

苏云金芽胞杆菌 *cry1Ac* 与烟草几丁质酶 *tchiB* 双价基因 克隆表达及其杀虫增效作用研究

丁学知^{1,2}, 罗朝晖¹, 夏立秋^{1*}, 高必达^{2*}, 孙运军¹

(¹湖南师范大学生命科学学院 微生物分子生物学湖南省重点实验室 长沙 410081)

(²湖南农业大学生物安全科学技术学院 长沙 410128)

摘 要 将苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) 4.0718 菌株质粒上的 *cry1Ac* 基因和烟草几丁质酶 *tchiB* 基因(去掉信号肽或去信号肽再加肠激酶位点)构建了重组基因。经过双酶切和亚克隆,将带有 *cry1Ac* 基因上游启动序列和下游终止序列的重组基因片段克隆至穿梭载体 pHT315,分别构建重组质粒 pHUAccB6、pHUAccB7,在大肠杆菌中扩增后,将两个重组质粒分别电转化苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 XBU001 中,获得重组菌株 HAccB6 和 HAccB7。经液体双相胞晶分离提取离心后,将晶体和上清液分别进行 SDS-PAGE 分析,双价基因重组与 *cry1Ac* 基因在无晶体突变株中表达量相比较,几丁质酶活性提高 5.2 倍,双价重组蛋白表达量显著提高,主要产生 130kDa 蛋白条带。经定量分析,双价重组目的晶体蛋白占总蛋白量的 61.38%, *Cry1Ac* 蛋白占总蛋白量的 42%。发酵上清液经 60% 硫酸铵沉淀,显示出一条分子量为 18kDa 新蛋白条带。经原子力显微镜和电子显微镜观察,表达后的重组蛋白呈菱形或椭原形晶体,其规格约为 $1.5 \times 3.0 \mu\text{m}$ 。经生测分析,重组菌株 HAccB6 和 HAccB7 毒力相近,与 HAc 菌株比较毒力提高 4.5 倍,对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)具有高效杀虫活性,其 3d LC_{50} 值分别为 $9.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $11.34 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。研究结果表明,烟草几丁质酶与 *cry1Ac* 双价基因重组表达产物具有杀虫增效作用。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; *cry1Ac* 基因; *tchiB* 基因; 原毒素; 电转化; 杀虫增效作用

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)06-1002-07

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)的伴胞晶体蛋白对鳞翅目(*Lepidoptera*)等多种害虫具有毒杀作用,其作用因子主要是 Bt 杀虫晶体蛋白,以其高效安全、对目标害虫的特异性而倍受人们青睐,已成为世界上应用最广泛的微生物杀虫剂。但是 Bt 杀虫剂存在杀虫谱较窄、稳定性较差和残效期较短的弊端。现有试验表明蔬菜害虫小菜蛾(*Plutella xylostella*)在 Bt 选择压力下抗性增强,从而限制了 Bt 杀虫剂更广泛的应用。解决这些问题的一个重要方法就是将 2 个或 2 个以上不同类型的杀虫基因同时导入细胞,构建高效、广谱的重组杀虫蛋白和重组 Bt 工程菌株。能在很大程度上使害虫产生耐受性的机率大大降低,克服 Bt 杀虫剂使用中存在的杀虫谱窄、易产生抗性等问题,对提高 Bt 制剂的毒力和速效性有着重要的意义。

几丁质(Chitin)是昆虫中肠围食膜和体壁的主

要结构成分^[1],人们相继发现多种微生物(如粘质沙雷氏菌 *Serratiamarcescens*)与烟草的提取液能够降解几丁质,原因是这些生物能够产生胞外或胞内几丁质酶(chitinase)。几丁质酶可以破坏生物体的重要结构或器官组织,能分解作为昆虫的中肠围食膜、上皮,破坏幼虫这道天然屏障,使病毒、细菌等更容易侵入幼虫体内,引起幼虫死亡。已有研究发现,Bt 制剂中添加微量的几丁质酶防治森林害虫云杉卷叶蛾效果十分明显^[2],其后在核型多角体病毒(NPV)制剂中添加 1% 的几丁质酶防治舞毒蛾 14 天幼虫的死亡率达 50%,而单独使用 NPV 制剂需要 21 天才能达到 50%^[3]。近年来有人已经在 Bt 的肯尼亚亚种^[4]和巴基斯坦亚种^[5]克隆得到了几丁质酶基因,Regev^[6]等利用在 *E. coli* 中重组表达 *S. marcescens* 几丁质酶基因和杀虫基因蛋白 *cry1C* 以提高 Bt 的 δ -内毒素对甜菜夜蛾的毒性。Wiwat 等^[7]从

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA02Z187, 2006AA10A212); 国家自然科学基金(30670052); 湖南省自然科学基金重点项目(06JJ2009); 农业部农作物病虫害生物防治重点实验室开放基金(LOBCR)

