

苏云金芽孢杆菌鮎泽变种 7-29 杀虫蛋白质 结构基因的改造和表达*

郭三堆 洪朝阳 王京红 王明波 俞梅敏 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心分子生物学研究室, 北京 100081)

对苏云金芽孢杆菌鮎泽变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*) 7-29 杀虫蛋白质基因调控区 (181bp) 和第五活性区 (217bp) 修饰后, 在它的 5' 端和 3' 端分别插入一个人工合成并带有启动密码子 (ATG) 的 adapter I (15bp) 和 PCR 合成并带有终止密码子 (TAA) 的第五活性区 (229bp)。使负责编码 N-端肽的 DNA 片段, 改造成既有启动翻译功能又有终止翻译功能的结构基因。经过 Western blotting 检测, 改造后的结构基因能在 *E. coli* JM 103 中正常表达。生物杀虫定性实验结果表明, 3' 端和 5' 端全改造后的杀虫基因比只改造 3' 端的杀虫基因更具有较好的杀虫活性。

关键词 苏云金芽孢杆菌鮎泽变种 7-29; 杀虫蛋白质基因; 修饰; 表达

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是一种土壤杆菌, 在形成芽孢时可产生一种对鳞翅目、双翅目及鞘翅目等幼虫具有毒杀作用的晶体蛋白质。对鳞翅目幼虫具有毒杀作用的蛋白质其分子量约为 130—140kD, 但进入幼虫中肠道被胃蛋白酶水解后, 能够起毒杀作用的杀虫肽分子量约为 60kD 左右^[1]。从杀虫基因结构与功能的研究结果表明, 这个杀虫肽位于蛋白质 N-端, 有五个不同而又高度重复的保守序列, 约占完整杀虫蛋白质分子量的一半, 而位于蛋白质 C-端的肽, 与毒杀活性无关^[2-4]。为使杀虫蛋白质具有更强的杀虫活性和更广泛的表达宿主(原核和真核细胞)范围, 近年来, 许多研究工作者用基因工程方法, 对杀虫蛋白质结构基因进行了改造。不仅使改造后的基因导入原核细胞, 获得了杀虫的大肠杆菌^[5]、枯草芽孢杆菌^[6]和假单胞菌^[7]等基因工程菌株, 而且使改造后的杀虫基因导入真核细胞^[8], 成功地得到了一批转抗虫基因植物工程植株^[9]。

苏云金芽孢杆菌鮎泽变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*) 是一株对棉铃虫、菜青虫及夜蛾科幼虫具有很强毒杀作用的菌株, 对它的杀虫蛋白质结构基因进行改造, 对研究杀虫蛋白质的结构与功能、构建杀虫工程菌、以及棉花抗虫、蔬菜抗虫等抗虫植物基因工程的研究, 都具有很大意义。本文首次报道用 PCR 方法合成杀虫蛋白质基因第五活性区, 对杀虫蛋白质结构基因的 3' 端和 5' 端进行了改造和表达的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌株和质粒

