

特异性杀虫基因 *Bt cry3A* 在桑粒肩天牛幼虫两种肠道常驻内生菌中的转化和表达

王中康, 何伟, 彭国雄, 夏玉先, 李强, 殷幼平*

(重庆大学生物工程学院, 重庆市杀虫真菌生物农药工程技术中心, 重庆市功能基因及调控技术重点实验室, 重庆 400030)

摘要:【目的】将特异性杀虫毒蛋白基因 *Bt cry3A* 转入桑粒肩天牛 (*Apriona germari* Hope, Ag) 幼虫肠道常驻内生菌中, 构建能在天牛幼虫肠道中定殖并表达特异性杀虫基因 *Bt cry3A* 的工程菌。【方法】以传统方法和 16S rDNA 分子生物学分析等方法分离、鉴定 Ag 幼虫肠道优势的常驻内生菌, 从中筛选出适合转化的候选菌株。利用电转化技术将含有对鞘翅目昆虫具专一性毒力 *Bt cry3A* 基因的 *Escherichia coli* - *Bacillus thuringiensis* 穿梭表达质粒 pHT305a 和 pHT7911 分别转入 Ag 幼虫肠道常驻内生菌短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis* Ag12, Ag12) 和苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* Ag13, Ag13) 中。【结果】从 Ag 幼虫肠道共分离获得 18 个不同种的可培养细菌菌株, 并从中选取菌株 Ag12 和 Ag13 作为出发菌株转入 *Bt cry3A* 基因。经质粒稳定性试验、转化子生长特性测试、伴孢晶体电镜检测、毒蛋白 SDS-PAGE 分析、工程菌定殖性分析以及生物毒力测试, 结果显示 *cry3A* 基因已经成功转入 Ag 幼虫的常驻内生菌短芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌中, 并且工程菌 Ag12-305a、Ag13-305a、Ag 12-7911 和 Ag13-7911 都能在天牛幼虫肠道内稳定生长、繁殖并表达分子量约 65kDa 的伴孢晶体杀虫蛋白 *Cry3A*。【结论】*Bt cry3A* 基因已成功转入桑粒肩天牛幼虫肠道优势常驻内生菌中, 获得了四株能在桑粒肩天牛幼虫肠道内定殖, 并能表达目的杀虫基因 *Bt cry3A* 的转基因工程菌。

关键词: 桑粒肩天牛; 肠道常驻内生菌; *Bt cry3A*; 工程菌; 表达

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1168-07

天牛是鞘翅目昆虫中较大的一个类群, 其幼虫大多以树木的纤维材料为食, 林木、果树、桑、茶、棉、木建材料、家具等都可以受到天牛的危害。由于天牛幼虫营钻蛀性生活, 生活隐蔽, 活动期长, 所以防治工作难度很大。目前的主要防治方法仍是以传统的人工钩杀幼虫、砸卵、堵洞和化学药剂防治等方法为主。其中人工防治费时、费工, 不适用于规模化大农场生产; 利用化学防治药剂防治由于药剂有效期短, 不易达到虫体, 而且容易导致害虫抗药性增强以及具有污染环境、杀伤天敌的弊端^[1]。

随着分子生物学技术的迅速发展, 新的害虫生物

防治理论和方法不断出现, 其中以植物内生常驻正常菌群为载体菌, 利用电转化技术将外源的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) δ -内毒素基因转入野生巨大芽孢杆菌 (*Bacillus smegaterium*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 等植物内生菌中构建抗虫内生工程菌, 在植物体内表达杀虫伴孢晶体蛋白防治害虫的新方法, 具有适应植株内环境, 有效克服 *Bt* 制剂持效期短、对根部和茎部害虫难以有效发挥作用等不足的优势, 已逐渐成为近年来生物农药研究领域的热点^[2]。但这类工程菌是在植物体内表达毒素, 被昆虫取食后才起杀虫作用, 而非菌体直接进入昆虫体内杀

基金项目: 重庆市自然科学基金(渝科发计字 2002.17 号); 重庆市科委重点攻关项目(CSTC, 2008AB1009)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-23-65120489; E-mail: ypy128@sina.com n

作者简介: 王中康(1956-), 男, 四川雅安人, 教授, 从事分子微生物研究。E-mail: zkwang@cqu.edu.cn

收稿日期: 2008-03-21; 修回日期: 2008-06-08

虫,因此其在植物体内的表达部位和表达量在很大程度上制约着它的杀虫活性,同时也受植物育种的限制。

在昆虫肠道中常驻有大量微生物,它们对于昆虫而言是一类共生菌,不仅对昆虫维生素的合成、脂肪和碳水化合物吸收利用起着重要作用,而且在抵御外籍病菌的侵入与定殖、促进免疫系统功能方面也有重要意义^[3]。本研究首次探索将天牛幼虫肠道常驻的正常菌群作为载体菌,转入杀虫毒蛋白基因,以构建在昆虫肠道

