

苏云金杆菌辅助蛋白 P20 对营养期杀虫蛋白 Vip3A 表达的影响

师永霞^{1,2} 袁美姝¹ 陈建武¹ 孙 钊¹ 庞 义^{1*}

(¹中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

(²南方医科大学基因工程研究所 广州 510515)

摘 要:为检测苏云金杆菌辅助蛋白 P20 对 Vip3A 表达和杀虫活性的影响,将 *p20* 基因与 *vip3A* 基因相连构建了重组质粒 pHVP20,然后电激转化至 Bt 中进行了共表达,以仅携带 *vip3A* 基因的质粒 pHPT3 作为对照质粒。Western blot 结果显示,当 *vip3A* 基因和 *p20* 基因在 Bt 无晶体缺陷株 CryB 中共表达时,Vip3A 蛋白的最大表达量约是其在 CryB pHPT3 菌株中单独表达的 1.5 倍。生物测定结果表明,CryB pHVP20 和 CryB pHPT3 菌株对初孵斜纹夜蛾幼虫的 LC_{50} 值分别为 48.79 μ g/mL 和 78.00 μ g/mL,这说明 P20 蛋白可以促进 *vip3A* 基因在 Bt 中的表达,但对提高 Vip3A 蛋白的杀虫毒力没有显著性帮助。

关键词: 苏云金杆菌,辅助蛋白 P20,营养期杀虫蛋白,生物测定

中图分类号:Q786,Q936 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)01-0085-05

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)是一种广泛分布于土壤中的革兰氏阳性细菌,它对昆虫的毒杀作用主要是由于芽孢形成期产生的伴孢晶体导致的^[1,2]。近年来,人们发现 Bt 在营养期生长阶段也可分泌一种新型的杀虫蛋白 Vip3A,它在 Bt 的芽孢期和孢子囊末期也能维持高水平的表达,对鳞翅目昆虫具有广谱高效的杀虫毒性^[3,4]。由于它与已知的杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins,简称 ICPs)没有序列同源性,而且其杀虫机理也与 ICPs 不同^[5,6],因此 Vip3A 蛋白的研究对于抗性害虫的防治和构建高效、广谱的杀虫剂的研制具有重要的意义。

辅助蛋白 P20 是 Bt 中的一类小分子量的蛋白,它们不具有杀虫活性,但能帮助某些杀虫晶体蛋白正常表达和形成晶体,这种作用有时候甚至是必需的,它们不是构成伴孢晶体的主要成分。已有文献报道 P20 分子伴侣可以促进 Cyt1Aa^[7]、Cry11Aa^[8]、Cry4Aa^[9]、Cry2Aa^[10]、Cry1Ab^[11]以及 Cry1Ac^[12]蛋白的合成,甚至对截短的 Cry1C 也能提高表达量^[13]。但是,P20 并不能提高所有 ICP 蛋白的表达量,如:P20 对 Cry4B 和 Cry20Aa 蛋白的表达和结晶都没有作用^[9,14]。目前,尚无辅助蛋白 P20 对 Bt 营养期表达蛋白影响的报道。

本研究将 *p20* 基因与 *vip3A* 基因在 Bt 中进行共表达,分析了辅助蛋白 P20 对 Vip3A 蛋白表达量

和杀虫活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:表 1 为研究所用菌株和质粒。其中大肠杆菌(*Escherichia coli*)在 37℃ 下于 LB 液体培养基或固体培养基^[15]上培养,苏云金杆菌在 28℃ 下于 LB 培养基或 TB 培养基^[16]中培养。抗生素使用浓度分别为氨苄青霉素(Amp^r)100 μ g/mL 和红霉素(Erm^r)50 μ g/mL。

1.1.2 主要试剂:限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司;RNase A 购自 Sigma 公司;质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司;Western blot 试剂盒购自 Roche 公司;硝酸纤维素膜购自 Gene 公司;蛋白定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司。