* 通讯作者。¹ Tel 86-731-8872599, xialq@hunnu.edu.cn; ² Tel 86-731-4618163, E-mail: bjdgao@yahoo.com.cn

作者简介: 丁学知(1954-),女,湖南津市人,博士,教授,主要从事微生物生物化学与分子生物学研究。E-mail: dxz963@tom.com

其他作者: 付祖姣¹, 刘飞¹, 胡胜标¹, 莫湘涛¹, 张友明¹

收稿日期: 2007-04-20, 接受日期: 2007-06-15, 修回日期: 2007-09-05

150 多个 Bt 菌株中筛选出几丁质酶高产菌株 HD-1(G), 以小菜蛾为生测对象, 发现与不产生几丁质酶 Bt 菌株作对照, HD-1(G) 的杀虫活性比对照菌株高近 10 倍。

随着对微生物几丁质酶研究的深入, 人们越来越认识到几丁质酶能增进对害虫的毒杀效果, 但有关烟草几丁质酶基因与 Bt *cry1Ac* 基因重组表达产物的杀虫增效作用研究迄今未见报道。本研究利用 Bt *cry1Ac* 基因与烟草几丁质酶 *tchiB* 基因以不同

方式的重组构建复合杀虫基因是延缓对鳞翅目等多种害虫抗性、弥补 Bt 毒蛋白的不足、提高杀虫毒力的一条有效途径, 为研制高毒力的微生物杀虫剂提供了新的基因和工程菌株资源。

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如表 1 所述。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Resource
Strains		
DH5 α	<i>E. coli</i> strain	Dr. Zhang Jian
BL21	<i>E. coli</i> strain(DH3)	Dr. Wu Xiushan
BL21(pGEX-chi)	BL21 contain the pGEX-chi plasmid	This work
Bt 4.0718	Bt strain wild type(CCTCC No. M200016)	Lab store
XBU001	Bt acrySTALLIFEROUS strain	Lab store
UAccB19	DH5 α (pUAccB19)	This work
XBU315	XBU001(pHT315)	Lab store
HAc	XBU001(pHAc315)	Lab store
HAccB6	XBU001(pHUAccB6)	This work
HAccB7	XBU001(pHUAccB7)	This work
HUAccB6	DH5 α (pHUAccB6)	This work
HUAccB7	DH5 α (pHUAccB7)	This work
Plasmid		
pTC21	carried the <i>tchi</i> gene	Dr. Gao Bida
pUC19	Amp ^r	TaKaRa Co.
pHT315	Amp ^r and Erm ^r shuttle vector of <i>E. coli</i> and Bt	Dr. Sun Ming
pGEX-4T-1	Amp ^r <i>E. coli</i> strain expression vector	Dr. xiushan wu
pHAc315	pHT315 carried 4.2-kb fragment of <i>cry1Ac</i>	Lab Store
pUAc19	pUC19 carried 4.2-kb fragment of <i>cry1Ac</i>	Lab store
pGEX-chi	pGEX19 carried 1.2-kb fragment of <i>tchi</i> B21	This work
pUAccB19	pUC19 carried 5.2-kb fragment of fusion gene that <i>tchi</i> B21 don't have the singal proteid	Lab store
pTC21	pBluescript SK carried 1.0-kb <i>tchi</i> B fragment of <i>E. coli</i>	Lab store
pHUAccB6	pHT315 carried 5.2-kb fragment of recombinant gene that <i>tchi</i> B21 don't have the singal proteid	This work
pHUAccB7	pHT315 carried 5.2-kb fragment of fusion gene that <i>tchi</i> B21 don't have the singal but have the enterokinase	This work

1.1.2 培养基和培养条件: 大肠杆菌使用 LB 培养基, 于 37℃ 培养。Bt 使用 LB 培养基, 摇瓶培养用发酵培养基, 于 28℃ 培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: Pyrobest *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、pUC19 载体、DNA 分子量标准均为 TaKaRa 公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒为上海中科开瑞生物芯片科技公司产品; 脑心浸膏(Brain Heart Infusion, BHI)为 DIFCO 公司; 氨苄青霉素和红霉素为 Amresco 公司。PCR-5415R 仪为 Eppendorf 公司; 电转化仪 GenepulserTM 为

Bio-Rad 公司产品; 凝胶成像分析仪为美国基因公司产品; SPA-400 原子力显微镜(AFM)为日本精工公司产品; PE70 半干式电泳凝胶转移仪为 Pharmacia 公司产品。

