

苏云金芽胞杆菌杀线虫伴胞晶体蛋白基因 *cry6Aa* 的克隆与表达

余子全** 白培胜** 郭素霞 喻子牛 孙 明*

(华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘 要 通过对晶体蛋白 N-末端氨基酸测序,设计简并探针,从对根结线虫高毒力苏云金芽胞杆菌 YBT-1518 菌株中克隆到 1 个含有杀线虫晶体蛋白基因的片段。序列测定表明该序列含有两个 ORF(*orf1* 和 *orf2*),其中 *orf1* 与基因 *cry6Aa1* 同源性为 98%,已在 GenBank 上登录(Acc. NO. AF499736),并被命名为 *cry6Aa2*。将克隆的该片段克隆到穿梭载体 pHT304 上,并转化苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171,重组菌株可形成米粒状伴胞晶体。生物测定表明,表达的毒素蛋白对北方根结线虫的 LC_{50} 为 $9.47\mu\text{g}/\text{mL}$,毒力与出发菌株($10.74\mu\text{g}/\text{mL}$)相当。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 线虫; *cry6Aa2* 基因; 基因克隆; 表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0865-04

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)是一种在土壤中广泛分布的革兰氏阳性细菌,其形成的伴胞晶体蛋白对鳞翅目、鞘翅目、双翅目等害虫有毒杀活性,还对线虫、螨类和疟原虫等有毒,在害虫的生物防治中扮演着极其重要的角色^[1]。现已从 Bt 中克隆到 *cry1-cry51* 及 *cyt1-cyt2* 共 53 大类杀虫晶体蛋白基因^[2,3],包括编码对线虫有毒性的晶体蛋白基因。根据这些杀线虫基因编码的蛋白质氨基酸序列同源性可以将这些毒素蛋白分为两个亚家族,*Cry5* 和其它抗线虫晶体蛋白 *Cry12*、*Cry13*、*Cry14*、*Cry21* 等同源性较高,它们共有同 1 个祖先,为 *Cry5* 亚家族,分子量一般为 65 ~ 155kDa;而 *Cry6* 则同其它晶体蛋白毒素晶体蛋白同源性都很低,为 *Cry6* 亚家族,分子量一般为 45 ~ 65kDa^[4,5]。所有这些杀线虫基因都受 Mycogen 公司的专利保护,而公开发表的数据极少^[6]。

植物寄生线虫是一种重要的病原生物,给农业生产造成巨大的损失,传统的防治方法都有一定的局限性。由于植物寄生线虫大多是以刺吸式口器的口针从寄主细胞内吸收营养物质,而且一般均为内寄生,Bt 晶体蛋白很难直接通过口针进入其体内,这给应用 Bt 防治植物寄生线虫带来了很大的困难。自上世纪七十年代发现苏云金芽胞杆菌外毒素及内毒素(伴胞晶体蛋白)对线虫有毒杀活性以来^[7,8],

国外在此方面作了大量的研究,而国内还没有见到有关这方面的报道。目前有关 Bt 对线虫的作用研究主要集中在 *Cry5B* 毒素蛋白对秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的作用机理方面,发现线虫体内的糖脂可作为毒素蛋白受体,而且这些糖脂均含有一个在无脊椎动物中广泛存在而在脊椎动物中不存在的四糖结构。毒素和受体的结合还受到半乳糖等碳水化合物的调节^[9~13]。这些研究旨在以模式生物秀丽小杆线虫(*C. elegans*)为模型,研究晶体蛋白毒素对无脊椎动物的作用机理及 Bt 在寄生线虫的生物防治中的应用潜力,但真正有关 Bt 防治寄生线虫,尤其是植物寄生线虫方面的报道非常少。

苏云金芽胞杆菌 YBT-1518 是本实验室分离到的一株对北方根结线虫(*Meloidgyne hapla*)高毒力的菌株。本研究从该菌株中克隆到杀线虫蛋白基因 *cry6Aa2*,并完成了该基因的序列分析、在无晶体突变株中的表达及表达产物的杀线虫活性分析,为发掘 Bt 防治植物寄生线虫的应用潜力和研究 Bt 对线虫作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 YBT-1518 为本实验室分离的一株对线虫高毒力 Bt 菌株,无鞭毛,产生米粒状伴胞