1.2 表达质粒 pHVP20 的构建

质粒提取、酶切反应、电泳鉴定、DNA 片断回收、连接反应和大肠杆菌的转化等步骤均参照分子克隆实验手册^[15]进行。

1.3 苏云金杆菌质粒 DNA 的提取

主要参考分子克隆实验手册^[15]中大肠杆菌质粒提取的碱裂解法进行,并适当修改。即在碱裂解法中,加终浓度为 5mg/mL 的溶菌酶于溶液 I 中,37℃ 作用 2h,其余步骤同碱裂解法。

基金项目:国家 973 项目(G2000016209);广东省自然科学基金研究团队项目

* 通讯作者。Tel 86-20-84113860;Fax 86-20-84037472;E-mail:ls12@zsu.edu.cn

作者简介:师永霞(1976-),女,河南省安阳市,博士研究生,研究方向为杀虫微生物及基因工程。E-mail:sys0817@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-05-16 接受日期:2005-07-15 修回日期:2005-07-11

表 1 本研究中的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids in this study

Bacteria and plasmids	Characterization	Sources or references
Strains		
CryB	AcrySTALLIFEROUS mutant of <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>karstaki</i>	Ohio State University, Columbus, USA
CryB (pHT3101)	CryB containing the plasmid pHT3101	In this study
CryB (pHPT3)	CryB containing the plasmid pHPT3	[5]
CryB (pHVP20)	CryB containing the plasmid pHVP20	In this study
<i>Escherichia coli</i> TG1	<i>SupE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	Lab store
<i>E. coli</i> K12	MerA ⁺ , MerBC ⁺ , EcoK ⁺	NEB Company
Plasmids		
pHT3101	Erm ^r and Amp ^r , shuttle vector of <i>E. coli</i> and <i>B. thuringiensis</i>	Dr. Wu Dong
pWF45	pHT3101 carrying <i>cyt1Aa</i> and <i>p20</i> genes	[7]
pUC19	Amp ^r , cloning vector	In the lab
pHPT3	pHT3101 carrying the <i>vip3A</i> gene from <i>B. thuringiensis</i> S184 strain	[5]
pUF45	pUC19 carrying <i>cyt1Aa</i> and <i>p20</i> genes	In this study
pUP20	pUC19 carrying <i>p20</i> gene	In this study
pUVP20	pUC19 carrying <i>vip3A</i> and <i>p20</i> genes	In this study
pHVP20	pHT3101 carrying <i>vip3A</i> and <i>p20</i> genes	In this study

1.4 苏云金杆菌的电激转化

参照文献 [17] 的方法制备苏云金杆菌感受态细胞和进行电激转化。电激参数设定为: 0.2cm 电激杯, 电阻 400 ~ 800Ω, 电容 25μF, 电压 1.5 ~ 1.75kV, 电激时间为 7 ~ 9ms。

1.5 Western blot

将 SDS-PAGE 凝胶电转移至硝酸纤维素膜上, Western blot 参照 Western blot 试剂盒说明书进行, 一抗为利用纯化的 Vip3A 蛋白制备的抗兔血清^[41]。

1.6 生物测定

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 由本实验室养虫室提供。按照文献 [18] 对初孵幼虫进行生物测定, 利用本实验室研制的昆虫毒力测定分析软件^[19] 对生物测定结果进行分析。

