

# 苏云金芽孢杆菌 *cry1* 基因在荧光假单胞菌 Pfx-18中的表达特性

刘子铎 汤江武 喻凌 孙明 喻子牛

(华中农业大学农业部农业微生物重点实验室微生物科学技术系 武汉 430070)

**摘要** 用 DIG 标记的 *cry1Aa* 基因 EcoRI-F 片段的 RNA 探针, 对筛选的鳞翅目高毒力菌株的质粒进行 Southern 分析, 将 *cry* 基因定位在 39.3MD 质粒上。该质粒经 HindIII 酶解, 用同样探针进行杂交, 呈现 6.5kb 和 7.1kb 两条阳性带, 其中 7.1kb 片段的杂交强度明显高于 6.5kb 片段。将 7.1kb 片段与多宿主质粒 pSUP106 连接, 转化荧光假单胞菌 Pfx-18, 获得克隆子 LZP-1。克隆基因用 PCR 鉴定, 显示典型的 *cry1Ab* 谱带。经 SDS-PAGE 分析, 克隆株表达 66kD 杀虫晶体蛋白和一些小分子多肽。其发酵液稀释 1000 倍对三龄小菜蛾幼虫的致死率为 33%。

**关键词** 苏云金芽孢杆菌, 荧光假单胞菌, *cry1Ab* 基因

**分类号** Q78

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 制剂的主要杀虫活性成分是杀虫晶体蛋白, 它是单基因表达的产物<sup>[1]</sup>。按照新的分类方法<sup>[2]</sup>, 迄今已发现 17 群 94 个亚类杀虫晶体蛋白基因。其中 *cry1* 类基因的表达产物对鳞翅目害虫具有特异毒性, 在农林害虫防治占有特殊地位, 故对 *cry1* 基因研究较为深入<sup>[3]</sup>。近年来, 国外利用基因重组技术构建出了多种不同用途的工程菌, 提高了杀虫效率, 扩大了杀虫谱<sup>[4]</sup>。荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 是植物根际微生物的主要类群之一, 具有独特的生态优点。因此早在 1986 年, 美国 Monsanto 公司把苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因通过 Tn5 转座子整合到荧光假单胞菌的染色体进行表达<sup>[5]</sup>。Mycogen 公司利用荧光假单胞菌开发了“生物囊”杀虫剂<sup>[6]</sup>, 有效地提高了杀虫晶体蛋白的残效期。国内也有将杀虫晶体蛋白基因转入荧光假单胞菌的报道<sup>[7]</sup>。本文试图将本室筛选的苏云金芽孢杆菌高毒力菌株的毒素基因转入荧光假单胞菌。为异源基因在荧光假单胞菌中的表达及构建抗病杀虫双功能工程菌奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

试验用菌株和质粒(见表 1)

### 1.2 KB 培养基

0.5% 酪蛋白水解物, 0.15% 甘油, 0.15%  $K_2HPO_4$ , 0.15%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.6% 琼脂粉, 3% 明胶。选择培养基加四环素使终浓度为  $12.5\mu g / ml$ 。

表1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	性质 Character	来源 Source
荧光假单胞菌Pfx-18	Tc <sup>s</sup> plasmid <sup>-</sup>	华中农业大学王平博士提供
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pfx-18	Cm <sup>r</sup>	From Dr. Wang Ping in Huazhong Agri. Uni.
苏云金芽孢杆菌YBT791	对鳞翅目特异菌株	本室筛选
<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT791	Lepidoptera-specific strain	Screened by our laboratory
pSBPL-1 RNA探针载体	含有cry1Aa基因EcoRI-F片段	本室构造
pSBPL-1 RNA probe vector	Containing EcoRI-F fragment of cry 1Aa gene	Constructed by our Lab.
多寄主质粒pSUP106	Tc <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	德国Bielefeld大学Dr.U.B. Priefer惠赠
Broad-host range plasmid pSUP106	MW9.9kb	From Dr. U. B. Priefer in Bielefeld University

