

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(1):110-116; 4 January 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

苏云金芽孢杆菌 *vip3A* 基因的鉴定、克隆及活性分析

申建茹¹, 侯名语², 郭巍^{1,2*}

(¹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)

(²河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

摘要 【目的】鉴定我国自行分离的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)菌株中 *vip3A* 基因的分布和基因型, 从其中对鳞翅目幼虫表现高毒力的 Bt 菌株中克隆 *vip3Aa* 基因。【方法】利用 PCR-RFLP 方法确定 *vip3A* 基因的分布和鉴定基因型, 利用 PCR 方法克隆 *vip3A* 全长基因。【结果】171 株野生型 Bt 菌株中共鉴定出 63 株含有 *vip3A* 基因, 均与 *vip3Aa1* 类基因相似。从 TF9 和 Bt16 菌株中克隆得到 2 个 *vip3Aa* 基因, 分别构建了携带 *vip3Aa* 基因的表达载体 p30vip-26 和 p30vip-27, SDS-PAGE 和 Western Blot 分析表明, IPTG 诱导后均可表达 88 kDa 左右的 Vip3A 蛋白, 蛋白可溶性分析表明约 10% 可溶。这两种基因序列已被国际 Bt 基因命名委员会分别正式命名为 *vip3Aa26* 和 *vip3Aa27*。生物测定结果显示, Vip3Aa27 蛋白对粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)和棉铃虫(*Helicoverpa armigera*) 3 种重要鳞翅目害虫初孵幼虫的毒力较高, LC₅₀ 值分别为 0.125 μg/mL, 0.238 μg/mL 和 9.238 μg/mL。而 Vip3Aa26 蛋白仅对粉纹夜蛾有活性, LC₅₀ 值为 4.423 μg/mL。【结论】本研究中的 Vip3Aa27 蛋白对粉纹夜蛾、甜菜夜蛾和棉铃虫幼虫均能表现高杀虫活性, 而 Vip3Aa26 蛋白仅对粉纹夜蛾幼虫有活性, 实验结果表明 Vip3A 蛋白个别氨基酸的变化对其杀虫活性影响很大。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 营养期杀虫蛋白 *vip3Aa* 基因; 克隆; 表达; 杀虫活性

中图分类号: Q786 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)01-0110-07

Estruch^[1]和 Warren^[2]等于 1996 年和 1998 年分别从 *B. thuringiensis* 菌株 AB88 和 *B. cereus* 菌株 AB78 上清液中发现了新型分泌杀虫蛋白, 即营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, VIPs), 该类蛋白从对数生长中期开始分泌, 直到稳定前期达到最高峰, 具有热不稳定性, 95℃ 处理 20min 便失活^[1]; 一般不形成伴孢晶体且与已知的杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins, ICPs)没有序列相似性, 最重要的是其杀虫作用机理与 ICPs 不同^[3]。Vip3A 毒蛋白在 pH 5~10 之间都可溶解, 其 C-端不

被切除, 与敏感昆虫上皮细胞结合, 诱发昆虫细胞凋亡, 细胞核溶解, 导致昆虫死亡^[3-4]。该蛋白的发现使 Bt 在杀虫活性、杀虫范围方面得到很大突破, 在一定程度上克服了多种害虫对 ICPs 低敏感或不敏感的弊端。有报道表明 Vip3A 蛋白对草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*) 等对杀虫晶体蛋白 ICPs 不敏感或低敏感的昆虫具有杀虫活性^[1], 对小地老虎(*Agrotis ipsilon*)的毒性比 Cry1Ac 高 260 倍^[3,5]。可见, VIPs 是一个极为丰富而且具有巨大

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划(2003CB114201)

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

作者简介: 申建茹(1981-), 女, 河北省保定市, 硕士研究生, 主要从事生物技术与生防微生物研究。Tel: +86-312-7528170, E-mail: shenjianru1981@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-07-15; 修回日期: 2008-10-19

潜力的资源,该领域已成为 Bt 研究的热点。

目前 GenBank 已收录的全长 vip 基因主要是 vip3A 类基因,在 GenBank 上登录的 vip3A 全长基因共有 28 个(NCBI-http://www. NCBI. Blastn)。对 vip3A 基因的序列分析表明该类基因在遗传上相当保守,刘金环等利用 PCR-RFLP 方法鉴定 vip3A 基因型的结果也证实该类基因的保守性^[6]。Vip3A 蛋白间的相似性很高,多数在 98.6% ~ 100% 之间,通过氨基酸序列比对分析,发现已鉴定的 Vip3A 蛋白在第 284、358、406、536、633、755、761 和 776 位氨基酸的变动频率均较高。但是蛋白间仅几个氨基酸的差异,杀虫谱和毒性却差异很大,Vip83 蛋白 N-端比