1.2 质粒 DNA 的分离和纯化

E. coli 质粒的分离参照文献[8] Bt 质粒的分离参照文献[9]的方法。

1.3 重组质粒的扩增、构建、转化及其稳定性检验 重组质粒的构建参照文献[8]的方法。大肠杆菌的常规转化采用氯化钙法[8] 质粒转化苏云金芽

胞杆菌采用电转化法。参考文献 [10] 检测重组质粒的稳定性。

Ac+ 上-F、Ac+ 上-R 扩增带有上游启动序列的 *cry1Ac* 基因；Chb-F、Chb-R 扩增几丁质酶基因；Chb 肠-F、Ch 肠-R 扩增几丁质酶加肠激酶位点基因；Ac 下-F、Ac 下-R 扩增带有下游终止序列基因，引物序列及退火温度见表 2。

1.3.1 PCR 扩增含有上游启动序列的 *cry1Ac* 基因 按文献 [11] 的方法加以改进提取 Bt 4.0718 菌株的质粒。以提取的质粒为模板，PCR 扩增含 *cry1Ac* 基因及上游序列。

1.3.2 PCR 扩增烟草几丁质酶基因 参照文献 [8] 的方法提取 pTC21(含烟草几丁质酶基因)质粒，并以 pTC21 质粒为模板，PCR 扩增带和不带肠激酶位

点的烟草几丁质酶 *tchiB* 基因(表 2)。

1.3.3 PCR 扩增含有下游终止序列的 *cry1Ac* 基因 以 Bt 4.0718 菌株的质粒为模板，以 Ac 下-F、Ac 下-R 为引物(表 2)进行 PCR 扩增。

1.3.4 PCR 扩增重组基因 将 PCR 扩增的几丁质酶基因和 *cry1Ac* 基因的终止子片段同时纯化，经 *Nco* I 酶切后连接，以此连接产物为模板，以 Chb-F/Chb 肠-F、Ac 下-R 为引物扩增融合几丁质酶基因和下游终止子。用 *Sal* I / *Bgl* II 酶切含上游启动序列的 *cry1Ac* 基因 PCR 产物，用 *Bgl* II / *Xma* I 酶切融合几丁质酶基因和 *cry1Ac* 基因下游终止序列的 PCR 片段，连接两者。以连接物为模板，以 Ac+ 上-F、Ac 下-R 为引物进行 PCR 扩增获得重组基因。

表 2 PCR 扩增目的基因所用引物

Table 2 PCR primers of aim genes used in this study

Genes	Sequence of primer(5'→3')	Length of genes/bp	$T_m/^\circ\text{C}$	GenBank accession
Ac+ 上-F	ACGCGTCGACTTGCAGGTAATGGTTC	3926	58.0	M73248
Ac+ 上-R	GCGCAGATCTAGATTCCTCCATAAGGAGTAA			
Chb-F	GCGCAGATCTGAACAATGTGGTTCGCAG	933	60.4	M15173
Chb-R	ACGCCCGGGCAAAAACACCCCTATTAGT			
Chb 肠-F	GCGCAGATCTGATGATGATGATAAAGAACAATGTGGTTCGCAG	948	60.4	M15173
Ch 肠-R	ACGCCCGGGCAAAAACACCCCTATTAGTGCCTTTATTTTCG			
Ac 下-F	ACGCCCATGGTCTCATGCAAACCTCA	289	60.8	M73248
Ac 下-R	ACGCCCGGGCAAAAACACCCCTATTAGT			

1.3.5 重组基因表达载体的构建 构建重组基因表达载体过程中 DNA 分子技术：如酶切、连接、转化等操作均按照分子克隆手册 [8] 中介绍的方法。

1.3.6 重组基因表达载体电转化无晶体突变株 XBU001 及筛选 感受态的制备和电转化采用文献 [8] 介绍的方法。

1.4 重组蛋白的分离提取和 SDS-PAGE 检测

重组菌株 HAccB6、HAccB7 采用 Bt 发酵培养基 28℃ 振荡培养 60h，重组晶体蛋白的分离提取采用液体双相分离法 [11]，蛋白质含量测定采用 Bradford 法 [12]，然后进行 SDS-PAGE 检测，对重组蛋白的表达量进行定量分析。

1.5 免疫印迹杂交鉴定 (Western blot)

将蛋白转移至 PVDF 膜(转移条件为恒流 0.8mA/cm²，30 ~ 45min)，5% 脱脂乳封闭过夜 TBST (0.1% Tween-20) 洗涤后加入 1:50 稀释的 pGST-chi 质粒 DNA 免疫兔血清(按 1mg/只的剂量免疫新西兰大白兔，免疫间隔时间 3 周，第 3 次免疫后 5 ~ 7d 采血分离兔血清)，洗涤后加入 1:1500 倍 TBST 稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG 为二抗，DAB

显色检测 [13]。

1.6 原子力和电子显微镜观察

1.6.1 原子力显微镜观察 重组菌株 HAccB6 经发酵后的收集物，用超纯水反复洗涤数次，稀释至合适浓度并取微量悬液滴于云母片上，在超净工作台上吹干，然后进行 AFM 观察 [14]。

