

苏云金芽孢杆菌 Cry1Aa 和 Cry1Ca 结构域交换 对晶体形态和杀虫活性影响

郭青云^{1,2} 蔡全信¹ 韩 蓓^{1,2} 袁志明^{1*}

(¹ 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(² 中国科学院研究生院 北京 100039)

摘 要 通过体外重组的方法,实现了苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白 Cry1Aa 和 Cry1Ca 的功能性结构域 I、II 和 III 的互换,得到了 6 株苏云金杆菌重组菌株 BT-ACC、BT-AAC、BT-ACA、BT-CAA、BT-CCA 和 BT-CAC。SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明,重组菌株 BT-CAA 和 BT-CCA 能表达产生 135kDa 左右的杂交晶体蛋白 Cry1CAA 和 Cry1CCA,但其蛋白表达量较野生型 Cry1Aa 和 Cry1Ca 低。用牛胰蛋白酶对杂交晶体蛋白 Cry1CAA、Cry1CCA 及野生型 Cry1Aa 和 Cry1Ca 进行消化,证明所有晶体蛋白都能产生 65kDa 的活性毒素。电镜观察发现,野生菌株 BT-Cry1Aa 和 BT-Cry1Ca 形成典型的菱形晶体,而重组菌株 BT-CCA 和 BT-CAA 则形成球形或颗粒状杂交晶体。纯化晶体的生物测定显示,杂交晶体蛋白 Cry1CAA 和 Cry1CCA 对甜菜夜蛾的毒力比野生型晶体蛋白降低 3~5 倍,对棉铃虫的毒力比野生型晶体蛋白降低了 190~260 倍。研究结果表明,苏云金杆菌晶体蛋白不同结构域的相互作用会影响杂交晶体蛋白的表达、晶体形态和杀虫活性。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; Cry1Aa; Cry1Ca; 结构域交换; 生物测定

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2006)06-0906-06

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)在芽孢形成过程中,会产生由一种或几种杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs)组成的伴孢晶体。敏感昆虫吞食芽孢/晶体混合物后,晶体蛋白在中肠碱性环境及一系列蛋白酶的作用下,原毒素降解为 60~65kDa 的激活毒素,然后结合到中肠上皮细胞的特异性位点上使细胞膜形成微孔而改变细胞的渗透性,最后细胞裂解而导致虫体死亡。Cry 类蛋白对目标昆虫具有高度特异性杀虫活性,这一特异性在很大程度上是由激活毒素与昆虫中肠上皮细胞上的毒素受体特异性结合决定的^[1]。

通过 X-ray 衍射对 3 种杀虫晶体蛋白 Cry1Aa、Cry3A 和 Cyt2A 的三维结构进行了分析。同 Cyt2A 相比,Cry1Aa 和 Cry3A 拥有相似的 3 个结构域(domain)结构域 I 包括 N-端约 200 多个氨基酸,由 7 个 α -螺旋组成,负责毒素插入到昆虫中肠上皮细胞微绒毛上和随后微孔的形成;结构域 II 主要由 3 个反向平行的 β -折叠片构成,该结构域可以和昆虫中肠刷状缘纹膜上的毒素受体相互作用,从而决定毒素的毒杀专一性;结构域 III 位于 C-端,主要由 2

个 β -折叠片组成,在某些情况下结构域 III 是决定毒杀专一性的一个重要因素^[2,3]。但有关 Cry 晶体蛋白结构和功能间的关系还有待进一步研究。

晶体蛋白的体外重组实验表明,交换结构域 III 可引起毒素蛋白同靶昆虫的特异性受体结合特性和杀虫专一性的改变^[4]。通过 Cry1Ea 与 Cry1Ca 结构域 III 交换所产生的杂交晶体蛋白 Cry1(EEA)获得了对甜菜夜蛾的杀虫活性,但 Cry1Ba 和 Cry1Ca 结构域 III 交换后获得的杂交晶体 Cry1(BBC)测对甜菜夜蛾无毒或低毒;对甜菜夜蛾和烟草天蛾有毒的 Cry1Da 和 Cry1Ca 交换结构域 III 后的杂交晶体 Cry1(DDC)失去了对两种昆虫的毒杀活性^[5,6]。另外,研究表明不同晶体蛋白结构域 I 的交换不仅影响膜穿孔的形成和膜的渗透性,影响毒素大小和稳定性,甚至导致杂交晶体蛋白杀虫活性的丧失^[7]。