2 结果和分析

2.1 重组质粒 pHVP20 的构建

pWF45 质粒经 *Sma* I / *Sal* I 双酶切后产生 6.6kb 和 4.1kb 两个片段, 将回收的 4.1kb 片段与同样双酶切的 pUC19 载体相连, 构建的重组质粒命名为 pUF45, 大小为 6.8kb; 回收 2.1kb *Bam* H I / *Sal* I 片段, 再次连接经同样双酶切的 pUC19 载体上得到 4.8kb 大小的重组质粒 pUP20; 回收 pHPT3 质粒经 *Sal* I / *Sph* I 双酶切后产生的 3.5kb 片段, 连接至 pUP20 质粒 4.8kb 片段的 *Sal* I / *Sph* I 双酶切片段上, 得到 8.3kb 的重组质粒命名为 pUVP20; 回收 pUVP20 质粒的 5.6kb *Kpn* I / *Sph* I 酶切片段, 与 6.6kb 的 pHT3101 穿梭载体连接, 得到的重组质粒为 pHVP20。重组质粒 pHVP20 的酶切鉴定如图 1-A 所示, pHVP20 经 *Kpn* I 和 *Sph* I 双酶切后产生

6.6kb 的载体和 5.6kb 的目的片段。该质粒与仅携带 *vip3A* 基因的 pHPT3 质粒相比, 在 *vip3A* 基因的上游增加了在 *cry1Ac* 强启动子控制下的 *p20* 基因 (图 1-B)。

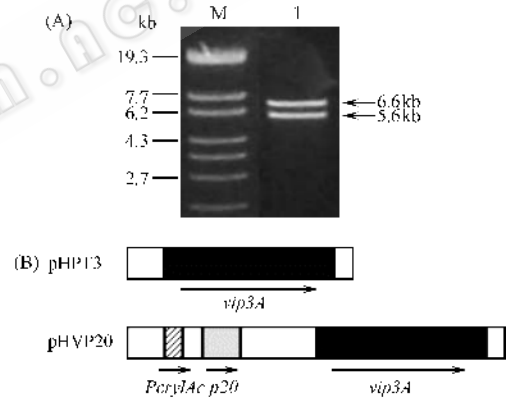


图 1 (A) 重组质粒 pHVP20 的酶切分析 (B) 重组穿梭质粒的物理图谱

Fig. 1 (A) Restriction analysis of the recombinant plasmid PHVP20 (B) The physical maps of the recombinant shuttle plasmids
M, λ-EcoT14I DNA marker; 1, pHVP20 / *Kpn* I + *Sph* I.

2.2 vip3A 基因在 CryB (pHPT3) 和 CryB (pHVP20) 中的表达

将重组表达质粒 pHPT3 和 pHVP20 电激转化至不含 *vip3A* 基因的 Bt 无晶体突变株 CryB 中, 转化子在 100mL TB 培养基中进行培养, 分别在 10h, 12h, 14h, 16h, 20h, 24h, 36h, 40h, 44h, 48h 和 60h 取样, 并对菌体沉淀浓缩 12 倍进行 Western blot 分析。结果表明 87.7kDa 的 Vip3A 蛋白在 CryB (pHPT3) 12h 的菌体沉淀中已开始检测到, 24h 其表达量达到最大 (图 2-A); Vip3A 蛋白在 CryB (pHVP20) 10h 的菌体沉淀中开始检测到, 在 48h 时表达量达到最大 (图 2-B)。在 10h 时, 重组菌株的整个培养期和培养后期

Vip3A 也维持较高水平的表达 (图 2)。

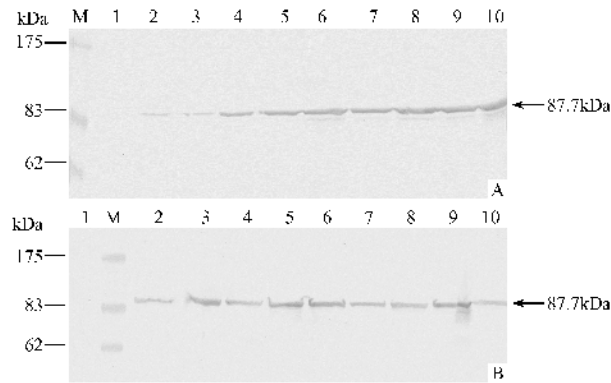


图 2 Vip3A 在 CryIc pHPT3 和 CryIc pHVP20 中表达时相的 Western blot 分析

Fig.2 Western blot analysis of Vip3A proteins in concentrated cell pellets of CryIc pHPT3 (A) and CryIc pHVP20 (B) cultures against the Vip3A antiserum

