

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(5):601-605; 4 May 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

对粉纹夜蛾高毒力 *cry9Ea* 基因的克隆及表达

孙永祥¹, 刘廷辉², 郭巍^{1,2*}, 王立光², 孙伟明¹

(¹ 河北农业大学生命科学院, 保定 071001)

(² 河北农业大学植物保护学院, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术中心, 保定 071001)

摘要:【目的】从本实验室分离的 Bt4 菌株中克隆 *cry9Ea* 基因, 并研究其表达和杀虫活性。【方法】以 PCR-RFLP 方法鉴定 Bt4 菌株含有 *cry9* 基因, 然后以菌株 Bt4 的质粒为模板, 利用全长引物 F9EA/R9EA 进行 PCR 扩增全长基因。【结果】将目的片段插入到表达载体 pET21b, 得到大肠杆菌重组表达质粒 pETCry9Ea。转化 *E. coli* BL21(DE3), 诱导后表达 130 kDa 的蛋白, 再将 *cry9Ea7* 基因连接到穿梭载体 pSXY422b, 电激转化 HD73⁻ (*cry⁻*), 得到工程菌 BioHD9Ea7, 提取 Cry9Ea7 晶体蛋白, 并进行生物活性测定。生物活性测定结果显示 Cry9Ea7 蛋白对粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 初孵幼虫具有高毒力, LC₅₀ 为 0.044 μg/mL, 而对甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 和棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 初孵幼虫未显示活性。【结论】克隆和表达了一个对粉纹夜蛾高毒力的基因 *cry9Ea7*, 并成功构建了工程菌 BioHD9Ea7。

关键词: 苏云金杆菌; *cry9Ea7* 基因; 基因克隆; 基因表达; 杀虫活性

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0601-05

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称苏云金杆菌或 Bt) 是一种广泛存在于土壤中的革兰氏阳性细菌。其特点是在其营养期后期产生伴胞晶体, 此伴胞晶体称为 δ-内毒素 (delta-endotoxin) 或称杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, 简称 ICPs)^[1]。由于其毒力高, 专一性强, 对人畜和环境安全而成为目前世界上使用最广泛的生物杀虫剂。自 1938 年第一个 Bt 商品制剂在法国问世以来, 其杀虫谱已达到包括鳞翅目、双翅目、鞘翅目、同翅目、膜翅目及螨类等十目 500 多种害虫^[2]。

编码苏云金杆菌杀虫晶体蛋白 (ICPs) 的基因称作 *cry* 基因。从 1981 年 Schnepf 和 Whiteley 克隆了苏云金杆菌的第一个杀虫毒素基因^[3] 以来, 已克隆的 *cry* 基因多达 462 个^[4]。由于 *cry* 基因在构建杀虫工程菌株和转基因植物应用中的巨大潜力, 有关高毒力和新型杀虫活性的 *cry* 基因的分离克隆和

开发研究已成为近年来国内外 Bt 研究和利用的热点之一。目前, 克隆的 *cry9* 类基因有 20 个, 其中 *cry9E* 基因有 8 个^[4]。但是 Cry9Ea 类蛋白对粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的杀虫活性还未见报道。粉纹夜蛾是一种危害严重的农作物和花卉害虫, 对粉纹夜蛾有效的是 Cry1 类毒素制剂。现在, 由于此类毒素的广泛应用, 导致了在商业化温室中粉纹夜蛾产生了不同程度的抗性^[5], 夜蛾科害虫的防治是农业生产中比较棘手的问题之一^[6]。因此筛选不同于 Cry1 类对夜蛾科高毒力的菌株和基因是解决这个问题的有效方法。

Bt4 是本实验筛选出的一株对多种鳞翅目害虫高毒力的 Bt 菌株, 经检测含有 *cry9* 基因, 本论文针对 *cry9E* 基因进行了克隆与表达, 并进行了生物活性测定。

基金项目: 国家“973 项目” (2009C13118900); 国家自然科学基金 (30771447); 农业厅科技项目

* 通信作者。Tel/Fax: +86-312-7528178; E-mail: guowei@hebau.edu.cn

作者简介: 孙永祥 (1983-), 男, 河南省许昌县人, 硕士研究生, 研究方向为基因工程与生防微生物。E-mail: sunyongxiang2002@163.com

收稿日期: 2009-10-14; **修回日期:** 2010-01-22

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫:甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、粉

纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)和棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)等试虫均由本实验室饲养。

