

苏云金芽胞杆菌 Rpp39 杀虫晶体蛋白基因的鉴定及 *cry2Aa12* 基因的克隆表达

谭芙蓉^{1,3}, 朱军^{1,3}, 李云艳^{1,3}, 郑爱萍^{2,3*}, 李平^{1,3*}

¹ 四川农业大学水稻研究所, 温江 611130)

² 四川省农业生物技术工程中心, 温江 611130)

³ 四川农业大学西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 雅安 625014)

摘要:【目的】本研究的目的是分析从四川生态条件下分离的苏云金芽胞杆菌 Rpp39 菌株的特性, 从分子水平上揭示该菌株对鳞翅目高毒力的原因; 进一步从中分离克隆 *cry2Aa* 基因, 并对其进行初步的表达研究。【方法】本研究主要采用扫描电镜观察、PCR-RFLP 鉴定法和 SDS-PAGE 分析法研究菌株的特性; 采用 PCR 直接克隆法克隆 *cry2Aa* 全长基因, 并亚克隆到原核表达载体 pET-30a 中, 构建重组表达质粒 pET-2Aa, 再转入受体菌 *E. coli* BL21(DE3) 中进行诱导表达; 采用室内生物测定法测定表达产物对小菜蛾和水稻二化螟的毒力。【结果】经扫描电镜观察菌株 Rpp39 主要产生菱形、方形和圆形 3 种伴胞晶体; SDS-PAGE 分析表明主要产生 130 kDa 和 60 kDa 左右 2 种蛋白; 经 PCR-RFLP 鉴定, 该菌株含有 *cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1Ia* 和 *cry2Aa* 五类杀虫晶体蛋白基因; 1 种 *cry2Aa* 类杀虫晶体蛋白全长基因被克隆, 序列分析显示该基因的开放阅读框 (ORF) 为 1902 bps, 编码由 634 个氨基酸组成的蛋白质, 氨基酸序列与 Cry2Aa1 蛋白同源率为 99.7%, 被国际 Bt 杀虫晶体蛋白基因命名委员会命名为 *cry2Aa12*。重组表达质粒 pET-2Aa 在 *E. coli* BL21(DE3) 中, 经 IPTG 诱导能正常表达, SDS-PAGE 电泳验证含有 65 kDa 表达蛋白。生物活性测定表明表达的包涵体蛋白对小菜蛾和二化螟具有杀虫活性, LC₅₀ 分别为 5.4 μg/mL 和 22.3 μg/mL。【结论】菌株 Rpp39 及从中分离克隆的 *cry2Aa12* 基因来自四川生态条件, 丰富了菌株及基因的资源, 在资源积累方面具有重要意义。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 鉴定; *cry2Aa12* 基因; 克隆表达; 杀虫活性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0684-06

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种非常重要的微生物杀虫剂, 在害虫的生物防治中占有极其重要的地位, 其主要杀虫活性成分是伴胞晶体和营养期杀虫蛋白^[1]及其他一些成分。其中伴胞晶体由杀虫晶体蛋白 (Insecticidal crystal proteins, ICPs) 组成, ICPs 由 *cry* 基因和 *cyt* 基因编码^[2,3]。自 1981 年 Schnepf 从菌株 HD-1 Dipel 中克隆了第一个能表达

杀虫活性的 *cry* 基因以来^[4], 国际上已有 360 多种杀虫晶体蛋白基因被分离克隆, 根据 Crickmore 等确立的新的分类规则, 它们被分别确定为 53 群、101 亚群、160 类和 365 亚类^[5, 6]杀虫蛋白基因。其中 *cryI* 类基因编码的杀虫晶体蛋白对鳞翅目害虫具有特异毒性, 在微生物和植物的基因工程中得到了广泛的应用。但是也存在着杀虫谱狭窄、昆虫产生抗药性等问

基金项目: 国家“863”计划(2006AA02Z189)

*通讯作者。Tel: +86-28-82722661; Fax: +86-28-82726875; E-mail: liping@cngk.com, aipingsau@hotmail.com