中高生存力、高繁殖率并能表达毒蛋白的新型杀虫工程菌。研究将可能为害虫的生物防治开辟一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫、菌株和质粒: 1至5龄桑粒肩天牛 *Apriona germari*(Hope)幼虫采自重庆大学校园构树 (*Broussonetia Papyrifera*), 菌株和质粒见表 1。

表 1 供试菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids in this study

Strains/Plasmids	Characteristics	Reference/ Source
<i>Escherichia coli</i> JM109	Amp ^r	TaKaRa Ltd.JP
<i>Escherichia coli</i> TG1-7911	Erm ^r	Presented by Dr. Lereclus
<i>Escherichia coli</i> TG1-305a	Erm ^r	Presented by Dr. Zhou Yi
plasmid pMD-18T	Amp ^r	TaKaRa Ltd. JP.
plasmid pHT305a	Erm ^r , 12.7 kb, carrying <i>cry3A</i> gene	Presented by Dr. Zhou Yi ^[4]
plasmid pHT7911	Erm ^r , 12.7 kb, carrying <i>cry3A</i> gene	Presented by Dr. Lereclus ^[5]
<i>Brevibacillus brevis</i> Ag12	Erm ^r , carrying no <i>cry3A</i> gene	This study
<i>Bacillus thuringiensis</i> Ag13	Erm ^r , carrying no <i>cry3A</i> gene	This study

1.1.2 培养基: LB 培养基; PDA 培养基; 高氏一号培养基; BP 琼脂培养基; BPA; ZM 培养基:蛋白胨 1%,酵母粉 0.2%,可溶性淀粉 0.3%,葡萄糖 0.2%, K₂HPO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, CaCO₃ 0.2%, 调至 pH 7.0; GT 培养基:CaCl₂ 0.008%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, 葡萄糖 0.2%, 微量元素溶液 1%(CuSO₄ 0.05%, ZnSO₄ 0.05%, MnSO₄ 0.5%, MgSO₄ 2%,蒸馏水 10mL), 1mol/L Tris(pH7.5) 0.5%, 酵母膏 0.15%, K₂HPO₄ 0.05%, 调至 pH7.4; ICPM 培养基:蛋白胨 0.6%, 葡萄糖 0.5%, CaCO₃ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, KH₂PO₄ 0.05%, 调至 pH7.0~7.2; NSM 培养基:蛋白胨 0.5%, 牛肉膏 0.3%, CaCl₂ 0.000077%, MnCl₂ 0.000007%, MgCl₂ 0.000095%, 调至 pH 7.0~7.2^[6]; T2 琼脂培养基:蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.5%, 酵母粉 0.2%, 葡萄糖 1%, 琼脂粉 1.5%, 调至 pH7.0^[7]。

1.1.3 主要试剂和仪器: 细菌生化鉴定管(杭州天和微生物试剂有限公司, 中国); 细菌质粒抽提试剂盒 (TaKaRa Ltd., JAPAN); 1mmol/L Hepes (调至 pH 7.0), 1mmol/L HG 溶液(1mmol/L Hepes、10%甘油)。

1.2 桑粒肩天牛幼虫肠道常驻正常菌群的分离鉴定

于 2005 年 10 月至 2006 年 10 月期间每隔一个月在重庆大学校园内构树 (*Broussonetia papyrifera*) 树干采集桑粒肩天牛 1~5 龄幼虫。按照何正波^[8]方法取不同龄期幼虫各 3 头, 分离纯化天牛幼虫肠道微生

物, 获得常驻内生菌的纯培养, 并计算各种微生物分离率。

根据文献[9,10]对分离、纯培养的菌株进行形态、生理生化测试以鉴定其种属。分离出的微生物菌株于-80℃保存备用。

根据细菌 16S rDNA 序列在物种进化过程中具有极高的保守性和一定可变性的特点^[9], 以所分离肠道微生物单菌落的菌悬液为 PCR 扩增模板, 以 16S rRNA 的通用引物进行菌落 PCR 扩增。正向引物为 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 反向引物为 1492r (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[10]。采用 50 μL 的 PCR 反应体系, PCR 反应条件: 94℃ 4 min 30 s; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 35 个循环; 72℃ 7 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 回收后与载体 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 JM109 进行培养, 筛选阳性克隆并送上海生工生物技术公司进行测序, 最后将结果与 GenBank 数据库比对验证生理生化鉴定结果。