Vip-C9 蛋白多两个氨基酸,对小菜蛾表现高活性,而 Vip-C9 对小菜蛾的活性很低^[7-8]。进一步分离克隆新型 vip3A 类基因,研究其杀虫范围及杀虫毒力,为明确其结构与功能的相互关系创造条件,也为高效转基因工程菌和工程植物的研制提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 所用菌株和质粒见表 1,抗生素使用浓度分别为氨苄青霉素(Amp^r)100 μg/mL 和卡那霉素(Kan^r)30 μg/mL。

1.1.2 主要试剂 :PCR 扩增相关试剂、限制性内切

表 1 菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids

| Strains and plasmids | Characteristics | Origin |
|--------------------------|---|----------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| <i>E. coli</i> TG1 | <i>supE hsdΔ5/F' thi K12Δ (lac-pro) traD36 proAB⁺</i> <i>LacZΔM15</i> | |
| <i>E. coli</i> M15 | Kan ^r with pREP4 | Supplied by Doctor Pang Yi |
| <i>E. coli</i> M30vip-27 | <i>E. coli</i> M15 with p30vip-27, Amp ^r , Kan ^r | This work |
| <i>E. coli</i> M30vip-26 | <i>E. coli</i> M15 with p30vip-26, Amp ^r , Kan ^r | This work |
| <i>B. thuringiensis</i> | | |
| 171 Bt isolates | Wild strains | This Lab |
| Plasmid (vector) | | |
| pMD18-T vector | 2.69kb, Amp ^r | TaKaRa |
| pQE30 | 3.4kb, Amp ^r | Supplied by Doctor Pang Yi |
| pTV-16 | pMD18-T vector containing full <i>vip3Aa27</i> gene, Amp ^r | This work |
| pTV-TF9 | pMD18-T vector containing full <i>vip3Aa26</i> gene, Amp ^r | This work |
| p30vip-27 | pQE30 containing full <i>vip3Aa27</i> gene, Amp ^r | This work |
| p30vip-TF9 | pQE30 containing full <i>vip3Aa26</i> gene, Amp ^r | This work |

酶、T₄ DNA ligase 和 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司。抗生素(Amp^r 和 Kan^r) anti-rabbit IgG(Alkaline Phosphatase conjugate antibody developed in goat)(Sigma)和其它生化试剂购自博士德生物工程有限公司。Vip3Aa 抗体由中山大学庞义教授提供。NBT、BCIP 和 UNIQ-10 柱 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 PCR-RFLP 分析

参照文献合成 vip3A 基因型 PCR-RFLP 鉴定的通用引物 Svip5/Svip3^[6]。合成扩增全长 vip3A 开放阅读框的引物 Vip3A5/Vip3A3,在 5' 和 3' 分别引入 BamHI 和 SalI 内切酶位点^[9]。PCR 反应条件:94℃ 3 min,94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 2 min 40s,32 个循环,72℃ 10 min。

1.3 Bt 质粒 DNA 的制备

Bt 质粒 DNA 的提取,采用 CTAB 方法,参见分子克隆实验手册^[10],略有改进。

1.4 菌株中 Vip3A 蛋白的银染和 Western blot

将菌株 TF9 和 Bt16 分别培养 24h,分时段收集上清,进行 SDS-PAGE 分析,然后进行 Western blot 分析,即以 Vip3Aa 蛋白的多克隆抗体作为一抗,以碱性磷酸酶标记的 anti-rabbit IgG 作为二抗,利用 NBT 和 BCIP 进行显色,检测两株 Bt 菌株中 Vip3A 蛋白的表达量随时间的变化情况。

1.5 vip3Aa 基因克隆及表达载体的构建

利用 UNIQ-10 柱 DNA 胶回收试剂盒回收扩增全长基因,与 pMD18-T 载体连接,热激转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*)TG1,蓝白斑筛选,酶切鉴定正确的

重组质粒。将 *vip3Aa* 基因插入 pQE30 表达载体,转化、筛选正确转化子。质粒提取、酶切、电泳鉴定、DNA 片段回收、连接、感受态细胞的制备和大肠杆菌的热激转化等均参照分子克隆实验手册^[10]进行。