随着苏云金杆菌杀虫剂的广泛应用和大量 Bt 转基因植物的出现,已发现一些害虫(如小菜蛾)对 Bt 毒素产生了抗性^[2]。所以有必要筛选出新的杀虫晶体毒素,或通过现代分子生物学技术构建出具有特异性杀虫活性的杂交晶体以延缓昆虫抗性的产

基金项目 国家自然科学基金(30270755,30470037)

* 通讯作者。Tel 86-27-87198195; Fax 86-27-87198120; E-mail: yzm@pentium.whiov.ac.cn

作者简介 郭青云(1979-),女,河南社旗县人,硕士生,主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: qingyun612@163.com

收稿日期 2006-02-20;接受日期 2006-04-06;修回日期 2006-06-28

生。本研究选用对鳞翅目昆虫高毒力的 Cry1Aa 蛋白和对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾有中等毒杀作用的 Cry1Ca 为出发晶体蛋白,采用晶体片段交换技术,进行了两晶体蛋白相应结构域的体外重组,获得了两毒素相应结构域交换的杂交晶体,并对杂交晶体的毒力、稳定性、溶解性及晶体蛋白的形态进行了研究,为深入研究毒素的结构与功能的关系和杀虫晶体蛋白的遗传改良奠定了良好的基础。

表 1 实验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study		
Strains and plasmids	Characterization	Resources
Plasmids		
pBU4	Tc ^r and Amp ^r , shuttle vector of <i>E. coli</i> and Bt	Pasteur institute
pMD-18T	Amp ^r	TaKaRa
pB1Aa	Tc ^r and Amp ^r , carried <i>cry1Aa</i> gene in pBU4	Xue <i>et al</i> , 2005
pB1Ca	Tc ^r and Amp ^r , carried <i>cry1Ca</i> gene in pBU4	Xue <i>et al</i> , 2005
pBACC	Derivative of pB1Aa substituting by DNA fragment encoding domain II and III of Cry1Ca	This work
pBAAC	Derivative of pB1Aa substituting by DNA fragment encoding domain III of Cry1Ca	This work
pBACA	Derivative of pB1Aa substituting by DNA fragment encoding domain II of Cry1Ca	This work
pBCAA	Derivative of pB1Ca substituting by DNA fragment encoding domain II and III of Cry1Aa	This work
pBCCA	Derivative of pB1Ca substituting by DNA fragment encoding domain III of Cry1Aa	This work
pBCAC	Derivative of pB1Ca substituting by DNA fragment encoding domain II of Cry1Aa	This work
Strains		
DH5α	<i>E. coli</i> strain	Lab store
CryB	Bt strain, acrySTALLiferous mutant (<i>cry</i> ⁻)	Dr. SUN Ming
BT-Cry1Aa	Bt recombinant containing plasmid pB1Aa	Xue <i>et al</i> , 2005
BT-Cry1Ca	Bt recombinant containing plasmid pB1Ca	Xue <i>et al</i> , 2005
BT-ACC	Bt recombinant containing plasmid pBACC	This work
BT-AAC	Bt recombinant containing plasmid pBAAC	This work
BT-ACA	Bt recombinant containing plasmid pBACA	This work
BT-CAA	Bt recombinant containing plasmid pBCAA	This work
BT-CCA	Bt recombinant containing plasmid pBCCA	This work
BT-CAC	Bt recombinant containing plasmid pBCAC	This work

1.1.2 酶和主要试剂:各种限制性内切酶,Taq 酶和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司,蛋白质分子量标准购自晶美生物有限公司,其它生化试剂及药品购自 Sigma 等公司。DNA 胶回收和 PCR 产物回收试剂盒购自 Omega 公司。

1.1.3 培养基:本试验采用了 LB 培养基和 G-Tris 培养基^[8]。

1.1.4 供试昆虫:供试的甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)和棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)是本所实验动物中心饲养的稳定的敏感品系,生物测定时采用初孵的幼虫进行生测。

1.2 引物设计

根据已测序的 *cry1Aa* 和 *cry1Ca* 基因序列,设计两对引物分别在 Cry1Aa 和 Cry1Ca 的结构域 I 和 II 之间的 DNA 序列上引入 *Xho* I 位点(下划线表