1.3 表达宿主菌株和促进伴孢晶体产生发酵培养基的筛选

表达宿主菌株的筛选: 以平板抑菌圈方法^[10]测试分离的天牛肠道常驻菌对红霉素的敏感谱, 筛选 Erythromycin^r (Erm^r) 菌株。根据质粒 pHT305A 和 pHT7911 上长 1.6 kb 的 *cry3A* 基因特异性序列设计引物(cqpc3/cqpc4: 5'-AGTAGGTTTCCCGTTTGG-3'

/5 -TAATCCTGTGACGCCTAT-3) , PCR 扩增筛选 *cry3A* 基因缺陷型且产芽孢的常驻菌株。参照彭清忠方法^[12]以 5% TCA 溶液覆盖经 48h 培养的 0.5% 干酪素 T2 平板, 筛选胞外蛋白酶活性低的表达菌株。最后筛选出的菌株保存于 -80 °C 冰箱备用。

发酵表达培养基的筛选: 取过夜培养的候选菌株 Ag12、Ag13 菌液按照 1% 的接种量分别转接 100 mL 的 T2、LB、ZM、GT、NSM、ICPM 液体培养基, 30°C 培养 20 h 且每隔两小时测定其 OD_{600} 值绘制生长曲线, 筛选促进 *Cry3A* 伴胞晶体快速大量产生的发酵培养基^[11]。

1.4 桑粒肩天牛肠道常驻菌转化系统的建立

采用细菌质粒抽提试剂盒提取穿梭表达质粒 pHT305a 和 pHT7911, 取培养至指数生长期的 Ag12 菌液, 参考 Shigezo Udaka^[6]和彭清忠^[14]所述方法制备感受态细胞, 分别加入质粒 pHT305a 和 pHT7911 各 0.5 μ g, 混匀后以电击法进行细胞转化, 转化后的细胞以 37 °C、250 r/min 培养 1 h 后涂红霉素 T2 平板, 37 °C 培养 12 h 后观察计数阳性菌落。

Ag13 菌的感受态制备方法如下: 取过夜培养的 Ag13 菌液转接于 100 mL 液体 LB, 培养至指数生长期, 取出菌液冰上放置 20 min, 于 4 °C 下 4000 \times g 离心 5 min, 去上清; 加入 100 mL Hepes 溶液, 4 °C 下 4000 \times g 离心 10 min, 去上清; 加入 HG 溶液 50 mL, 4 °C 下 4000 \times g 离心 10 min, 弃上清, 重复 3 次; 获得感受态细胞。取制备的感受态细胞以 200 μ L/管分装, 每管中各加 0.5 μ g 的质粒 pHT305a 或 pHT7911, 混匀后转入 0.2 cm 的电转化池, 以电压 1.5 ~ 2.5 kV、电容 25 μ F、电阻 200 ~ 1000 Ω 条件电击, 转化后的细胞培养 1 h 后涂红霉素 LB 平板, 37 °C 培养 12 h 后观察计数阳性菌落。

挑转化子菌落以特异性引物 *cqpc3/cqpc4* PCR 扩增和一步法^[15]提质粒确定转化子并计算转化阳性率。

1.5 外源质粒在天牛肠道常驻菌中的稳定性及对宿主菌生长特性影响的测试

按照文献^[16]进行操作。

1.6 杀虫工程菌的发酵培养和伴胞晶体的提取纯化及 SDS-PAGE 分析

分别挑取具有良好质粒稳定性的各工程菌阳性转化子接种其宿主菌对应的种子培养基中过夜培养, 再从中各吸取 1 mL 分别转接 100 mL 产芽孢培养基于 30 °C、250 r/min 培养, 培养期间从第 30 h 开始每隔 3 h 取少量菌液磷钨酸染色后电子显微镜观察芽孢和晶体生长情况, 待 90% 以上的芽孢脱落、晶体释放

时停止培养取出发酵菌液, 按照郭艾英的方法^[17]提取、纯化伴胞晶体蛋白, 并对提取的伴胞晶体蛋白进行 SDS-PAGE 胶电泳分析^[18]