1.6 目的蛋白 Vip3A 的诱导表达

挑取单菌落接种于 2 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,220 r/min 过夜培养。以 1:100 转接于 10 mL 含有上述抗生素的 LB 液体培养基,培养至 OD_{600} 为 0.5~0.7 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导,分别取培养 1 h 至 8 h 的培养液 1 mL 进行 SDS-PAGE 分析,绘制生长曲线。

1.7 Vip3A 重组蛋白的 Western Blot 分析

方法同 1.4。

1.8 表达产物的可溶性分析

参照文献[9]对诱导菌体进行超声波处理,10000 \times g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,吸取上清(含有可溶性蛋白的粗提液 S),并保存沉淀(含有不溶蛋白的粗提液 P),进行蛋白定量及 Western Blot 分析。

1.9 蛋白浓度测定及生物活性分析

蛋白浓度测定参照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒

(威格拉斯生物技术有限公司)说明书进行,根据蛋白标准品浓度和吸光度制作蛋白浓度标准曲线,从标准曲线和样品稀释倍数计算样品的蛋白浓度。

生物活性测定采用饲料表面覆盖法^[11],以空载菌诱导蛋白和灭菌双蒸水作对照,将已测定浓度的蛋白样品经过系列稀释,得到不同浓度的生测样品,对粉纹夜蛾、甜菜夜蛾和棉铃虫 3 种鳞翅目昆虫的初孵幼虫进行生物活性测定,进行 LC_{50} 分析。以 95 $^{\circ}\text{C}$ 处理 20 min 的目的蛋白作为参照,验证该类蛋白的热不稳定性。

2 结果

2.1 Bt 菌株中 *vip3A* 基因的 PCR-RFLP 鉴定

对本实验室分离保存的 171 株野生型 Bt 菌株进行 PCR 鉴定,63 株获得 *vip3A* 基因 1.45 kb 阳性产物,即约有 36.8% 的菌株含有 *vip3A* 基因。PCR 产物经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,均产生约 870 bp、255 bp、186 bp 的片段,与 *vip3Aa1* 基因的电泳图谱一致,即 63 株含有的 *vip3A* 基因均与 *vip3Aa1* 相似,部分酶切鉴定结果见图 1。

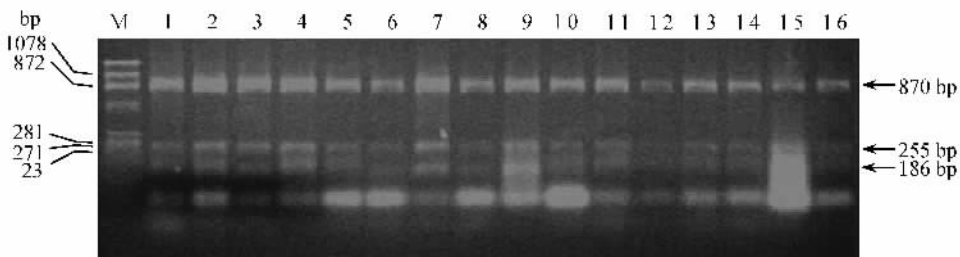


图 1 Bt 菌株 *vip3A* 基因扩增产物限制性酶切分析

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of *vip3A* genes amplified from Bt strains. M. ϕ x174 1. Bt 2 2. Bt 3 3. Bt 16 4. Bt 20 5. Bt 27 6. Bt 32 7. Bt 47 8. Bt 49 9. Bt 61 10. Bt 67 11. Bt 73 12. TF6 13. TF7 14. TF9 15. TF10 16. GS7

2.2 Bt 菌株中 *Vip3A* 蛋白的表达

将不同时段收集的上清,进行 SDS-PAGE,银染结果表明自 7 h 左右,均可以检测到约 88 kDa 的蛋白,随着培养时间延长表达量增多,Western blot 分析验证了该结果,即两菌株 *Vip3A* 蛋白大约都是自 7 h 开始明显检测到,从 9 h 开始至 20 h 蛋白的表达量维持高水平,增长缓慢,20 h 后 *Vip3A* 蛋白表达量降低。1 h~15 h 的具体检测结果如图 2A、2B 所示。

2.3 *vip3Aa* 基因的克隆

分别以菌株 Bt16 和 TF9 的质粒 DNA 为模板,进行全长 *vip3A* 基因 PCR 扩增,均获得 2.37 kb 的阳性 PCR 产物。分别将 PCR 产物回收,连接 pMD18-T 载体,经酶切及 PCR 鉴定得到正确的重组质粒,分