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本实验所用的菌株和质粒见表 1。大肠杆菌和苏云金杆菌分别在 37℃ 和 30℃ 培养。抗生素使用浓度分别为氨苄青霉素(Amp) 100mg/mL,四环素(Tc)12.5mg/mL。

示,下同):1ADImutXa:5'-CACCTACAGTTTCCCAATTAACTCGAGAAATTTATACGAACCCAG-3';1ADImutXb:5'-CTGGGTTTCGTATAAAATTTCTCGAGTTAATTGGGAAACTGTAAGTG-3';1CmutXa:5'-CAGCCAGTTGGTCAACTAACTCGAGAAGTTTATACGGACCC-3';1CmutXb:5'-GGGTCCGTATAAACTTCTCGAGTTAGTTGACCAACTGGCTG-3'。

另外设计两对引物分别在 Cry1Aa 和 Cry1Ca 结构域 II 和 III 之间的 DNA 序列上引入 *Sac* II 位点:1AD II MutXa:5'-CGTTCCGCGGTCACAAATTACAC-3';1ADIIMutXb:5'-GCTGTGACCGCGGAATTATATTATTAAATTC-3';1CDIIMutXa:5'-CAAATACAATTGATCCGCGGAGAATTAATC-3';1CDIIMutXb:5'-GATTAATTCTCCGCGATCAATTGTATTTG-3'。在两基因的下游设计了一个保守的共用引物,自身带有 *Km* I 位点,5'-

GTAAAACGACGGCCAGT-3′。为引入 *Xho* I 和 *Sac* II 位点所改变的碱基均为同义突变,所有引物都由上海博亚生物公司合成。

1.3 重组质粒的构建

目的基因片段的 PCR 扩增、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参照文献 [9]。重组基因的 DNA 测序由上海博亚生物公司完成。

1.4 苏云金杆菌的电击转化

重组基因转化 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 晶体缺陷型菌株 CryB⁻ 参照文献 [10]。转化条件:电压 2.2kV,电阻 400Ω,电容 25μF,0.2cm 的电激杯。

1.5 SDS-PAGE

重组 Bt 菌株在固体 LB 或 G-Tris 液体培养基中培养 3~4d 至芽孢释放。取等体积的发酵液离心收集菌体,用无菌去离子水重悬菌体,加入等体积的 2 倍加样缓冲液,充分混匀后在沸水中煮 5~10min,离心后取上清 15μL 点样。按常规方法在 Bio-Rad 电泳仪上进行恒流电泳,用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.6 苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的纯化分离和胰蛋白酶降解特性

采用液体双相法分离晶体^[14]。晶体采用 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃(pH 10.5)和 2% β-巯基乙醇 37℃处理 2h,加入 2%的胰蛋白酶 37℃酶解 1h,取样进行 SDS-PAGE 检测。

1.7 Western 印迹

将 SDS-PAGE 凝胶电转移至硝酸纤维素膜上,在含 5%脱脂奶粉的 TBST 中封闭 2h,用洗液 TBST 洗膜 4 次,与 Cry1Aa 的多克隆抗体即一抗孵育 2h,洗膜 4 次,加入碱性磷酸酶标记的二抗孵育 1h,洗膜 4 次,加入显色缓冲液进行显色。

1.8 显微镜观察

光学显微镜的观察:直接取孢子脱落成熟的培养物涂布于载玻片上,用碱性复红染色,以 100 倍油镜观察。电子显微镜的观察:样品的处理和晶体体积的确定参照文献 [11]。

1.9 生物测定

野生和杂交晶体蛋白对棉铃虫和甜菜夜蛾的毒性测定采用常规的生物测定方法^[12]。采用 Bradford 的方法测定纯化的野生和杂交晶体蛋白含量^[13]。然后将各样品分别稀释成 5 个浓度梯度液,以加无菌水作为对照,对甜菜夜蛾和棉铃虫初孵幼虫的毒力测定。每个浓度加入饲料至 40g 总重量,所得的混合感染液用组织搅拌器充分混匀后,倒进 24 孔组