Lane M: prestained protein marker; Lane 1: cell pellet of 17h of CryB (pHT3101). For (A), Lanes 2 ~ 10 correspond to cell pellets of 12h, 14h, 16h, 20h, 24h, 36h, 40h, 48h and 60h of CryIc pHPT3. For (B), Lanes 2 ~ 10 correspond to cell pellets of 10h, 12h, 14h, 16h, 20h, 24h, 36h, 48h and 60h of CryIc pHVP20.

2.3 Vip3A 蛋白在 Bt 重组菌株沉淀物中表达量的比较

用软件 ImageMaster VDS 分析比较 Vip3A 蛋白在 CryIc pHPT3 和 CryIc pHVP20 重组菌株中的最大表达量,发现 Vip3A 蛋白在 CryIc pHVP20 菌株中的最大表达量约是在 CryIc pHPT3 中最大表达量的 1.5 倍。

2.4 生物测定

用 CryIc pHPT3 和 CryIc pHVP20 菌株最大表达量时的上清液和浓缩的菌体对斜纹夜蛾初孵幼虫进行生测,结果表明,重组 Bt 菌株没浓缩的上清液对试虫均无杀虫活性;CryB (pHPT3) 和 CryB (pHVP20) 菌株浓缩的菌体对斜纹夜蛾均具有较高的杀虫活性,其 LC_{50} 值分别为 $78\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $48.79\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 2)。

表 2 重组 Bt 菌株对斜纹夜蛾初孵幼虫的毒力测定

Table 2 Toxicity of Bt recombinant strains against the first instar larvae of *Spodoptera litura**

Bt strains	LC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Regression equation	95% fiducial limits ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
CryIc pHPT3	78.00	$y = 2.6714 + 1.2307x$	47.78 ~ 127.32
CryIc pHVP20	48.79	$y = 2.3632 + 1.5618x$	31.90 ~ 74.63
CryIc pHPT3101	NA	NA	NA

* Toxicity treatment was replicated three times with 30 first instar larvae each time. Mortality was recorded after 72h of incubation. NA, no activity.

3 讨论

Vip3A 蛋白是 Bt 菌株在营养期生长阶段分泌的一类新型的杀虫蛋白。在本研究中, CryIc pHPT3 菌株的培养上清和菌体中均检测到了相同分子量大小的 Vip3A 蛋白的表达,而且表达产物大都在菌体沉淀中^[5],该现象表明来自于 S184 菌株的 Vip3A 蛋白是一种分泌蛋白,虽然其 N 端存在信号肽序列,但缺少信号肽酶作用位点,因此 Vip3A 在跨膜易位时不进行 N 端信号肽的加工,这种情况在 G^+ 细菌中比较少见^[3]。为了便于比较 Vip3A 在各 Bt 重组菌株中的表达量和杀虫活性的差异,以后 Western blot 和生物测定均使用 Bt 菌株的沉淀进行分析。