1.1.2 菌株和质粒:所用菌株和质粒见表1,苏云金杆菌 Bt4 菌株由本实验室分离并保存。

表1 菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Origin
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE hsd(5 thi ((lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacIⁿ lacZ(M15]</i>	Stored in this lab
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)</i>	Stored in this lab
<i>E. coli</i> BL21	F- <i>ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm λ(DE3)</i> ,	Stored in this lab
BL21(cry9Ea7)	<i>E. coli</i> BL21 with pETcry9Ea7, Amp ^R	This work
Bt 4	Wild strain	Stored in this lab
HD73 ⁻ (cry ⁻)	Bt acrySTALLIFEROUS mutant strain	By Dr. Zhang Jie
BioHD9Ea7	HD73 with pScry9Ea7, Amp ^R Er ^R	This work
pET21b	Amp ^R <i>E. coli</i> expression vector, 5.4 kb	Stored in this lab
pSXY422b	Amp ^R Er ^R Bt- <i>E. coli</i> shuttle expression vector, 7.3 kb	By Dr. Zhang Jie

1.1.3 主要试剂和仪器:PCR 扩增相关试剂、限制性内切酶、T4 DNA ligase、DNA Fragment Purification Kit 和 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司。抗生素和其他生化试剂购自 Sigma 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海生工,引物合成和序列测定均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成,Cry9Ea 蛋白的多克隆抗体由河北省科学院生物技术研究所制备。PCR 仪、紫外分光光度仪均购自 Eppendorf 公司,电泳仪购自 BioRad 公司。

1.2 Bt 质粒 DNA 的制备

采用改进的 CTAB 方法,参见文献[7]。

1.3 PCR-RFLP 鉴定体系

参照宋福平等^[8]等方法,通用引物 S5un9/S3un9 见表2。

1.4 引物及聚合酶链式反应

按照已经发表的 *cry9Ea* 基因序列,参照文献设计了扩增全长 *cry9Ea* 开放阅读框的引物 F9EA/R9EA,在 5'和 3'分别引入 *Sal* I 和 *Not* I 内切酶位点,下划线所示,引物序列见表2。PCR 反应条件:94℃ 3 min;94℃,1 min,59℃ 1 min,72℃ 4 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

表2 PCR 扩增所用的引物

Table 2 PCR primers used for amplification

Primers	Primers sequence (5'→3')	Size/ bp	Restriction site
S5un9	AGGACCAGGATTTACAGGAGG	21	-
S3un9	CCCAATGCCAAAGAAGACTAAG	20	-
F9EA	CGGCGT <u>TCGAC</u> ATGAATCGAAATAATCCAAATG	32	<i>Sal</i> I
R9EA	ACGCGGCCGCCTACTCTTGTGTTTCATGAAGCTC	34	<i>Not</i> I

1.5 cry9Ea7 基因的克隆

以 CTAB 法提取的 Bt4 菌株质粒 DNA 为模板,利用全长基因引物 F9EA/R9EA 扩增得到全长基因,经 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切,回收目的片段并连入 pET21b 载体,转化大肠杆菌,筛选阳性克隆^[7]。

1.6 cry9Ea7 基因的序列测定和分析

DNA 测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司完成,DNA 及氨基酸序列采用 DNAMAN 软件、GenBank 数据库和 ExPASy 数据库进行分析。

1.7 cry9Ea7 基因的诱导表达

cry9Ea7 基因的诱导表达参见分子克隆实验手

册^[7]。取未加入 IPTG 时 1 mL 菌液为 0 h,在诱导 2、4、6、8、16 h 时分别取样,经 4℃,8228 × g 离心 10 min 收集菌体,重悬于适量无菌水中。

1.8 Bt 工程菌的构建

将重组载体 pETcry9Ea 经 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切,回收目的片段,连接到穿梭载体 pSXY422b, CaCl₂ 法转化 SCS110 细胞进行去甲基化^[9],然后将去甲基化的重组穿梭质粒(pScry9Ea)电激转化 Bt 无晶体突变株 HD73⁻(cry⁻),(参数:2.2 kV,1 kΩ,25 μF,0.2 cm 电激杯),将转化子涂布于含有氨苄青霉素和红霉素抗性的 LB 平板上,挑取阳性克隆并检验。

1.9 工程菌晶体观察及晶体蛋白提取

挑取鉴定正确的克隆(含 *cry9Ea7* 基因)接入 10 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素的 LB 液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至胞晶分离状态。取样,碱性复红染色后在油镜下观察。利用等电点沉淀法^[10]提取晶体蛋白。