1.6.2 扫描电镜观察 将培养物置盖玻片上进行离子溅射，40kV 下用 J EOL2J EM 1200EX 型扫描电镜进行观察并拍照。

1.7 供试昆虫的生物活性

生测以 HAc 菌株为对照和重组菌株 HAccB6、HAccB7 经发酵纯化的菌液，分别以初孵棉铃幼虫 (*Helicoverpa armigera*) 由本室人工饲养为供试昆虫，将发酵液 170 × 60r/min 10min 收集沉淀，以一定的比例混合人工饲料生测，生测方法参照文献 [15]。

1.8 胶体几丁质的制备和几丁质酶活的测定

参照文献 [16] 制备胶体几丁质，用二硝基水杨酸法 (DNS 法) [17] 测定几丁质酶活。

1.9 序列测定

由上海生物工程技术有限公司完成测序。

序列分析采用 ORF-finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 软件。

2 结果和分析

2.1 重组基因的构建和鉴定

分别提取 Bt 4.0718 的质粒和含烟草几丁质酶基因的 pTC21 质粒,经琼脂糖凝胶电泳检测。以提取的 Bt 4.0718 菌株质粒和 pTC21 质粒为模板,分别以 Ac 上-F、Ac 上-R、Ac 下-F、Ac 下-R、ChbF、Chb R、Chb + 肠激酶上-F、Chb + 肠激酶下-R 为引物进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳显示获得了预期大小的 PCR 产物,*cry1Ac* 片段 3.90 kb,烟草几丁质酶片段 0.92kb 和终止子下游序列片段 0.30kb,回收 PCR 产物,先将烟草几丁质基因片段与 *cry1Ac* 下游终止子序列连接,再与含 *cry1Ac* 基因上游启动序列连接。以连接物为模板,以 Ac + 上-F、Ac 下-R 为引物进行 PCR 扩增,获得 5.2kb 大小的片段。

2.2 重组基因表达载体的构建

将重组基因的 PCR 产物经 *Sal* I 和 *Xma* I 双酶切,同时将质粒 pUAc19 进行相同酶切,回收 pUC19 载体片段序列,连接两者,获得重组质粒 pUAcB19,转化入 *E. coli* DH5 α 。经 *Sal* I / *Bgl* II、*Bgl* II / *Nco* I、*Nco* I / *Xma* I 酶切和测序鉴定转化子。测序结果经 Blast 分析,所克隆的 *cry1Ac* 基因的 orf 序列与 GenBank 中(Accession No. M 73248)的序列 100% 同源,与本室以前的研究结果^[18]一致。其中 *tchiB* 基因序列、下游终止序列也与预期一致,且在克隆过程中没有出现移码和突变现象。将重组质粒 pUAcB19 进行 *Sal* I 和 *Xma* I 双酶切,回收 5.21kb 带有上游启动序列和下游终止序列的重组基因片段,将其克隆进穿梭载体 pHT315 中,获得表达载体

pHUAccB6 (图 1) pHUAccB7,转化 *E. coli* DH5 α 。经蓝白斑筛选和酶切鉴定,确定表达载体 pHUAccB6、pHUAccB7 构建正确。

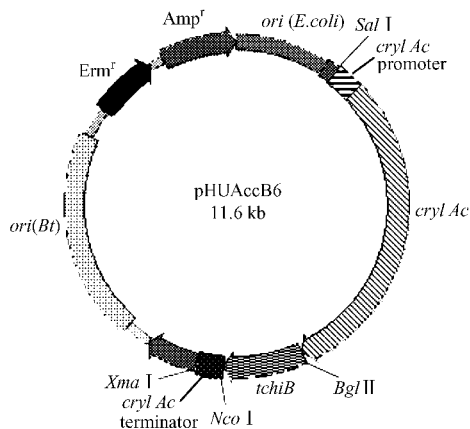


图 1 含 *cry1Ac* 和 *tchiB* 重组基因表达载体 pHUAccB6

Fig.1 Expression vector pHUAccB6 containing fusion gene of *cry1Ac* and *tchiB*.