大肠杆菌 JM 103 由法国巴斯德研究所 M. M. leredus 教授赠送, pUCF 33 质粒

本文于 1990 年 11 月 1 日收到。

* 本课题属“七五”攻关及非教育系统留学回国人员择优资助课题。

本室伍宁丰同志提供了免疫抗血清, 中国科学院微生物研究所王永力同志给予合成了 adapterI, 在此一并感谢。

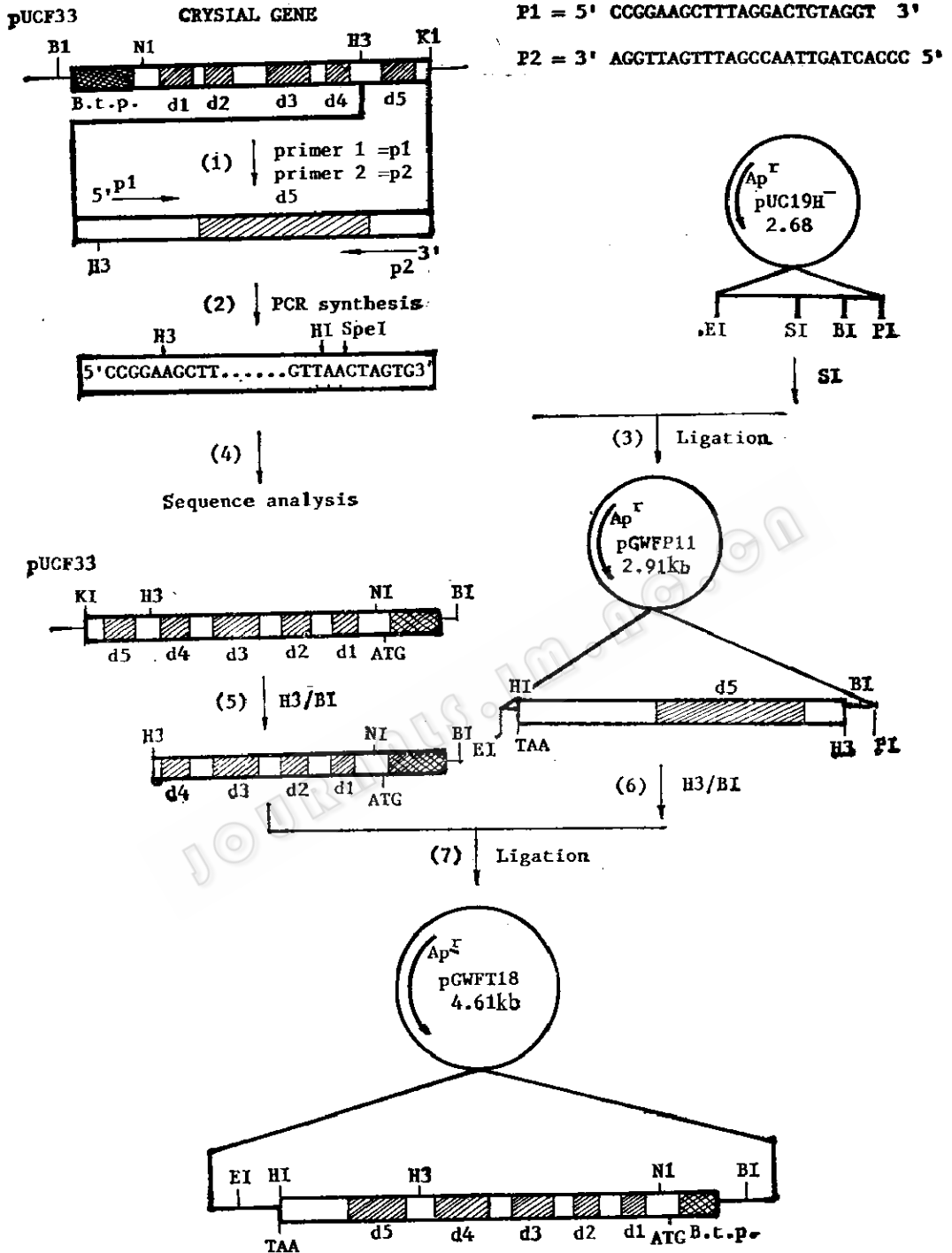


图1 PCR 合成第五毒活性区片段和杀虫蛋白质基因 3' 端的改造

Fig. 1 The PCR synthesis of the fifth toxic active region and modification of the insecticidal protein gene 3' truncated

Abbreviation: d1(2, 3, 4, 5) = domain (2, 3, 4, 5), B1 = BamHI, NI = NsiI, H3 = HindIII, K1 = KpnI, HI = HpaI, EI = EcoRI, PI = PstI, SI = SmaI, B.t. p. = the promoter of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene

由郭三堆等构建^[12], 克隆试剂盒和测序试剂盒购于 Boehringer 公司, pGWFP 11、pGWF 18、pGWFA 11 质粒的构建属本研究工作。