别命名为 pTV-TF9 和 pTV-16。

2.4 *vip3Aa* 基因的序列测定及分析

对 pTV-TF9 和 pTV-16 的序列测定结果表明这两种来自不同菌株的 *vip3Aa* 基因与已知 *vip3A* 基因的序列相似性分别介于 96.75%~99.75% 和 96.67%~99.58%,GenBank 登录号分别为 EU294496 和 EU332167。国际 Bt 基因命名委员会正式分别命名为 *vip3Aa26*(TF9)和 *vip3Aa27*(Bt16)。

Vip3Aa26 与已知 *Vip3A* 蛋白氨基酸序列相似性介于 96.70%~99.11%,*Vip3Aa27* 与已知 *Vip3A* 蛋白氨基酸序列相似性介于 97.34%~99.49%。*Vip3Aa26* 和 *Vip3Aa27* 与同类已知蛋白氨基酸序列比对结果见表 2,第 91、223、342、398、491、514、608、

640、662、716、767 位氨基酸与其它蛋白存在明显 差异。

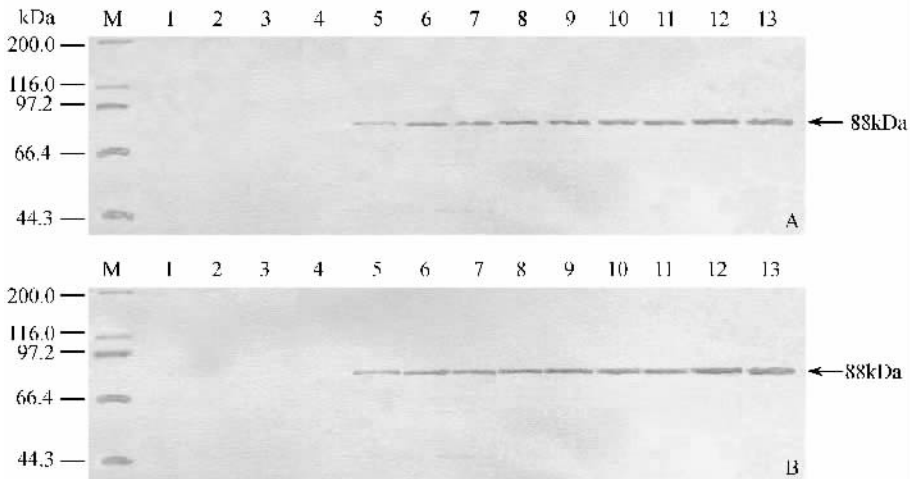


图 2 菌株 TF9 Vip3A Bt16 Vip3A 蛋白的表达情况分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the Vip3A from TF9 (A) and Vip3A from Bt16(B). M. Protein Marker 1.1 h 2.3 h 3.5 h 4.6 h 5.7 h 6.8 h 7.9 h 8.10 h 9.11 h 10.12 h 11.13 h 12.14 h 13.15 h

表 2 Vip3Aa26& Vip3Aa27 与其它同源蛋白氨基酸序列比较

Table 2 Analysis of Vip3Aa26& Vip3Aa27 with other Vip3A deduced

| Protein | Amiro acid residue | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 91 | 121 | 129 | 217 | 223 | 284 | 342 | 398 | 451 | 464 | 466 | 491 | 514 | 605 | 608 | 640 | 662 | 716 | 742 | 762 | 767 |
| Vip3Aa26* | R | I | M | K | K | K | N | K | D | Y | T | E | P | P | R | A | F | L | E | K | T |
| Vip3Aa27* | K | I | M | K | G | K | D | E | D | Y | T | G | L | P | H | T | L | F | E | K | I |
| Vip3Aa10 | K | I | M | K | D | K | D | K | D | Y | T | G | L | P | H | T | F | F | E | K | I |
| Vip3Aa1 | K | I | M | K | D | Q | D | K | D | Y | T | G | L | P | H | T | F | F | E | K | I |
| Vip3Aa13 | K | I | M | K | D | K | D | K | D | H | T | G | L | P | H | T | F | F | E | K | I |
| Vip3Aa16 | K | L | M | K | D | K | D | K | D | Y | T | G | L | P | H | T | F | F | E | K | I |
| Vip3WY197 | K | I | M | K | D | K | D | K | D | Y | A | G | L | P | H | T | F | F | E | E | I |
| Vip3BR | K | I | M | N | D | K | D | E | D | Y | T | G | L | P | H | T | F | F | E | K | I |
| Vip3Aa18 | K | I | M | K | D | K | D | K | D | Y | T | G | L | T | H | T | F | F | E | K | I |
| Vip3-AB51 | K | I | M | K | D | K | D | K | G | Y | T | G | L | P | H | T | F | F | E | K | I |
| Vip3Aa20 | K | I | I | K | D | Q | D | K | D | Y | T | G | L | P | H | T | F | F | E | K | I |
| Vip3Aa9 | K | I | M | K | D | K | D | K | D | Y | T | G | L | P | H | T | F | F | G | K | I |

* This study.

