAGC-3。

PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 29 个循环。

1.4 基因融合片段表达载体的构建

利用重叠引物 PCR,获得基因融合片段,依两端酶切位点,双酶切该片段,与相应酶切的 pHT315 连接,转化 DH5 α , 筛选阳性重组质粒。PCR 产物回收按 DNA-Spin-column 说明进行,大肠杆菌质粒 DNA 提取、酶切、去磷酸化、连接和转化参考文献 [7]。

1.5 基因融合片段的表达

将从 DH5 α 提取的阳性重组质粒电转化 E. coli SCS110, 提取质粒电转化 Bt cryB⁻ 筛选获得含基因融合片段的 Bt 重组工程菌,观察晶体形成,SDS-PAGE 检测蛋白表达量。Bt 转化方法参见 [8],晶体蛋白 SDS-PAGE 分析和电镜观测参见文献 [6]。

2 结果和分析

2.1 融合基因片段表达载体的构建

分别以 cry2Aa 操纵元和 cry2Ab5 基因为模板,采用引物

对 Ya2A5/Ya2A3 和 Y2Ab5/L2Ab3 扩增 orf1 + orf2 和 cry2Ab5, 并分别获得 1.6 kb 和 1.9 kb 的扩增产物。在此基础上,以扩增产物混合物为模板,以引物对 Ya2A5/L2Ab3 扩增获得大小为 3.5 kb 的融合基因片段 orf1 + orf2-cry2Ab。同样分别通过引物对 Ya2A5/Ya2A3-ORF1、Yb2A5-ORF1/L2Ab3、Ya2A5/L2Ab3 和 Yb2A5-ORF2/Ya2A3、Y2Ab5/L2Ab3、Yb2A5-ORF2/L2Ab3 获得融合基因 orf1-cry2Ab 和 orf2-cry2Ab 结果图片从略。BamHI 和 EcoRI 双酶切上述片段,与相应酶切的 pHT315 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选获得阳性重组质粒,分别命名为 pFU(orf1 + orf2 + 2Ab), pFU(orf1 + 2Ab) 和 pFU(orf2 + 2Ab)。

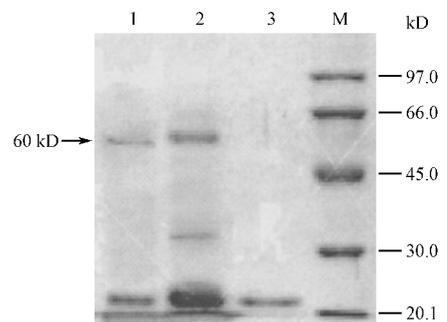


图 1 融合基因表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analyse for expression products of fusion gene

M. protein marker; 1. HTFU(2Ab + orf1);

2. HTFU(2Ab + orf1 + orf2); 3. HTFU(2Ab + orf2).

2.2 融合基因的表达、产物检测和晶体观察

Bt cry B⁻ 筛选获得工程菌,分别命名为 HTFU(2Ab + *orf1*)、HTFU(2Ab + *orf1* + *orf2*)和 HTFU(2Ab + *orf2*)。

在牛肉膏蛋白胨培养基中培养,32℃,230r/min,36h 左右,光镜、电镜观察晶体形成,SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。结果表明,单独 *orf1* 可帮助 *cry2Ab5* 基因表达 60 kD 左右的蛋白(图 1 Lane 1),但观察不到晶体形成(图 2-A);单独 *orf2* 存在时检测不到 *cry2Ab5* 基因的表达产物(图 1 Lane 3);在 *orf1* 和 *orf2* 同时存在的情况下,*cry2Ab5* 基因能表达 60 kD 左右的蛋白(图 1 Lane 2)并形成方形晶体(图 2-B)。

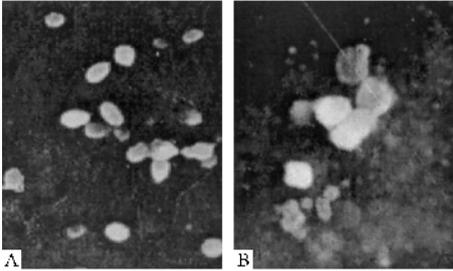


图 2 工程菌晶体电镜观察(5000 ×)

Fig.2 Crystals in recombinated bacterium(5000 ×)

A. HTFU(2Ab + *orf2*); B. HTFU(2Ab + *orf1* + *orf2*).

3 讨论

已有研究表明 *Bt cry2Ab* 基因在 *Bt* 中不能有效表达^[3,7],序列分析表明 *cry2Ab5* 基因上游序列与已经发表的相关基因高度同源,不存在明显的启动子序列,且在 *Bt* 中也检测不到表达产物(作者未发表结果)。国外报道通过启动子融合分别实现了 *cry2Ab1* 和 *cry2Ab2* 基因在 *Bt* 无晶体突变株的有效表达,而且后者在 *cry2Aa* 操纵元 ORF2 帮助下形成了蛋白晶体^[3]。国内也有通过 T7 启动子融合实现 *cry2Ab3* 基因在大肠杆菌表达的报道^[7]。

论文选用从国内分离株 BtLy30 克隆的 *cry2Aa10* 操纵元和 *cry2Ab5* 基因,直接通过重叠 PCR 实现基因融合和表达研究,方法简便。但要特别注意引物设计和 *Taq* 酶的保真性。如在引物两端分别引入不同的酶切位点,有利于融合基因与载体的高效正确连接。*Pfu Taq* 不仅具有 3' 端核酸外切酶活性,而且扩增产物末端不加 A 尾。因此,用 *Pfu Taq* 酶代替普通 *Taq* 酶,不仅有效地获得了两基因的融合片段,而且具有较高的保真性。

