

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 *cry2Aa*10 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* + 2*Ab*)和 pFU(*orf1* + *orf2* + 2*Ab*)。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 *cry2Aa*10 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, *cry2Aa*10 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: 1001-6209(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晶体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 *cry2Aa*10 和 *cry2Ab5* 基因(姚 江,未发表资料),通过重叠引物 PCR,实现 *cry2Aa*10 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 *cry2Aa*10 操纵元和 *cry2Ab5* 基因的全序列,确定 *cry2Aa*10 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'-CTCATACACAAAAC 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		
DH5α	<i>SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96</i>	This Lab
SCS110	<i>Rpsl thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	Dr. D. Lereclus
BL2(DE3)	<i>hsdS gal(λcIts857 ind1 Sam7 ini5</i>	This lab
EKLy2Ab	BL21 containing pEKLy2Ab	This work
HFU(2Ab + orf1)	DH5α containing pHFU(2Ab + orf1)	This work
HFU(2Ab + orf1 + orf2)	DH5α 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 <i>E. coli</i> - <i>B. thuringiensis</i> 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'-CAATAGACTATTTCAT 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℃ 3min ,94℃ 1min , 55℃ 1min , 72℃ 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 DH5α ,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 DH5α 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 DH5α,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)。

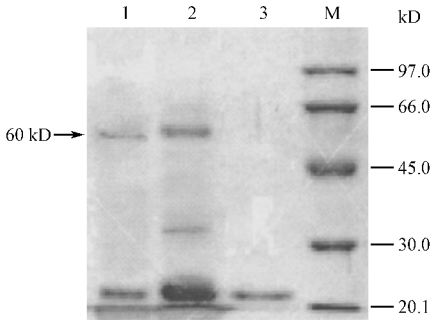


图 1 融合基因表达产物 SDS-PAGE 分析

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)。

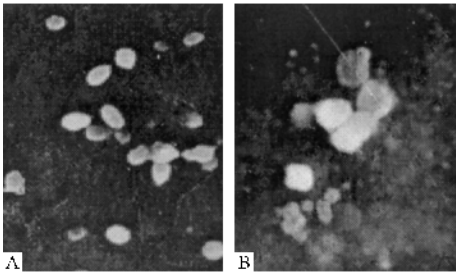


图 2 工程菌晶体电镜观察(5000×)

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*,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 :dlfh313@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