织培养板,每孔加入健康活泼的甜菜夜蛾或棉铃虫幼虫一头,每个浓度至少测试 48 头虫,重复 3 次。利用 Probit 软件对生物测定结果进行分析。

2 结果

2.1 含不同 cry 基因片段的重组质粒的构建

根据 *cry1Aa* 和 *cry1Ca* 基因序列,设计和合成了 4 对引物,分别在两 Cry 蛋白的相应保守结构域即结构域 I 和 II,II 和 III 之间区域的 DNA 序列上引入同义突变位点 *Xho* I 和 *Sac* II。通过 PCR 的方法获得了编码两蛋白的结构域 II 区,结构域 III 区的 DNA 片段的亚克隆,分别测序验证后,采用片段交换技术进行两蛋白相应结构域互换(图 1),获得了 6 个含 *cry1Aa* 和 *cry1Ca* 两基因不同片段的重组质粒 pBACC pBAAC pBACA pBCAA pBCCA 和 pBCAC。

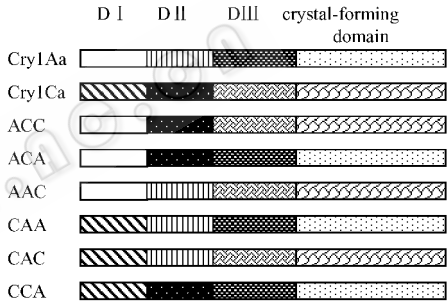


图 1 Cry1Aa 和 Cry1Ca 结构域交换示意图

Fig.1 Schematic of domain swapping between Cry1Aa and Cry1Ca.

2.2 重组基因在苏云金杆菌无晶体突变株 CryB 中的表达

将构建的 6 个重组质粒电激转化苏云金杆菌无晶体突变株 CryB,分别获得 6 株重组菌株 BT-ACC, BT-AAC, BT-ACA, BT-CAA, BT-CCA, BT-CAC。含 *cry1Aa* 和 *cry1Ca* 基因的苏云金杆菌重组菌株 BT-Cry1Aa 和 BT-Cry1Ca 在 G-Tris 培养基中能正常生

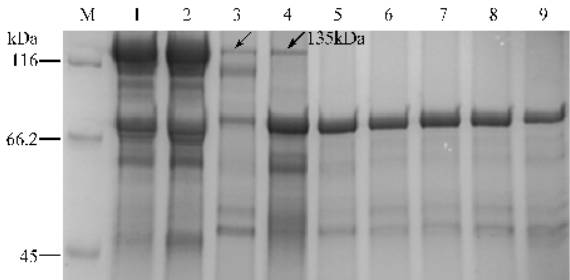


图 2 重组菌株 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of chimeric recombinant *Bacillus thuringiensis*. M. Molecular weight markers; 1. BT-Cry1Aa; 2. BT-Cry1Ca; 3. BT-CCA; 4. BT-CAA; 5. BT-CAC; 6. BT-AAC; 7. BT-ACC; 8. BT-ACA; 9. CryB.

长 ,大量表达约 135kDa 蛋白。含有不同重组基因的苏云金杆菌重组菌株在 G-Tris 培养基中能正常生长和发育 ,培养 72h 芽孢基本脱落。光镜观察发现只有重组菌株 BT-CAA 和 BT-CCA 能产生球形或颗粒状伴胞晶体。SDS-PAGE 检测表明 ,BT-CAA 和 BT-CCA 能产生 135kDa 的杂交晶体蛋白 Cry1CAA 和 Cry1CCA ,但其表达量低于野生菌株 BT-Cry1Aa 和 BT-Cry1Ca (图 2)。Western 印迹结果也证明了 BT-CAA 和 BT-CCA 菌株中杂交晶体蛋白的表达 ,但未见 BT-ACC ,BT-AAC ,BT-ACA ,BT-CAC 目的蛋白的表达 (图 3)。

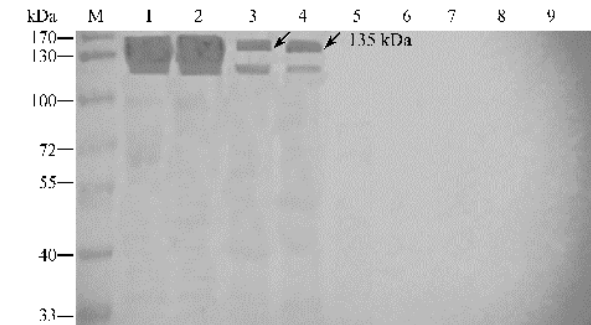


图 3 重组菌株的 Western blot 图谱

Fig. 3 Western blot analysis of chimeric recombinant *Bacillus thuringiensis*. M. Molecular weight markers ; 1. BT-Cry1Aa ; 2. BT-Cry1Ca ; 3. BT-CCA ; 4. BT-CAA ; 5. BT-CAC ; 6. BT-AAC ; 7. BT-ACC ; 8. BT-ACA 9. CryB.