基金项目: 国家 863 计划(2006AA02Z174, 2006AA03A243), 国家 973 项目(2003CB114201)

* 通讯作者。Tel: 86-27-87283455; Fax: 86-27-87280670; E-mail: yn98sun@mail.hzau.edu.cn

** 作者简介: 对本文有同等贡献。余子全(1976-),男,湖北蕲春人,博士研究生,主要从事杀虫微生物研究。E-mail: yuziquan@webmail.hzau.edu.cn; 白培胜(1978-),男,广东茂名,人,硕士研究生。

收稿日期: 2007-01-29; 接受日期: 2007-05-14; 修回日期: 2007-07-01

晶体蛋白 ;BMB171 为苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 ;pHT304 为大肠杆菌-苏云金芽胞杆菌穿梭载体^[14]。pBMB15 为含有 *cry6Aa2* 基因的克隆片段以 *Hind*III 位点插入 pHT304 构建的重组质粒。

1.1.2 主要试剂和仪器 :限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 *Taq* 酶均为 TaKaRa 公司产品 ;DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling and Detection Kit 购自 Roche 公司 ;引物和简并寡核苷酸探针合成、测序由北京奥科生物技术公司完成 ;蛋白质测序由上海基康生物技术有限公司完成。

1.1.3 培养基 :LB 培养基见参考文献[15] ;PM 培养基见参考文献[16]。

1.2 苏云金芽胞杆菌质粒 DNA 和总 DNA 抽提

Bt 质粒 DNA 抽提参照参考文献[17]进行 ,总 DNA 抽提参照参考文献[18]进行。

1.3 *cry6Aa2* 基因的克隆和序列测定

DNA 酶切、电泳分析、DNA 回收、连接反应及大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 转化均按产品说明书及分子克隆实验指南进行^[15]。克隆片段连接到 pUC19 上测序。

1.4 Southern blot、菌落原位杂交和斑点杂交

根据测定的晶体蛋白 N-末端氨基酸序列设计简并寡核苷酸引物 (5'-ATGATHATHGAYW SNAARACNAC-3') 然后通过 DIG 标记作为探针 ,标记方法参照 DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling and Detection Kit 说明书进行。Southern blot、菌落原位杂交和斑点杂交参照分子克隆实验指南进行^[15]。

1.5 Bt 转化

构建的重组质粒电转化到 BMB171 中 ,电击参数为 :脉冲场强 $V = 10\text{kV/cm}$,电容 $C = 25\mu\text{F}$,电阻 $R = 200\Omega$,脉冲时间 $G = 4.6\text{ms}$ 。

1.6 伴胞晶体蛋白 SDS-PAGE 及其 N-末端测序

Bt 菌株在 PM 培养基上 30℃ 培养至胞晶分离^[18] ,收集菌体 ,1mol/L NaCl 洗涤 3 次 ,蒸馏水洗 3 次 ,ddH₂O 悬浮菌体 ,加等量上样缓冲液 ,95℃ 加热 3~5min ,10000r/min 离心 2min ,取上清液点样电泳。凝胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上测序。

1.7 生物活性测定

供试线虫采用北方根结线虫 (*Meloidgyne hapla*)。从被北方根结线虫感染的番茄根部采集虫卵 ,自来水冲洗干净 ,用 0.5% NaClO 表面消毒后 ,再用无菌水冲洗干净 ,在 25℃ 孵化 2d ,即可得到大量活跃的 2 龄幼虫 ,用作生物测定。

用 PM 培养基培养待测菌株至胞晶分离 ,收集

菌体用 ddH₂O 洗 3 次 ,沉淀用晶体裂解液 (50mmol/L Na₂CO₃ , 2% β-巯基乙醇 , pH 9.5) 悬浮 ,37℃ 温育 30min ,离心取上清液 ,透析 24h 以上即为生测样品。样品中蛋白浓度测定参照文献^[19]进行。生物测定在 96 孔酶标板中进行 ,每孔吸入 40 头 2 龄幼虫 ,加入稀释好的毒素蛋白 ,每孔体积为 100μL ,不足部分用无菌水补充。设 5~7 个浓度梯度 ,每个浓度设 4 个重复。pH9.0、25℃ 条件下作用初孵北方根结线虫 2 龄幼虫 ,用 20μg/mL BSA 作对照 ,7 天后统计死亡率。将死亡率校正后换算成几率值 ,蛋白浓度换算成对数值 ,求出二者之间回归方程计算 LC₅₀。校正死亡率 = 处理死亡率 (1 - 对照死亡率) × 100%。