## 1.3 质粒抽提参照文献 [8] 进行

## 1.4 Southern 分析参照文献 [9] 进行

## 1.5 cry1 基因 RNA 探针制备及杂交参照文献 [10] 进行

## 1.6 cry1 基因克隆

表2 cry1基因不同亚类的特异引物

Table 2 Specific primers for different subtype of cry 1 genes

引物 Primers	序列 Sequences	引物结合位点 Binding sites of primers	产物大小(碱基对) Sizes of products (bp)
cry 1Ab	5' -GGTCGTGGCTATATCCTTCGTGTCACAGC	3070~3098	238
	5' -GAATTGCTTTCATAGGCTCCGTC	3283~3305	
cry 1Aa	5' -TCGAATTGAATTGTTCCGGCAGAAGTA	1391~1418	724
	5' -ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	2082~2114	
cry 1Ac	5' -TCACCTCCCATCCGACACTCTACC	1551~1572	487
	5' -ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	2005~2037	
cry 1Ba	5' -GTCAACCTTATGATCACCTGGGCTTC	1292~1318	830
	5' -ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	2089~2121	
cry 1Ca	5' -GAACCTCATTGGTGCACCTTC	1820~1842	288
	5' -ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	2075~2107	
cry 1DAa	5' -GGTACATTTAGATATTCACAGCCAC	1838~1863	414
	5' -ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	2220~2252	
cry 1Ea	5' -CTTAGGGATAAATGTAGTACAG	1131~1152	880
	5' -ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	1978~2010	
cry 1Fa	5' -CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	1649~1673	368
	5' -ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	1884~2016	

将苏云金芽孢杆菌 YBT-791 的 39.3MD 质粒经 HindIII 酶解后, 将 7.1kb 片段用 Glassmilk 法纯化。连接到多宿主载体 pSUP106 的 Hind III 位点, 用  $\text{CaCl}_2$  法<sup>[11]</sup> 转化荧光假单胞菌 Pfx-18。随机用牙签挑取一些转化子置于 Eppendorf 离心管, 加 50 $\mu\text{l}$  细胞裂解液 (2% SDS, 50mmol / L EDTA pH8.0), 煮沸 1min, 15000r / min 离心 3min, 用上清液直接点尼龙膜, 80 $^\circ\text{C}$  烘 2h, 用 *cryI* 基因探针进行常规分子杂交。然后从呈阳性的克隆株中抽提质粒, 用 HindIII 酶解, Southern 分析确证插入片段的正确性。

### 1.7 *cryI* 基因 PCR 分析

引物合成参照文献 [12] 的引物序列, 由于该引物系统对 *cryIAb* 基因会出现 *cryIAa* 的非特异性带, 故 *cryIAb* 的 5'-端引物采用 Amplify 软件设计, 利用这套引物通过 PCR 可依不同基因型, 扩增出不同长度 (236~836bp) 代表某一特定基因型的产物 (见表 2)。

PCR 扩增条件为: 94 $^\circ\text{C}$  1min, 55 $^\circ\text{C}$  1min, 72 $^\circ\text{C}$  1min, 25~30 循环。

### 1.8 杀虫晶体蛋白分析参照文献 [13] 进行。

### 1.9 生物测定参照文献 [14] 用 3 龄小菜蛾进行生物测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 *cryI* 基因的克隆

将苏云金芽孢杆菌质粒进行琼脂糖电泳后, 进行 Southern 分析, 结果表明杀虫晶体蛋白基因定位在 39.3MD 的质粒上。然后将质粒用 HindIII 酶解, Southern 分析出现两条阳性带, 分子量分别为 7.1kb 和 6.5kb。7.1kb 片段的杂交程度明显高于 6.5kb。将含有杀虫晶体蛋白基因的 7.1kb 片段与 pSUP106 连接并转化荧光假单胞菌 Pfx-18, 筛选获得克隆子 LZP-1, 从中抽提质粒, 用 HindIII 酶解并进行 Southern 分析, 结果表明, 克隆株含有 7.1kb 毒素基因片段 (图 1)。PCR 分析, 该基因属 *cryIAb* (图 2)。

### 2.2 *cryIAb* 基因在 Pfx-18 中的表达

参照文献 [14] 方法从荧光假单胞菌克隆株 LZP-1 中抽提杀虫晶体蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明, 除了含有 66kD 蛋白质谱带外还含有几条小分子量谱带 (图 3)。