1.7 工程菌在天牛肠道内的定殖和生物活性初步测试

将野外采集并在室内饲养 5 d 的健康桑粒肩天牛幼虫 (2 ~ 3 龄) 分为每组 10 头, 称重后以饲料拌和与强行饲喂方法将工程菌导入幼虫肠道, 以无菌水和野生菌作为空白对照。饲喂、接种后的幼虫保湿并给予人工饲料在试管中饲养, 4 d 和 10 d 后分别观察检测天牛幼虫体重变化和死亡情况^[19]。饲喂 10 d 后, 分别取饲养工程菌后的活虫和死虫解剖其肠道, 取肠液涂 Erm 平板培养分离单菌落, 并挑取长出的单菌落进行 PCR 扩增, 以检测其是否为工程菌。

2 结果和分析

2.1 桑粒肩天牛幼虫肠道菌的分离及鉴定

通过分离培养, 根据菌体及菌落形态、生理生化及分子生物学鉴定方法从桑粒肩天牛幼虫肠道中共分离鉴定出分别属于 18 个不同种的细菌可培养菌株, 其鉴定结果、分类地位、分离率(%) = (有菌虫数/检测虫数) \times 100%、菌株 16S rRNA 基因在 GenBank 登陆号见表 2。

表 2 所列菌群中, 溶血葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)、人葡萄球菌 (*Staphylococcus homis*)、短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 等 4 个菌株全年在幼虫肠

表 2 桑粒肩天牛幼虫肠道菌的鉴定结果

Table 2 Identification for intestinal microorganism isolated from *A. germari* (Hope) larvae

Isolated strains	Species	Isolation rate/%	Sequence accession No.
Ag06	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	100	EU554432
Ag08	<i>Staphylococcus homis</i>	98.09	EU554434
Ag16	<i>Enterobacter aerogenes</i>	34.04	EU554442
Ag14	<i>Escherichia coli</i>	30.53	EU554440
Ag09	<i>Micrococcus luteus</i>	29.98	EU554435
Ag12	<i>Brevibacillus brevis</i>	29.05	EU554438
Ag13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	28.60	EU554439
Ag02	<i>Enterobacter cloacae</i>	25.91	EU554428
Ag17	<i>Micrococcus kristinae</i>	25.02	EU554443
Ag07	<i>Shigella boydii</i>	16.32	EU554433
Ag05	<i>Shigella flexneri</i>	14.89	EU554431
Ag01	<i>Klebsilla Oxytoca</i>	13.69	EU554427
Ag18	<i>Enterobacter absburiae</i>	12.11	EU554444
Ag11	<i>Serratia ficaria</i>	11.68	EU554437
Ag04	<i>Pseudomonas putida</i>	11.14	EU554430
Ag03	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10.81	EU554429
Ag10	<i>Breneria quercina</i>	7.57	EU554436
Ag15	<i>Naxibacter haematophilus</i>	5.57	EU554441

道中均能分离到,成团杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogens*)、阿氏肠杆菌 (*Enterobacter absburiae*)可在除 1~2 月份外的全年大部分时间分离到,其它细菌种类则只能在 4~11 月份分离到,说明至少溶血葡萄球菌 (*S. haemolyticus*)、人葡萄球菌 (*S. homis*)、短短芽孢杆菌 (*B. brevis*)、苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)应为天牛肠道常驻菌群,而其余种类细菌则很可能是随进食或与环境接触而进入的过路菌群。

2.2 表达宿主菌株的筛选和伴孢晶体促进培养基的筛选

2.2.1 宿主菌筛选

作为表达外源 *cry3A* 基因的载体菌,首先应该是能插入选择性标记、而且必须对人畜无毒害作用,蛋白表达方式最好为非分泌表达,因此我们做了以下实验对候选菌株进行了筛选。

抗生素抑菌圈实验结果表明菌株 *B. brevis* Ag12, *B. thuringiensis* Ag13, *S. haemolyticus* Ag6 为 Erm^r 型,可作为质粒 pHT305a 和 pHT7911 转化的受体菌,以红霉素作为工程菌株的选择性标记。

Cry3A 基因特异性引物 PCR 扩增检测候选菌株,结果显示常驻菌 Ag6、Ag12、Ag13 菌均为 *cry3A* 菌株。产芽孢培养显示 Ag12、Ag13 为产芽孢细菌,而芽孢脱落利于伴孢晶体的集中释放,因此菌株 Ag12、Ag13 适合作为外源 *Cry3A* 基因表达的载体菌。

使用 5% TCA 溶液覆盖培养物以检测候选对象的胞外蛋白酶活性,结果显示 Ag12、Ag13 菌株经培养后其菌落上无透明圈出现,表明它们都无胞外蛋白酶活性,表达的重组蛋白不易被降解失活,因此可作为高效表达外源 *Cry3A* 伴孢晶体的宿主菌;而 Ag6 菌的菌落上出现透明圈,表明它有胞外蛋白酶活性,而且它和上述的 Ag8 菌一样均为可能对人畜有致病的葡萄球菌,因此最后选择 Ag12、Ag13 菌株作为外源伴孢晶体基因表达菌株。

