

苏云金芽孢杆菌 Cry1Ca7 蛋白定点突变对 甜菜夜蛾杀虫活性的影响

任羽¹, 刘华梅¹, 宋福平¹, 黄大昉², 张杰^{1*}

(¹ 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室北京 100094)

(² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白 Cry1Ca7 对重要的农业害虫甜菜夜蛾具有较高毒力。【目的】本文的研究目的是通过定点突变的方法获得毒力发生改变的毒蛋白, 为下一步研究工作提供有价值的实验材料。【方法】利用重叠引物 PCR 技术对 *cry1Ca7* 基因进行定点突变, 获得了 10 种突变基因, 通过生物活性测定的方法确定了各突变基因表达产物对甜菜夜蛾的杀虫活性。【结果】活性降低的突变毒蛋白有 G¹³⁸S, T²²¹D, T²²¹R, N²⁵¹S, ⁴³⁹GGT⁴⁴⁰, N³⁰⁶R, W³⁷⁶F, R⁵²²E 和 R⁵⁷⁰G, 其中, 位于 Domain 内的突变的活性依次是 ⁴³⁹GGT⁴⁴⁰<N³⁰⁶R<W³⁷⁶F; 位于 Domain 内的突变 R⁵²²E<R⁵⁷⁰G, 二者的活性较 Cry1Ca7 也有明显降低; 只有位于结构域 中的 R¹⁴⁸G, 产生了活性提高的突变毒蛋白, 其毒性较 Cry1Ca7 提高了 6 倍, 而同样位于 Domain 内的突变 T²²¹D<T²²¹R<G¹³⁸S<N²⁵¹S, 尤其是 T²²¹D 活性完全丧失。研究结果表明, 在结构域 中的突变更容易产生活性提高的突变蛋白, 而结构域 和 较难获得毒力提高的突变蛋白。【结论】本项研究所获得的这些活性发生不同变化的蛋白为揭示 Cry 蛋白的杀虫机理提供了基础材料, 而活性提高的诱变基因及其表达产物将可作为新的杀虫资源, 用于抗虫遗传工程菌和转基因植物的构建。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 杀虫晶体蛋白; 定点突变; *cry1Ca7* 基因; 甜菜夜蛾

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0733-06

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 在产芽孢期形成的、对多种害虫具有毒性的晶体蛋白, 是由 3 个不同的结构域构成的, 结构域 位于毒性多肽的 N 端, 由 7 个 α 成, 主要参与在昆虫中肠上皮细胞形成孔道。结构域 主要是 β -棱柱结构, 它决定毒素的专一性和与受体的特异性结合。结构域 位于 C 端, 也是由 β -折叠片构成, 主要功能是调节毒素的活性, 在不同的毒素中具有不同的功能^[1]。

目前已有 Cry1Aa 等^[2] 7 种蛋白晶体的结构通过 X-晶体衍射的方法解析; 在此基础上, 通过三维结构模型, 对 Bt 毒蛋白进行理性设计, 选择相应的突变

位点, 提高毒力和扩大其杀虫谱, 直接用于害虫的防治已成为可能。

Cry 蛋白结构域 是一个螺旋束的结构, 相对灵活, 在这一部分进行突变, 更容易产生活性提高的蛋白, 例如: Kumar 对 Cry1Ac 进行定点突变, 发现对烟草天蛾和美洲烟芽叶蛾 (*Heliothis virescens* Fabricius) 的活性有所提高^[3]。随后, Audtho^[4]、Alcantara^[5]、Bah^[6]等分别对 Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry2Aa 进行研究, 均得到对鳞翅目害虫活性提高的突变。

结构域 和结构域 是 β 折叠片层, 结构相对稳定, 对其进行突变, 引起突变蛋白的结构和活性变化

基金项目: “863 计划” (2006AA10A212); 国家自然科学基金 (30571252)

*通讯作者: Tel: +86-10-62815921; E-mail: jzhang@ippcaas.cn

作者简介: 任羽 (1979-), 女, 北京怀柔人, 博士研究生, 主要从事苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白分子设计研究。E-mail: renyu1020@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-11-09; 修回日期: 2008-03-17

比较大，一般获得毒力降低的突变蛋白。Cry1Aa^[7]的β 6(³⁶⁵LYRRIIL³⁷¹) 氨基酸的替换或删除都会显著降低毒素对家蚕幼虫(*Bombyx mori*)的毒性。Cry1Ab^[8]的突变 G⁴³⁹A 和 F⁴⁴⁰A 显著地降低了活性。Cry1Ac^[9]在结构域 ⁵⁰⁹QNR-AAA⁵¹¹的突变使素性降低了 2 倍多。