2.3 表达载体 pHUAccB6、pHUAccB7 电转化 Bt 无晶体突变株 XBU001

将载体 pHUAccB6、pHUAccB7 电转化 Bt 无晶体突变株 XBU001 中,获得重组菌株 HAccB6、HAccB7。以 Ac-F、Ac 下-R (ChbF、Ac 下-R)为引物对转化子进行菌落 PCR 鉴定。结果显示,阳性转化子中能扩增出预期大小的 *cry1Ac*、*tchiB* 和融合基因片段,证明重组基因表达载体已转入无晶体突变株。

2.4 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

采用液体双相分离法提取重组晶体蛋白,进行 SDS-PAGE 分析。*cry1Ac* 基因编码的氨基酸为 1178 个,烟草几丁质酶基因 *tchiB* 共编码 307 个氨基酸,从理论上计算重组蛋白的分子量为 168 kDa。经 Gel-pro Analyzer 软件分析,其分子量实验值与理论

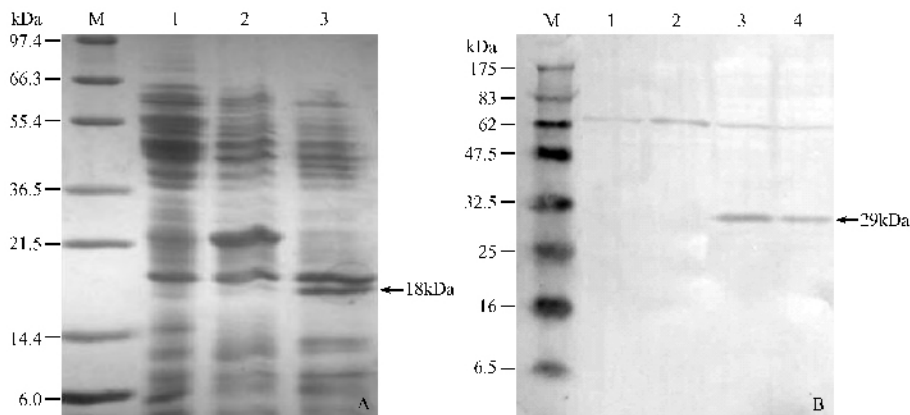


图 2 工程菌发酵上清液 SDS-PAGE 分析(A)和菌体裂解液的 Western blotting 分析(B)

Fig.2 SDS-PAGE analysis of express supernatant product of fusion gene and western blotting of transformants. M. Protein Marker;

A: 1. Supernatant product of XBU001; 2. Supernatant product of HAccB6; 3. Supernatant product of HAccB7. B: 1. Cell lysate

of XBU001; 2. Cell lysate of HAccB6; 3. Cell lysate of HAccB7; 4. Cell lysate of HAccB7. <http://journals.im.ac.cn>

值不相一致,但较对照 *cry1Ac* 有一条新的蛋白带,发酵后的上清液通过 60% 硫酸铵沉淀呈现一条分子量约为 18 kDa 的新蛋白条带(图 2-A)。双价重组蛋白的表达量占总蛋白量的 61.38%, *Cry1Ac* 蛋白占总蛋白量的 42%。

重组蛋白表达菌体裂解液经 SDS-PAGE 后再转移到 PVDF 膜上,用 *Cry1Ac* 和 *Tchi* 抗体作为一抗进行免疫印迹(Western blot)检测。结果显示,工程菌 HAccB6、HAccB7 菌株的 *Cry1Ac* 蛋白得到表达,但表现出不同程度的降解。几丁质酶抗体检测到重组 HAccB6、HAccB7 菌株相应位置出现特异性杂交带,而 XBU001 菌株和 HAc 对照菌株未出现杂交带(图 2-B)。

2.5 原子力和扫描电子显微镜观察

重组菌株 HAccB6 发酵产生的伴胞晶体蛋白经 AFM 和 SEM 观察(图 3),重组基因在重组菌中表达后依然能形成较规则的菱形晶体。

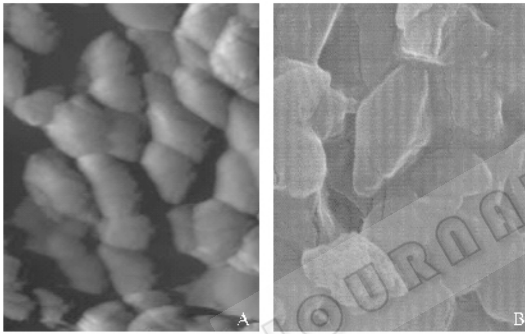


图 3 Bt 工程菌 HAccB6 晶体蛋白的原子力显微镜(A, 5000 \times)和扫描电子显微镜观察(B 20000 \times)

Fig.3 Atomic force microscopy (A 5000 \times) and SEM of crystals protein of the engineering strain HAccB6 (B 20000 \times).

表 3 Bt 工程菌对棉铃虫生测毒力分析

Table 3 Statistic analysis of virulence of the engineering strains on *Helicoverpa armigera*

Sample	LC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	95% C. I. ^a	Intercept	slope	P value
HAccB6	9.10	6.90 ~ 11.53	3.11	1.70	0.83
HAccB7	11.34	9.12 ~ 3.9914	2.89	2.20	0.94
Bt4.0718	12.95	9.93 ~ 17.13	3.03	1.89	0.74
HAc	41.22	34.07 ~ 50.03	1.28	2.30	0.83
XBU001	> > 200				

^a C. I. confidence interval.