作者简介: 谭芙蓉(1979-), 女, 四川中江人, 博士, 主要从事杀虫基因的分离及克隆研究。E-mail: furong987@126.com

收稿日期: 2007-11-22; 修回日期: 2008-01-20

题^[7], 因此分离筛选新菌株、克隆新的杀虫基因是解决上述问题的有效手段之一。经研究发现, Cry2 类蛋白在结构和杀虫机制上不同于 Cry1 类, 可用于害虫抗性的治理, 国外转双价基因 (cry1Ac 和 cry2Ab) 的棉花可有效提高杀虫效果和延缓抗性的产生^[8,9]。因此, 新型 cry2A 类基因的发掘能够为抗虫转基因植物提供有益的基因资源, 丰富能够利用的杀虫基因种类。

苏云金芽胞杆菌 Rpp39 是本实验室从四川生态条件下分离的野生菌株, 对鳞翅目农业害虫棉铃虫、小菜蛾、斜纹夜蛾具有高毒力。本文用 PCR-RFLP 方

法鉴定了其含有的杀虫基因种类, 并对其表达的杀虫晶体蛋白进行了 SDS-PAGE 分析, 揭示了该菌株对鳞翅目害虫高毒力的原因。从中分离克隆了 cry2Aa12 全长基因, 为构建杀虫工程菌和培育抗虫转基因植物提供高毒力的候选基因。并进行了在大肠杆菌中的表达, 测定了表达产物对小菜蛾和二化螟的杀虫活性, 为进一步研究和利用该基因奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究所用及构建的菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used or constructed in this study

Strains and plasmids	Characterization	Source
strains		
Bt Rpp39	<i>B.thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> wild type	Stored in this lab
<i>E.coli</i> . DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU</i> ₁₆₉ (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>has R17 recA1 end A1 gyr A₉₆ thi⁻¹relA1</i>	Stored in this lab
<i>E.coli</i> . DH2Aa	<i>E.coli</i> . DH5 α carrying pMD-2Aa	This work
<i>E.coli</i> .BL21(DE3)	<i>hsdS gal</i> (λ <i>clts857 ind1 Sam7 ini5</i>)	Stored in this lab
<i>E.coli</i> .BL21(2Aa12)	<i>E.coli</i> .BL21(DE3) carrying pET-2Aa12	This work
Plasmids		
pMD18-T vector	Amp ^R	Stored in this lab
pET-30a	Kan ^R	Stored in this lab
pMD-2Aa	pMD18-T vector carrying 3872bps of <i>cry2Aa</i>	This work
pET-2Aa12	pET-30a carrying <i>cry2Aa12</i> gene	This work

1.1.2 主要试剂和仪器: Bt 和 *E. coli* 培养基均使用 LB 培养基, 参照文献[10]。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、高分子量标准蛋白、IPTG、X-gal、氨苄青霉素、卡拉霉素、Taq Ex DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; DNA 回收试剂盒购自 TIANGEN 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 DNA 提取

Bt 质粒 DNA 的提取参照 Narva 等方法[11]; *E. coli* 质粒 DNA 的提取、酶切、连接、转化, 大肠杆菌感受态细胞的制备等均参照文献[10]。

1.3 扫描电镜观察

电镜样品的制备参照文献[12]所述方法进行。

1.4 菌株 Rpp39 杀虫晶体蛋白的研究及杀虫基因的鉴定

菌株 Rpp39 于 30 $^{\circ}$ 活化过夜, 1% 转接于 100 mL LB 液体培养基中, 分时段取样光学显微镜观察菌体形态, 并 SDS-PAGE 电泳检测晶体蛋白表达情况。菌株 Rpp39 的基因鉴定采用 PCR-RFLP 方法, 其鉴定