2.3 重组 BT 菌株产生的杂交晶体的溶解性及胰蛋白酶降解特性

通过在 LB 或 G-Tris 培养基中连续传代培养 , BT-CAA 和 BT-CCA 的蛋白产量和晶体形态无明显变化 ,说明重组基因在 BT 中得到了稳定的表达。通过对亲本和杂交晶体胰蛋白酶降解特性的研究 ,表明野生型晶体蛋白 Cry1Aa、Cry1Ca 及杂交晶体蛋白 Cry1CAA、Cry1CCA 经 1mg/mL 的胰蛋白酶处理后 ,都可以被消化产生约 65kDa 左右的活性毒素。

2.4 电镜观察

BT-Cry1Aa 和 BT-Cry1Ca 产生典型的菱形晶体 ,而 BT-CAA 和 BT-CCA 产生球形或颗粒状的杂交晶体 (图 4)。杂交晶体的体积远远小于野生 Cry1Aa 和 Cry1Ca 晶体。

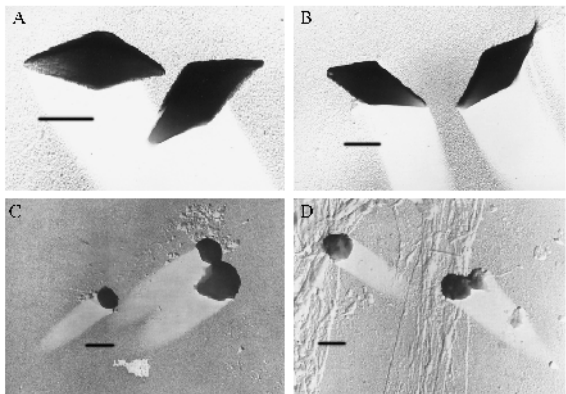


图 4 BT-Cry1Aa、BT-Cry1Ca、BT-CAA 和 BT-CCA 菌株伴胞晶体透射电子显微镜照片
Fig.4 Electron microscopy of parasporal bodies of BT-Cry1Aa ,BT-Cry1Ca BT-CAA and BT-CCA strains. A : BT-Cry1Aa(30 × 10³) ; B : BT-Cry1Ca(20 × 10³) ; C : BT-Cry1CAA(17 × 10³) ; D : BT-Cry1CCA (15 × 10³). Bar 0.2μm.

2.5 生物测定

生物测定结果表明野生 Cry1Aa 和 Cry1Ca 对棉铃虫和甜菜夜蛾都有较高毒杀作用 ,Cry1Ca 对甜菜夜蛾的毒力比 Cry1Aa 高 ,对棉铃虫的毒力比 Cry1Aa 低 ,但两者毒力无显著性差异 (表 2)。杂交晶体蛋白 Cry1CAA 和 Cry1CCA 对两种供试昆虫的毒力较低 ,对棉铃虫的毒力分别比 Cry1Aa 和 Cry1Ca 的毒力下降 260 倍和 190 倍 ,对甜菜夜蛾的毒力也分别下降了 3 ~ 4 倍和 4 ~ 5 倍。同时 ,在生物测定中 ,我们还观察到 Cry1CAA 和 Cry1CCA 蛋白同野生 Cry1Aa 和 Cry1Ca 一样具有抑制甜菜夜蛾和棉铃虫幼虫生长作用。