(二) 杀虫蛋白质结构基因的改造

质粒 DNA 的提取、纯化、DNA 重组连接、大肠杆菌转化、及限制性内切酶酶切分析均按文献[13]方法进行。

(三) PCR 合成^[14]杀虫蛋白质结构基因的第五活性区片段

用约 100ng 纯化的带有杀虫基因 (+1688 bp—1904 bp) 的 pUCF 33 质粒 DNA 为模板, 分别加入约 500ng 的 26 个碱基的 3' 端引物 (5' CCCACTAGTTAACCAATTT GATTGGA 3') 和 23 个碱基的 5' 端引物 (5' CCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGT 3') 10 μ l 的 10 \times 缓冲液, 补加重蒸灭菌无离子水到 99 μ l, 混匀, 煮沸 5 分钟, 立即加入 1 μ l (2.5u) 的 Taq 酶 (Biolab 公司产品), 混匀, 离心, 加 100 μ l 灭菌石蜡油, 95 $^{\circ}$ C 变性 45 秒钟, 52 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 合成 2 分钟, 重复合成 30 个循环, 合成了长度为 229bp 的第五活性区 DNA 片段。用 3 倍的乙醇沉淀合成的 DNA 片段, 加 100 μ l TE buffer 溶解后, 取 5 μ l 在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 结果见图 1 中(1)、(2)和图版 (A)。

(四) Western blotting 分析

细胞总蛋白的 SDS-PAGE 分析按文献[16]方法进行。Western blotting 分析按文献[17]方法进行。羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG 为军事医学科学院微生物流行病研究所产品。*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* 7-29 抗血清由本室伍宁丰同志提供。

(五) 生物杀虫活性的定性测定

生物杀虫活性的定性测定按文献[18]方法进行。

结 果

(一) 杀虫蛋白质结构基因 3' 端和 5' 端的研究

1. 第五活性区 DNA 片段的克隆及 pGWFP 11 的构建: 用 SmaI 酶切 1 μ g pUC19 质粒 DNA, 加入 10 μ l 合成的 DNA 片段, 经连接, 转 *E. coli* JM 103 受体菌, 在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 IPTG 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 得到 173 个白色抗性转化子。随机挑选 24 个转化子, 进行抽提转化重组质粒 DNA, 用 BamHI 分别与 HpaI、KpnI、SalI 和 EcoRI 进行双酶切, 测定质粒的重组方向, 将含有正方向的第 11 号重组子中的质粒命名为 pGWFP 11 (图 1 中(3)和图版 I-B)

2. 第五活性区 DNA 序列的测定^[15]及比较: 用 EcoRI 和 BamHI 酶切 pGWFP 11 质粒 DNA, 凝胶电泳分离纯化第五活性区 DNA 片段, 进一步克隆到 M13 mp19 DNA 的 EcoRI 和 BamHI 位点上, 转 *E. coli* JM 103 受体菌, 得到约 300 个白色噬菌斑。随机挑选 40 个白斑进一步转染新鲜 *E. coli* JM103 受体菌, 37 $^{\circ}$ C 快速培养 2.5 小时后, 提取纯化双链重组 DNA。再随机取 5 个纯化后的双链 DNA, 用 HpaI 酶切, 其中有 4 个被切成一条带。提取其中 24 号单链重组 M13 mp19—24 DNA, 用 ³⁵S-ddATP 的双脱氧核苷酸链式终止序列方法进行测定, PCR 合成的第五活性区序列(除人工设计合成的 12 个碱基区外)与原序列完全相同(图 2)。

3. pGWFT 13 重组质粒的构建: 用 BamHI 和 HindIII 分别双酶切 pUCF 33

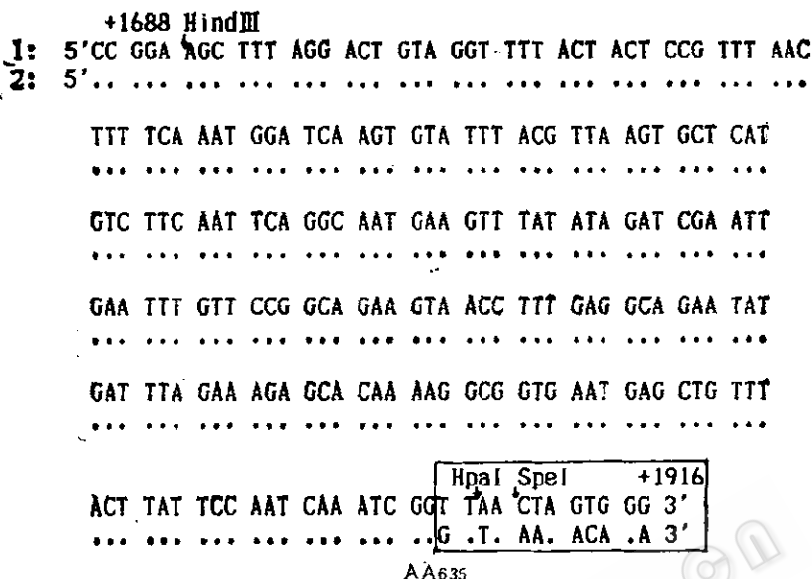


图2 PCR合成的DNA片段序列与杀虫蛋白质基因第五毒杀活性区序列的比较

Fig. 2 The comparison of sequences of DNA fragment by PCR synthesis and fifth toxic active domain of insecticidal protein gene

