

# 苏云金芽胞杆菌 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 基因共表达 可在芽胞外壁内侧形成伴胞晶体

张 睿 赵昌明 喻子牛 孙 明\*

(华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

**摘 要** 苏云金芽胞杆菌幕虫亚种的伴胞晶体在预芽胞外壁内侧形成,呈现晶体芽胞粘连的现象。根据已发表的 *cry26Aa* 1 和 *cry28Aa* 1 基因序列设计引物,从苏云金芽胞杆菌幕虫亚种 T02 中扩增得到 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 基因,通过穿梭载体将这两个基因分别和同时转化到苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171 后,透射电镜下可在芽胞外壁内侧和外侧同时观察到伴胞晶体,而单独表达时可在芽胞外壁外侧观察到伴胞晶体。结果表明,伴胞晶体在芽胞外壁内侧表达不单独依赖于启动子的时空调控,可能还受到晶体蛋白相互作用的影响。

**关键词** 苏云金芽胞杆菌,芽胞外壁,胞晶粘连, *cry26*, *cry28*

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)06-0955-04

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是一种革兰氏阳性细菌,在芽胞形成过程中伴有蛋白晶体的形成,称为伴胞晶体(Parasporal crystal)。伴胞晶体是毒杀昆虫的主要活性物质,由一种或多种毒素蛋白组成,亦称杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal protein, 简称 ICP, 或晶体蛋白)。Bt 的伴胞晶体是在芽胞形成期(Sporulation)合成并累积而成。当芽胞成熟以后,细胞自溶,释放出芽胞和伴胞晶体。在绝大多数 Bt 中,伴胞晶体是在母细胞中形成的,在空间上与芽胞是无关的。但是,在少数亚种中,芽胞成熟后伴胞晶体和芽胞总是粘连在一起,例如幕虫亚种(*B. thuringiensis* subsp. *finitimus* serotype H<sub>2</sub>)<sup>[1]</sup>和 *Graciosensis* 亚种(*B. thuringiensis* subsp. *graciosensis* serotype H<sub>66</sub>) [未发表资料],电镜结果显示这些晶体总是在芽胞外壁(Exosporium)内侧形成。

有关 Bt 幕虫亚种的研究非常少,也未见到有关胞晶粘连机制的报道。因此,对这一现象的研究,既是从理论上对苏云金芽胞杆菌中伴胞晶体和芽胞分化机制的探讨,同时为构建在芽胞外壁内侧表达不同杀虫晶体蛋白基因的工程菌以及构建新型“生物囊”工程菌提供了理论基础。

从苏云金芽胞杆菌幕虫亚种中曾克隆到晶体蛋白基因 *cry26Aa* 和 *cry28Aa*<sup>[2]</sup>。该亚种标准血清型菌株 T02 表现出明显的晶体芽胞粘连现象。但有关 T02 菌株毒力未见报道。本研究以苏云金芽胞杆菌幕虫亚种 T02 菌株质粒为模板,利用 PCR 扩增出其晶体蛋白基因 *cry26Aa* 和 *cry28Aa*,并在苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171 中共表达,为进一步研究苏云金芽胞杆菌中胞晶粘连机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

所用菌株和质粒见表 1。苏云金芽胞杆菌 T02 菌株由本

室保藏。用 LB 培养基于 30℃ 培养苏云金芽胞杆菌,37℃ 培养大肠杆菌(*Escherichia coli*)。抗生素使用浓度分别为氨苄青霉素(Amp)100μg/mL,红霉素(Erm)25μg/mL,新霉素(Neo)5μg/mL。