2.2.2 伴孢晶体促进培养基的筛选

在提供的培养基中培养 Ag12、Ag13,每隔两小时记录菌液 OD_{600} 值并绘制生长曲线(如图 1)。

从图 1 中可见菌株 Ag12 对所提供的几种培养基选择性不大,这些培养基均能适应菌株生长,但在 T2、NSM 培养基中生长最好,且当 $OD_{600} \approx 0.6$ 时细胞进入指数生长期;而菌株 Ag13 对培养基有较大选择性,在 LB 和 ICPM 培养基中生长最好,当 $OD_{600} \approx 0.4$ 时细胞进入指数生长期。因此选用 T2 和 NSM 两种培

养基分别作为载体菌株 Ag12 的种子培养基和产伴孢晶体培养基, LB 和 ICPM 两种培养基分别作为 Ag13 菌株的种子培养基和产伴孢晶体培养基。

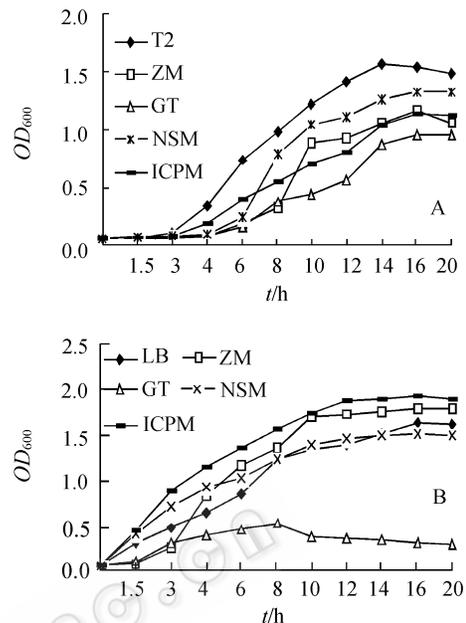


图 1 天牛幼虫肠道常驻菌的野生菌株在不同培养基中的生长曲线

Fig. 1 Vegetal curve of wild resident strains on different culture medium. A: Vegetal curve of Ag12; B: Vegetal curve of Ag13.

2.3 转化系统的建立及结果分析

工程菌株转化采用电击法。对多个电击参数进行了优化,结果显示以电压 1.75 kV、电容 25 μ F、电阻 500 Ω 的条件分别转化质粒 pHT305a 和 pHT7911 到 Ag12 菌株时转化率最高,分别为 8.78×10^5 和 5.30×10^4 CFU/ μ g DNA, 转化率相差 15 倍;而质粒 pHT305a 和 pHT7911 电转化 Ag13 菌株的最佳条件为电压 2.0 kV、电容 25 μ F、电阻 400 Ω , 转化率分别为 2.1×10^6 、 3.6×10^5 CFU/ μ g DNA, 而且在此菌株的转化中质粒 pHT305a 转化效率同样明显高于质粒 pHT7911。分析原因可能是 pHT305a 更容易被转化宿主细胞摄取所致,但其深层原因尚有待研究。

挑取 Erm^r 平板上阳性转化子作模板,使用特异性引物 *cqpc3/cqpc4* 对菌落 PCR 扩增后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检验获得 1.6 kb 目的片段,说明转化成功,转化子的阳性率均在 95% 以上。

提取转化子质粒,以琼脂糖凝胶电泳检测发现转化子比出发菌株多出一条大小约为 12.7 kb 条带,与转入的外源质粒的大小 12.7 kb 一致。回收、纯化该条带后以 *Bam*HI 酶切分析(图略)分别获得两条大小为

6.1、6.6 和 3.7、9.0 kb 的条带, 这表明转化子中已成功转入质粒 pHT305a 和 pHT7911, 获得了 4 株工程菌 Ag12-305a, Ag13-305a, Ag12-7911, Ag13-7911。

2.4 外源基因在天牛肠道常驻菌中的稳定性及对出发菌株生长特性的影响

从工程菌 *B. brevis* Ag12-7911, *B. thuringiensis* Ag13-7911, *B. brevis* Ag12-305a 和 *B. thuringiensis* Ag13-305a 的 Erm^r 平板上分别挑取 10 个克隆传代, 经 30 代后均仍能在 Erm^r 平板上良好生长且质粒抽提能获得 12.7 kb 重组目标质粒条带, 说明外源质粒在天牛幼虫肠道常驻内生菌中能够稳定自主复制。