1: DNA fragment synthesized by PCR;

2: The fifth toxic active domain of insecticidal protein gene

和 pGWRP 11 质粒 DNA, 从酶切后的 pUCF 33 中, 分离纯化只带有杀虫蛋白质 N-端前 4 个活性区基因片段, 重组到 pGWFP 11 质粒中 3' 端被改造后的杀虫蛋白基因第五活性区上游, 构建成除 3' 端 12 个碱基对与原杀虫结构基因序列完全相同的重组质粒 (pGWFT 18) (图版 I-C)

4. 杀虫结构基因 5' 端的改造及 pGWFA 11 的构建: 用 BamHI 和 NsiI 酶切 pGWFT 18 重组质粒, 去掉原杀虫结构基因的调控区 (-150 bp) 和启动密码子 (ATG) 下游区的片段 (+31 bp), 插入一个人工设计合成的, 能从 ATG 起始正确读码的 adapter I (5' GATCCATGGAATGCA 3') 进行原杀虫结构基因的 5' 端的改造, 构建出了重组质粒 pGWFA 11 (图 3)。用 BamHI 和 Hind III 双酶切 pGWFT 18 和 pGWFA 11 重组质粒进行琼脂糖凝胶电泳的比较, 结果见图版 I-C。

(二) 改造后的杀虫蛋白质结构基因在大肠杆菌中的表达

1. Western blotting 分析: 分别取阳性重组子 *E. coli* JM 103 (pGWFT 18) 和 *E. coli* JM 103 (pGWFA 11), 以及阴性对照菌 *E. coli* JM 103 (pUC 19) 的单菌落, 接种在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 0.5 mmol/L IPTG 的液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。取 1.5ml 菌液离心收集菌体, 加 100 μ l 样品悬浮液, 煮沸 5—10 分钟, 取 80 μ l 裂解液进行 SDS-10% PAGE 分析, 结果见图版 I-D。为进一步证明杀虫蛋白质在 *E. coli* JM 103 中达到表达, 将电泳后的蛋白质转至硝酸纤维素滤膜上, 用 *B. thuringiensis* var. *aizawai* 7-29 杀虫蛋白质的兔抗血清及羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG 进行免疫反