2.5 重组表达载体的构建与 *vip3Aa* 的表达

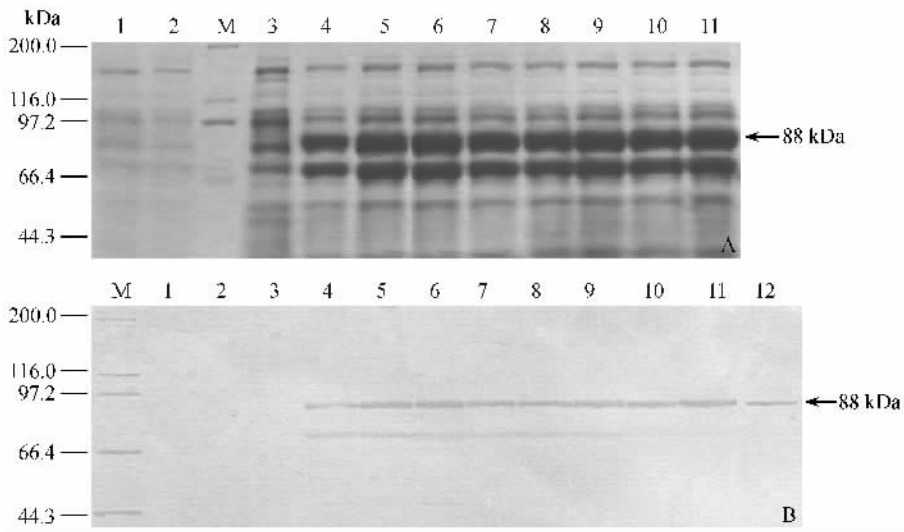
将克隆有 *vip3A* 基因的重质粒 pTV-TF9 与 pTV-16 和表达载体 pQE30 分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切,回收 2.4 kb 目的片段和 3.4 kb 载体片段,连接后转化 *E. coli* TG1,提取质粒,经酶切及 PCR 鉴定,得到正确的重组质粒命名为 p30vip-26 和 p30vip-27。将表达载体转化 *E. coli* M15 进行诱导表达。转化子 M30vip-26 和 M30vip-27 经过终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导后, *vip3Aa26/27* 基因均能够表达 88kDa 的多肽,生长曲线结果表明诱导菌的生长速度明显低于非诱导菌(结果未列出)。

对诱导 1~8h 的目的蛋白样品分别进行 SDS-PAGE 分析,可发现目的蛋白随诱导时间的延长表达量逐渐增多,到第 6 h 时达到最大,约占总蛋白的

55%(图 3-A、图 4-A),直至诱导 24 h 时,仍维持较高的蛋白表达量(结果未列出),而其它蛋白表达量随时间变化不大。该结果进一步经 Western blot 分析得到证实(图 3-B、图 4-B),目的蛋白均能够与 Vip3A 特异性抗体相结合,产生约 88kDa 的阳性信号,诱导 6h 时蛋白表达量达到最大,而空载菌和非诱导菌均没有检测到阳性信号。