与 Cry1A 类蛋白相比，Cry1C 的定点突变研究论文不多，而且几乎都是针对个别关键位点的活性降低的研究^[10~12]。本研究在 Domain 、 和 内选取多个位点进行突变，对 Cry1Ca7 的几个关键位点进行初步探索。

cry1Ca7 是本实验室克隆的对重要农业害虫甜菜夜蛾具有高毒力的基因，通过同源建模的方法，我们

得到了 Cry1Ca7 蛋白的三维结构，本研究利用重叠引物 PCR 技术对该基因进行了定点突变，通过一系列基因克隆和蛋白表达，我们获得了活性提高和降低的突变蛋白，这些材料为杀虫机理的研究和杀虫基因的应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基：表 1 为本研究所用菌株与质粒。培养大肠杆菌(*Eschrichia coli*)采用 LB 培养基 (Tryptone 1.0% , yeast extract 0.5% , NaCl 1.0%, pH 7.2)。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and Plasmids

Strains and plasmids	Characteristic	Origin
JM110	<i>rpsL(str^r)</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> ⁻¹ , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [<i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZAM15</i>]	Novagen Cor.
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen Cor.
pET-21b	Amp ^r , 5.4 kb	Novagen Cor.
pET-1Ca	pET-21b carrying <i>cry1Ca7</i> gene,	Store in this lab
pET-1CaMu	pET-21b carrying 11 mutants from <i>cry1Ca7</i> respectively	This study

1.1.2 主要试剂：氨苄青霉素 100 mg/mL，-20 保存，使用终浓度为 50 μg/mL。PCR 扩增试剂购自上海生工生物工程公司。限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司。DNA 回收试剂盒购自北京诺德金生物技术有限公司。

1.1.3 供试昆虫：甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hübner) 由武汉科诺生物农药有限公司提供。

1.2 Cry1Ca7 蛋白序列分析及引物设计

在 NCBI 上 Conserved Domain Summary 分别定位出 Cry1Ca7 三个 Domain 所对应的区域，进行引物设

表 2 引物及其序列
Table 2 Primers and their sequences

Primers	Sequences (5 → 3)	Outer2(H)/XXX ^b Forward ^d	Outer1/XXX ^b reverse ^d
Outer1	CGCGGATCCGATGGAGAAAATAATCAAAATC	—	—
Outer2(H)	ACGCGTTCGACCTTCTGTGCTCTCTCTAAATC	—	—
^a R ¹⁴⁸ G forward	CCAGAAATTCCAAACGAAG	1400	450
^c R ¹⁴⁸ G reverse	CTTCGTTTGGAAATTCTGGATT		
G ¹³⁸ S forward	CTTGATTCTGCTACTTGAA	1490	410
G ¹³⁸ S reverse	AAGTAGCGAATCAAGTAT		
T ²²¹ D forward	CCGAAATCTGATTATCAAGATTGG	1240	660
T ²²¹ D reverse	CCAATCTTGATAATCAGATTTCGG		
T ²²¹ R forward	AAATCTAGGTATCAAGAT	1240	660
T ²²¹ R reverse	TTGATACCTAGATTTCGG		
N ²⁵¹ S forward	TATGACAGTAGGAGATAT	1000	820
N ²⁵¹ S reverse	TCTCTACTGTTCATAGTT		
⁴³⁹ GGT ⁴⁴⁰ forward	AGATCTGGAGGAACACCTTTT	580	1320
⁴³⁹ GGT ⁴⁴⁰ reverse	AAAAGGTGTTCTCCAGATCT		
N ³⁰⁶ R forward	TTGAATCGTCTTACAATC	980	920
N ³⁰⁶ R reverse	TGTAAGACGATTCAATAT		
W ³⁷⁶ F forward	CAGCAACCTTTCCAGCGCCA	772	1128
W ³⁷⁶ F reverse	TGGCGCTGGAAAAGGTTGCTG		
R ⁵²² E forward	TTAGAATTTTCGTTACGCTTCCAGT	200	1700
R ⁵²² E reverse	ACTGGAAGCGTAACGAAATTCTAA		
R ⁵⁷⁰ G forward	ACATTTGGATATACC	190	1710
R ⁵⁷⁰ G reverse	GGTATATCCAAATGTTCT		

Note: a. R: Argine; G: Glycine; N: Asparagine; S: Serine; E: Glutamic acid; F: Phenylalanine; T: Threonine; W: Tryptophan; D: Aspartic acid. b. XXXs represent the R148G, etc. c. R148G indicates the 148th amino acid Argine was replaced by Glycine, others are the similar. d. Outer 1 is the 5' primer of *cry1Ca7* toxic gene sequence; Outer 2(H) is the 3' primer of *cry1Ca7* toxic gene sequence.

