

## 四川盆地生态区苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因的鉴定及新型模式 *cry* 基因的克隆

朱军<sup>1,3#</sup>, 谭芙蓉<sup>2#</sup>, 余秀梅<sup>1,3</sup>, 关鹏<sup>1,3</sup>, 唐杰<sup>1,3</sup>, 王世全<sup>1,3</sup>, 郑爱萍<sup>1,3\*</sup>, 李平<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup> 四川农业大学水稻研究所, 温江 611130)

(<sup>2</sup> 上海市农业科学院生物技术研究所, 上海 201106)

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

**摘要** 【目的】为了明确四川盆地生态区土壤中苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因资源情况, 进一步克隆出新型的杀虫晶体蛋白基因。【方法】本研究主要通过菌株晶体形状的光学显微镜及扫描电镜观察、PCR-RFLP 技术鉴定 *cry* 基因型法、杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析和菌株生物活性测定等方法对此地区菌株进行研究。【结果】从四川盆地不同生态区采集 2650 份土壤样品中分离了 791 株苏云金芽胞杆菌。PCR-RFLP 鉴定结果表明: 此地区的苏云金芽胞杆菌主要含有 *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4/10*, *cry9*, *cry30* 和 *cry40* 等 7 种 *cry* 基因类型, 含 *cry1* 基因的菌株最丰富, 共有 21 种不同 *cry1* 型基因组合; 从中发现了新型模式基因, 并采用 Tail-PCR 技术获得了其中 3 个基因的全长序列, 被国际苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因命名委员会命名为 *cry54Aa1*、*cry30Fa1* 和 *cry30Ga1*。通过生物活性测定, 发现对鳞翅目和双翅目害虫具毒力的菌株。未鉴定出基因型的 80 个菌株的伴胞晶体 SDS-PAGE 分析表明, 这些菌株均有 40~130 kDa 蛋白表达, 极有可能含新型的杀虫蛋白基因。【结论】研究结果充分体现了四川盆地生态区苏云金芽胞杆菌资源的多样性及特殊性, 所蕴含的杀虫蛋白基因在农业生产上具有重要意义和应用前景。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌; *cry* 基因; PCR-RFLP; SDS-PAGE; 模式基因; 杀虫活性

**中图分类号:** Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0324-07

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 属革兰氏阳性细菌, 广泛分布在土壤、虫尸、污水、淤泥、尘埃等介质中。土壤作为微生物定殖的大本营, 是 Bt 生存的最佳介质<sup>[1-2]</sup>。Bt 是目前世界上应用最为广泛的微生物杀虫剂, 它产生的伴胞晶体蛋白(parasporal crystal protein), 即  $\delta$ -内毒素或杀虫晶体蛋白(ICP, Insecticidal Crystal Protein), 是 Bt 杀虫活性的主要来源, 对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等多种昆虫,

以及线虫、螨类和原生动物等都具有特异性的杀虫活性<sup>[3-4]</sup>。

Bt 的 ICPs 是 *cry* 基因的直接表达产物, *cry* 基因的多样性决定了伴胞晶体蛋白组成与形态的多样性, 并且与其杀虫活性的多样性也密切相关。目前, 关于 ICPs 的分类, 主要采用以 Crickmore 为首的 Bt 杀虫晶体蛋白基因命名委员会在 1995 提出的新分类系统, 截止到 2008 年, 55 类约 390 种 *cry* 基因被

基金项目: 国家 863 计划(2006AA02Z189)

\* 通信作者。Tel: +86-28-82722661; E-mail: liping6575@163.com; japing@sau@hotmail.com

作者简介: # 对本文具有同等贡献。朱军(1980-)男, 四川巴中人, 博士研究生, 主要从事杀虫基因的分离与克隆研究。E-mail: zhujun987@126.com;

谭芙蓉(1979-)女, 四川中江人, 博士, 主要从事基因工程研究。E-mail: tfurong987@126.com

收稿日期: 2008-11-13; 修回日期: 2008-12-14

克隆 (<http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt>)。但是,仅少部分 ICPs 能用于害虫的防治,自上世纪 80 年代中期开始,害虫对 Bt 杀虫剂抗性不断在实验室和田间试验中得到证实<sup>[5]</sup>。因此分离新的高毒力 Bt 菌株及克隆更多的新型 *cry* 基因是解决这些问题的关键所在<sup>[6-10]</sup>。近年来 PCR-RFLP 技术广泛应用于 *cry* 基因型的鉴定,这种技术不仅能准确地检测出 Bt 中已知的杀虫蛋白基因,还能检测出未知基因<sup>[11-12]</sup>。