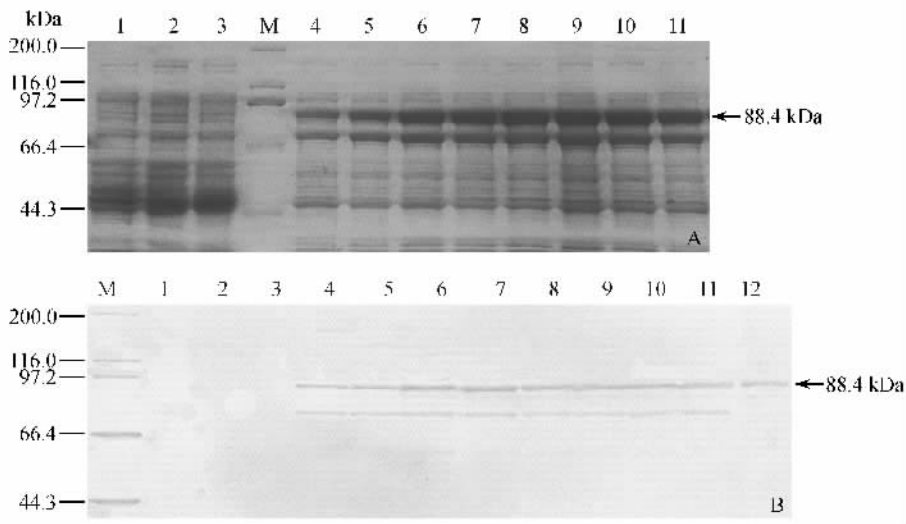
2.6 Vip3Aa26 蛋白和 Vip3Aa27 蛋白的可溶性分析

将含有可溶性蛋白的粗提物 S 与含有不溶蛋白的粗提物 P 进行定量及 Western blot 分析,结果如图 5 所示, Vip3Aa26 蛋白和 Vip3Aa27 蛋白的可溶性蛋白含量很低,约占目的蛋白总量的 10%,目的蛋白主要以包涵体形式存在。



3 vip3Aa26 在 *E. coli* M15 中表达的 SDS-PAGE (A) 和 Western-Blot (B) 分析

Fig.3 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analyses of expression of *vip3Aa26* in *E. coli* M15. M. Protein Marker; 1. M15 [pQE30] without IPTG induction; 2. M15 [pQE30] with IPTG induction; 3. M30 *vip3Aa26* without IPTG induction; 4 ~ 11. M30 *vip3Aa26* for 1h ~ 8h cultivation with IPTG induction; 12. supernatant of the TF9 for 12h.



4 vip3Aa27 在 *E. coli* M15 中表达的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 分析

Fig.4 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analyses of expression of *vip3Aa27* in *E. coli* M15. M. Protein Marker; 1. M15 [pQE30] without IPTG induction; 2. M15 [pQE30] with IPTG induction; 3. M30 *vip3Aa27* without IPTG induction; 4 ~ 11. M30 *vip3Aa27* for 1 h ~ 8h cultivation with IPTG induction; 12. supernatant of the Bt16 for 12h.

2.7 生物测定

按照方法 1.9 进行生物测定,结果显示 Vip3Aa26 对 *T. ni* 初孵幼虫具有杀虫活性, LC_{50} 值为 $4.423 \mu\text{g/mL}$, 对 *S. exigua* 和 *H. armigera* 初孵幼虫抑制活性较低(表 3)。Vip3Aa27 对 *T. ni*, *S. exigua* 和 *H. armigera* 的初孵幼虫均具有较高的杀虫活性, 对 *T. ni* 幼虫的毒力最高, 对 *H. armigera* 幼虫的毒力相对较低, 对 *S. exigua* 幼虫的毒力居中, LC_{50} 值分别为 $0.125 \mu\text{g/mL}$, $0.238 \mu\text{g/mL}$ 和 $9.238 \mu\text{g/mL}$ (表 3, 4)。95°C 处理 20 min 的目的蛋白

全部失去杀虫活性。

3 讨论

利用 PCR-RFLP 方法, 从我国自行分离的 171 株 Bt 菌株中共筛选出 63 株含有 *vip3A* 基因, 分布率为 36.84%, 比 Estruch、陈建武、刘荣梅得出的分布率偏高, 比蔡启良的结果偏低^[17-9], 筛选出的 *vip3A* 基因与 *vip3Aa1* 基因型相似, 说明 *vip3A* 基因相当保守, 其中 *vip3Aa1* 类基因居多, 这与刘金环等的研究结果基本一致^[6]。Western Blot 分析表明, 本

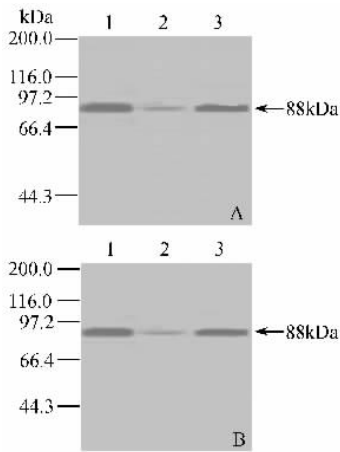


图 5 Vip3Aa26 (A) 和 Vip3Aa27 (B) 可溶性蛋白的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of Vip3Aa26 (A) and Vip3Aa27 (B). M. Protein Marker; 1. Total proteins of recombinant (A) M30vip-TF9 and (B) M30vip-16; 2. Soluble fraction of (A) M30vip-TF9 (S) and (B) M30vip-16 (S); 3. pellets of recombinant (A) M30vip-TF9 (P) and (B) M30vip-16 (P).