计,同时在引物中引入相应的酶切位点。通过 Clustal W 将 Cry1Ca7 与其它类型的 Cry 蛋白进行核苷酸和氨基酸序列的比对,在 3 个结构域内分别选取 9 个氨基酸位点 G138、R148、T221、N251、N306、W376、439GT440、R522、R570,设计合成重叠引物,采用重叠引物 PCR 的方法,进行定点突变。

根据在 NCBI 上查询的 Cry1Ca7 蛋白 3 个 Domain 和突变氨基酸所对应的核酸位点设计了相应的引物,不同引物的序列及扩增产物大小见表 2。

1.3 重叠引物 PCR

第一次 PCR:以含有 *cry1Ca* 基因的 pET-1Ca 质粒 DNA 为模板,用引物 Outer1/XXX reverse 和 Outer2(H)/XXX forward 进行第一次 PCR 扩增,其中 XXX 表示 R¹⁴⁸G 等 10 种引物,即前一个氨基酸变成了后一个氨基酸。第二次 PCR:以第一次 PCR 得到的两个 DNA 片段混合物为模板,用 *cry1Ca* 半长基因的 5 端引物 Outer1 和 3 端引物 Outer2(H)组合,扩增出一条完整的含有突变碱基的 *cry1Ca* 半长基因。PCR 反应采用 100 μ L 体系。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C, 1 min; 54 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2 min; 32 cycles; 72 $^{\circ}$ C, 10 min; 保存于 4 $^{\circ}$ C。

1.4 DNA 片段的回收、酶切、克隆、转化

回收方法参见公司试剂盒说明;酶切、克隆、转化等参见文献[13];分别从得到的转化子中提取质粒,进行酶切和 PCR 鉴定。

1.5 序列测定

由北京诺赛基因组研究中心有限公司进行序列测定,测序结果采用 Clustal W 软件进行分析。

1.6 蛋白的诱导表达与分析

将含有突变的 *cry1Ca7* 1.8 kb 半长基因重组质粒的 BL21 转化子接种于 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、230 r/min,过夜。2%接种于 200 ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、230 r/min 培养 2 h,OD₆₀₀ 至 0.5 左右,加入 IPTG 至终浓度为 0.7 mmol/L,18 $^{\circ}$ C、150 r/min 诱导 12 小时。离心收集菌体,将菌体悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,超声波破碎细胞 5 min (Ampl 37%, pulse on 5 s, pulse off 5 s),12000 r/min 离心 15 min,将沉淀重新悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中;采用 SDS-PAGE 分析各种重组蛋白表达情况。

1.7 生物活性测定

利用超声波破碎的方法得到菌体破碎液,12000

r/min 离心获得突变粗蛋白,SDS-PAGE 进行检测后,将提取粗蛋白进行梯度稀释,分别以 Cry1Ca7 和转 pET-21b 空质粒的 BL21 为阳性对照和阴性对照,测定粗蛋白对甜菜夜蛾的毒力。称取 30 g 人工饲料置于灭菌培养皿中,加入 3 mL 待测样品稀释液,充分混匀,分装于经消毒(5%福尔马林浸泡)的 24 孔细胞培养板中。用毛笔轻轻接入甜菜夜蛾初孵幼虫,每孔一头,每处理重复 3 次,放置 25 $^{\circ}$ C 光照培养箱中,培养 7 天调查死、活虫数。用 POLO 软件对生物活性测定的数据进行分析,计算 LC₅₀ 值^[14]。

2 结果和分析

2.1 杀虫晶体蛋白的序列分析和结构分析

2.1.1 序列分析:Cry1Ca7 蛋白的 Domain I 范围是第 1~253 个氨基酸,Domain II 的范围是 258~457 个氨基酸,Domain III 所对应的是第 467~630 个氨基酸。