所用的引物参照文献[13, 14, 15, 16]。

1.5 含 cry2Aa 基因大片段的克隆及测序

根据 GenBank 中公布的 *cry2Aa* 基因全长序列设计引物 P1: 5'-GAAGTAATCAAGAAAGCGGTG-3'; P2: 5'-TATACTCATTTAGTTCCGTCAA-3', 以 Bt Rpp39 的质粒为模板进行扩增, 产物回收纯化后与 pMD18-T 载体进行连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆, 再进行 PCR 鉴定^[10]。测序由上海生工生物工程技术公司完成。

1.6 cry2Aa 基因在大肠杆菌中的表达及 SDS-PAGE 检测

根据 *cry2Aa12* 基因开放阅读框两端序列, 设计并合成 1 对特异性引物 P3: 5'-GCCGCATATGAATA-ATGTATTGAATAGTGGAAAG-3'; P4: 5'-GGCGGAT-CCTTAATAAAGTGGTGGAAAGATTAG-3', 分别在 5 端引入 *Nde* 和 *Bam*H 酶切位点。以 pMD-2Aa 质粒为模板进行扩增, 扩增的产物采用 *Nde* 和 *Bam*H 进行双酶切, 酶切产物与同样进行双酶切后的载体 pET-30a 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 再转

入受体菌 *E.coli*.BL21(DE3)。

转接阳性克隆子 *E.coli*.BL21(2Aa12)于 LB 培养基中,在 210 r/min、37°C 培养条件下,加入 0.6 mmol/L IPTG 进行诱导表达 20 h,取 2 L 菌液离心,弃上清,加入 30 mL 10 mmol/L Tris HCl (pH 8.0) 超声波破碎,取上清和沉淀蛋白用于 SDS-PAGE 检测。

1.7 室内生物测定

小菜蛾(二龄幼虫)和水稻二化螟(初孵幼虫)由本实验室提供。小菜蛾杀虫活性的测定采用浸叶法。将甘蓝叶片用水洗净晾干,选取鲜嫩一致的叶片,浸入稀释好的待测样品 10 s,取出晾干,放入生测瓶中,每瓶接 2 龄幼虫 30 头,每处理重复 3 次,放置 25 光照培养箱中,96 h 后调查结果,计算 LC_{50} 。水稻二化螟杀虫活性的测定参见文献[17]的方法。

2 结果

2.1 菌株 Rpp39 的特性

2.1.1 电镜观察结果: 菌株 Rpp39 主要产生典型的菱形、方形和圆形 3 种伴胞晶体(图 1)。

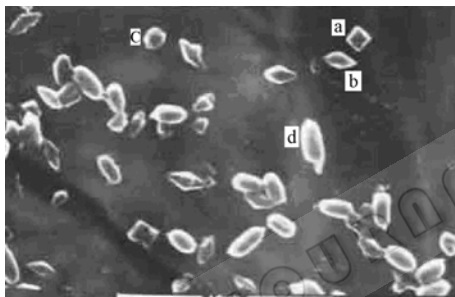


图 1 苏云金芽胞杆菌 Rpp39 芽孢、伴胞晶体扫描电镜图(6000×)。

Fig. 1 Scanning electron microscope showing spores and crystalline inclusions by Bt Rpp39(6000×). a. quadrate parasporal crystal; b. rhombic parasporal crystal; c. circular parasporal crystal; d. spore.

2.1.2 菌株 Rpp39 杀虫晶体蛋白的研究: 光学显微镜检测和 SDS-PAGE 分析表明,当 Rpp39 在培养 14 h 时已有芽孢和晶体产生(图 2,泳道 1),14-22 h 表

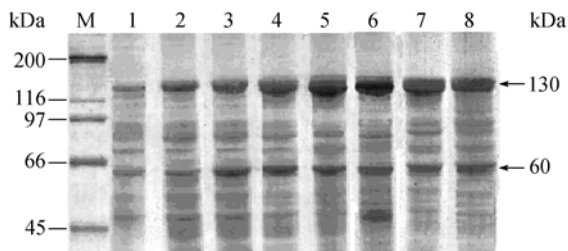


图 2 Rpp39 菌体晶体蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of crystal proteins from Bt Rpp39. M. protein marker; 1. 14 h; 2. 16 h; 3. 18 h; 4. 20 h; 5. 22 h; 6. 24 h; 7. 30 h; 8. 38 h.