2 结果

2.1 *cry6Aa* 基因的克隆

YBT-1518 菌株在 PM 培养基上能形成形态特殊的米粒状伴胞晶体形态 (图 1-A)。SDS-PAGE 显示伴胞晶体由分子量为 54kDa 和 45kDa 的 2 个蛋白质组成 (图 2 , lane 1)。测定 54kDa 蛋白的 N-末端氨基酸序列为 MIIDSKTTLPRHSLI。根据该序列设计简并寡核苷酸探针 ,Southern blot 证明该蛋白的编码基因定位在 3.0kb *Hind*III 片段上 (图 3)。

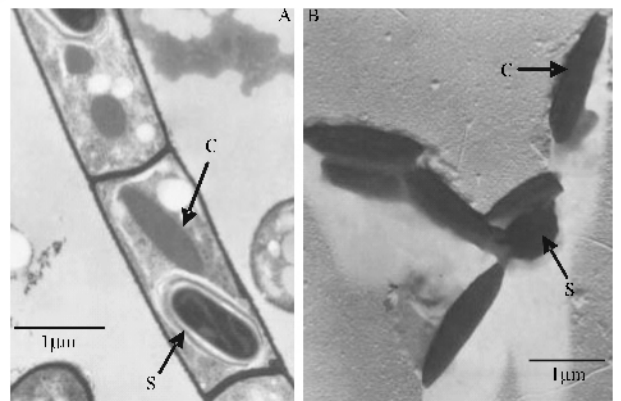


图 1 YBT-1518 和 BMB171-15 的伴胞晶体透射电镜图 (1:12000× 2:10 000×)

Fig. 1 Transmission electron micrographs of parasporal crystal from YBT-1518 and BMB 171-15. S: spore; C: crystal. A: YBT-1518; B: BMB171-15.

以简并寡核苷酸为探针 ,采用菌落杂交技术从 3.0 kb *Hind*III 基因组文库中筛选出 3 个阳性反应转化子 ,分别含有重组质粒 pBMB15 , pBMB102 和 pBMB40

选取重组质粒 pBMB15 ,对插入的外源片段测序 ,得到一个 2941bp 克隆片段。GeneScan 分析显示该序列含有两个 ORF :orf1 和 orf2 ,orf1 编码的前 15 个氨基酸与测定的 N-末端氨基酸序列完全相同 ,说明 orf1 即为要克隆的目标基因。两 ORF 相隔 88bp。

中间还有核糖体结合特征序列(GGAGG)。BLAST分析显示 *orf1* 与只公布 1455bp 编码区的 *cry6Aa1* 基因核苷酸序列相似性为 98%, 被国际苏云金芽胞杆菌杀虫基因命名委员会命名为 *cry6Aa2*。利用蛋白质分析工具分析表明: *orf1* 编码 475 个氨基酸, 分子量为 54075.49Da, 等电点为 5.01; *orf2* 编码 301 个氨基酸, 分子量为 35141.89Da, 等电点为 5.02。本序列已经在 GenBank 上登陆, 登陆号为 AF499736。

序列分析表明, 在 *orf1* 的后半部分, 存在 3 个正向重复序列(ATTGGTATAATAATT) 相应的氨基酸也是 3 个重复, 编码的都是极性氨基酸, 这与蛋白质的稳定性有关。重复序列中多是 AT 碱基, 而且包含有启动子特征序列 TATAAT, 结合 *orf2* 来看, 这里就可能是 *orf2* 的启动子。但是在这 3 个正向重复序列之后, 核糖体结合特征序列之前, 还存在一对反向重复序列 TAATAAACGGGAAAAATAA 和 TTATTTTTCCCGTTTATTA, 形成一个“茎环”结构, *orf1* 翻译到其上游就会被终止, *orf2* 就不会表达, 这与 SDS-PAGE 结果相符(图 2, lane 2)。