1.10 目的蛋白生物活性测定

采用饲料表面覆盖法^[11]进行生测,将饲料平铺于饲料盒内,将晶体蛋白定量并进行梯度稀释,均匀覆盖饲料表面,晾干后接入 10 头健康初孵幼虫,以空载菌作对照,48 h 后统计死虫数,计算死亡率,共重复 4 次,用 SPASS 软件计算 LC_{50} 。

2 结果和分析

2.1 *cry9* 基因 PCR-RFLP 鉴定与克隆

用通用引物 S5un9/S3un9 扩增得到 1.5 kb 片段,经 *Msp* I & *Cla* I 双酶切,得到 1.4 kb 和 148 bp 片段,表明 Bt4 菌株的 *cry9* 基因为 *cry9Ea*。然后用全长引物 F9EA/R9EA 扩增出 3.5 kb 的片段,经酶切、连接,最后成功构建了原核表达质粒 pET*cry9Ea7*,并转化 BL21(DE3)。

2.2 *cry9Ea* 基因的序列分析

将鉴定得到正确的重组质粒进行测序, Blastn 比对分析,证明克隆的基因为 *cry9Ea* 基因,提交 GenBank 登记,登录号为 FJ380927。该基因编码框为 3453 个碱基,编码 1150 个氨基酸,所编码的蛋白质的分子量为 130 kDa,经国际 Bt 基因命名委员会正式命名为 *cry9Ea7*。该基因与其它 *cry9Ea* 基因序

列相似性为 98% - 99%,该序列推断的蛋白与其它 *Cry9Ea* 类蛋白氨基酸残基相似性为 97% - 98%。

利用欧洲分子生物学开放软件包 EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite),在线调用 pepstats (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/pepinfo/>)后,输入 *Cry9Ea7* 蛋白的氨基酸序列,得到蛋白的一级结构和一些基本参数,结果见表 3。

表 3 *Cry9Ea7* 蛋白的氨基酸残基特性分析

Table 3 Amino acid residues property of *Cry9Ea7*

Residues Property	Number	% by frequency
Tiny (A + C + G + S + T)	323	28.09
Small (A + C + D + G + N + P + S + T + V)	608	52.87
Aliphatic (I + L + V + A)	233	20.26
Aromatic (F + H + W + Y)	143	12.44
Non-polar (A + C + F + G + I + L + M + P + V + W + Y)	573	49.83
Polar (D + E + H + K + N + Q + R + S + T + Z)	577	50.17
Charged (B + D + E + H + K + R + Z)	261	22.69
Basic (H + K + R)	119	10.35
Acidic (B + D + E + Z)	142	12.35

通过用 NCBI Conserved Domain Database 分析 *Cry9Ea7* 蛋白保守结构域,结果表明该蛋白的 Domain I 由 N 端第 70 - 296 位,共 227 个氨基酸残基组成; Domain II 由第 302 - 505 位,共 204 个氨基酸残基组成; Domain III 由第 515 - 651 位,共 137 个氨基酸残基组成。因此 *Cry9Ea7* 蛋白的活性区估计应位于 N 端的第 70 - 651 个氨基酸残基区域(图 1)。

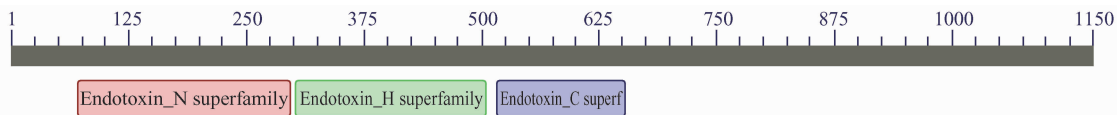


图 1 *Cry9Ea7* 蛋白 3 个结构域

Fig. 1 Three Domains in *Cry9Ea7* protein.