研究中克隆的目的基因能够表达与 Vip3A 特异性抗体相结合的目的蛋白,即产生约 88 kDa 的阳性信号。SDS-PAGE 和 Western Blot 结果共同表明,重组菌在诱导 6 h 时蛋白表达量达到最大,这与陈建武所表达的 Vip3A-S184 相比,重组蛋白的诱导速度快而且表达水平高^[9],说明本研究中克隆的 2 个 vip3A 基因具有更高的实用意义。

表 3 Vip3Aa26 蛋白对粉纹夜蛾初孵幼虫的毒力分析结果

Table 3 Bioassay results of Vip3Aa26 protein against *T. ni* neonates

| Tested insects | Toxic regression formula | Value of LC ₅₀ (μg/mL) | 95% Fiducial limits |
|----------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| <i>T. ni</i> | $y = 0.4110x + 3.9126$ | 4.423 | 1.708 - 11.452 |

表 4 Vip3Aa27 蛋白对粉纹夜蛾、甜菜夜蛾和棉铃虫初孵幼虫的毒力分析结果

Table 4 Bioassay results of Vip3Aa27 protein against *T. ni*, *S. exigua* and *H. armigera* neonates

| Tested insects | Toxic regression formula | Value of LC ₅₀ (μg/mL) | 95% Fiducial limits |
|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| <i>T. ni</i> | $y = 0.3035x + 4.3632$ | 0.125 | 0.038 - 0.411 |
| <i>S. exigua</i> | $y = 0.2645x + 4.6359$ | 0.238 | 0.056 - 1.011 |
| <i>H. armigera</i> | $y = 0.7822x + 3.4625$ | 9.238 | 5.837 - 14.622 |

结构域分析表明,本研究中的 Vip3Aa26 蛋白和 Vip3Aa27 蛋白分别在 C-端 536 ~ 666 位氨基酸残基间有一个糖类结合域(CBM_4_9, Carbohydrate binding domain),推测可能参与敏感昆虫中肠受体结合,应用 Tmap 软件分析发现这两种 Vip3A 蛋白 N-

端 271 ~ 296 位氨基酸残基间存在一个跨膜螺旋,可能与固有的穿孔特性有关。

生物测定结果显示,Vip3Aa27 蛋白对 *S. exigua* 和 *H. armigera* 初孵幼虫的杀虫活性均高于 Vip3A-S184^[9], Vip3A-LSI^[12] 和 Vip3Aa26。Vip3Aa27 与 Vip3A-LSI (Vip3Aa22) 和 Vip3Aa26 在 223、398、662、716 位置的氨基酸存在不同,且疏水性和亲水性存在明显差异,推测 223、398、662、716 位置上的某个氨基酸处于特殊活性功能区。氨基酸的极性与蛋白的三维结构和功能密切相关,Vip3Aa27 蛋白在 223、398 和 640 位置上的氨基酸极性与其它 Vip3Aa 相应的氨基酸极性不同,决定其三维结构和功能与其它 Vip3Aa 蛋白不同,推测这是 Vip3Aa27 蛋白活性高于其它 Vip3Aa 蛋白活性的原因之一。

Vip3Aa26 蛋白与对鳞翅目高毒力的 Vip3Aa 蛋白相比,在 91、342、491、514、608、640、716、767 位置上的氨基酸存在明显差异,并且在 491、514、608、640、716、767 位置的氨基酸疏水性和亲水性存在明显差别,Selvapandiyani 等证明 Vip3A 蛋白 C-端含有稳定功能区^[13],对于维持 Vip3 活性至关重要,或缺或增加几个氨基酸都会使它的活性完全丧失,因此不同 Vip3 蛋白 C-端的变异可能是对不同生物活性的选择^[14]。因此推测是 491、514、608、640、716、767 位置上氨基酸的变动导致了 Vip3Aa26 蛋白杀虫活性的变化。

vip3Aa26 和 vip3Aa27 基因的获得将为基因改造、工程菌和转基因植物的构建提供基因来源,通过与其它 vip 基因进行基因序列交换或者改造,有望得到杀虫谱更广、杀虫活性更高的融合基因^[15]。将 vip3A 基因单独在高毒力 Bt 菌株中进行表达或将该基因与 ICPs 基因进行共表达,这样构建的工程菌株对于提高 ICPs 蛋白的杀虫活性和克服昆虫对 ICPs 产生抗性等方面均具有重要意义。

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(11): 5389 - 5394.

[2] Warren GW, Koziel MG, Mullins MA. Pesticidal proteins and strains. World Intellectual Property Organization Patent, 5846870, 1998 - 12 - 24.