四川盆地是我国四大盆地之一,具有独特的生态环境和丰富的生物多样性,植被保存完好,有利于 Bt 的生长与繁殖,很有可能蕴藏着新的 Bt 资源及新型杀虫蛋白基因。国内曾经对四川部分地区的 Bt 资源进行了 *cry* 基因鉴定<sup>[13]</sup>,但只是零碎取样,没有系统地四川盆地各个生态区 *cry* 基因资源的分布特点进行调查研究,从而不能全面了解此地区 Bt 菌 *cry* 基因特点。本研究对四川盆地的山地、高原、冰川、峡谷、平原和丘陵等不同生态区土壤中 Bt 菌 *cry* 基因进行了系统的调查,克隆了新型杀虫蛋白基因。在农业生产上具有重要意义和应用前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 培养基:**LB 液体、固体培养基,参见 Sambrook<sup>[14]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器:***Taq* 酶购自 TaKaRa 公司,限制性内切酶分别购自 Promega 和 MBI 公司;PCR 扩增仪为美国 Thermo 公司设备,凝胶成像系统及蛋白电泳仪均为美国 BioRad 公司设备。

### 1.2 土样采集及菌株分离

土壤样品采集于四川盆地不同生态区,每点于土层下 5~10 cm 取土壤,共 2650 个样品。采用

醋酸钠-抗生素分离法分离,称取 10 g 土样放入装有 50 mL 醋酸钠-抗生素培养基(醋酸钠 3.4%;牛肉膏 0.5%;蛋白胨 1%;青霉素钠盐 400 μg/mL;硫酸庆大霉素 400 μg/mL,pH 7.0)的摇瓶中,摇床培养(200 r/min,30℃)4 h。然后取土壤悬液 10 mL,加入无菌的离心管内离心(800 × g,15 min),取上层混浊液 2 mL 于 65℃ 水浴 15 min,取热处理后的混浊液 0.1 mL 涂 LB 固体平板,于 30℃ 培养 48 h。挑取类似 Bt 菌株,在光学显微镜下观察晶体形成,然后分离纯化菌株,选取具代表性晶体形状的菌株,再用扫描电镜观察菌株晶体。

### 1.3 Bt 质粒 DNA 的提取

分离纯化后的 Bt 菌在液体 LB 中(230 r/min,30℃)培养 12 h,采用 Narva 方法提取质粒<sup>[15]</sup>。

### 1.4 杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

离心收集于液体 LB 中培养 48 h 的菌体,按 Laemmli 方法处理样品及 SDS-PAGE 分析<sup>[16]</sup>。

### 1.5 苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因型的鉴定

采用 PCR-RFLP 方法对杀虫晶体蛋白基因进行鉴定。其中 *cry1* 基因的鉴定参见 Kuo 和宋福平的方法<sup>[12,17]</sup>;其它 *cry* 基因的鉴定参见宋福平及苏旭东<sup>[11,18]</sup>的方法。

### 1.6 新型模式基因全长序列的克隆

分别设计特异引物及简并引物(表 1),采用 TAIL-PCR 进行 *cry* 基因克隆,热循环反应:94℃ 5 min,94℃ 30 s,56℃ 50 s,72℃ 2 min,2 个循环;94℃ 30 s,33℃ 50 s,72℃ 2 min,15 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物经切胶回收后,由上海生物工程有限公司测序,运用 DNASTar 软件与相应的已知序列拼接,得到基因全长序列。在 GenBank 注册后提交 Bt 国际杀虫晶体蛋白基因命名委员会命名。

表 1 Tail-PCR 所用特异引物与简并引物

Table 1 The specific primers and degenerate primer sequences of the Tail-PCR

PN	Sequence(5'→3')	AT/℃	Target strain and gene	References
SP1	ATGGTAATGCGTCCACAACCTCAAC	64	HS18-1, <i>cry30</i> -like	This research
SP2	TCTCCTGGACCACGATAAGACCTA	63		This research
SP3	GCTGATCCTGGACCAGGCATAGC	68	BtMC28, <i>cry4/10</i> -like	This research
SP4	AACCTATCAAGCAGGTAGAA	63		This research
SP5	TACTTCCCACAAACCTCTTACTC	63	BtMC28, <i>cry30</i> -like	This research
SP6	GTCAAACCTGGAGTGTGGGGTA	64		This research
DP	GGAGNNNNNNNNWTG	39		This research

PN, primer name; DP, degenerate primer; AT, annealing temperature.