### 1.2 聚合酶链式反应

PCR 扩增用的引物序列见表 2。引物 P1~P6 用于扩增 *cry26Aa* 基因<sup>[2]</sup>,其中引物 P1 对应该基因的第 1~18 个核苷酸,并在 5'端添加了含有 *Kpn* I 位点的 9 个核苷酸;引物 P2 对应 1793~1819 的互补序列,内含一个单一酶切位点 *Xho* I;引物 P3 与引物 P2 序列互补,但两端各少一个碱基;引物 P4 对应 4974~4950 的互补序列,内含一个单一酶切位点 *Eco* R I;引物 P5 与引物 P4 序列互补;引物 P6 对应 6709~6728 的互补序列,并在 5'端添加了含有 *Bam* H I 位点的 8 个核苷酸。引物 P7~P10 用于扩增 *cry28Aa* 基因<sup>[2]</sup>,其中引物 P7 对应该基因的第 1~14 个核苷酸,并在 5'端添加了含有 *Sal* I 位点的 9 个核苷酸;引物 P8 对应 2525~2553 的互补序列,内含一个单一酶切位点 *Hind* III;引物 P9 与引物 P8 序列互补,但 5'端少 4 个碱基;引物 P10 对应 4944~4959 的互补序列,并在 5'端添加了含有 *Bam* H I 位点的 9 个核苷酸。PCR 反应条件:94℃ 5min;94℃ 1min,54℃ 1min,72℃ 3min30s,然后每 5 个循环复性温度降 1℃,降至 49℃,共 30 个循环,72℃ 10min。

### 1.3 重组质粒的构建

大肠杆菌质粒的提取、酶切、连接、转化大肠杆菌均按文献[6]进行。苏云金芽胞杆菌质粒的提取类似大肠杆菌质粒的碱裂解法,但需 30℃ 培养菌体,且加 Solution I 震荡悬浮菌体后,每 100μL 菌悬液要加 10μL 溶菌酶(浓度 50mg/mL)冰上作用 1h 以上,细胞壁溶解后再加 Solution II。

基金项目 国家自然科学基金(30470026),国家 973 项目(2003CB114201),国家 863 计划(2003AA223081,2004AA214092)

\* 通讯作者。Tel 86-27-87283455;Fax 86-27-87280670;E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

作者简介 张 睿(1980-)女,上海市人,硕士研究生,主要从事苏云金芽胞杆菌分子生物学研究工作。现在美国佐治亚大学学习。

收稿日期 2005-01-30,修回日期 2005-07-18

表 1 实验所用的菌株和质粒

Table 1 The bacteria and plasmids used in this work		
Strain/plasmid	Characteristics	Reference or source
Strain		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>sup</i> E44Δ <i>lac</i> U169 ( Φ80 <i>lac</i> ZΔM15 ) <i>hsd</i> R17 <i>rec</i> A1 <i>end</i> A1 <i>gyr</i> A96 <i>thi</i> – 1 <i>rel</i> A1	Stored in this lab
<i>Bacillus thuringiensis</i> T02		Stored in this lab
<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171	Crystal minus mutant of YBT – 1463	Stored in this lab <sup>[3]</sup>
<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB0108	BMB171 derivative with plasmid pBMB0108	This work
<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB0109	BMB171 derivative with plasmid pBMB0109	This work
<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB0110	BMB171 derivative with plasmid pBMB0108 and pBMB0109	This work
Plasmid		
pBluescript	Amp <sup>r</sup> , 3.0kb	Stored in this lab
pBE2	Shuttle vector , Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , 6.2kb	Stored in this lab <sup>[4]</sup>
pHT315	Shuttle vector , Amp <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup> , 6.6kb	Stored in this lab <sup>[5]</sup>
pBMB0105	6.7kb <i>Kpn</i> I – <i>Bam</i> H I fragment containing full <i>cry</i> 26 <i>Aa</i> gene in pBluescript	This work
pBMB0108	6.7kb <i>Kpn</i> I – <i>Bam</i> H I fragment containing full <i>cry</i> 26 <i>Aa</i> gene in pHT315	This work
pBMB0106	4.9kb <i>Sal</i> I – <i>Bam</i> H I fragment containing full <i>cry</i> 28 <i>Aa</i> gene in pBluescript	This work
pBMB0109	4.9kb <i>Sal</i> I – <i>Bam</i> H I fragment containing full <i>cry</i> 28 <i>Aa</i> gene in pBE2	This work