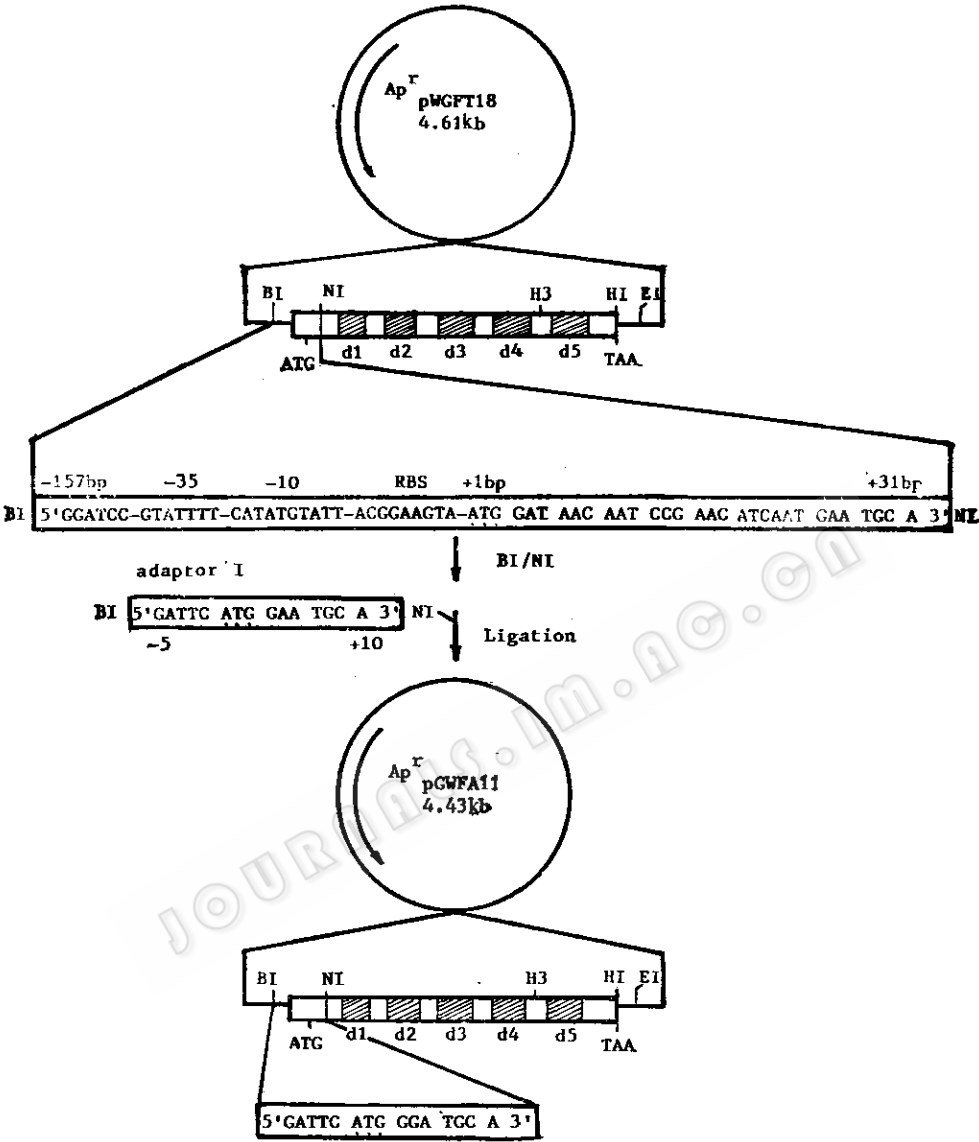


图 3 杀虫基因 5' 端的改造和重组质粒 PGWFA11 的构建

Fig. 3 The modification of the insecticidal gene 5' end and construction of recombination plasmid pGWFA11

应测定,结果见图版 I-E。

2. 定性生物杀虫试验: 离心收集过夜培养的 200 ml 阳性重组子 *E. coli* JM 103 (pGWFT 18) 和 *E. coli* JM 103 (pGWFA11)。阴性对照菌 *E. coli* JM 103 (pUC 19) 菌体,用 3—5ml 灭菌水悬浮后,于冰上超声破碎。将破碎液涂抹在甘蓝菜叶上,放上 2—3 龄的菜青虫,在 27℃ 下进行定性生物杀虫试验,结果见表 1。

表 1 大肠杆菌重组子细胞制备裂解物的杀虫活性

Table 1 Insecticidal activities of the lysate prepared from recombinant *E. coli* JM103 cells

裂解物 Lysates	不同时间内杀死菜青虫幼虫的比例 Proportion of <i>Pieris rapae</i> larvae died in different time				
	24h	36h	48h	72h	96h
pGWFA11	9/20	14/20	19/20	20/20	
pGWFT18	3/20	5/20	11/20	16/20	18/20
pUC19	0/20	0/20	0/20	0/20	1/20

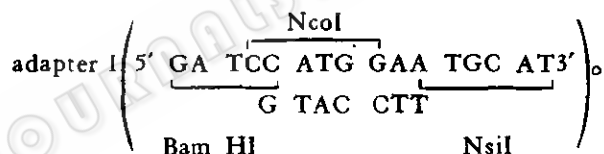
用 2 龄和 3 龄菜青虫幼虫进行的杀虫试验

For test against second-instar and third-instar larvae of *Pieris rapae*

讨 论

B. thuringiensis var. *aizawai* 7-29 所产生的杀虫晶体蛋白质对棉铃虫、菜青虫及夜蛾科幼虫具有很强的杀虫活性,为了使这杀虫蛋白质能够在不同的受体细胞(原核和真核)中得到很好的表达,必须对基因的 5' 端调控区和具有杀虫活性肽的下游区的 3' 端结构进行最佳的修饰和改造。