[3] Yu CG, Mullins MA, Warren GW, et al. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(2): 532 - 536.

- [4] Lee MK , Walters FS , Hart H , et al. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of CryIAb δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology* , 2003 , 69(8) : 4648 – 4657.
- [5] Estruch JJ , Yu CG , Warren GW , et al. Class of proteins for the control of plant pests. United States Patent , 6107279 , 2000-8-22.
- [6] Liu JH , Song FP , Zhang J , et al. Identification of *vip3A*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *vip3A*-type gene. *Letters in Applied Microbiology* , 2007 , 45(4) : 432 – 438.
- [7] 蔡启良 , 刘子铎 , 孙明 , 等. 苏云金芽孢杆菌营养期杀虫基因的克隆及表达分析. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*) , 2002 , 18(5) : 578 – 582.
- [8] 刘荣梅 , 张杰 , 高继国 , 等. 苏云金杆菌营养期杀虫蛋白基因 *vip3A* 的研究. 高技术通讯(*High Technology Letters*) , 2004 , 14(9) : 39 – 42.
- [9] 陈建武 , 唐丽霞 , 宋少云 , 等. 苏云金芽孢杆菌 *vip3A* 基因的检测及保守性分析. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*) , 2003 , 9(5) : 538 – 543.
- [10] Sambrook J , Russell D W. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory , 2001.
- [11] 郭巍. 粉纹夜蛾对苏云金芽孢杆菌 Cry1Ac 的抗性及其防御体系的研究. 中山大学博士学位论文 , 2005.
- [12] 陆秀君 , 郝会海 , 李国勋 , 等. 苏云金芽孢杆菌营养期杀虫蛋白 *vip3A*-LS1 基因的克隆与表达. 农业生物技术学报(*Journal of Agricultural Biotechnology*) , 2007 , 15(5) : 872 ~ 876.
- [13] Selvapandiyana A , Arora N , Rajagopal R , et al. Toxicity analysis of N- and C-terminus deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus Thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* , 2001 , 67 : 5855 – 5858.
- [14] 徐宁. 苏云金芽孢杆菌营养期杀虫蛋白(Vip3) 突变体的杀虫活性及其对胰蛋白酶的敏感性. 浙江大学博士学位论文 , 2007.
- [15] Fang J , Xu X , Shen Z. et al. Characterization of Chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 Toxins. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73(3) : 956 – 963.

Identification and Cloning of *vip3A* Genes from Isolates of *Bacillus thuringiensis* and Their Bioactivity Analysis

Jianru Shen² , Mingyu Hou² , Wei Guo^{1, 2*}

(¹ College of Plant Protection , Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province , Agricultural University of Hebei , Baoding 071001 , China)

(² College of Life Sciences , Agricultural University of Hebei , Baoding 071001 , China)

Abstract [Objective] To survey the distribution of *vip3A*-type genes from isolates of *Bacillus thuringiensis* in China and to clone novel *vip3A* genes encoding Vip3A proteins with high insecticidal activity against Lepidopteran insect larvae. **[Methods]** We applied PCR-RFLP method to identify *vip3A*-type genes from 171 isolates and cloned novel *vip3Aa* genes. **[Results]** The *vip3A*-type genes appeared in 63 of 117 *B. thuringiensis* isolates. We cloned 2 novel *vip3Aa* genes from isolates of TF9 and BT16. Then , we subcloned *vip3Aa26* and *vip3Aa27* into vector pQE30 and transformed into *Escherichia coli* M15 , respectively. The results of SDS-PAGE and Western blot analyses showed that an 88 kDa peptide was expressed in *E. coli* M15 with 1mmol/L of IPTG induction at 37°C , respectively. The International Nomenclature Committee of Bt nominated these two genes as the novel *vip* genes of *vip3Aa26* and *vip3Aa27* , respectively. The bioassay results indicated that the Vip3Aa27 proteins were highly toxic to *Trichoplusia ni* , *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera* larvae and the LC₅₀ values were 0.125 μ g/mL , 0.238 μ g/mL and 9.238 μ g/mL , respectively. However , the Vip3Aa26 protein only possessed toxicity to *T. ni* larvae. **[Conclusions]** The novel Vip3Aa27 protein had higher activity to Lepidopteran insect larvae compared with that for Vip3Aa26 protein. The results demonstrated that some amino acid changes had remarkable effect on the insecticidal activity.

Keywords : *Bacillus thuringiensis* ; vegetative insecticidal proteins (VIPs) ; *vip3A* gene ; cloning ; expression ; insecticidal activity

(本文责编 : 王晋芳)