研究结果显示,没有 *cry2Aa10* 操纵元启动子仅与 *orf2* 融合,*cry2Ab5* 基因不能有效表达;与 *cry2Aa10* 操纵元的启

动子及 *orf1* 融合,*cry2Ab5* 基因虽能有效表达但不能形成晶体,而与 *cry2Aa10* 操纵元的启动子及 *orf1* + *orf2* 融合后,*cry2Ab5* 基因不仅能有效表达,而且还能形成方形晶体。这些结果不仅显示了启动子对 *cry2Ab5* 有效表达的作用,而且也直接证实了 ORF2 帮助晶体形成的作用。这与 Crickmore 等^[3]的研究结果基本一致,这也表明尽管基因来源不同,但 *cry2Ab* 基因沉默机制和 *cry2Aa* 操纵元 Orf2 蛋白帮助晶体形成的功能是高度保守的。研究中表达的 Cry2Ab 蛋白大小为 60 kD 左右,而非理论值 71 kD,与 Staples 等^[5]近期研究的结论相符,分子量减小可能是降解所致。

参 考 文 献

- [1] Höfte H, Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, 1989, **53**: 242 - 255.
- [2] Adams L F, Visick J E, Whiteley H R. A 20 - kilodalton protein is required for efficient production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27 - kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 521 - 530.
- [3] Crickmore N, Wheeler V C, Ellar D J. Use of an operon fusion to induce expressing and crystallization of a *Bacillus thuringiensis* δ - endotoxin encoded by a cryptic gene. *Mol Gen Genet*, 1994, **242**: 365 - 368.
- [4] Widner W R, Whiteley H R. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 965 - 974.
- [5] Staples N, Ellar D, Crickmore N. Cellular localization and characterization of the *Bacillus thuringiensis* Orf2 crystallization factor. *Current Microbiology*, 2001, **42**: 388 - 392.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 金冬雁 黎孟枫, 等, 译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [7] 陈中义, 李长友, 刘加宝, 等. 苏云金芽孢杆菌沉默基因 *cry2Ab3* 在大肠杆菌中的表达及杀虫活性研究. *微生物学报*, 2002, **42**(5): 561 - 566.
- [8] Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, et al. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bt*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, **60**: 211 - 217.

Function of Proteins Coded by *Bacillus thuringiensis cry2Aa10* Operon on ICPs Crystallization

YAO Jiang^{1,2} ZHANG Jie¹ CHEN Zhong-Yi¹ LI Chang-You¹ HUANG Da-Fang³

(¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Insect Pests and Diseases ,

Institute of Plant Protection ,Chinese Academy of Agricultural Science ,Beijing 100094 , China)

(² Lianyungang Teacher's College , Lianyungang 222000 , China)

(³ Biotechnology Research Institute ,Chinese Academy of Agricultural Science , Beijing 100081 ,China)

Abstract :By using overlapping PCR techniques , *cry2Ab5* was fused with *orf1* , *orf2* and *orf1 + orf2* of *cry2Aa10* , and then was inserted *E. coli*-*B. thuringiensis* shuttle plasmid pHT315 respectively after digestion by *Bam*H1 and *Eco*R1 . The recombinant plasmid was named as pFU(*orf1 + 2Ab*) , pFU(*orf1 + orf2 + 2Ab*) and pFU(*orf2 + 2Ab*) and electroporated into *Bt* acrySTALLIFEROUS mutant strain 4Q7 respectively . Though the 60 kD protein band was detected in pFU(*orf1 + orf2 + 2Ab*) and pFU(*orf1 + 2Ab*) by SDS-PAGE , the square crystals was only observed in pFU(*orf1 + orf2 + 2Ab*) by scanning electron microscope . The results showed that the *orf1 + orf2* from *cry2Aa10* operon not only can help *cry2Ab5* expression , but also assist the formation of square crystals .

Key words :*Bacillus thuringiensis* , *cry2Aa10* operon , *cry2Ab5* , ORF2 protein , Crystallization

Foundation item : National Transgenic Special Project(J99-A-033)

* Corresponding author . Tel 86-10-62817545 ; Fax 86-10-62894642 ; E-mail :dfh313@public.bta.net.cn

Received date : 02-11-2003

《微生物学报》投稿要求

1. 投稿范围 :凡有关微生物学基础研究、应用基础研究及其高技术创新等领域的研究成果 ,包括普通微生物学 ,工业、农业、医学和兽医微生物学 ,免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究报告、简报等 本刊均欢迎投稿。
2. 应首次发表 :所有来稿均应未在公开出版的刊物上发表过。要求论点明确、数据可靠、行文简练、用词规范、图表清晰、结论合理。
3. 介绍信 :所有来稿要求一式两份。论文是否涉及保密、署名是否无误 ,请出示第一署名单位的介绍信。若是与国外作者合写的论文 ,应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的信函说明。
4. 作者联系方式 :请在投稿时提供通讯作者或第一作者的 Tel、Fax 和 E-mail 地址。
5. 审稿费 :投稿时请随寄 100 元审稿费 ,可通过邮局汇来(务请在汇款单上注明汇款单位和稿件第一作者 ,我们将开具正式发票)。
6. 投稿及汇款地址 (100080)北京中关村 中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部
欲知更详细的投稿要求请登陆我刊的网址 :Http ://www.im.ac.cn/journals