辅助蛋白 P20 可以促进 Bt 菌株中某些晶体蛋白的合成^[7-13],甚至对 Cyt1A 蛋白的大量表达和晶体形成是必需的^[7]。Mclean 等^[20]和 Visik 等^[21]发现 P20 不是在杀虫晶体蛋白的转录水平上起作用,而是通过与正在合成的新生肽结合发生作用的。该研究将 *p20* 基因与 *vip3A* 基因在 Bt 中共表达,分析了辅助蛋白 P20 对营养期杀虫蛋白 Vip3A 蛋白表达量和杀虫活性的影响。Western blot 结果表明, Vip3A 蛋白在 CryIc pHPT3 菌株的第 12h 培养液开始表达, 24h 的表达量达到最大,整个芽孢期和芽孢后期也维持较高水平的表达(图 2-A)。当 *vip3A* 基因和 *p20* 基因在 Bt 中共表达时,在 CryIc pHVP20 的菌株 10h 的培养液中已经检测到 Vip3A 蛋白的表达, 48h 表达量达到最大,约是 CryIc pHPT3 最高表达量的 1.5 倍(图 2-B),这可能是由于 P20 通过与芽孢期正在形成的 Vip3A 新生肽结合,增加了 Vip3A 蛋白的稳定性,从而保护或减缓了 Vip3A 被 Bt 的蛋白酶快速降解造成的;P20 对营养期表达的 Vip3A 合成没有促进作用,这与 P20 利用 *Cry1A* 的启动子仅在芽孢期进行合成的现象一致。生物测定结果表明 CryIc pHPT3 和 CryIc pHVP20 对斜纹夜蛾初孵幼虫的毒力没有显著性差异(表 2),这是由 Bt 重组菌株的菌液浓度计算获得的结果,但若从 Bt 重组菌株对鳞翅目昆虫致死的菌液体积角度考虑,后者的杀虫活性要高于前者[CryIc pHVP20 最大表达量的浓度约是 CryIc pHPT3 最大表达量的 2 倍]。总之,芽孢期合成的 P20 蛋白可以促进 *vip3A* 基因在 Bt 中的表达,但对 Vip3A 蛋白的杀虫毒力没有显著性帮助。

Vip3A 和 Bt 的其它 ICPs 没有任何的序列同源性而且它们的杀虫作用机理也不同^[3,6],利用 Bt 中的辅助蛋白 P20 或其它辅助蛋白提高 Vip3A 的表达

量,这样构建的工程菌株对于提高 ICPs 蛋白的杀虫活性和克服昆虫对 ICPs 产生的抗性等方面均具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(3): 775 - 806.
- [2] 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990. 306 - 307.
- [3] Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(11): 5389 - 5394.
- [4] 陈建武, 唐丽霞, 汤慕瑾, 等. 苏云金杆菌 vip3A 基因的克隆、表达及杀虫活性分析. *生物工程学报*, 2002, **18**(6): 687 - 692.
- [5] Chen JW, Sun F, Tang LX, et al. Expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminally truncated vip184 gene in an acrySTALLIFEROUS strain of subspecies *kurstaki*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2003, **19**(9): 883 - 889.
- [6] Yu CG, Mullis MA, Warren GW, et al. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(2): 532 - 536.
- [7] Wu D, Federici BA. A 20-kDa protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol*, 1993, **175**(16): 5276 - 5280.
- [8] Wu D, Federici BA. Improved production of the insecticidal CryIVD protein in *Bacillus thuringiensis* using cry1Ac promoters to express the gene for an associated 20-kDa protein. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **42**(5): 697 - 702.
- [9] Yoshisue H, Yoshida K, Sen K, et al. Effect of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 20 kD protein on production of the Bti 130 kD crystal protein in *Escherichia coli*. *Biophys Biotechnol Biochem*, 1992, **56**(9): 1429 - 1433.
- [10] Ge B, Bideshi D, Moar WJ, et al. Differential effects of helper proteins encoded by the cry2A and cry11A operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **165**(1): 35 - 41.
- [11] 汤慕瑾, 袁美姝, 陈建武, 等. 苏云金杆菌辅助蛋白 P20 对杀虫晶体蛋白 Cry1Ab 表达的影响. *生物工程学报*, 2003, **19**(5): 566 - 571.
- [12] Shao ZZ, Liu ZD, Yu ZN. Effects of the 20-kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(12): 5362 - 5369.
- [13] Park HW, Bideshi DK, Federici BA. Molecular genetic manipulation of truncated Cry1C protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improved stability and yield. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(10): 4449 - 4455.
- [14] Lee HK, Gill SS. Molecular cloning and characterization of a novel mosquitocidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(12): 4664 - 4670.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] Estruch JJ, Yu CG, Warren GW, et al. Class of proteins for the control of plant pests. World Intellectual Property Organization Patent. 2000, WO 6107279.
- [17] Wu D, Johnson J, Federici BA. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*, 1994, **13**(6): 965 - 972.
- [18] 曾晓慧, 张宏宇, 喻子牛, 等. 苏云金芽孢杆菌对甜菜夜蛾幼虫毒力的生物测定方法. *中国生物防治*, 1998, **14**(4): 172 - 175.
- [19] 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**(3): 39 - 43.
- [20] McLean KM, Whiteley HR. Expression in *Escherichia coli* of a cloned crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol*, 1987, **169**(3): 1017 - 1023.
- [21] Visick JE, Whiteley HR. Effect of a 20-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on production of the CytA protein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991, **173**(5): 1748 - 1756.