### 1.7 生物测定

菜青虫(*Pieris rapae* Linne)和伊蚊(*Aedes aegypti*)

幼虫由本实验室提供。室内杀虫活性测定参见谭芙蓉和 Ibarra 的方法<sup>[9,19]</sup>,LC<sub>50</sub>用 SPSS10.0 软件分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株的分离

从 2650 份土样中分离出 5889 株芽胞杆菌,利用光学显微镜从中初步鉴定出 791 株 Bt 菌,平均分离率为 13.4%(Bt 菌占有所有芽胞杆菌的比率)(表 2);周公山、碧峰峡、蒙顶山和沐川原始森林的 Bt 菌

分离率为 19%~23%,高于其他地方的分离率;海螺沟冰川和泸定高原的分离率最低,只有 5% 和 7%。791 个菌株的伴胞晶体有长(短)菱形、大(小)菱形、方形、球形和不定形等几种形状(图 1-A、B、C、D)。晶体形状的差别说明菌株所含 *cry* 基因类型的不同,从而也导致菌株的杀虫活性具有差别,充分显示了四川生态区 Bt 资源多样性。

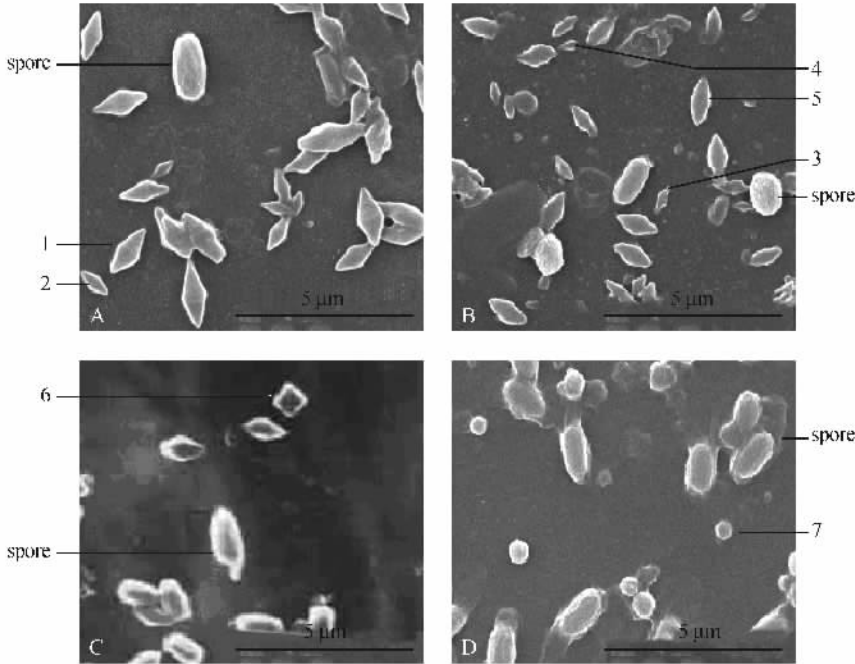


图 1 部分苏云金芽胞杆菌扫描电镜晶体

Fig. 1 Scanning electron microscopy observation of the spore and crystal mixtures produced by Bt isolates. (1, 2). big (small) bipyramidal crystal inclusions; (3, 4). long (short) bipyramidal crystal inclusions; 5. erose crystal inclusions; 6. square crystal inclusions; 7. round crystal inclusions.

表 2 四川盆地不同地点 Bt 分离结果

Table 2 The isolation results of Bt from different areas in Sichuan

Site	CV	SN	TBS	IS	IR/%	<i>cry</i> genes present in each ecosystem						
						<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry3</i>	<i>cry4/10</i>	<i>cry9</i>	<i>cry30</i>	<i>cry40</i>
ZG	Forest	385	591	124	21	107	82	1	9	3	9	-
MD	Forest	285	410	78	19	68	28	2	3	2	3	-
BF	Forest	320	479	110	23	72	47	1	-	3	-	3
MC	Forest	180	425	85	20	13	5	2	5	4	5	-
KD	Grassland	195	351	35	10	12	4	2	-	3	-	-
CD	Farmland	280	616	80	12	65	45	1	-	7	-	-
OC	Farmland	540	1114	156	14	102	61	4	6	-	6	-
LD	Farmland	215	1401	98	7	75	47	2	-	3	-	-
HL	Forest	250	501	25	5	8	3	5	10	3	10	-
	Total	2650	5889	791	13.4*	522	312	20	33	28	33	3
%						66%#	39.5%#	2.5%#	4.2%#	3.5%#	4.2%#	<1%#