3 讨论

本研究从 Bt 4.0718 菌株出发,该菌株基因组经 PCR-RFLP 分析,其质粒和伴胞晶体中 20kb-DNA 上含有丰富的 ICPs 基因资源,如 *cry1Ac*、*cry1Aa*、*cry2Aa*、*cry2Ab* 等基因^[18,19]。通过毒力生测实验证明该菌株对鳞翅目昆虫有很强的毒性^[20]。据文献

2.6 生测分析

生测结果表明(表 3):重组菌株 HAccB6 和 HAccB7 与对照菌 HAc 经发酵产生的晶体蛋白对棉铃虫杀虫活性进行比较,重组菌株 HAccB6 和 HAccB7 在 72h 的 LC₅₀ 值分别为 9.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 11.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其对照菌株 LC₅₀ 值为 41.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$,两株工程菌对棉铃虫的杀虫毒力分别为对照菌株的 4.529 倍和 3.635 倍(图 4)。在菌株发酵 12~48h 时,测定两重组菌株 HAccB6 和 HAccB7 几丁酶活性相近,而且是对照菌 HAc 的 5.2 倍。

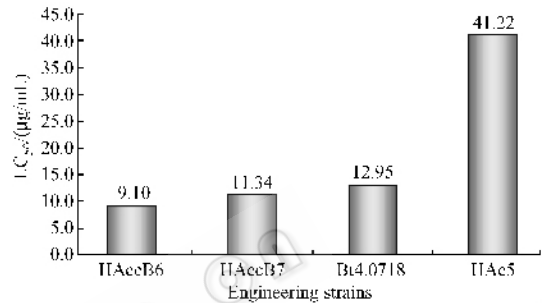


图 4 Bt 工程菌株对棉铃虫的 LC₅₀ 值

Fig.4 LC₅₀ value of the engineering strains on *Helicoverpa armigera*.

通过毒力生物测定,工程菌 HAccB6 和 HAccB7 与对照菌株 HAc 比较,对棉铃虫、小菜蛾、甜菜夜蛾、菜青虫和斜纹夜蛾杀虫时间提前 36h,致死时间由原来 48h 提前至 12h。HAccB6 和 HAccB7 对棉铃虫毒性均比 HAc 毒力高,显示出具有很好的杀虫增效作用。HAccB6 速效杀虫时间提前,可能暗示着 *Cry1Ac* 毒性核心片段和 HAccB6 的毒性核心片段识别受体蛋白的作用机制不同,提示 HAccB6 的重组蛋白毒性核心片段较 HAc 有正协同效应。

[21] 报道:*Cry1* 类晶体中 *Cry1Ac* 晶体蛋白对棉铃虫 (*Helicourpa armigera*) 和小菜蛾 (*P. xylostella*) 的毒力较高,因此本研究以该菌株质粒上的 *cry1Ac* 基因为基础进行重组基因克隆和表达的研究,试图构建一种新的高效的杀虫重组蛋白。

烟草几丁质酶基因,相对于 Bt 作为宿主菌,是一种外源毒素基因,在重组基因的表达载体的构建

上采用 pHT315 穿梭载体,在重组基因的两端保留了 *cry1Ac* 基因 5'端 ATG 上游 383bp 启动区序列和 3'端 TAG 下游 250bp 大部分终止区序列,将重组基因表达载体 pHAccB6、pHAccB7 电转化无晶体突变株 XBU001,获得重组菌株 HAccB6、HAccB7。重组基因得到表达的结果表明,*cry1Ac* 基因上游启动序列携带的 *Bt* I、*Bt* II 双启动子是适合在 *Bt* 无晶体突变株 XBU001 中表达的强启动子;*cry1Ac* 基因的下游终止子区中的茎环结构和 Poly(T)结构在转录过程中能有效终止转录并使 mRNA 更稳定;重组蛋白在表达过程中形成晶体能有效防止重组蛋白中的外源蛋白被胞内酶所降解。重组菌株发酵后的上清液呈现一条分子量约为 18kDa 的新带,至于获得重组菌株 HAccB6 和 HAccB7 有利此蛋白质的高效表达的原因,有待进一步分析研究。

根据 AFM 和 SEM 观察结果,重组菌株表达的重组蛋白依然能形成有规则的菱形晶体。由于 CryI 类晶体的形成是通过其 C 端保守区的二硫键来维持的^[22],本项研究利用 *cry1Ac* 基因构建重组基因达到维持表达产物的稳定性和形成规则的菱形晶体的目的。