达的晶体蛋白不断增加(图 2,泳道 2-5),22 h 后表达基本稳定(图 2,泳道 6-8),25 h 以后有个别晶体释放,38h 菌体已完全裂解,芽孢和晶体全部释放。从图 2 可以清楚地看出,该菌主要表达大约 130 kDa 和 60 kDa 左右大小的 2 种蛋白。

2.1.3 Bt 菌株 Rpp39 杀虫基因型的鉴定: 在所用的鉴定引物中,K5un2/K3un2、S5uni/S3uni 和 S5un2/S3un2 这 3 对引物扩出了目的片段(图 3),而其它几对引物没有扩出条带,表明菌株 Rpp39 含有 *cryI*、*cryII* 和 *cry2* 类杀虫基因。将 PCR 扩增产物纯化回收后,采用相应的限制性内切酶进行酶切。从酶切图谱发现引物 K5un2/K3un2 的扩增产物酶切后共产生五条带,分别是 1117 bp、1039 bp、801 bp、518 bp 和 322 bp,这与 *cryIAa*、*cryIAb* 和 *cryIAc* 基因的酶切产物条带一致,说明含有这三种 *cryI* 类基因。引物 S5uni/S3uni 的扩增产物酶切后产生 571 bp、444 bp、381 bp 及更小的片段,与 *cryIIa* 基因的酶切产物条带一致,说明菌株 Rpp39 含有 *cryIIa* 基因。引物 S5un2/S3un2 的扩增产物酶切后产生 958 bp 和 273 bp 两条带,与 *cry2Aa* 基因的酶切产物一致,说明含有 *cry2Aa* 基因。

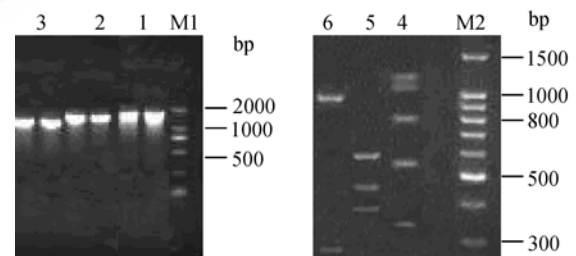


图 3 菌株 Rpp39 杀虫基因 PCR-RFLP 鉴定图谱

Fig. 3 PCR-RFLP analysis of *cry* gene from Bt Rpp39. M1. DL2000; M2. 100 bp Marker; 1. K5un2/K3un2 PCR products; 2. S5uni/S3uni PCR products; 3. S5un2/S3un2 PCR products; 4. K5un2/K3un2 PCR products/*Pst* + *Xba*; 5. S5uni/S3uni PCR products/*Bsp*119 + *Ban*; 6. S5un2/S3un2 PCR products/*Hinc* + *Msp*.

2.2 含 *cry2Aa* 基因的全长序列克隆

用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增,得到大约 3.8 kb 左右的片段,将该片段克隆进 pMD18-T 载体中。转化子用 PCR 扩增筛选获得 3 个阳性克隆,分别进行测序,结果表明 3 个序列完全一致。将其中一个转化子命名为 *E.coli* DH2Aa,将含目的片段的重组质粒命名为 pMD-2Aa。