CV, characteristics of vegetation; SN, sample number; TBS, Total *Bacillus strain*; BI, Number of Bt Isolations; IR, Isolation Rate of Bt isolations in total *Bacillus* isolations from the same site; ZG, Zhou Gong Mountain; MD, Meng Ding Mountain; BF, Bi Feng Canyon; HL, Hai Luo Glacier; LD, Lu Ding Plateau; MC, Mu Chuan Virgin Forest; KD, Kang Ding Plateau; CD, Cheng Du Plain; OC, Other Cities, Hurst; "-", not amplified with any primer; \*, average rate of Bt isolations in all *Bacillus* isolations; #, the rate of strain harbored the same *cry* gene in all Bt isolations.

### 2.2 苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因的鉴定

#### 2.2.1 PCR-RFLP 鉴定结果 采用 PCR-RFLP 鉴定方

法对 791 株菌株进行了 *cry* 基因的鉴定分析(表 2),共发现了 *cry1*、*cry2*、*cry3*、*cry9*、*cry4/10* 和 *cry40* 等 7

种基因型;*cry1*型基因最丰富,占66%,其次是*cry2*、*cry3*、*cry4/10*、*cry9*、*cry30*和*cry40*型;另外,有80株菌没有鉴定出*cry*基因型,可以推测他们含有新型的*cry*基因。

**2.2.2 *cry1*型基因的酶切鉴定分析:**运用引物K5un2/K3un2、K5un3/K3un3和S5uni/S3uni共鉴定出522株菌含有*cry1*型基因。用*Pst* I + *Xba* I、*Eco* R I + *Pst* I和*Bsp* 119 I + *Ban* I内切酶分别对它们的扩增产物进行基因分型。共发现6种不同的*cry1*基因型(*cry1A*、*cry1B*、*cry1C*、*cry1E*、*cry1F*和*cry1I*)构

成了21种不同*cry1*型基因组合(表3);其中*cry1Ac*(15.33%)、*cry1Aa*(13.22%)和*cry1Aa* + *cry1Ab* + *cry1Ac*(10.54%)含量最丰富;其次是含量在5.17-8.62%的*cry1Ab*、*cry1Aa* + *cry1Ac*、*cry1Aa* + *cry1Ac* + *cry1Ia*、*cry1Aa* + *cry1Ab* + *cry1Ia*、*cry1Aa* + *cry1Ab*和*cry1Aa* + *cry1Ia*基因组合;其它几种*cry1*型基因组合如:*cry1Aa* + *cry1Ab* + *cry1Ca*、*cry1Aa* + *cry1Ab* + *cry1Ac* + *cry1Ia*和*cry1Aa* + *cry1Ac* + *cry1Cb*数量相对较少,含*cry1Aa* + *cry1Ea*和*cry1Aa* + *cry1Fa*的基因组合菌株数量最少,仅占0.38%。

表3 四川盆地不同生态区*cry1*类基因的特点

Table 3 The Distribution of *cry1*-type gene profiles in different ecology areas of Sichuan Basin

<i>cry1</i> -type gene profiles	ZG	MD	BF	HL	LD	MC	KD	OC	CD	N	F/%
<i>cry1Ac</i>	30	8	7	-	3	10	4	6	12	80	15.33
<i>cry1Aa</i>	15	11	13	2	10	-	-	11	7	69	13.22
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ab</i> + <i>cry1Ac</i>	8	9	7	2	8	9	2	4	6	55	10.54
<i>cry1Ab</i>	12	9	7	-	4	3	3	7	-	45	8.62
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ac</i>	9	7	6	1	2	4	3	5	5	42	8.05
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ac</i> + <i>cry1Ia</i>	6	9	2	2	1	6	4	6	-	36	6.90
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ab</i> + <i>cry1Ia</i>	-	4	8	1	7	6	-	3	2	31	5.94
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ab</i>	8	-	3	-	-	4	-	12	-	27	5.17
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ia</i>	1	-	-	-	-	-	3	6	2	27	5.17
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ab</i> + <i>cry1Ca</i>	6	-	-	1	6	4	3	4	-	24	4.60
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ab</i> + <i>cry1Ac</i> + <i>cry1Ia</i>	5	2	4	-	1	1	2	3	1	19	3.64
<i>cry1Ab</i> + <i>cry1Ac</i>	5	1	-	-	-	-	3	3	1	13	2.49
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ca</i> + <i>cry1Ia</i>	1	-	1	-	2	4	2	2	-	12	2.30
<i>cry1Ac</i> + <i>cry1Ca</i>	-	2	-	1	1	2	1	3	-	10	1.91
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ca</i>	2	1	1	-	2	-	1	1	1	9	1.72
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ac</i> + <i>cry1Cb</i>	2	3	1	-	2	-	-	-	-	8	1.53
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ba</i> + <i>cryAb</i>	-	-	2	-	-	2	-	1	-	5	0.96
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ab</i> + <i>cry1Ba</i>	1	-	1	-	1	-	-	-	-	3	0.57
<i>cry1Ba</i>	1	-	2	-	-	-	-	-	-	3	0.57
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Ea</i>	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2	0.38
<i>cry1Aa</i> + <i>cry1Fa</i>	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2	0.38