利用蛋白三级结构预测服务 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) 对 *Cry9Ea7* 蛋白进行三维建模,得到最初原子模型(pdb 文件)并用 Swiss pdb viewer 进行评价优化,显示结果如图 2。

2.3 *cry9Ea7* 基因的诱导表达

挑取阳性克隆 BL21(*cry9Ea7*),转接于 100 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。以 BL21(pET21b)做负对照,分别取培养 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h 和 16 h 的培养液 1 mL 进行 SDS-PAGE 分析,表明 *cry9Ea7* 基因在 2 h 后开始表达 130 kDa 左右大小的蛋白。至 16 h 表达量

没有明显变化。

2.4 Bt 工程菌的构建及 SDS-PAGE 分析

提取工程菌 BioHD9Ea7 的 *Cry9Ea7* 晶体蛋白,进行 SDS-PAGE 分析和 Western blotting,结果如图 3。表明工程菌构建成功,并表达 130 kDa 的 *Cry* 蛋白。

2.5 *Cry9Ea7* 蛋白生物活性测定

提取 *Cry9Ea7* 蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行定量,对粉纹夜蛾、甜菜夜蛾和棉铃虫初孵幼虫分别用提取的 *Cry9Ea7* 蛋白进行生物活性测定。测定结果显示,*Cry9Ea7* 蛋白对甜菜夜蛾初孵幼虫

和棉铃虫初孵幼虫没有活性,而对粉纹夜蛾初孵幼虫具有高毒力,LC₅₀为0.044 μg/mL,结果见表4。

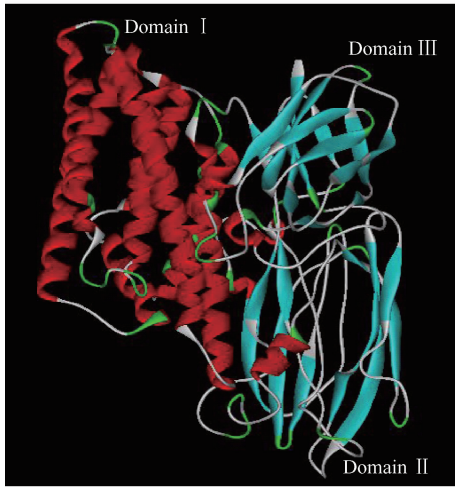


图2 Cry9Ea7 蛋白三级结构预测图

Fig. 2 The tertiary structure prediction of Cry9Ea7 protein.

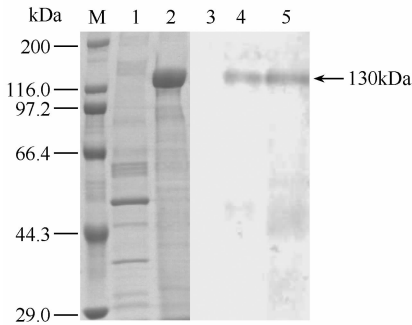


图3 Cry9Ea7 蛋白 SDS - PAGE and Western blot 分析

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of Cry9Ea7 protein.

M. Protein Marker; 1, 3. HD73⁻ (cry⁻); 2, 4. Cry9Ea7 protein; 5. Bt4 protein.

表4 Cry9Ea7 蛋白对粉纹夜蛾、甜菜夜蛾和棉铃虫初孵幼虫的活性测定

Table 4 Toxicity of Cry9Ea7 protein against *T. ni*, *S. exigua* and *H. armigera* neonates

Tested insects	LC ₅₀ / (μg/mL)	95% confidence/ (μg/mL)	Linear equation	regression
<i>T. ni</i>	0.044	0.032 - 0.062	Y = 3.1485 + 1.1243x	
<i>S. exigua</i>	-	-	-	
<i>H. armigera</i>	-	-	-	

note: (-) No toxicity

3 讨论

苏云金杆菌的伴胞晶体具有特异杀虫活性,对目标害虫高效专一,研究相应蛋白的杀虫活性愈来愈受到人们的重视。本实验成功进行了苏云金杆菌

Bt4 中的 *cry9Ea7* 基因的克隆和表达,构建了工程菌,并检测了表达产物的杀虫活性。通过对3种鳞翅目害虫的毒力测定,发现 Cry9Ea7 蛋白对粉纹夜蛾初孵幼虫表现出高毒力,LC₅₀为0.044 μg/mL,而对甜菜夜蛾和棉铃虫没有活性。相关报道的 Cry9Ec1 蛋白对家蚕 (*Bombyx mori*) 和小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 有一定活性,而对斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)、印度谷螟 (*Plodia interpunctella*)、美洲棉铃虫 (*Helicoverpa zea*) 和淡色骚扰库蚊 (*Culex pipiens molestus*) 没有毒性^[12],但没有报道对粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的毒性,本研究首次证实了 Cry9E 类蛋白对粉纹夜蛾具有高活性。经三维建模比较 Cry9Ea7 蛋白与 Cry1 类蛋白的相似性,发现它们在三维结构上有很大的相似性,但是它们的杀虫活性却有很大不同,推测其原因可能是某些特定位点的氨基酸残基决定的。甜菜夜蛾、粉纹夜蛾和棉铃虫都属于鳞翅目夜蛾科,然而 Cry9Ea7 蛋白对它们的活性却相差甚大,这可能与三种昆虫中肠刷状缘膜囊泡上的受体与 Cry9Ea7 蛋白亲和力大小不同或者与围食膜蛋白的结合不同所致,但究竟是什么原因造成的,还有待进一步研究。