5' 端结构的修饰: 首先人工设计合成了一个 15bp 的



在这个序列中, 5' GATCC 3' 可与 Bam HI 酶切后的粘性末端序列互补; 5' CCATGG 3' 是 NcoI 的酶切位点序列, 在杀虫基因的 5' 端和 pUC19 质粒的 polylinker 中, 因无 NcoI 酶切位点序列, 因此可以用来检测 adapter I 在 pGWFA11 上的插入; 其次, 它又含有 ATG 三个碱基, 可作为杀虫蛋白正确读码的起始翻译密码子。5' ATGCAT 3' 是 NsiI 酶切位点序列, 它可与杀虫蛋白区 5' 区 ATG 起始密码子下游区的 +31bp 序列 (+1 5' ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC A 3') 上 NsiI 酶切位

点相互补, 并能正确读码。因此, 用 BamHI 和 NsiI 双酶切 pGWFT18 质粒, 可直接去掉杀虫蛋白质基因 -10 和 -35 调控区的 -150bp 和 ATG 起始密码子下游区的 +31bp (编码 10 个氨基酸) 序列, 插入 adapter I (15 个碱基, 编码 3 个氨基酸), 完成了杀虫蛋白质结构基因的 5' 端结构的修饰(图 3)。

3' 端结构的改造: 完整的杀虫蛋白质被昆虫的胃蛋白酶水解后, 具有杀虫活性肽的分子量一般为 60—63kD, 含有 620—635 个氨基酸及五个活性中心区。在 620—635 个氨基酸之间有一个蛋白酶水解位点, 使杀虫肽在二级结构和多维结构上保持了最佳杀虫

活性。但用一般的基因工程方法进行修饰, 在结构上很难保持精确的杀虫蛋白的基因长度; 即使用酶随机的修饰, 幸运地保持了 1905bp 的长度, 如 3' 端末加终止密码, 在蛋白翻译时, 也很难使其在最佳位点上终止。因此, 我们采用 PCR 合成第五活性区片段的方法, 对 3' 端进行人工改造。首先, 我们以第五活性中心上游区的 +1688 bp 至 1710 bp 之间含有 Hind III 酶切位点在内的序列为模板, 合成一段 23 个碱基的 5' 端引物 (5' CCGAAGCTTTAGGACTGTAGGT 3') 再按杀虫肽结构基因 3' 端 +1891bp 至 1905 bp 之间的序列 (14 个碱基), 再加入人工设计的 12 个碱基序列为模板, 合成一段 26 个碱基的 3' 端引物 (5' CCCACTAGTTAACCGATTTGATTGGA 3'), 通过 PCR 方法, 合成含第五活性区在内的 229 个碱基片段 (图 1, 2)。

为了检测 PCR 合成片段的忠实性, 以及 3' 端人工设计的正确性, 在 229 个碱基片段克隆到 M13 mp19 后, 进行了双脱氧核苷酸链式终止序列分析, 结果见图 2。序列分析表明, PCR 合成的序列与原序列相同, 即证明了我们用 PCR 技术合成片段具有很好的忠实性。在 5' 端区合成了与原序列完全相同的 Hind III 位点, 同时观察到 3' 端 12 个碱基与人工设计的完全相同, 证明了 PCR 合成的正确性, 其中有 8 个碱基与原序列不同:

(人工合成序列 5' G

T	TAA	CTA	GTG	GG
G	TTA	AAA	ACA	GA

 3') 其目的如下:

(1) 增加原 3' 端序列中没有的 HpaI (5' GTTAAC 3') 和 SpeI (5' ACTAGT 3') 酶切位点, 使基因操作更方便。

(2) 在第五活性区下游的 3' 端增加了一个 TAA 终止密码子, 使杀虫活性肽的翻译能正确终止。

(3) 保持原完整杀虫蛋白质被昆虫胃蛋白酶水解后的最佳 N-端杀虫活性分子量 (635 个氨基酸)。

用 Western blotting 测定的免疫生物学结果表明, *E. coli* JM 103 (pGWFT 18) 和 *E. coli* JM 103 (pGWFA 11) 细胞蛋白质在 ~60 和 ~63kD 处有免疫反应凝聚带出现, 而阴性对照 *E. coli* JM 103 (pUC 19) 细胞蛋白质无凝聚带, 证明了改造后的杀虫蛋白质在大肠杆菌中能正常表达。