2.3 *cry2Aa* 基因的核苷酸及氨基酸的序列分析

对重组质粒 pGEM-2Aa 的测序结果进行分析,发现该 3872 bp 片段中含有 3 个开放阅读框, *orf1* 位置在 350~853, 编码 167 个氨基酸; *orf2* 位置在 1020~1778, 编码 252 个氨基酸; *orf3* 位置在 1868~3769, 编码 633 个氨基酸。其中 *orf1* 和 *orf2* 编码的是两个帮助蛋白; *orf3* 编码的是 Cry2Aa 杀虫蛋白, 分子量为 70.799 kDa, 等电点 $pI = 8.126$, 为弱碱性蛋白质, 天冬酰胺 (Asn)、亮氨酸 (Leu) 和丝氨酸 (Ser) 3 种氨基酸含量最高, 分别为 10.6%、9.8% 和 9.8%。与其它已知的 Cry2Aa 蛋白相比, 该蛋白的氨基酸序列与 Cry2Aa1 具有 99.7% 的同源性, 具有两个氨基酸的差异, 即 $Leu^{242} \rightarrow Ser$, $Asn^{600} \rightarrow Ser$ 。该蛋白被 Bt 杀虫晶体蛋白命名委员会命名为 Cry2Aa12 (登录号为 DQ977646)。采用软件 ClustalW 将 Cry2Aa12 与其它 Cry2Aa 蛋白分析, 结果表明已发现的 12 种 Cry2Aa 类蛋白分为 2 个主要的分支, Cry2Aa12 与 Cry2Aa1、Cry2Aa2 和 Cry2Aa9 等在一个大分支里, 亲缘关系最近。

2.4 *cry2Aa12* 基因在大肠杆菌中的表达

经 IPTG 诱导后, *cry2Aa12* 基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中获得了表达, SDS-PAGE 分析表明 *cry2Aa12* 基因的表达产物在菌体超声破碎后的沉淀中 (图 4, 泳道 3), 分子量约为 65kDa 左右, 而在上清中未检测出表达产物 (图 4, 泳道 2), 说明其表达产物为不可溶蛋白, 形成了包涵体。

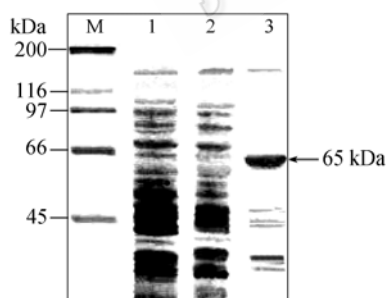


图 4 *cry2Aa12* 基因在 *E. coli* BL21(DE3) 中的 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of *cry2Aa12* gene expressed in *E. coli* BL21(DE3). M. protein marker; 1. *E. coli* BL21(DE3)(pET-30a); 2. lysate supernatant; 3. Cry2Aa12 protein in inclusion body.

2.5 生物测定

提取含有 Cry2Aa12 蛋白的包涵体, SDS-PAGE 分

析定量后, 分别测定小菜蛾和二化螟的杀虫活性, 结果见表 2。Cry2Aa12 蛋白对小菜蛾和二化螟具有显著的毒杀作用, 其 LC_{50} 分别为 5.4 $\mu\text{g/mL}$ 和 22.3 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 Cry2Aa12 蛋白对小菜蛾、二化螟的生测结果
Table 2 Bioassay result of Cry2Aa12 against *Plutella xylostella* and *Chilo suppressalis*

Tested insect	$LC_{50}/(\mu\text{g/mL})$	95% confidence/ $(\mu\text{g/mL})$
<i>Plutella xylostella</i>	5.4	1.7~7.9
<i>Chilo suppressalis</i>	22.3	17.5~28.9

3 讨论

本研究通过 PCR-RFLP 方法鉴定了菌株 Rpp39 的杀虫基因类型, 该菌株含有 *cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1Ia* 和 *cry2Aa* 五种杀虫基因, SDS-PAGE 分析结果表明该菌株主要产生 130 kDa 和 60 kDa 左右两种大小的蛋白, 由此可以推测 *cry1Ia* (编码蛋白分子量为 81.3 kDa^[18]) 未表达或表达量较低, 与 Tailor 等的研究结果一致, 其原因需要进一步通过转录和基因序列加以分析。