Note: ZG, Zhou Gong Mountain; MD, Meng Ding Mountain; BF, Bi Feng Canyon; HL, Hai Luo Glacier; LD, Lu Ding Plateau; MC, Mu Chuan Virgin Forest; KD, Kang Ding Plateau; CD, Cheng Du Plain; OC, Other Cities, Hurst; "-" , not containing this type gene; N, number of strains; F, strain harbored this *cry1*-type gene combination in all Bt isolations contain *cry1* gene.

**2.2.3 新型模式基因的克隆:**采用引物 S5un4/S3un4和 S5un30/S3un30 分别可从部分菌株中扩增出目的片段。扩增产物的限制性内切酶酶切分析表明,菌株 BtMC28 的 *cry4/10* 型基因扩增产物经 *Bst* E II + *Dra* I 酶切后产生 4 条带,而菌株 HS70-8、MD7-5、HS18-1、HS15-3 和 ZG108-36 的扩增产物则不能被 *Bst* EII + *Dra* I 双酶切(图 2-A),与 *cry4Aa1*、*cry4Ba1* 和 *cry10Aa1* 等模式基因的相应酶切结果有差异;另外,这些菌株的 *cry30* 型基因扩增产物的 *Msp* I 酶切片段(图 2-B)与 *cry30Aa1*、*cry30Ba1* 和 *cry30Ca1* 基因相应酶切结果也不同(序列来源于 <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt>,用 DNASTar

软件分析相应酶切位点)。测序分析表明,这些菌株用引物 S5un4/S3un4 扩增后的产物序列所编码的氨基酸与 *Cry10Aa1* 的同源性最高,约为 39%;用引物 S5un30/S3un30 扩增后的产物序列所编码的氨基酸与 *Cry30Aa1* 的同源性最高,分别为 72%、72%、74%、74%、72%和 68%。因此这些基因片段极有可能为新型模式基因的片段。

用 Tail-PCR 技术获得的其中 3 个新型模式基因的未知片段与相应的 PCR-RFLP 所获得的片段拼接,得到了 *cry* 基因全长序列。氨基酸序列同源性分析发现:用 S5un4/S3un4 引物鉴定出及来自菌株 BtMC28 的全长基因与 *Cry10Aa1* 的同源性最高,为

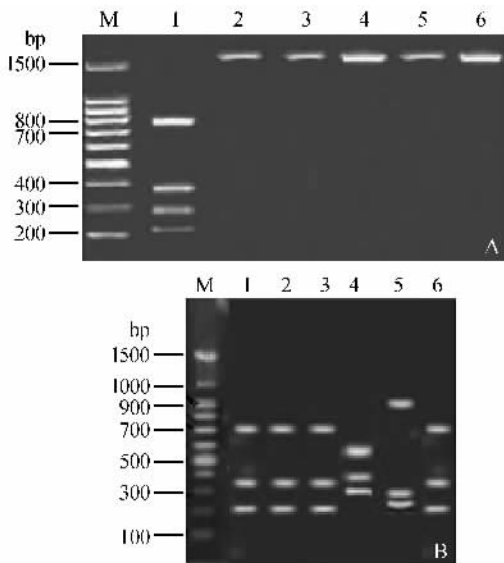


Fig.2 部分菌株 *cry4/10* 型和 *cry30* 型基因 PCR 扩增产物的 RFLP 鉴定图谱

Fig.2 PCR-RFLP pattern of *cry4/10*-type and *cry30*-type genes.

A: PCR-RFLP pattern of *cry4/10*-type genes digested with *BstE II + Dra I*; Lane1-6: BtMC28, ZG108-36, MD7-5, HS18-1, HS15-3, HS70-8; M, 100 bp Marker. B: PCR-RFLP pattern of *cry30*-type genes digested with *Msp I*; Lane1-6: BtMC28, ZG108-36, MD7-5, HS18-1, HS15-3, HS70-8; M, 100 bp DNA Marker.