按照天然 *cryIAb* 基因的大小应表达的实际分子量为 130kD 的蛋白质。但在荧光假单胞菌 Pfx-18 中没有 130kD 的谱带出现, 所呈现的主带为 66kD, 大小相当于 130kD 原毒素在体外胰蛋白酶水解激活的产物。*cryIAb* 基因的 3' 端共用引物在 *cryIAb* 基因中的附着位点是 3283~3305。PCR 分析结果表明有典型 *cryIAb* 谱带形成。从生测结果看,

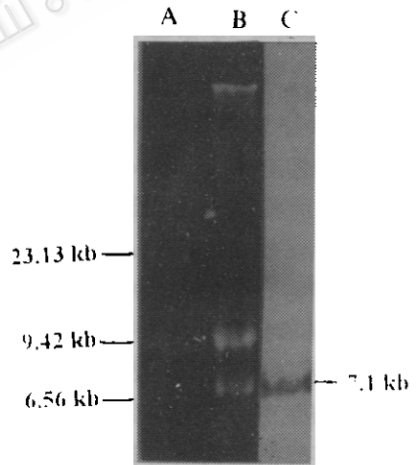


图 1 LZP-1 的重组质粒的 HindIII 酶解和 southern 分析

Fig. 1 Digestion of recombinant plasmid with HindIII and southern analysis  
A. DNA standard molecular weight marker; B. Digested products of recombinant plasmid with HindIII; C. Hybridization result of digested product of recombinant plasmid with HindIII.

发酵液稀释 1000 倍对三龄小菜蛾幼虫的致死率为 33%。说明 66kD 蛋白质保持有该基

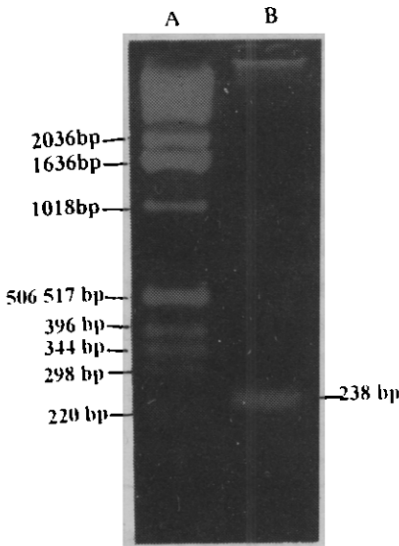


图 2 克隆基因的 PCR 分析

Fig.2 PCR analysis of cloned gene

A. DNA standard molecular weight marker;  
B. PCR product of cloned gene.

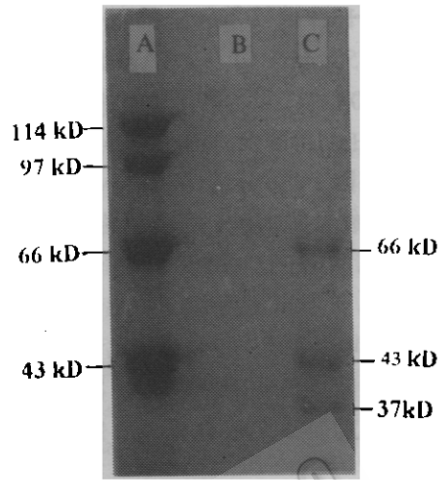


图 3 克隆株 LZP-1 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression of products cloned strain LZP-1