表 2 杂交晶体蛋白 Cry1CAA 和 Cry1CCA 及野生 Cry1Aa 和 Cry1Ca 对甜菜夜蛾和棉铃虫初孵幼虫的生物测定结果				
Table 2 Toxicity of Cry1CAA , Cry1CCA , Cry1Aa , Cry1Ca against the first instar of <i>Spodoptera exigua</i> and <i>Helicoverpa armigera</i>				
Toxin	Insect species	Toxicity(μg/mL)(95% FL)		
		LC ₅₀	LC ₉₀	
Cry1Aa	<i>Spodoptera exigua</i>	336.3 (247.2 – 514.2)	2867 (1481 – 8616)	
	<i>Helicoverpa armigera</i>	4.619 (3.227 – 6.999)	34.33 (18.17 – 111.4)	
Cry1Ca	<i>Spodoptera exigua</i>	280.7 (203.3 – 435.8)	3136 (1515 – 10850)	
	<i>Helicoverpa armigera</i>	5.326 (3.354 – 9.949)	79.90 (29.84 – 745.7)	
Cry1CAA	<i>Spodoptera exigua</i>	1463 (1014 – 2796)	8164 (3860 – 362910)	
	<i>Helicoverpa armigera</i>	1282 (872.3 – 2409)	8646 (3889 – 54530)	
Cry1CCA	<i>Spodoptera exigua</i>	479.0 (351.0 – 719.0)	5371 (2673 – 17450)	
	<i>Helicoverpa armigera</i>	927.3 (663.5 – 1438)	5124 (3889 – 54530)	

3 讨论

苏云金杆菌产生的 CryI 类蛋白对鳞翅目害虫具有特异性毒杀作用,该类蛋白具有很高的氨基酸同源性和相似的三维结构^[1,3]。大量的研究数据表明,CryI 类毒素之间的结构域交换可以改变毒素的杀虫谱、影响原毒素的结构、稳定性和晶体的形成,甚至影响整个毒素的毒力^[4~7,15]。本文的研究结果表明,通过片段交换技术构建的重组菌株 BT-ACC、BT-AAC、BT-ACA、BT-CAA、BT-CCA 和 BT-CAC 中,仅有 BT-CAA、BT-CCA 能表达形成杂交晶体蛋白 Cry1CAA 和 Cry1CCA,但其表达量较低。同时,SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果都显示,BT-CAA 和 BT-CCA 除表达产生分子量约为 135kDa 的 Cry1CAA 和 Cry1CCA 蛋白外,还产生 120kDa 左右的蛋白带,DNA 序列分析未发现 2 个开放阅读框存在,可能是 mRNA 的翻译提前终止所致,也可能是蛋白降解所致,但详细的机制还有待进一步研究。

电镜观察表明,重组菌株 BT-CAA 和 BT-CCA 表达聚集形成球形或颗粒状的杂交晶体,晶体形态同典型的 Cry1Aa 和 Cry1Ca 菱形晶体不同。这可能是由于 CryI 类蛋白上的半胱氨酸残基形成的链间二硫桥在协助该类蛋白聚集形成晶体(包涵体)的过程中起重要的作用,结构域交换后,晶体中蛋白的排列方式和链间二硫桥的排列方向都有可能发生改变,造成原毒素三维结构的改变,导致晶体形态的差异。

生物测定结果显示,杂交晶体蛋白 Cry1CCA 和 Cry1CAA 对棉铃虫和甜菜夜蛾幼虫的毒力较野生型 Cry1Aa、Cry1Ca 的毒力有很大降低。Cry1CAA 由 Cry1Ca 的结构域 I 和 Cry1Aa 的结构域 II 和 III 组成,理论上,Cry1CAA 具有和 Cry1Aa 一样的受体识别位点,毒力也相当。但事实上,Cry1CAA 对两种靶昆虫的毒力下降最为急速,这可能是 Cry1Ca 的结构域 I 与 Cry1Aa 的结构域 II 的相互作用影响了毒素的三维结构,进而影响毒素与昆虫中肠刷状缘纹膜上毒素受体的结合,导致毒力的大量丧失。同样 Cry1CCA 包含 Cry1Ca 的结构域 I、II 和 Cry1Aa 的结构域 III,理论上,Cry1CCA 具有和 Cry1Ca 一样的受体识别位点,但由于 Cry1Ca 的结构域 III 在决定对甜菜夜蛾的毒杀专一性方面起重要作用,因此,Cry1CCA 对甜菜夜蛾的毒力将会降低。生物测定结果也证明,Cry1CCA 对甜菜夜蛾的毒力下降了 3~4

倍。这一方面验证了 Cry1Ca 结构域 III 的重要作用,另一方面也说明 Cry 蛋白的功能性结构域的相互作用在毒素与受体的识别和结合,及毒素的杀虫谱等方面的重要作用。但有关 CryI 类蛋白结构和功能间的关系还有待进一步研究,对其结构和功能关系的了解将有利于今后对该类蛋白的遗传改良。