Honee 等人用分别属于 *cry1Ab* 和 *cry1C* 的两个基因 *Bt* VI 和 *Bt* II 构建了一个重组基因,编码一种由这两种 *Bt* 毒蛋白的活性片段构成的重组蛋白。发现它具有杀虫活性,并且它的杀虫范围比单一的 *Bt* VI 或 *Bt* II 的杀虫范围都宽^[23]。郭三堆等人构建了 *cry1A* 基因与经过修饰的 *CpTi* 基因的高效双价杀虫基因植物表达载体 pGB121S4ABC,在棉花中获得成功表达^[24]。本研究首次将 *cry1Ac* 基因和来源于烟草的几丁质酶基因 *tchiB* 重组,并在 *Bt* 中高效表达重组晶体蛋白。当重组晶体蛋白被敏感昆虫吞食后,在肠道碱性环境下溶解,肠激酶先将重组蛋白降解,先通过其中 *Cry1Ac* 蛋白的活性区域与昆虫中肠细胞表皮膜形成离子通道或孔道,破坏细胞渗透压平衡,这可能是弱化昆虫的围食膜,使毒素更容易进入中肠上皮细胞^[25]。同时,由于几丁质酶的作用使昆虫幼虫上皮细胞中与 *Cry* 杀虫毒素分子结合的膜受体数目增加,导致昆虫厌食而亡。因此,选择几丁质酶作为增效剂来破坏几丁质结构或几丁质代谢的平衡来防治害虫,克服杀虫剂使用中存在的问题具有极大的应用潜力。从生测结果看,重组菌株表达的重组蛋白的杀虫毒力显著增高,为对照菌株毒力的 4.529 倍。几丁质酶活性显著提高,相比本室研究文献 [14] 中 *Cry1Ac* 晶体蛋白的毒力增加,呈现了

强的杀虫增效作用。几丁质酶虽然未装配进晶体包含体,重组菌株以可溶性的几丁质酶分泌到培养基中。该种重组晶体蛋白具有安全的特点;因为重组晶体蛋白在人畜消化道酸性环境中不会溶解,原毒素激活被抑制,活性毒肽不能被释放。只有在肠膜细胞膜产生“孔道”的情况下产生毒性作用。本研究为构建 *cry* 基因和外源毒素基因的重组基因以及获得更高毒力的 *Bt* 杀虫工程菌株奠定了重要基础。

参 考 文 献

- [1] Brandt CR. The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and Function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orygia pseudotsugata*. *J Invertebr Pathol*, 1978, **32**: 12-14.
- [2] Smirnov WA. Effect of chitinase on the action of *Bacillus thuringiensis*. *J Can Entomologist*, 1971, **103**: 1829-1831.
- [3] Shapiron, Preisler HK, Robertson J. Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (Lepidoptera, Lymantriidae) by chitinase. *J Economic Entomol*, 1987, **80**: 1113-1116.
- [4] Barboza-Corona JE, Nieto-Mazzocco E, Bautista M, et al. Cloning, sequence and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(2): 1023-1029.
- [5] Thamthiankul S, Suan-Ngay S, Tantimavanich S, et al. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. *Appl Micro Biotech*, 2001, **56**: 395-401.
- [6] Regev A, Keller M, Strizhov N, et al. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(10): 3581-3586.
- [7] Wiwat C, Thaithanun S, Pantuwatana S, et al. Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1(G) toward *Plutella xylostella*. *J Invertebr Pathol*, 2000, **76**(4): 270-277.
- [8] Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- [9] Kalman S, Kiehne KL, Libs JL, et al. Cloning of a novel *cry1C* type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Galleriae*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 1131-1137.
- [10] 魏芳, 孙明, 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌拟步行甲亚种质粒复制子 *ori165* 的克隆. *微生物学报*, 2002, **42**(1): 45-49.
- [11] 刘全兰, 张何, 陈宇, 等. 一种改进的提取苏云金杆菌质粒 DNA 的方法. *湖南师范大学自然科学学报*, 2001, **3**: 73-74.
- [12] Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. Protein Methods. New York: Wiley Liss Inc, 1996, **50**: 50-55.
- [13] Harlow E, Lane D. Antibodies (A Laboratory Manual). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998, 105-144.
- [14] 胡宏源, 夏立秋, 史红娟, 等. 苏云金芽胞杆菌伴胞晶体 20kb DNA 中 *cry1Ac* 基因的克隆、高效表达和生物活性研究. *生物工程学报*, 2004, **20**(5): 656-661.
- [15] 钟连胜, 谢天健, 吴继星, 等. 棉铃虫作供食虫的苏云金杆菌制剂毒力生物测定的研究. *生物防治通报*, 1990, **6**(增刊):