A. protein standard molecular weight; B. *Pseudomonas fluorescens* Pfx-18; C. Cloned strain LZP-1.

因完整的 N-半端活性中心。因为目前对杀虫晶体蛋白的结构与功能研究表明,只有杀虫晶体蛋白拥有 N-半端一定的氨基酸残基,以保证形成特定的空间结构时,才具有杀虫活性。因而推测 66kD 蛋白质和一些小分子多肽的形成可能是荧光假单胞菌细胞内的蛋白酶活性较强或 *cry1Ab* 产物在荧光假单胞菌中不稳定所致。杀虫晶体蛋白克隆基因表达产物在其它细胞内的降解现象也有报道。如苏云金芽孢杆菌以色列亚种的 *cryIVD* 基因单独转到大肠杆菌时,只能形成 50kD 和 30kD 的多肽,而不是本应表达的 72kD 杀虫晶体蛋白<sup>[15]</sup>。我们把杀虫晶体蛋白基因转到苏云金芽孢杆菌无晶体突变株中表达时也存在类似的现象(未发表资料)。因而认为产生这种现象的主要原因可能是寄主菌蛋白酶活性高的缘故。因此,在构建工程菌时,选用低蛋白酶活性受体菌是保证真实表达和高量表达的一个重要环节。

## 参 考 文 献

- [1] Hofte H, Whiteley H R. *Microbiol Review*, 1989, 53: 242~255.
- [2] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J *et al*. Program and Abstracts SIP 28th Meeting Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis cry* genes, 1995, 14.
- [3] 喻子牛, 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白及其基因的研究及应用. 见: 李卓隽等主编. 生命科学和土壤学中几个领域的研究进展 北京: 农业出版社. 1993, 170~179.
- [4] Gelemter W D, Schwab G E, Transgenic Bacteria Viruses, Algae and Other Microorganisms as *Bacillus thuringiensis* Toxin Delivery Systems. In: Entwistle P F ed. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice. Chichester John Wiley & Sons Ltd Press. 1993, 89~104.

- [5] Mark G O, Frederick J P, Kuniko K *et al.* *J Bacteriol*, 1986, **168**: 982~989.
- [6] Gelemerter W D. Targeting Insecticide-Resistant Markets: New developments in Microbial based products. In Green W K ed. *Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies*. Washington American Chemical Society Press. 1990. 105~117.
- [7] 张光炳, 张杰, 彭于发, 等. *中国农业科学*, 1995, **28**: 8~13.
- [8] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982, 90~91.
- [9] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982, 324~325.
- [10] 洪玉枝, 刘子铎, 汤江武, 等. *华中农业大学学报*, 1995, **4**: 7~11.
- [11] 刘子铎, 洪玉枝, 汤江武, 等. *微生物学报*, 1995, **35**: 250~253.
- [12] Kalman S, Kiehne K L, Yamamoto T. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 1131~1137.
- [13] 洪玉枝, 刘子铎, 潘学文, 等. 从大肠杆菌克隆株中分离杀虫晶体蛋白的方法, 见: 中国微生物学会农业微生物专业委员会编, *杀虫微生物(第四卷)*, 武汉: 武汉大学出版社, 1995, 54~56.
- [14] 沈鞠群, 王锦举, 喻子牛, 等. *生物防治通报(增刊)*. 1990, 12~16.
- [15] Visik J E, Whiteley H R. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 1748~1756.

## EXPRESSION CHARACTERISTIC OF *BACILLUS THURINGIENSIS* *CRY1* GENE IN *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* Pfx-18

Liu Ziduo Tang Jiangwu Yu Ling Sun Ming Yu Ziniu

(Key Lab. of Agri-Microbiology, Ministry of Agriculture, Dept. of Microbial Science and Technology, Huazhong Agricultural university, Wuhan 430070)

**Abstract** The plasmids of lepidopteran-specific *Bacillus thuringiensis* strain from our laboratory were hybridized with RNA probe of *cry1Aa* EcoR I-F fragment labelled using DIG. *Cry1* gene was located in 39.3 MD plasmid. The plasmid was digested with Hind III and analysed by southern blot. It appeared both 7.1kb and of 6.5kb positive bands. The 7.1kb fragment was ligated to broad-host-range vector pSUP106 and transformed into *Pseudomonas fluorescens* Pfx-18. The cloned strain, LZP-1 was obtained. The plasmids of LZP-1 were analysed by PCR. The results showed that gene-type is *cry1Ab*. SDS-PAGE analysis demonstrated that LZP-1 could express 66kD insecticidal crystal protein and some small molecular weight peptides. Bioassay showed that mortality of 1000-fold diluted fermentation broth was 33% to 3rd instar *plutella xylostella* larvae.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *cry1* gene