参 考 文 献

- [1] Schnepf E, Crickmore N, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Rev*, 1998, **62**:775-806.
- [2] Yamamoto T. One Hundred Years of *Bacillus thuringiensis* Research and Development: Discovery to Transgenic Crops. *J Insect Biotechnol Sericol*, 2001, **70**:1385-1408.
- [3] Grochulski P, Masson L, Cygler M, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel. *J Mol Biol*, 1995, **254**:447-464.
- [4] Lee MK, Young BA, Dean DH. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin affect binding to different Gypsy moth midgut receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **226**:306-312.
- [5] Ruud A, de Maagd RA, Bosh MD, et al. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all Cry1-Cry1C hybrids. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **60**:1559-1563.
- [6] Karlova R, Ruud A, de Maagd RA, et al. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac domain III enhances activity against *Heliothis virescens* in some, but not all Cry1-Cry1Ac hybrids. *J Invertebr Pathol*, 2005, **88**:169-172.
- [7] Rang C, Vachon V, Frutos R, et al. Exchange of domain I from *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins influences protoxin stability and crystal formation. *Curr Microbiol*, 2001, **43**:1-6.
- [8] Arvidson H, Dunn PE, Strnad S, et al. Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae: factors involved *in vivo* and in the structure of a purified protoxin. *Mol Microbiol*, 1989, **3**:1533-1543.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [10] 李林,邵宗泽,喻子牛.电脉冲法转化苏云金芽孢杆菌 BMB171 的研究.微生物学通报,2000, **27**(5):331-334.
- [11] Shao ZZ, Liu ZD, Yu ZN. Effects of the 202kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**:5362-5369.
- [12] 钟连胜.棉铃虫作供试昆虫的苏云金杆菌制剂生物测定的研究.生物防治通报,1990, **6**(增刊):1-5.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248-254.

- [14] 王 瑛, 白 成, 温 洁. 苏云金杆菌晶体与芽孢分离的研究. 微生物学报, 1980, 20(3): 285–288.
- [15] Ballester V, Granero F, Ferre J, et al. Role of *Bacillus thuringiensis* toxin domains in toxicity and receptor binding in diamondback moth. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 1900–1993.
- [16] Xue JL, Cai QX, Yuan ZM, et al. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1c from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. *Lett Appl Microbiol*, 2005, 40: 460–465.

Domain swapping of Cry1Aa and Cry1Ca from *Bacillus thuringiensis* influence crystal formation and toxicity

GUO Qing-yun^{1,2}, CAI Quan-xin¹, HAN Bei^{1,2}, YUAN Zhi-ming^{1*}

(¹ Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: *Bacillus thuringiensis* has been successfully used for agricultural pest and medical insect control with its significant benefits based on environmental and safety considerations. However, the deficiency of this pesticide, such as limited spectrum of insecticidal activity, low toxicity to the targets and the inducement of insect resistance, results in the urgent need to exploit new resources of *B. thuringiensis* or to modify known strains by genetic engineering. In this study, six recombinant *Bacillus thuringiensis* BT-ACC, BT-AAC, BT-ACA, BT-CAA, BT-CCA and BT-CAC were constructed through the domain swapping between crystal protein Cry1Aa and Cry1Ca. SDS-PAGE and Western blot revealed that only the recombinant BT-CAA and BT-CCA produced a 135kDa chimeric protein Cry1CAA and Cry1CCA respectively, but the production level was lower than the native protein Cry1Aa and Cry1Ca. These chimeric crystal proteins could be activated by trypsin, giving a 65kDa protease-resistant core toxin as the native crystal proteins Cry1Aa and Cry1Ca. Electron microscopy study indicated that the two chimeric proteins could be produced and accumulated as spherical or granules crystals during sporulation of BT-CAA and BT-CCA, whereas native Cry1Aa and Cry1Ca were accumulated as bipyramidal crystals. Unexpectedly, the toxicity of purified chimeric crystal proteins Cry1CAA and Cry1CCA was 3~5 times lower to *Spodoptera exigua*, and 190~260 times lower to *Helicoverpa armigera* than that of native Cry1Aa and Cry1Ca. These data suggested that the domain swapping of different crystal proteins might influence the formation and toxicity to targets of chimeric crystal proteins.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Cry1Aa; Cry1Ca; Domain swapping; Bioassay