38% ;用 S5un30/S3un30 引物鉴定出及分别来自菌株 BtMC28 和 HS18-1 的全长基因与 *Cry30Aa1* 的同源性

表 4 部分菌株对伊蚊和菜青虫的杀虫活性的测定

Table 4 Dose-response insecticidal activities against *A. aegypti* and *pietis rapae* Linne

Strains	<i>cry</i> gene types	<i>A. aegypti</i>		<i>pietis rapae</i> Linne	
		LC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	95% CI*	LC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	95% CI*
BtMC28	<i>cry4/10, cry30</i>	6.02	4.2 - 7.8	15.45	12.34 - 19.64
HS15 - 3	<i>cry4/10, cry30</i>	14.96	11.8 - 17.2	> 100 <sup>#</sup>	
HS18-1	<i>cry4/10, cry30</i>	14.33	10.6 - 17.1	> 100 <sup>#</sup>	
MD7-5	<i>cry4/10, cry30</i>	20.56	19 - 24.31	> 100 <sup>#</sup>	
HS70-8	<i>cry4/10, cry30</i>	90.1	76.4 - 120.4	> 100 <sup>#</sup>	
ZG108-36	<i>cry4/10, cry30</i>	30.68	23.6 - 51.4	> 100 <sup>#</sup>	
YWC5-4	<i>cry1, cry2, cry9</i>	23.42	19.86 - 25.53	13.24	11.02 - 16.48
A4	<i>cry1, cry2, cry9</i>	45.34	31.43 - 63.59	14.07	10.11 - 18.32
Bts	<i>cry1, cry2, cry9</i>	17.65	12.64 - 22.47	13.37	12.09 - 17.95
Rpp02	<i>cry1, cry2</i>	> 100 <sup>#</sup>		7.32	6.03 - 8.23
Rpp39	<i>cry1</i>	> 100 <sup>#</sup>		19.15	13.2 - 27.5

Note: CI\*, confidence interval. " # ", At this concentration, no mortality was obtained.

### 3 讨论

我们在四川盆地的山地、高原、冰川、峡谷、平原和丘陵等不同生态区系统地采集土样, Bt 平均分离率高达 13.4%, 较中国其它地方高<sup>[10, 18]</sup>, 可能因为此地区植被保存完好, 有利于 Bt 的生长与繁殖。本研究中, 森林土样的 Bt 分离率普遍较草原和农田高, 可能是因为农田和草原中的农牧活动较多, 对 Bt 的生长与繁殖有一定影响, 海螺沟属冰川生态环

境, 分别为 74% 和 64%。根据 *Cry* 杀虫蛋白基因的命名规则, 这些基因属于模式基因。它们在 GenBank 中的注册号分别为 EU339367、EU751609 和 EU882064, 被国际 Bt 杀虫晶体蛋白基因命名委员会命名为 *cry54Aa1*、*cry30Fa1* 和 *cry30Ga1*。

### 2.3 生物测定

选取含模式基因的菌株及含多个基因组合的部分菌株对伊蚊和菜青虫进行生物活性测定, 结果表明: 菌株 BtMC28 对伊蚊的活性最高, LC<sub>50</sub> 为 6.02  $\mu$ g/mL, 菌株 Rpp02 对菜青虫活性最高, LC<sub>50</sub> 为 7.32  $\mu$ g/mL, 菌株 BtMC28、YWC5-4、A4 和 Bts 对伊蚊和菜青虫都具有活性, 菌株 HS15-3、HS18-1、HS70-8、MD7-5 和 ZG108-36 仅对伊蚊有活性, 而菌株 Rpp02 和 Rpp39 也仅对菜青虫有活性(表 4)。

### 2.4 杀虫晶体蛋白的测定

对未鉴定出 *cry* 基因型的 Bt 菌株进行了杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析, 结果表明 80 菌株都含有一条或两条大小介于 40 ~ 130 kDa 之间的主要蛋白条带(图 3)。揭示出这些菌株可能具有潜在的杀虫活性。同时这些菌株的蛋白条带各有差异, 说明四川盆地生态区杀虫晶体蛋白类型存在多样性, 可以推测这些菌株极有可能含不同的 *cry* 基因及基因组合。

境, 而泸定高原的农田土样较为贫瘠, 所以这两个地区 Bt 菌的分离率仅有 5% 和 7%, 此结果与苏旭东的研究结果一致, 也符合 Bt 菌的分布特点<sup>[18]</sup>。