Effects of helper protein P20 from *Bacillus thuringiensis* on Vip3A expression

SHI Yong-xia^{1,2}, YUAN Mei-jin¹, CHEN Jian-wu¹, SUN Fan¹, PANG Yi^{1*}

[¹ State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan (Sun Yat-sen) University, Guangzhou 510275, China]

[² Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China]

Abstract: Insecticidal crystal proteins (ICPs) produced in *Bacillus thuringiensis* accumulate as crystalline inclusions that represent up to 30% of total dry weight the cell produces. The mechanisms of *in vivo* crystallization of these insecticidal proteins remain interests, yet unclear. A 20-kDa protein (P20), the product of the third open reading frame of cry11A operon in *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* has been defined to be an important molecular chaperone (helper protein) for forming Cyt1A crystal and enhancing Cry11A expression. The novel vegetative insecticidal proteins (VIPs) are

secreted outside the cell of *B. thuringiensis* during mid-logarithmic growth. VIP3A shows activity against many lepidopteran insect larvae in a different mechanism from that of ICPs. To investigate the influence of helper protein P20 on Vip3A production and its insecticidal activity, P20 was coexpressed with Vip3A protein in *B. thuringiensis* and the yields and insecticidal toxicity of Vip3A were also analyzed. The recombinant plasmid pHVP20 was constructed by inserting a 5.4kb foreign fragment containing both *vip3A* gene and *p20* gene into the shuttle vector pHT3101. The plasmid pHPT3 only containing *vip3A* gene was used as control. pHVP20 and pHPT3 were transformed into the *B. thuringiensis* acrySTALLIFEROUS strain CryB not containing *vip3A* gene by electroporation. The obtained *B. thuringiensis* transformants were CryB (pHVP20) and CryB (pHPT3) respectively. Western blot showed that Vip3A protein reached its maximum yield after 48h of CryB (pHVP20) growth and remained high expression level during the sporulation. The maximum yield of Vip3A protein in CryB (pHVP20) was about 1.5 fold as compared with that in CryB (pHPT3) by the mean of ImageMaster VDS software. It is considered that P20 might combine with the native Vip3A protein during the sporulation, stabilize Vip3A and protect Vip3A from unspecific full proteolysis. Bioassay showed that the cell pellets of CryB (pHVP20) and CryB (pHPT3) performed high insecticidal toxicity against the first instar larvae of *Spodoptera litura*. Their LC_{50} s of were 48.79 μ g/mL and 78.00 μ g/mL respectively and were not significantly different. Cell supernatants of two strains containing small amounts of secreted Vip3A were not toxic to the tested insect. It suggests that *p20* can enhance the expression of Vip3A, but not improve its insecticidal toxicity remarkably.

Keywords : *Bacillus thuringiensis* ; Helper protein P20 ; The vegetative insecticidal protein ; Bioassay

Foundation item :Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G2000016209) ; Natural Science Foundation of Guangdong Province

* Corresponding author. Tel : 86-20-84113860 ; Fax : 86-20-84037472 ; E-mail : ls12@zsu.edu.cn

Received : 16 May 2005 / Accepted : 15 July 2005 / Revised : 11 July 2005