工程菌株与出发菌株各自在产伴孢晶体培养液中测得的生长曲线显示工程菌 Ag12-7911、Ag12-305a、Ag13-7911、Ag13-305a 与其出发菌株在生长特性上无明显差异 (图 2)。

2.5 工程菌发酵伴孢晶体形态与蛋白检测

将工程菌 Ag12-7911、Ag12-305a 和 Ag13-7911、Ag13-305a 分别接种于产伴孢晶体的发酵培养基中并于 30 和 230r/min 条件振荡培养, 定期取培养液电镜观察晶体产生情况。结果显示 Ag12-7911、Ag12-305a 在 72h, Ag13-7911、Ag13-305a 在 64h 后

90% 以上芽孢脱落, 并释放出大量由 *Cry3A* 毒蛋白组成的特征性斜方形伴孢晶体颗粒 (图 3)。

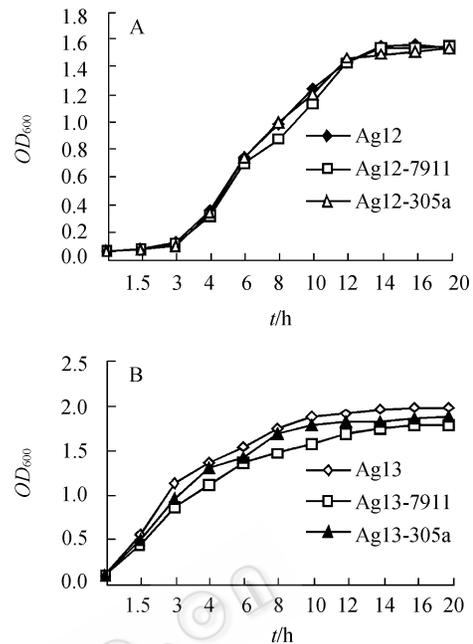


图 2 转化子与其对应出发菌株在发酵培养基中的生长曲线比较

Fig. 2 Vegetal curve of transformants and wild strains A: wild strain Ag12 and transformants Ag12-7911, Ag12-305a B: wild strain Ag13 and transformants Ag13-7911, Ag13-305a.

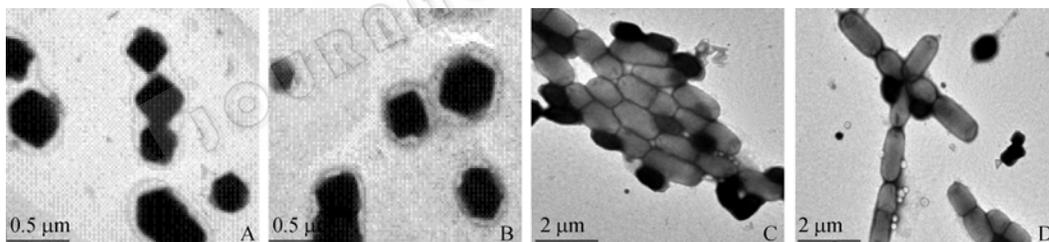


图 3 转化子产生的杀虫毒蛋白晶体形态

Fig. 3 Crystal poisonous protein in transformants. A: Ag12-7911; B: Ag12-305a; C: Ag13-7911; D: Ag13-305a.

工程菌发酵至芽孢脱落 (约 64~72 h) 时停止菌液的发酵, 提取并纯化伴孢晶体蛋白, 以 11% SDS-PAGE 凝胶电泳并考马斯亮蓝染色分析, 结果显示 4 株工程菌株都能产生约 65 kDa 的目标毒蛋白 (图 4), 表明构建的工程菌已成功表达了外源杀虫基因 *cry3A*。

2.6 工程菌在天牛幼虫体内的定殖能力和生物活性

人工饲养了工程菌 Ag12-7911、Ag12-305a 和 Ag13-7911、Ag13-305a 的桑粒肩天牛幼虫在第 4 d 出现死亡, 校正死亡率分别为 10%、20%、20%、30%, 到第 10 d 时分别达到 30%、50%、40%、60%; 未死亡幼虫与饲喂前相比体重明显减轻, 30d 后的试虫平均体重只占饲喂前平均体重的 75.2%、70.3%、71.7%、64.6% (表 3), 而且表现出食欲减退、不能正常蜕