四川盆地 Bt 菌主要含有 *cry1*、*cry2*、*cry3*、*cry9*、*cry4/10*、*cry30* 和 *cry40* 等 7 种基因型, 与中国其它地区所含 *cry* 基因类型有差异<sup>[10, 18]</sup>。本研究中 *cry1* 含量最高(66%), 与墨西哥、以色列、哈萨克斯坦、乌兹别克斯坦及中国其它地区的情况具有一致性<sup>[6, 10, 12, 17-18]</sup>, 而在伊朗, *cry2* 含量最高<sup>[22]</sup>; 墨西哥,

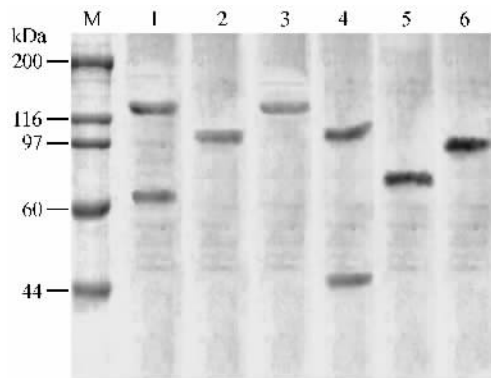


图3 部分菌株的杀虫晶体蛋白

Fig.3 The SDS-PAGE of spore-crystal suspensions of selected strains. Lane1-6: A1, CW3, MD7-2, ZG157-4, JF19-8, YWC9-4; M: protein marker.

以色列、哈萨克斯坦和乌兹别克斯坦的第二位 cry 基因分别是 cry3 和 cry4<sup>[6,12]</sup>,而四川盆地生态区含量居于第二位的是 cry2 类基因;在以色列、哈萨克斯坦、乌兹别克斯坦和伊朗没有发现 cry3 型基因<sup>[21-22]</sup>,但是在四川盆地生态区却有 cry3 的存在(表2)。表明此生态区 cry 基因构成与其它地区既有一致性又有其独特性。

cry1、cry2、cry3 和 cry9 普遍存在于四川盆地的山地、高原、冰川、峡谷、平原和丘陵的农田、森林和草原等不同生态区中;cry4/10、cry30 和 cry40 主要存在于山地、峡谷和冰川的森林土样中;另外,森林土样所含 cry 基因类型较农田与草原丰富(表2)。表明此地区 cry 基因的分布与生态环境有一定关系。

Cry1 蛋白对鳞翅目害虫有特异毒性,四川生态区含有 6 种不同的 cry1 类基因亚型,构成了 21 种不同 cry1 型基因组合,不仅充分显示了 cry1 型基因的多样性(表3),而且也表明了四川生态区 cry1 类基因的分布特点,如:cry1A、cry1C 和 cry1I 类基因在四川盆地的山地、高原、冰川、峡谷、平原和丘陵等不同生态区都有存在,而 cry1Ba 仅存在于周公山与碧峰峡谷,cry1Ea 和 cry1Fa 也仅存在于沐川原始森林与成都平原。有晶体蛋白产生而未鉴定出基因型的菌株,可能是由于现有的鉴定引物特异性不够高,鉴定不出其基因型,推测有可能含有新型的 cry 基因。因此需要进一步对这些菌株进行大量生物活性测定,从中发现高毒力菌株,再通过蛋白序列克隆新型杀虫基因。

本研究运用 PCR-RFLP 方法初步明确了四川生态区 Bt 菌及其 cry 基因资源的特点,从中发现了一批特异性菌株和新型 cry 基因,再一次证明 PCR-RFLP 法不但能鉴定已知基因,还能鉴定新型未知基因<sup>[11-12]</sup>,表明四川生态区蕴藏着丰富而特别的 Bt

资源,为害虫的防治提供了基因及菌株资源。目前,我们正对此地区 Bt 菌株的杀虫谱进行测定及杀虫基因的表达研究,期望能挖掘出具有高效广谱的杀虫活性的 Bt 菌株及基因资源。