cry2Aa12 基因是从我国四川生态条件下分离的菌株 Rpp39 中分离克隆出来的, 与其它已知的 *cry2Aa* 基因差异较小, 编码的蛋白质仅存在几个氨基酸的差异, 说明来自不同国家和地区的菌株所含的同一亚类基因保守性较强。菌株 Rpp39 和从中分离克隆的 *cry2Aa12* 基因在资源积累上具有重要价值。*cry2Aa12* 基因通过原核表达载体 pET-30a 在大肠杆菌中实现了高效表达, 表达产物对小菜蛾和二化螟具有较强的杀虫活性, 生测 LC_{50} 结果与已发表的数据相吻合^[17, 19, 20], 说明个别氨基酸的改变并不影响其杀虫效果, 因此该基因可以作为培育抗虫转基因作物以及构建微生物杀虫剂新基因的来源。另外, *cry12Aa* 基因在大肠杆菌中表达 65 kDa 的蛋白, 与 Lenin 等人的报道结果相似^[21], 这种结果与从氨基酸组成推导的分子量 70.799 kDa 有一定差异; 分析 Cry2Aa12 的氨基酸组成, 发现共含有 4 个半胱氨酸, 含量占氨基酸总数的 0.62%, 由于蛋白中的二硫键少, 不能形成正确的折叠, 同时形成的蛋白不够稳定, 容易受蛋白酶的消化, 这些可能是 SDS-PAGE 检测到的蛋白分子量小于理论分子量的原因。

国内外第一代转基因抗虫作物主要是转 *cry1* 类基因, 一方面存在基因品种单一, 害虫易产生抗性等问题^[7, 22], 另一方面次要害虫不断猖獗, 对转基因产品的

毒力和杀虫谱等提出了更高的要求。由于 Cry2 类蛋白与 Cry1 类蛋白在昆虫中肠上的结合位点及作用机制有可能不同^[19]，因此将多价基因转入作物可有效增强活性或延缓昆虫抗性的产生；cry2 类蛋白的杀虫谱较广，既可以杀鳞翅目害虫，又对双翅目害虫有效，cry2Aa12 新基因的克隆，为构建多价基因提供了重要的基因来源。

参 考 文 献

- [1] Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93: 5389–5394.
- [2] Hofte HE, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, 1989, 53: 242–255.
- [3] Schnepf HE, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 775–806.
- [4] Schnepf HE, Whiteley HR. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(10): 2893–2897.
- [5] 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.
- [6] <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt/>
- [7] Akhurst RJ, James W, Bird LJ, et al. Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*, 2003, 96 (4): 1290–1299.
- [8] Tabashnik BE, Dennehy TJ, Sims MA, et al. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68 (8): 3790–3794.
- [9] Chitkowski RL, Turnipseed SG, Sullivan MJ, et al. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests. *J Econ Entomol*, 2003, 96(3): 755–762.
- [10] Sambrook JE, Fritsch F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版, 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Narva KE, Payne JM, Schwab GE, et al. Novel *Bacillus thuringiensis* microbes active against nematodes, and genes encoding novel nematodes- active toxin from *Bacillus thuringiensis* isolates. European Patent Office: EP 0462721. 1991.
- [12] 朱晨光, 孙明, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌 CTC 菌株的 S-层蛋白可以形成伴胞晶体. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2002, 42(6): 670–674.
- [13] Kwo WS, Chak KF. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1369–1377.
- [14] 宋福平, 张杰, 黄大昉, 等. 苏云金芽孢杆菌 cry 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立. 中国农业科学 (*Agricultural Sciences in China*), 1998, 31(3): 13–18.
- [15] Song FP, Zhang J, Guang X, et al. Identification of cryII-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cryII-type gene. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 5207–5211.
- [16] Yu H, Zhang J, Huang DF, et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strain Bt185 Toxic to the Asian Cockchafer: *Holotrichia parallela*. *Current Microbiology*, 2006, 53: 13–17.
- [17] 李海涛, 姚江, 郭巍, 等. 苏云金芽孢杆菌 cry2Aa 基因的克隆、表达与活性. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2005, 13(6): 789–791.
- [18] Tailor R, Tippett J, Gibb G, et al. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol Microbiol*, 1992, 6(9): 1211–1217.
- [19] Liang Y, Dean DH. Location of a lepidopteran specificity region in insecticidal crystal protein CryIIA from *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 1994, 13(4): 569–75.
- [20] Sims SR. Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* protein: Effects on Lepidoptera, Diptera, and non-target arthropods. *Southwestern Entomologist*, 1997, 22: 395–404.
- [21] Lenin K, Mariam MA, Udayasuriyan V. Expression of a cry2Aa gene in an acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* strain and toxicity of Cry2Aa against *Helicoverpa armigera*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001, 17: 273–278.
- [22] 郭三堆, 崔洪志, 夏兰芹, 等. 双价抗虫转基因棉花研究. 中国农业科学 (*Agricultural Sciences in China*), 1999, 32(3): 1–7.