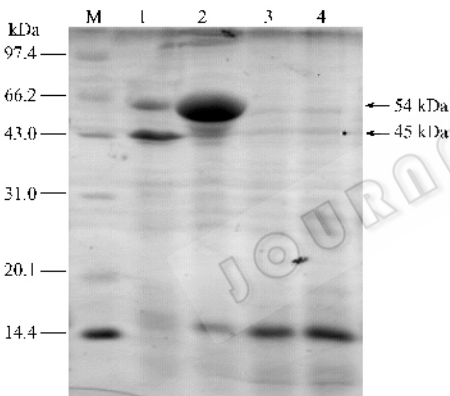


图 2 晶体蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of crystal proteins. M. Marker; 1. YBT-1518; 2. BMB171-15; 3. BMB171-304; 4. BMB171.

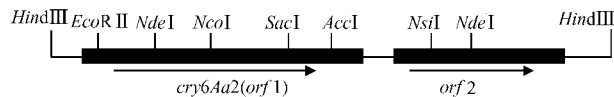


图 3 克隆片段酶切图谱

Fig. 3 Restriction map of cloned segment with gene *cry6Aa2*.

2.2 *cry6Aa* 基因的表达

SDS-PAGE 分析表明重组菌株 BMB40、BMB102 和 pBMB15 都未能表达目的蛋白(未列数据)。这可能是大肠杆菌的特异 δ 因子不能识别 *orf1* 和 *orf2* 的启动子的缘故。重组菌株 BMB171-15 在 PM 培养基上正常生长和发育, 在细菌的芽胞形成期表达产生形成 54 kDa 蛋白, 形成米粒状晶体(图 1-B)。表达蛋白的分子量和形成的晶体形态同野生菌株 YBT-1518 表达蛋

白分子量和晶体形态一致(图 2, lane 2)。

2.3 杀线虫活性分析

生物测定结果显示, 纯化表达的伴胞晶体蛋白对北方根结线虫的毒力较高, 其 LC_{50} 为 9.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与出发菌株 YBT-1518 (LC_{50} 为 10.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 相当(表 1)。

表 1 YBT-1518 及 BMB171-15 对北方根结线虫的生物测定结果

Table 1 Bioassay of YBT-1518 and BMB171-15 against 2 stage larvae of *M. hapla*

Strain	Regression linear equation	Relativity	LC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
YBT-1518	$y = 1.2576x + 3.7033$	0.9891	10.74
BMB171-15	$y = 1.6433x + 3.3954$	0.9680	9.47

3 讨论

本研究采用蛋白质末端测序方法从 YBT-1518 中克隆到一个杀线虫基因 *cry6Aa2*, 在无晶体突变株 BMB171 中获得高效表达, 并且形成与出发菌株相似的米粒状晶体。生物测定结果表明, *cry6Aa2* 基因在 BMB171 中表达的晶体蛋白对北方根结线虫的毒力很高, 其 LC_{50} 与 YBT-1518 菌株大致相当。由于 YBT-1518 菌株的生物测定样品包含 54 kDa 和 45 kDa 两种蛋白, 推测 45 kDa 蛋白也具有杀线虫活性。目前我们已经克隆到该 45 kDa 蛋白基因, 并且其表达产物对线虫也表现出毒力。该实验证实了我们的推测, 结果将另作报道。

本研究克隆到的核苷酸片断除了含有杀线虫晶体蛋白基因 *cry6Aa2* 外, 在其下游还存在另外一个基因 *orf2*, 两者被一茎环间隔开。有关 *orf2* 的功能还不清楚, 我们推测这两个基因之间可能存在着某种关系, 该工作正在进行中。

在杀线虫晶体蛋白中, *Cry5B* 和 *Cry6A* 分别是 *Cry5* 亚家族和 *Cry6* 亚家族其典型代表。*Cry5B* 与结构已知的 *Cry1* 和 *Cry3* 一样也具有保守三结构域结构, 而 *Cry6A* 与 *Cry5B* 及其它所有晶体蛋白结构都不相同^[5]。研究结果也表明, 对 *Cry5B* 具有抗性的秀丽小杆线虫 (*C. elegans*) *bre* 基因突变体对 *Cry6A* 仍然敏感, 这预示着 *Cry6A* 对线虫的作用机理可能与 *Cry5B* 完全不同^[9]。本研究克隆的 *cry6Aa2* 基因不但对研究其独特的杀虫机理有着重要的理论意义, 也为植物寄生线虫的生物防治和线虫抗性的治理提供了一条新的有效途径。