定性生物杀虫试验结果表明, 阴性对照菌 *E. coli* JM 103 (pUC 19) 无杀虫活性, 两个阳性的重组子 *E. coli* JM 103 (pGWFT 18)、*E. coli* JM 103 (pGWFA 11) 具有杀虫活性。结果说明, 5' 端和 3' 端全部改造后的杀虫基因要比只改造 3' 端基因表达更好 (表 1)。

人工改造后的杀虫结构基因, 去掉了与杀虫活性无关的 C-端肽序列, 大小为原完整杀虫结构基因的一半左右; 使负责编码杀虫活性 N-端肽的最佳长度 (1905 bp) 的 DNA 序列, 改造成了具有启动翻译功能, 又有终止翻译功能的完整的杀虫结构基因; 只要在人工改造后的杀虫结构基因的 5' 端装上不同宿主的启动子, 将会在不同宿主 (原核和真核细胞) 范围内得到正确的表达, 将为构建杀虫工程菌以及导入植物获得转基因工程植株, 打下良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Höfte, H. et al.: *Micribiol. Rev.*, 53: 242—255, 1989.
- [2] Adang, M. J. et al.: *Gene*, 36: 289—300, 1985.
- [3] Höfte, H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 161: 273—280, 1986.
- [4] Sanchis, V. et al.: *Mol. Microbiol.*, 2: 393—404, 1988.
- [5] Schnepf, H. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 260: 6273—6280, 1985.
- [6] Wabiko, H. et al.: *DNA*, 5(4): 305—314, 1986.
- [7] Schnepf, H. E. et al.: *J. Bacteriol.*, 169: 4110—4118, 1987.
- [8] Shivakumar, A. G. et al.: *J. Bacteriol.*, 168: 194—204, 1986.
- [9] Obukowicz, M. G., et al.: *Gene*, 45: 327—331, 1986.
- [10] Kretzmer, E. J. et al.: *Bio/technology*, 5: 807—813, 1987.
- [11] Barton, K. A. et al.: *Plant Physiol.*, 85: 1103—1109, 1987.
- [12] 郭三堆等: *生物工程学报*, 7(1): 54—61, 1991.
- [13] 杨 虹等: *中国农业科学*, 22(6): 1—5, 1989.
- [14] Kim, H. S. et al.: *Nucl. Acids. Res.*, 16: 8887—8903, 1988.
- [15] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, 143: 161—178, 1980.
- [16] Lugtenberg, B. et al.: *FEBS Letters*, 58: 254—258, 1974.
- [17] 孙午良, 范云六: *中国科学*, 12: 1267, 1988.
- [18] Nakamura, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 54(3): 715—724, 1990.

MODIFICATION AND EXPRESSION OF INSECTICIDAL PROTEIN STRUCTURAL GENE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. AIZAWAI 7-29

Guo Sandui Hong Zhaoyang Wang Jinghong

Wang Mingbo Yu Meimin Fan Yunliu

(Lab. of Molecular Biology, Biotechnology Research Centre, Chinese Academy of
Agricultural Sciences, Beijing 100081)

The regulative region (181bp) and the fifth toxic active domain (217bp) were removed from the insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* 7—29. After the synthesis of the adaptor (15bp) that contains initiation codon (ATG) and the PCR synthesis of the fifth toxic active domain (229bp) that contains stop codon (TAA), were inserted into on 5' truncated and 3' truncated of the coding for N-terminal peptid's DNA fragment, that to become a modified structural gene. The modified structural gene can be play initiatic translation-function and stop translation-function during translation of insecticidal protein. The insecticidal protein was determined by western blotting, showed the expression of modified structural gene in *Escherichia coli* JM 103. The bioassay of insecticidal proteins showed the 3' truncated and 5' truncated of insecticidal gene was higher toxic active than the 3' truncated of insecticidal gene in *Escherichia coli* JM 103.

Key words

Bacillus thuringiensis var. *aizawai* 7—29; Insecticidal gene; Modification; Expression