提高 Cry 蛋白的杀虫活性及扩大杀虫谱是 Bt 研究面临的现实问题,一方面,可以从自然界筛选高毒力的菌株来解决;另一方面,还必须深刻了解 Cry 蛋白的杀虫机理,根据靶害虫中肠结构,受体与 Cry 蛋白的相互作用去设计新的高活力的 Cry 蛋白,从而定向杀死靶标害虫,提高 Cry 蛋白的应用价值。

参考文献

- [1] Hofte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 1989, 53 (2): 242-255.
- [2] Schnepf E, Crickmore N, Van RJ, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 1998, 62: 775-806.
- [3] HE Schnepf, Whiteley HR. Cloning and Expression of the *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1981, 78(5): 2893-2897.
- [4] Crikmore N. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [Online]. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt.
- [5] Janmaat AF, Myers J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse

- populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the royal society*, 2003, 270 (1530): 2263-2270.
- [6] 于思勤. 中国夜蛾科昆虫区系初步研究(鳞翅目:双孔亚目). *昆虫分类学报 (Entomotaxonomia)*, 1998, 20(1): 44-50.
- [7] Sambrook J, Fritschand EF, Maniatis T. *Molecular cloning, A laboratory manual [M]*. 2nd edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [8] 宋福平, 张杰, 黄大昉等. Bt *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 1998, 31(3): 13-18.
- [9] 任莹博, 宋福平, 陈中义等. 苏云金芽孢杆菌 *cry1Aa14* 基因
- 的分离、克隆及其表达. *农业生物技术学报 (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 2004, 12(2): 188-191.
- [10] 郭艾英, 王硕. 苏云金芽孢杆菌晶体蛋白的制备方法. *食品与发酵工业 (Food and Fermentation Industries)*, 2005, 31(8): 8-10.
- [11] Zhao JZ, Cao J, Li YX, et al. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 1493-1497.
- [12] Wasano N, Saitoh H, Maeda M, et al. Cloning and characterization of a novel gene *cry9Ec1* encoding lepidopteran-specific parasporal inclusion protein from a *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* strain. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51(11): 988-995.

Cloning and characterization of a novel gene *cry9Ea7* encoding crystal protein with high toxicity against *Trichoplusia ni*

Yongxiang Sun¹, Tinghui Liu², Wei Guo^{1,2*}, Liguang Wang², Weiming Sun¹

(¹ College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

(² College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract: [**Objective**] We cloned a novel *cry9Ea* gene encoding a Cry9Ea protein with a high insecticidal activity against *Trichoplusia ni*. [**Methods**] We identified a *cry9*-type gene from Bt strain (Bt4) by PCR-RFLP. The full length *cry9Ea* gene was amplified by PCR with a pair of primers F9EA/R9EA. [**Results**] We cloned the complete *cry9Ea7* gene into pET21b. The SDS-PAGE results showed that the 130 kDa Cry9Ea7 protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3). We also constructed an engineering strain BioHD9Ea7 by transforming a shuttle vector pSXY422b containing the *cry9Ea7* gene into Bt acrySTALLIFEROUS mutant HD73⁻ (*cry*⁻). The bioassay results indicated that the Cry9Ea7 protein was highly toxic against *Trichoplusia ni* neonates, and the LC₅₀ value was 0.044 μg/mL. However, the Cry9Ea7 protein showed no activity against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera* neonates. [**Conclusion**] The novel *cry9Ea7* gene encoding Cry9Ea7 is highly toxic against *Trichoplusia ni* neonates.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; *cry9Ea7* gene; gene cloning; gene expression; insecticidal activity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2009C13118900), the National Natural Science Foundation of China (30771447) and the Science and Technology Project of Agriculture Department

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-312-7528178; E-mail: guowei@hebau.edu.cn

Received: 14 October 2009/ Revised: 22 January 2010