皮和发育。而所有对照试虫则全部存活且生长健康。

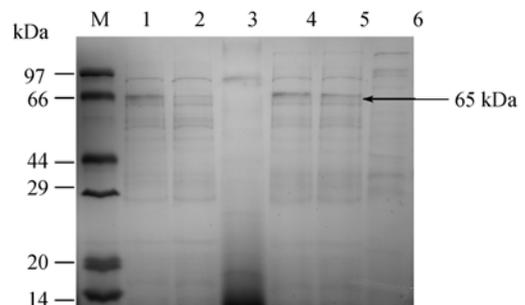


图 4 工程菌伴孢晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the protein in transformants. M. Marker; 1. Ag13-305a; 2. Ag13-7911; 3. Ag13; 4. Ag12-305a; 5. Ag12-7911; 6. Ag12.

由此显示,工程菌在天牛肠道中能够正常表达杀虫毒蛋白,对天牛幼虫具有较强的杀虫活性。

表 3 工程菌株对桑粒肩天牛幼虫室内生物测定
Table 3 Bioassay of engineering strains to *Apriona germari*(Hope) larvae under the control condition

Strains	Total number of insects	Number of the dead insect	Mortality /%	Average weight of survivors/(g·head)	Average ratio of weight (After feeding/Before feeding)
Negative control (Water)	10	0	0	0.591	0.976
Negative control (Ag12)	10	0	0	0.607	0.989
Negative control (Ag13)	10	0	0	0.583	0.951
Ag12-7911	10	3	30	0.401	0.752
Ag12-305a	10	5	50	0.366	0.703
Ag13-7911	10	4	40	0.369	0.717
Ag13-305a	10	6	60	0.345	0.646

解剖喂养了工程菌的死虫和剩余活虫,取肠液涂平板后能筛选检测到少量工程菌,挑取其单菌落经 PCR 扩增,均能检测到外源 *cry3A* 基因,检出率达 90%,结果表明工程菌已经在天牛体内定殖。

3 讨论

昆虫肠道正常菌群在与昆虫长期共同进化过程中形成了对昆虫肠道环境的适应能力,能够在肠道中定殖并繁殖达到相当的数量,以其作为载体出发菌转入外源杀虫毒蛋白基因构建的工程菌可以通过成虫产卵和幼虫的取食与虫子接触而进入幼虫肠道,在肠道内表达杀虫毒蛋白,从而对营隐蔽生活的幼虫起控制作用。这种生防制剂具有特异性好,对环境安全等优点,具有良好的应用前景。

在杀虫工程菌构建过程中,受体菌的遗传背景(如内生质粒的数量及拷贝数、对外源质粒的耐受能力、限制修饰能力)和受体菌生理状态是决定外源质粒导入受体菌的频率和稳定性高低的主要因素,细菌种类繁多,菌株间形态、结构及细胞壁的差异较大^[6],因而每一菌株的遗传转化都要求建立专一的转化系统。针对昆虫对杀虫剂抗性产生的机理,在出发菌株的选择中因尽量选用毒蛋白以伴胞晶体形式产生的菌株,以使产生的毒蛋白能够在积累到一定量后集中释放进入肠腔,以避免天牛对毒蛋白产生抗性。

本研究获得的转基因工程菌经毒蛋白分析的结果显示,转入的 *cry3A* 基因已经成功在桑粒肩天牛幼虫肠道常驻优势菌 *B. brevis* Ag 12 和 *B. thuringiensis* Ag13 菌株中表达;初步的饲喂试验和毒力测定也显示该工程菌能够在天牛幼虫肠道内定殖,并已经显示出一定的杀虫活性。但是该工程菌在桑粒肩天牛幼虫肠道中的定殖位点、与其它肠道菌的竞争能力、毒

蛋白的表达时间延迟以及表达量都还需要进一步深入的研究,获得更高的杀虫活性,才可能真正将其用于害虫防治。

致谢 法国巴斯德研究所的 Dr. Lereclus 和长江大学周燚博士为本研究提供质粒并对试验提供帮助,在此表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] 蒋书楠. 中国天牛幼虫. 第一版. 重庆: 重庆出版社, 1989, pp.1-160.
- [2] Misaghi IJ. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 1990, 80(9): 808-811.
- [3] 康白. 微生物学. 第一版. 大连: 大连出版社, 1988, pp.64-81.
- [4] Souza MTE, Lecadet MM, Lereclus D. Full expression of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. *J Bacteriol*, 1993, 175(10): 2952-2960.
- [5] Lecadet MM, Chaufaux J, Ribier J, et al. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 1992, 58(3): 840-849.
- [6] Yue CY, Sun M, Yu ZN. Broadening the insecticidal spectrum of lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains by chromosomal integration of *cry3A*. *Wiley InterScience*, 2005, 91(3): 299-301.
- [7] Takagi H, Kagiya S, Kadowaki K, et al. Genetic transformation of *Bacillus brevis* with plasmid DNA by electroporation. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(11): 3099-3100.
- [8] 何正波, 殷幼平, 曹月青, 等. 桑粒肩天牛幼虫肠道菌群的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2001. 31(1): 41-48.
- [9] John GH, Nobel RK, Peter HA, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: WilliaIns and Wilkins