Identification, cloning and expression of the insecticidal protein genes from *Bacillus thuringiensis* isolate Rpp39

Furong Tan^{1,3}, Jun Zhu^{1,3}, Yunyan Li^{1,3}, Aiping Zheng^{1,3*}, Ping Li^{1,3*}

⁽¹⁾Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang, Sichuan 611130)

⁽²⁾Sichuan Agricultural Biotechnology Engineering Research Center, Wenjiang, Sichuan 611130)

⁽³⁾Key laboratory of Southwest Crop Gene Resource & Genetic Improvement of Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

Abstract: [Objective] We characterized strain Rpp39 isolated from the soil of Sichuan, China. A type of *cry2Aa* gene was cloned and expressed in *E. coli*. [Methods] We characterized strain Rpp39 by scanning electron microscope, PCR-RFLP identification and SDS-PAGE analysis. We cloned *cry2Aa* gene by PCR clone. We constructed the recombinant plasmid pET-2Aa, and transformed *E. coli*.BL21(DE3) to express by IPTG. We determined the toxicity of expressed products to the larvae of *Plutella xylostella* and *Chilo suppressalis* through bioassay. [Results] The strain Rpp39 contained three types parasporal crystals, diamond, squareness and round, observed under the scanning electron microscope. SDS-PAGE analysis showed that two kinds of molecular mass of insecticidal crystal proteins, one was about 130kDa and the other 60 kDa, were expressed in isolate Rpp39. The strain contained *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia* and *cry2Aa* gene, analyzed by the PCR-RFLP method. One *cry2Aa*-type gene of Rpp39 was cloned and designated as *cry2Aa12* by *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins Nomenclature Committee. Sequence analysis revealed that this gene contained an open reading frame of 1902 nucleotides encoding a protein of 634 amino acids. Compared with Cry2Aa1 protein, Cry2Aa12 protein has shown as high as 99.7% amino acid homology. We amplified the full open reading frame sequence of the *cry2Aa12* gene by use of a pair of PCR primers P3/P4 designed according to its DNA sequence, and the PCR product was inserted into the *Nde* I / *Bam*HI site of *E. coli* expression vector pET-30a to obtain the recombinant plasmid pET-2Aa. The result of SDS-PAGE proved that Cry2Aa12 could be expressed as 65 kDa protein in *E. coli* BL21(DE3) strain induced by IPTG. We found that Cry2Aa12 was highly toxic to the larvae of *Plutella xylostella* and *Chilo suppressalis* through bioassay, with LC₅₀ as 5.4 µg/mL and 22.3 µg/mL, respectively. [Conclusion] Strain Rpp39 and *cry2Aa12* gene cloned from strain Rpp39 were came from Sichuan ecological condition in China. They could be affluent in the resources of strain and gene. It has important significance to accumulate the resource.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; indentification; *cry2Aa12* gene; cloning and expression; insecticidal activity

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z189)

*Corresponding author. Tel: +86-28-82722661; Fax: +86-28-82726875; E-mail: liping@cngk.com; aipingsau@hotmail.com

Received: 22 November 2007/ Revised: 20 January 2008