表 2 PCR 引物及其扩增产物

Table 2 Primers and amplified products of PCR		
Primers	Sequences	Products
P1	5' – TCT GGTACCGATCCAGCCGCTTCTGTT – 3'	1.8kb fragment
P2	5' – ACATCTGTATACACTT CTGAGTAAGC – 3'	<i>cry</i> 26 <i>Aa</i> gene
P3	5' – CTTA CTCGAGAAAGTGTATACAGATG – 3'	3.2kb fragment
P4	5' – GTAAAA GAATTCGACTGTACCAAGC – 3'	<i>cry</i> 26 <i>Aa</i> gene
P5	5' – GCTTGGTACAGTC GAATTCCTTTTAC – 3'	1.7kb fragment
P6	5' – ATA CGATCCGTTAGATGCTTCAGGGATA – 3'	<i>cry</i> 26 <i>Aa</i> gene
P7	5' – TCT GTCGACGATCGGCCGAATCG – 3'	2.5kb fragment
P8	5' – AGTAACTTCGT AAGCTTTTACCAATGGGA – 3'	<i>cry</i> 28 <i>Aa</i> gene
P9	5' – TCCCATTGGTAA AAGCTTACGAAGT – 3'	2.4kb fragment
P10	5' – TCT GGATCCGATCAAAAAGAAATTC – 3'	<i>cry</i> 28 <i>Aa</i> gene

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

1.4 苏云金芽胞杆菌质粒的电转化

按文献 7 的方法进行操作。

1.5 杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE

Bt 菌株用 ICPM 培养基( 蛋白胨 0.6% ,葡萄糖 0.5% , CaCO<sub>3</sub> 0.1% , MgSO<sub>4</sub> 0.05% ~ 0.1% , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05% ,调节 pH 值 7.0 )培养。Bt 芽胞和伴胞晶体的收集 ,晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析等其它操作参照文献 8 所述方法。

1.6 电镜样品的制备

参照文献 9 所述方法进行的操作。

2 结果和分析

2.1 晶体蛋白基因 *cry*26*Aa* 和 *cry*28*Aa* 的克隆

根据已知 *cry*26*Aa*1 和 *cry*28*Aa*1 基因序列设计引物。待扩增片段包括全长基因及上下游序列 ,分别为 6.7kb 和

4.6kb ,其中编码区分别为 897 ~ 4388bp 和 1129 ~ 4458bp。以 T02 菌株质粒为模板 ,将 *cry*26*Aa*1 基因分 3 段进行 PCR 扩增 ,分别回收并克隆扩增片段到 pBluescript 上 ,进一步将 3 个片段拼接成一个完整的基因 ,与 pBluescript 载体连接后 ,转化 *E. coli* DH5α 得到重组质粒 pBMB0105。同理将 *cry*28*Aa*1 基因分二段扩增再进行连接 ,最后将完整基因克隆到 pBluescript ,得到重组质粒 pBMB0106。

2.2 晶体蛋白基因 *cry*26*Aa* 和 *cry*28*Aa* 在无晶体突变株中的表达

从质粒 pBMB0105 中酶切回收了 6.7kb 含完整 *cry*26 基因及侧翼序列的片段 ,装入穿梭载体 pHT315 的 *Kpn* I / *Bam* H I 位点后得到重组质粒 pBMB0108。从质粒 pBMB0106 中酶切回收了 4.6kb 含完整 *cry*28 基因及侧翼序列的片段 ,装入穿梭载体 pBE2 的 *Sal* I / *Ram* H I 位点后得到重组质粒

pBMB0109。

**2.2.1 晶体蛋白基因在无晶体突变株中的表达** :用电转化法将质粒 pBMB0108 和 pBMB0109 分别导入无晶体突变株 BMB171 中,得到转化子 BMB0108、BMB0109,将质粒 pBMB0108 和 pBMB0109 共同导入无晶体突变株 BMB171,得到转化子 BMB0110。将转化子 BMB0108、BMB0109 和 BMB0110 用 ICPM 培养基摇瓶培养 36h,观察产生的伴胞晶体情况。由图 1 可以看出,当把 *cry26* 和 *cry28* 基因同时导入 BMB171 中时,能形成游离的晶体,这与 *cry26* 和 *cry28* 基因单独表达时形成的晶体形态一致。但当两基因同时存在时,在芽胞形成过程中,亦能观察到伴胞晶体与芽胞粘连。SDS-PAGE 检测形成的晶体蛋白大小与 T02 晶体蛋白大小一致。