2.1.2 结构分析:通过同源建模(<http://swissmodel.expasy.org/>)的方法得到 Cry1Ca7 三个 Domain 的结构图,对不同 Cry 蛋白间氨基酸进行序列比对,选取了 9 个位点作定点突变(表 3,图 1)

表 3 关键氨基酸的性质改变

Table 3 Characteristic changes of the crucial amino acid

Change of amino acid	Location	Characteristic
R ¹⁴⁸ G	α 4	forming the turn between helices
G ¹³⁸ S	α 4	nonpolar to polar amino acid
T ²²¹ R	α 6- α 7	neutral to alkaline amino acid
T ²²¹ D	α 6- α 7	neutral to acidic amino acid
N ²⁵¹ S	A7- β 1	acylamino to hydroxy amino acid
W ³⁷⁶ F	β 6- β 7	heterocyclic to aromatic amino acid
N ³⁰⁶ R	β 2	neutral to alkaline amino acid
⁴³⁹ GGT ⁴⁴⁰	β 10- β 11	forming the turn between sheets
R ⁵⁷⁰ G	β 21	electropositive to neutral amino acid
R ⁵²² E	β 17	electropositive to electronegative amino acid

通过重叠引物 PCR 的方法构建了一系列半长突变基因并将其连接到了 pET-21b 上,并转化了 JM110,提取质粒,PCR 和酶切鉴定正确后,进行序列测定,结果表明所有突变位点和 DNA 片段均准确无误。

2.2 突变蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 检测

将重组质粒导入大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达后,进行 SDS-PAGE 检测,结果表明这些突变基因能正常表达。图 2 中为部分突变蛋白电泳分析结果:

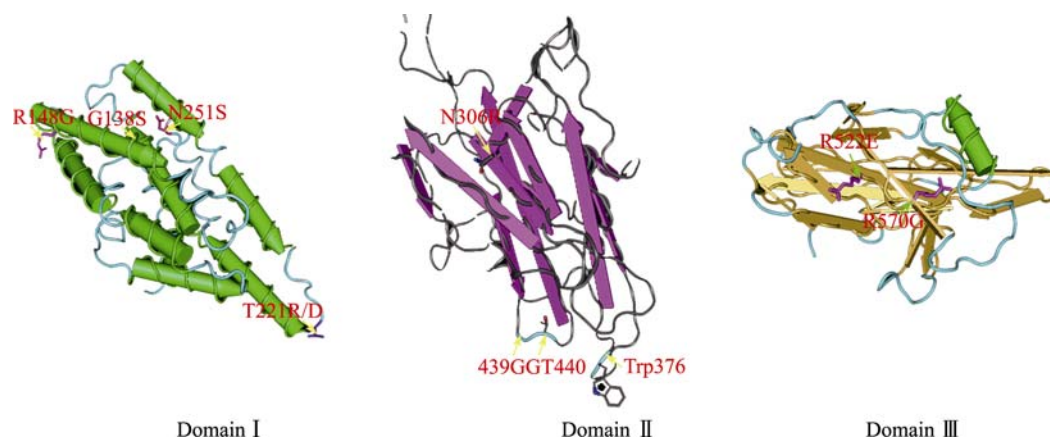


图 1 Cry1Ca7 三个结构域及各突变位点

Fig. 1 3D structure of three domains of Cry1Ca7 protein and amino acid sites of mutagenesis.

R¹⁴⁸G、N²⁵¹S、R⁵²²E、T²²¹D/R 和 ⁴³⁹GGT⁴⁴⁰，其它蛋白的表达与这几种突变蛋白相同（图片略），表达的

突变蛋白分子量均约为 68 kDa（lane 3、4、5、6、7、8）。

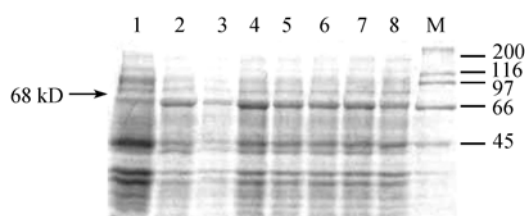


图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of mutant proteins. 1. CK BL21; 2. Cry1Ca7; 3. R¹⁴⁸G; 4. N²⁵¹S; 5. R⁵²²E; 6. T²²¹R; 7. T²²¹D; 8. ⁴³⁹GGT⁴⁴⁰; M. Protein Marker.