- [16] Sampson MN , Gooday GW. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology* , 1998 , **144** : 2189 – 2194.
- [17] 李 华 , 刘开启 , 王 革. 利用还原糖法测定木霉菌产几丁质酶特性. 仲恺农业技术学院学报 , 2003 , **16** (1) : 19 – 22.
- [18] Xia LQ , Sun YJ , Ding XZ , *et al.* Identification of cry-type genes on 20-kb DNA associated with Cry1 crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol* , 2005 **51** : 53 – 58.
- [19] 丁学知 , 刘全兰 , 莫湘涛 , 等. 苏云金芽胞杆菌 4.0718 菌株的杀虫晶体蛋白基因的分析. 微生物学报 , 2003 **43** (3) : 413 – 417.
- [20] 丁学知 , 夏立秋. 苏云金杆菌高毒力菌株 4.0718 的快速选育. 中国生物防治 , 2001 **17** (4) : 163 – 166.
- [21] Palidam M. The insecticidal crystal protein Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in highly toxic for *Heliothis armigera*. *J Invertebr Pathol* , 1992 **59** : 109 – 111.
- [22] Chang LL , Grant R , Aronson A. Regulation of the packaging of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins into inclusions. *Appl Environ Microbiol* , 2001 **67** (11) : 5032 – 5036.
- [23] Perlak FJ , Deaton RW , Armstrong TA , *et al.* Insect resistant cotton plants. *Biotechnology* , 1990 **8** : 939 – 943.
- [24] 郭三堆 , 崔洪志 , 夏兰芹 , 等. 双价抗虫转基因棉花的研究. 中国农业科学 , 1999 **32** (3) : 1 – 7.
- [25] Chen XJ , Lee MK , Dean DH. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc Natl Acad Sci* , 1993 **90** (19) : 9041 – 9045.

Cloning and expression of the *cry1Ac-tchiB* fusion gene from *Bacillus Thuringiensis* and Tobacco and its insecticidal synergistic effect

DING Xue-zhi^{1,2} , LUO Zhao-hui¹ , XIA Li-qiu^{1*} , GAO Bi-da^{2*} , SUN Yun-jun¹

(¹ College of Life Sciences of Hunan Normal University , Key Laboratory for Molecular Biology of Microorganism of Hunan province , Changsha 410081 , China)

(² College of Bio-safety Science and Technology , Hunan Agricultural University , Changsha 410128 , China)

Abstract : A new fusion gene *cry1Ac-tchiB* was constructed to enhance the toxicity of crystal proteins , the *cry1Ac* gene of *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 was combined with a *tchiB* (deleted signal peptide and Enterokinase site sequence) . In this process , the Enterokinase site sequence was inserted into the midst of these two genes . Then the combined fragment carrying the upstream promoter region and the downstream terminator region of *cry1Ac* gene were cloned into the shuttle vector pHT315 . And after a series of enzyme digestions and subclonings two new expression vector pHUAccB6 and pHUAccB7 were obtained . The two vectors were transformed into *B. thuringiensis* acrySTALLIFEROUS strain XBU001 with electroporation to obtain the recombinant strain HAccB6 and HAccB7 . The fusion gene was expressed and the expression product was detected by SDS-PAGE . The result indicated that the recombinant Cry1Ac-tchiB protein accumulated to the level of 61.38% of total bacterial proteins . Cry1Ac protein accumulated to the level of 42% of total bacterial proteins . Chitinase activities is 5.2 time more than that of the control strain . Under Atomic Force Microscopy and SEM of crystals protein there were some bipyramidal crystals with a size of $1.5 \times 3.0 \mu\text{m}$. Bioassay showed that the fusion crystals from recombinant strain HAccB6 and HAccB7 were high toxic against third-instar larvae of *Helicoverpa armigera* with the LC₅₀ (after 72h) value of $9.10 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $11.34 \mu\text{g}/\text{mL}$. The constructed fusion proteins had more toxicity than Cry1Ac crystal proteins . The study will enhance the toxicity of *B. thuringiensis* Cry toxins protein and makes a ground for constructing the fusion genes of *B. thuringiensis* cry gene and other foreign toxin genes and the recombinant strain with high toxicity .

Keywords : *Bacillus thuringiensis* ; *cry1Ac* gene ; *tchiB* ; protoxin ; electroporation ; insecticidal enhancing effect

Foundation item : National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z187 , 2006AA10A212) ; National Natural Science Foundation of China (30670052) ; Provincial Natural Science Foundation of Hunan (06JJ2009)

* Corresponding author . ¹ Tel : 86-731-8872599 , E-mail : xialq@hunnu.edu.cn ; ² Tel : 86-731-4618163 , E-mail : bdgao@yahoo.com.cn

First author : Tel : 86-731-8872298 , E-mail : lxx963@tom.com

Other authors : FU Zu-jiao¹ , LIU Fei¹ , HU Sheng-biao¹ , MO Xiang-tao¹ , ZHANG Yong-ming¹

Received : 20 April 2007 / Accepted : 15 June 2007 / Revise : 5 September 2007