## 参考文献

- [1] Ohba M, Shisa N, Thaitanun S, et al. A unique feature of *Bacillus thuringiensis* H-serotype flora in soils of a volcanic island of Japan. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2002, 48(4): 233-235.
- [2] Maeda M, Mizuki E, Nakamura Y, et al. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Current Microbiology*, 2000, 40(6): 418-422.
- [3] 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*, 1996, 93(11): 5394-5399.
- [4] Faust RM, Abe K, Held GA, et al. Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid*, 1983, 9: 98-103.
- [5] McGaughey WH. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 1985, 229: 193-195.
- [6] Bravo A, Sarabia S, Lopez L, et al. Characterization of cry genes in a Mexican *B. thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 4965-4972.
- [7] Iriarte J, Porcar M, Lecadet MM, et al. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. *Current Microbiology*, 2000, 40(6): 402-408.
- [8] Vilas-Boas GT, Manoel VF, Lemos. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(8): 605-613.
- [9] 谭芙蓉, 郑爱萍, 周华强, 等. 一株对鳞翅目高毒力的苏云金芽孢杆菌亚种的分离与鉴定. *四川农业大学学报 (Journal of Sichuan Agricultural University)*, 2006, 24(2): 152-155.
- [10] 罗兰, 谢丙炎, 袁忠林, 等. 我国土壤中苏云金芽孢杆菌的分离与基因型的鉴定. *应用与环境生物学报 (Chinese Journal of Applied & Environmental Biology)*, 2005, 11(6): 759-763.
- [11] 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.
- [12] Kuo 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 1369-1377.

- [13] 李凤梅, 李平, 闫敏, 等. 苏云金芽孢杆菌的筛选和初步鉴定. 生物技术( *Journal of Biotechnology* ), 2003, 13(6): 34–36.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. 1989, Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [15] Narva KE, Payne JM, Schwab GE, et al. Novel *Bacillus thuringiensis* microbes active against nematodes, and genes encoding novel nematodes-active toxins cloned from Bt isolates. EP 0462721A2. 1991.
- [16] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680–685.
- [17] Song FP, Zhang J, Gu A, et al. Identification of *cry1I* genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of novel *cry1I*-type gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5207–5211.
- [18] 苏旭东. 苏云金芽孢杆菌菌株的分离和 *cry* 基因的鉴定. 硕士论文, 河北农业大学, 2005.
- [19] Ibarra JE, Cristina del Rincon M, Orduz S, et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 5269–5274.
- [20] Wang JH, Annemie B, Jeroen VR. Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *B. thuringiensis* isolates from China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2003, 82(1): 63–71.
- [21] Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 4883–4890.
- [22] Gholamreza SJ, Ali PA, Rasoul M, et al. Distribution and diversity of Dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35: 83–94.

## Characterization of insecticidal crystal Protein *cry* gene of *Bacillus thuringiensis* from soil of Sichuan Basin and cloning of novel holotype *cry* gene

Jun Zhu<sup>1,3#</sup>, Furong Tan<sup>2#</sup>, Xiumei Yu<sup>1,3</sup>, Peng Guan<sup>1,3</sup>, Jie Tang<sup>1,3</sup>, Shiquan Wang<sup>1,3</sup>, Aiping Zheng<sup>1,3\*</sup>, Ping Li<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China)

(<sup>2</sup>Biotechnology Research Institute, Shanghai Academy of Agriculture Sciences, Shanghai 201106, China)

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

**Abstract [ Objective ]** In order to systematically investigate the *cry* gene resources from *Bacillus thuringiensis* (Bt) in different ecological regions in Sichuan Basin and further clone novel *cry* genes. **[ Methods ]** We used the methods of microscopic and scanning electron microscopic observation, PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and test of insecticidal activities to research Bt strains collected in this basin. **[ Results ]** We screened 791 Bt isolates from 2650 soil samples, and found *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4/10*, *cry9*, *cry30*, and *cry40*-type genes in this basin. Strains containing *cry1* genes were the most abundant in our collection (66%), and 21 different *cry1*-type gene combinations were found. Furthermore, several novel holotype *cry* genes were found and the full-length sequences of 3 novel *cry* genes were designated as *cry54Aa1*, *cry30Fa1*, and *cry30Ga1* by *B. thuringiensis* Pesticidal Crystal Protein Nomenclature Committee. The results of insecticidal activities showed that Sichuan Basin harbored Bt isolates with insecticidal activities. SDS-PAGE assay of 80 strains without PCR products indicated that these strains may harbor potentially novel *cry* proteins gene. **[ Conclusion ]** The diversity and particularity of *cry* gene resources in Sichuan Basin have important meanings in theories and practices.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; *cry* gene; PCR-RFLP; SDS-PAGE; novel holotype genes; insecticidal activities

(本文责编 张晓丽)

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

\* Corresponding author. Tel : + 86-28-82722661 ;E-mail : liping6575@163.com, aipingsau@hotmail.com

# Those authors contributed equally to this work.

Received : 13 November 2008/Revised : 14 December 2008