2.3 突变蛋白生物活性测定结果

通过表 4 可以看出，在结构域 I 中，活性上升的突变蛋白是 R¹⁴⁸G，提高为原来的 6 倍，活性降低的突变蛋白有：N²⁵¹S 和 G¹³⁸S 的活性变为原来的 1/2，T²²¹R 变为原来的 1/3 左右，T²²¹D 完全丧失了活性；结构域 II 中的突变活性都降低了：W³⁷⁶F 变为原来的 1/3 左右，N³⁰⁶R 变为原来的 1/6，⁴³⁹GGT⁴⁴⁰ 变为原来的 1/30；在结构域 III 中，R⁵⁷⁰G 和 R⁵²²E 的活性都降低到原来的 1/10 到 1/20。

表 4 不同的突变 Cry1Ca7 蛋白对甜菜夜蛾的生物活性测定结果

Table 4 Bioassays results of different expression products against *Spodoptera exigua* larvae

Mutants	Domains	Secend structure	LC ₅₀ / (μg/mL)	95% fiducial Limits
Cry1Ca7			40.0	21.0–67.0
R ¹⁴⁸ G		α4	7.0	2.0–11.0
N ²⁵¹ S		α7–β1	72.0	10.0–288.0
G ¹³⁸ S		α4	73.1	39.3–95.4
T ²²¹ R	Domain I	α6–α7	146.0	38.0–291.0
T ²²¹ D		α 6–α7	>10000	–
W ³⁷⁶ F		β6–β7(loop2)	142.8	75.0–207.0
N ³⁰⁶ R		β2	247.0	100.0–952.0
⁴³⁹ GGT ⁴⁴⁰	Domain II	β10–β11(loop)	1350.0	536.0–4100.0
R ⁵⁷⁰ G		β21	376.0	138.7–2065.4
R ⁵²² E	Domain III	β17	529.0	272.0–898.0

3 讨论

重叠引物 PCR 方法是一种成熟实用的技术，已广泛用于基因定点突变、结构域互换等分子设计研究。

本文通过重叠引物 PCR 的方法对 Cry1Ca7 蛋白进行定点突变的研究，关键位点对活性的影响较大。在结构域 I 中，通过对模型的分析发现，G138 位于

α4 螺旋内，将其突变为 Ser 后 (G¹³⁸S)，非极性氨基酸变成了极性氨基酸，活性有所降低。有文献报导，位于 Cry4B 蛋白 α4–α5 内的保守位点 R¹⁴⁸ 与插入膜有关^[15]。本文将其变为不带电荷的甘氨酸，提高与疏水环境的亲和力，而且 Gly 是一个转角氨基酸（图 1 Domain I），发现毒力为突变前的 6 倍，由此可见，Cry1Ca7 的 R¹⁴⁸ 的插膜功能确实与毒性相关。Cry1 类蛋白的 Block 2 可以形成至少 4 种盐桥^[6]。我们通

过结构建模和序列分析,将第 221 位的 Thr 变成 Asp/Arg 后,中性氨基酸向酸/碱性氨基酸的变化,可能与 Arg²⁸¹ 形成盐桥。生物测定结果发现,T²²¹D 的活性几乎完全丧失,T²²¹R 的毒性降低了 3 倍,说明氨基酸的酸碱性及其位置对形成盐桥作用不同,对毒性的影响程度也不同。

在结构域 中,通过对模型的分析发现,N251 位于结构域 与结构域 交汇处的 $\alpha 7$ - $\beta 1$ (图 1 Domain)。进行 N²⁵¹S 诱变后,极性酰胺键变成了极性羟基,活性降低了一半。Tuntitipawan 等认为,位于 $\beta 2$ - $\beta 3$ 的 R336 可以与 $\beta 8$ - $\beta 9$ 的 A410 形成氢键,使蛋白结构更加紧密^[16]。我们将 Cry1Ca7 的第 306 位 Asn 变成 Arg 后,毒性降低了 6 倍多,可见,氢键的形成与否和形成位置对蛋白活性影响很大。Smith and Ellar 等人研究发现 Cry1Ca1 的 Gln374-Pro377(loop3) 与受体的结合能力有关^[17],Trp 的侧链具有形成氢键的能力,在蛋白质结构中是位于内外部皆可的氨基酸。本文通过 W³⁷⁶F 的突变研究发现,Trp 和 Phe 的侧链大小虽然相同,但杂环族氨基酸变成芳香族氨基酸后,因为 Phe 是非极性的,在与受体结合的区域蛋白质结构中更多的被包裹在内部,有可能因此失去形成氢键的机会,可见,与受体的结合的 loop3 中的氨基酸必须保持形成氢键的能力(图 1 Domain)。Rajamohan 等发现,在 Cry1Ab 中,⁴³⁹GGT⁴⁴⁰位于 $\beta 10$ - $\beta 11$ (结构域 的 loop3),与初始结合有关^[8]。本文在 Cry1Ca7 的这个关键环区中增加了一个容易产生拐角的氨基酸 Gly,使⁴³⁹GGT⁴⁴⁰的活性降低了 30 倍,因此在诱变的选择上,氨基酸的角度和 loop 的长度要同时兼顾。