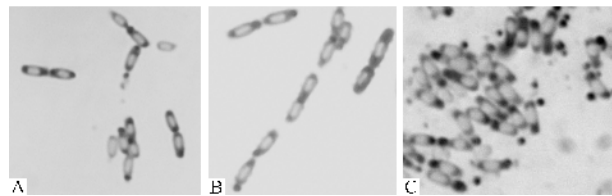


图 1 转化子 BMB0108(A)、BMB0109(B)、BMB0110(C) 产生的芽胞和伴胞晶体

Fig.1 Photograph of parasporal bodies and spores of transformants BMB0108(A), BMB0109(B) and BMB0110(C)

**2.2.2 晶体蛋白基因形成的伴胞晶体的形态** :超薄切片透射电镜下观察到 *cry26* 基因和 *cry28* 基因均能在 BMB171 芽胞外壁外侧形成晶体,而同时导入了两个基因的 BMB171 转化子 BMB0110 可形成两个伴胞晶体,一个在芽胞外壁外侧,另一个则在芽胞外壁内侧产生(图 2)。

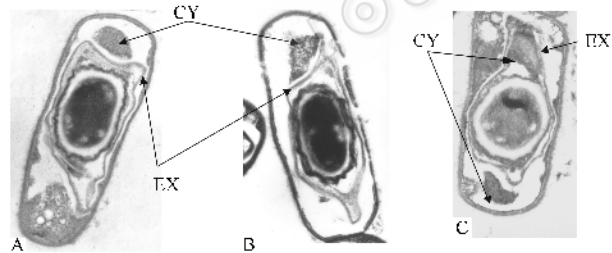


图 2 转化子 BMB0108、BMB0109 和 BMB0110 的芽胞和伴胞晶体的超薄切片透射电镜照片

Fig.2 Thin section of the spores and crystals of transformants BMB0108, BMB0109 and BMB0110 under transmission electron microscopy (CY: crystals, EX: exosporium; Bar = 0.5  $\mu$ m)

A: The inclusion was free of the exosporium in BMB0108; B: The inclusion was free of the exosporium in BMB0109; C: One inclusion was free of the exosporium and another was enclosed by the exosporium in BMB0110.

### 3 讨论

*cry26* 基因在无晶体突变株 BMB171 中表达时,绝大多数晶体在芽胞外壁外侧形成,但也有部分细胞晶体包含在芽胞外壁内侧,形成不典型的胞晶粘连现象(图略)。*cry28* 基

因在无晶体突变株 BMB171 中表达时,则只在芽胞外壁外侧形成晶体。当把 *cry26* 基因和 *cry28* 基因同时导入 BMB171 中,有两个晶体产生,并且其中一个被包含在芽胞外壁内侧。已经有报道证明 Bt 的芽胞形成过程有类似 *B. subtilis* 的调控系统,通过顺序激活与芽胞形成有关的 6 个  $\sigma$  因子,即营养生长因子  $\sigma^A$ ,过渡期的  $\sigma^H$ ,芽胞形成期的 4 个有顺序活性的  $\sigma^F$ 、 $\sigma^E$ 、 $\sigma^G$ 、 $\sigma^K$  因子,使芽胞形成基因在时间和空间上有序而准确的表达<sup>[10]</sup>。绝大多数 Bt 杀虫晶体蛋白基因主要由  $\sigma^E$  和  $\sigma^K$  类似的因子调节,从而决定了其表达在芽胞形成期启动,伴胞晶体在母细胞中形成<sup>[11]</sup>。但 *cry26* 和 *cry28* 基因的启动子不同于所有报道的 Bt 晶体蛋白基因启动子,且侧翼序列也很特殊,所以推测产生胞晶粘连现象与其独特的启动子在时空上的精确调控有关,但单单启动子的调节并不足以导致胞晶粘连现象的产生。