参 考 文 献

- [1] Schnepf EN, Crickmore N, van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 775-806.
- © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, *et al.* Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 807–813.
- [3] Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf, E, *et al.* “ *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature ” (2007) http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
- [4] Wei JZ, Hale K, Carta L, *et al.* *Bacillus thuringiensis* crystal protein that target nematodes. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, **100**: 2760–2765.
- [5] Marroquin LD, Elyassnia D, Griffiths JS, *et al.* *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2000, **155**: 1693–1699.
- [6] Payne JM. Isolates of *Bacillus thuringiensis* that are active against nematodes. 1993, U.S. Patent 5 270 448.
- [7] Prasad SSV, Tilak KVBR, Gollakota KG. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root-knot disease. *J Invertebr Pathol*, 1972, **20**: 377–378.
- [8] Ignoff CM, Dropin VH. Deleterious effects of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* on species of soil-inhabiting, myceliophagus and plant-parasitic nematodes. *J Kansas Ent Soc*, 1977, **50**: 394–398.
- [9] Griffiths JS, Haslam SM, Yang T, *et al.* Glycolipids as receptor for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. 2005, *Science*, **37**: 922–925.
- [10] Griffiths JS, Huffman DL, Whitacre JL, *et al.* Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 45594–45602.
- [11] Griffiths JS, Whitacre JL, Stevens DE, *et al.* Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science*, 2001, **293**: 860–864.
- [12] Griffiths JS, Aroian RV. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *BioEssays*, 2005, **27**: 614–624.
- [13] Huffman DL, Bischof LJ, Griffiths JS, *et al.* Pore worms: Using *Caenorhabditis elegans* to study how bacterial toxins interact with their target host. *Int J Med Microbiol*, 2004, **293**: 599–607.
- [14] Arantes O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 1991, **108**: 115–119.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] Sun M, Luo X, Dai J, *et al.* Evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strain from chinese soils toxic to mosquito larvae. *J Invertebr Pathol*, 1996, **68**: 77–79.
- [17] Kalman S, Kiehne KL, Libs JL, *et al.* Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 1131–1137.
- [18] Mizuki E, Park YS, Saitoh H, *et al.* Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, **7**: 625–634.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.

Cloning and expression of nematocidal crystal protein gene *cry6Aa* of *Bacillus thuringiensis*

YU Zi-quan^{**}, BAI Pei-sheng^{**}, GUO Su-xia, YU Zi-niu, SUN Ming^{*}

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract : On the basis of the sequencing of the N-terminal amino acid of the crystal protein, a nucleotide acid fragment harboring a novel nematocidal gene *cry6Aa2* was obtained from *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1518. This fragment contains two ORFs: *orf1* and *orf2*, while a “stem-loop” exists between *orf1* and *orf2*. BLAST showed the similarity of *orf1* nucleotide acid sequence with *cry6Aa1* is 98%, and has been deposited in the Genbank database (Acc. No. AF499736). The cloning fragment was transferred to crystal negative mutation strain BMB171 by *E. coli-Bt* shuttle vector pHT304. A 54kDa protein with similarity to strain YBT-1518 was detected in recombinant strain, and rice shaped crystal was detected with transmission electron microscope. Bioassay indicated the LC₅₀ of recombinant strain against second larvae juvenile of *Meloidogyne hapla* is 9.47 μg/mL, nearly equal to the original strain YBT-1518 (10.74 μg/mL).

Keywords : *Bacillus thuringiensis* ; Nematode ; *cry6Aa2* gene ; gene cloning ; expression

Foundation item : National Programs for High Technology Research and Development of China (863)(2006AA02Z174 , 2006AA03A243) ; Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (973)(2003CB114201)

^{*} Corresponding author. Tel : 86-27-87283455 ; Fax : 86-27-872806 ; E-mail : m98sun@mail.hzau.edu.cn

^{**} Equal contribution

Received : 29 January 2007 / Accepted : 14 March 2007 / Revised : 1 July 2007