在结构域 中,Masson 等研究结果表明,位于 $\beta 17$ - $\beta 18$ 之间的 R522 在 Cry1 类中是保守的,与 Block 2 的 R254 相互作用,与结合膜渗透性有关^[18]。本文将的第 522 位的 Arg 变为 Glu,这种从带正电荷的氨基酸变为带负电荷的氨基酸使其毒力下降了 13 倍(图 1 Domain),今后将验证 Cry1Ca7 中的 R522 是否同样与结合膜渗透性有关。除此之外,带电荷氨基酸向不带电荷氨基酸的转变,如 R⁵⁷⁰G,活性降低至原来的 1/10。目前,由于结构域 III 其作用机理尚未明确,所以合理解释其活性降低的原因还需要更多的试验证据的支持。

综上所述,在有些 Cry1 类保守的位点 R148 进行突变,得到了与文献报道一致的结果,说明,这个保守位点发挥毒性的机理在 Cry1 类蛋白中是相似的。在其它比较保守的位点(W³⁷⁶F、R⁵²²E)关键位点的氨基酸性质的变化(N²⁵¹S、G¹³⁸S、T²²¹R/D、

N³⁰⁶R、⁴³⁹GGT⁴⁴⁰和 R⁵⁷⁰G),毒性没有提高,反而降低了,原因可能有两点:一是这些位点发挥毒性的机理在不同蛋白之间有着比较大的差异;二是同源建模产生的模型不准确,导致对应的关键位点选择误差,这些因素将在今后研究中重点考虑和改善。

供试突变基因在大肠杆菌与苏云金芽孢杆菌中表达的差异性。在大肠杆菌中,突变基因与 Cry1Ca7(均为半长基因)在表达水平上没有明显的差异,所有的蛋白以包涵体的形式存在。在苏云金芽孢杆菌中,以全长基因形式表达,可以形成双锥体型晶体,可溶于碳酸钠等碱性缓冲液,这些蛋白的表达、生化特性没有显著变化。

本文通过重叠引物 PCR 的方法对 Cry1Ca7 蛋白进行定点突变的研究,对其它 Cry 蛋白的分子设计和改造具有重要的参考价值。由此获得的活性提高的诱变基因及其表达产物将可作为新的杀虫资源,用于抗虫遗传工程菌和转基因植物的构建;同时为揭示 Cry 蛋白的杀虫机理创造了必要的物质条件。

参 考 文 献

- [1] Herrero S, Gonzalez-Cabrera J, Ferre J, et al. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains and in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem J*, 2004, 384(Pt 3): 507-513.
- [2] Grochulski P, Masson L, Borisova S, et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol*, 1995, 254 (3): 447-464.
- [3] Kumar AS, Aronson AI. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *J Bacteriol*, 1999, 181 (19): 6103-6107.
- [4] Audtho M, Valaitis AP, Alzate O, et al. Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1 delta-endotoxin by protein engineering. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65 (10): 4601-4605.
- [5] Alcantara EP, Alzate O, Lee MK, et al. Role of alpha-helix seven of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin in membrane insertion, structural stability, and ion channel activity. *Biochemistry*, 2001, 40(8): 2540-2547.
- [6] Bah A, van Frankenhuyzenk., Brousseau R, et al. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *J Invertebr Pathol*, 2004, 85 (2): 120-127.
- [7] Lu H, Rajamohan F, Dean DH. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAa associated