- Press, 1994.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, et al. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture independent methods. *App Environ. Microbio*, 2004, 70 (1): 293–300.
- [12] 彭清忠, 张惟材, 朱厚础. 具有分泌蛋白能力的短芽孢杆菌的筛选及鉴定. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2002, 42(6): 693–699.
- [13] Kurt A, Ozkan M, Ozcengiz G. Inorganic phosphate has a crucial effect on *cry3Aa* δ -endotoxin production. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41(4): 303–308.
- [14] 彭清忠, 彭清静, 张惟材, 等. 短芽孢杆菌的转化方法. 吉首大学学报(*Journal of Jishou University*), 2003, 25(4): 35–38.
- [15] Sambrook KJ, Russell DW. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 32–34.
- [16] 季林, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌无质粒突变株 BMB171 的转化和表达性能. *应用与环境生物学报(Chinese Journal of Applied & Environmental Biology)*, 1999, 5(4): 395–399.
- [17] 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)*, 2004, 31(8): 8–10.
- [18] Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, et al. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Fems Microbiol Lett*, 1989, 51(1): 211–218.
- [19] 陈军, 王学聘, 卢孟柱, 等. 抗光肩星天牛苏云金芽孢杆菌 Bt886 菌株的分离及对毒蛋白编码基因的初步鉴定. *林业科学(Scientia Silvae Sinicae)*, 2004, 40(5): 138–142.

Transformation and expression of specific insecticide gene *Bt cry3A* in resident endogenetic bacteria isolated from *Apriona germari* (Hope) larvae intestines

Zhongkang Wang, Wei He, Guoxiong Peng, Yuxian Xia, Qiang Li, Youping Yin *

(Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing Engineering and Technology Center for Fungal Insecticides, Key Lab of Genetic Function and Regulation, Chongqing 400030, China)

Abstract: [Objective] Transforming the specific insecticidal gene *Bt cry3A* into the dominant resident endogenetic bacteria in intestines of *Apriona germari* (Hope) larvae to construct transgenic bacteria that can colonize and express the insecticidal gene *Bt cry3A* perfectly in intestines of *Apriona germari* (Hope) larvae. **[Method]** We isolated and identified the dominant resident endogenetic bacteria by traditional methods and molecular method based of 16S rDNA analysis. Two *Escherichia coli* - *Bacillus thuringiensis* shuttle plasmid pHT305a and pHT7911 which contained specific insecticidal gene *Bt cry3A* were transformed into two resident endogenetic bacteria *Brevibacillus brevis* Ag12 and *Bacillus thuringiensis* Ag13 isolated from *A. germari* larvae intestines respectively by electro-transformation. **[Results]** Eighteen species of bacteria have isolated and identified from *Apriona germari* larvae intestines and two of them (*Brevibacillus brevis* Ag12 and *Bacillus thuringiensis* Ag13) were selected as starting bacteria to receive the *Bt cry3A*. The 4 transgenic engineering strains Ag12-7911, Ag12-305a, Ag13-7911 and Ag13-305a were obtained successfully and validated by testing the plasmid stability in recombinants, transformants vegetal properties, crystal poisonous protein observation, expressional protein SDS-PAGE. The *Bt cry3A* gene had been transformed into *Brevibacillus brevis* and *Bacillus thuringiensis*. Both bioassay and examination of the engineering strains in intestines after feeding them to larvae showed that all these transformant strains (*Brevibacillus brevis* Ag12-305a, *Bacillus thuringiensis* Ag13-305a, *Brevibacillus brevis* Ag12-7911 and *Bacillus thuringiensis* Ag13-7911) could colonize and express 65 kDa protoxin in intestines of *A. germari* larvae and had insecticidal activity. **[Conclusion]** We obtained four transgenic bacteria that can colonize and express the target insecticide gene *Bt cry3A* in *A. germari* larvae. They may be developed as a new insecticide.

Keywords: *Apriona germari* (Hope); intestinal resident endogenetic bacteria; *Bt cry3A*; engineering bacteria; expression