尽管含有 *cry26* 基因和 *cry28* 基因的 BMB171 菌株能产生类似 T02 菌株的两个晶体,且其稳定性较两基因单独表达时有所提高,但仍低于出发菌株 T02。芽胞形成末期,部分细胞伴胞晶体全部游离于芽胞,并且很快降解。推测还存在有其它基因协助调控晶体蛋白的稳定性。另外,由于本研究是通过 PCR 扩增得到的 *cry26* 和 *cry28* 基因,是否也是影响晶体表达的因素还有待进一步考证。在金龟子芽胞杆菌和球形芽胞杆菌中,人们也发现了晶体位于芽胞外壁内侧<sup>[12,13]</sup>,它们是否也具有同样的调控机制,也需要进一步的研究证明。

### 参 考 文 献

- [1] Debro L, Fitz-James P C, Aronson A. Two different parasporal inclusions are produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriology*, 1986, **165**(1): 258 - 268.
- [2] Wojciechowska J A, Lewitin E, Revina L P, et al. Two novel delta-endotoxin gene families *cry26* and *cry28* from *Bacillus thuringiensis* ssp. *finitimus*. *FEBS Letters*, 1999, **453**: 46 - 48.
- [3] 李 林, 杨 超, 刘子铎, 等. 苏云金芽胞杆菌无晶体突变株的逐级升温筛选及其转化性能. *微生物学报*, 2000, **41**(1): 85 - 90.
- [4] 郭兴华, 熊 占, 周 民, 等. 枯草杆菌大肠杆菌多功能穿梭载体的构建. *生物工程学报*, 1991, **7**(3): 224 - 229.
- [5] Arants O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 1991, **108**: 115 - 119.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis 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, 1993.
- [7] 吴 岚, 孙 明, 喻子牛. 利用苏云金芽胞杆菌转座子 Tn4430 构建含 *cry1Ac10* 基因的解离载体. *微生物学报*, 2000, **40**(3): 264 - 269.
- [8] 孙 明, 吴 岚, 刘子铎. 苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry218* 的克隆和表达. *农业生物技术学报*, 1996, **4**(3): 293 - 297.
- [9] 朱晨光, 孙 明, 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌 CTC 菌株的 S-层蛋白可以形成伴胞晶体. *微生物学报*, 2002, **42**(6): 670 - 674.

- [ 10 ] Brown K L , Whiteley H R . Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. *J Bacteriology* ,1990 **172** ( 12 ) 6682 – 6688 .
- [ 11 ] Lereclus D ,Agaisse H ,Grandvalet C ,et al . Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis* . *Int J Med Microbiol* 2000 **290** ( 4 – 5 ) 295 – 299 .
- [ 12 ] Thierry I ,Hamon S ,Delecluse A ,et al . The introduction into *Bacillus sphaericus* of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* *cyt1Ab1* gene results in higher susceptibility of resistant mosquito larva populations to *B. sphaericus* . *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** ( 10 ) 3910 – 3916 .
- [ 13 ] Zhang J B ,Hodgman T C ,Krieger L ,et al . Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae* . *J Bacteriology* ,1997 **179** ( 13 ) 4336 – 4341 .

## Co-expression of crystal protein gene *cry26Aa* and *cry28Aa* has an ability to form parasporal crystal inside exosporium in *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*

ZHANG Rui ZHAO Chang-ming YU Zi-niu SUN Ming\*

( College of Life Science and Technology , State Key Laboratory of Agricultural Microbiology ,  
Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China )

**Abstract** : Parasporal crystal in *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus* T02 forms within the exosporium and remains attached to the spore after mother cell lysis , which leads to spore-crystal connection . According to the crystal protein gene sequence in *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* , *cry26* and *cry28* were cloned from strain T02 by PCR amplification and transformed into the crystal negative *Bacillus thuringiensis* strain BMB171 by shuttle vectors , alone or in combination together . Crystal can be observed inside of exosporium when co-expression of these two genes . But crystal mainly formed outside of exosporium when they expressed alone . This suggests interaction between of the two crystal proteins may be involved in enclosure .

**Key words** : *Bacillus thuringiensis* , Exosporium , Spore-crystal connection , *cry26* , *cry28*

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( 30470026 ) ; National Basic Research Program of China ( 2003CB114201 ) ; Chinese National Program for High Technology Research and Development ( 2003AA223081 , 2004AA214092 )

\* Corresponding author . Tel : 86-27-87283455 ; Fax : 86-27-87280670 ; E-mail : m98sun@mail.hzau.edu.cn

Received date : 01-30-2005