- with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J Bacteriol*, 1994, 176: 5554–5559.
- [8] Rajamohan F., Hussain SR., Dean DH., *et al.* Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb delta-endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J Biol Chem*, 1996, 271: 25220–25226.
- [9] Lee MK., Jenkins JL., Dean DH., *et al.* Mutations at the arginine residues in alpha8 loop of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAc affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *FEBS Lett*, 2001, 497: 108–112.
- [10] Ballester V., Granero F., Ferre J., *et al.* Role of *Bacillus thuringiensis* toxin domains in toxicity and receptor binding in the diamond-back moth. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 1900–1903.
- [11] bdul-Rauf M., Ellar DJ. Mutations of loop 2 and loop 3 residues in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin affect insecticidal specificity and initial binding to *Spodoptera litoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes. *Curr Microbiol*, 1999, 39: 94–98.
- [12] Herrero S., Gonzalez-Cabrera J., de Maagd RA., *et al.* Mutations in the *Bacillus thuringiensis* CryICa toxin demonstrate the role of domains and in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem J*, 2004, 384: 507–513.
- [13] Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 分子克隆实验指南, 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [14] Russel RM. POLO: a new computer program for probit analysis. *ESA Bull*, 1977, 23: 209–213.
- [15] Kanintronkul Y., Sramala I., Katzenmeier G., *et al.* Specific mutations within the alpha4-alpha5 loop of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin reveal a crucial role for Asn-166 and Tyr-170. 2003, *Mol Biotechnol*, 24: 11–20.
- [16] Tuntitippawan T., Boonserm P., Katzenmeier G., *et al.* Targeted mutagenesis of loop residues in the receptor-binding domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin affects larvicidal activity. 2005, *FEMS Microbiol Lett*, 242: 325–332.
- [17] Smith GP., Ellar DJ. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin affects insecticidal specificity. 1994, *Biochem J*, 302: 611–616.
- [18] Masson L., Tabashnik BE., Mazza A., *et al.* Mutagenic analysis of a conserved region of domain III in the CryIAc toxin of *Bacillus thuringiensis*. 2002, *Appl Environ Microbiol*, 68: 194–200.

Effect of Cry1Ca7 protein modified by site-directed mutagenesis on inhibiting *Spodoptera exigua* Hübner

Yu Ren¹, Huamei Liu¹, Fuping Song¹, Dafang Huang², Jie Zhang^{1*}

(¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

(² Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] To obtain the mutants with different toxicity from the wild-type Cry1Ca7. [Methods] Insecticidal crystal protein Cry1Ca7 from *Bacillus thuringiensis* which is highly toxic to *Spodoptera exigua*, an important agricultural pest in China, and we mutated this toxin by over-lapping extensive PCR method in different domains to obtain 11 chimeric mutants. [Results] The results of bioassays against *Spodoptera exigua* neonates showed that several conserved amino acid sites were crucial to insects. The pesticidal activities of most of mutated proteins were decreased, including Glycine¹³⁸ Serine, Threonine²²¹ Aspartic acid, Threonine²²¹ Argine, Asparagine²⁵¹ Serine, ⁴³⁹GlycineGlycineThreonine⁴⁴⁰, Asparagine³⁰⁶ Argine, Tryptophan³⁷⁶ Phenylalanine, Argine⁵²² Glutamic acid and Argine⁵⁷⁰ Glycine. The activity of those mutated proteins in the Domain was ⁴³⁹GlycineGlycineThreonine⁴⁴⁰ < Asparagine³⁰⁶ Argine < Tryptophan³⁷⁶ Phenylalanine. In the Domain , the mutant Argine⁵²² Glutamic acid < Argine⁵⁷⁰ Glycine, their toxicities reduced distinctly compared with Cry1Ca7. The toxicities of the mutant Argine¹⁴⁸ Glycine in Domain increased six-fold, nevertheless the activities of the mutants Glycine¹³⁸ Serine, Threonine²²¹ Argine and Asparagine²⁵¹ Serine mutant reduced totally, even the mutant of Threonine²²¹ Aspartic acid was not toxic entirely. In [Conclusion] It is relatively easier to obtain mutant with higher toxicity in Domain of Cry1Ca7 protein than these in both Domain and . We can use the improved mutant genes as the potential resources to construct novel engineering bacteria and transgenic plant, meanwhile, to perform the study of interaction mechanism between insects and Cry proteins.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; insecticidal crystal protein; Site-directed mutagenesis; *cry1Ca7* gene; *Spodoptera exigua*

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China(06AA10A212)and the National Natural Science Foundation of China(0571252)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62815921; E-mail: hang@ippcaas.cn

Received: 15 November 2007/ Revised: 17 March 2008