

苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry1Ab22* 的克隆与表达

伍金元^a,冯纪年^a,张 兴^b

(西北农林科技大学 a. 植保资源与病虫害防治教育部重点实验室, b. 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】克隆并表达苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)杀虫晶体蛋白 *cry1Ab22* 基因,为解决昆虫抗性提供有效途径,并为构建新型转基因工程菌和转基因植物提供基因材料。【方法】根据 GenBank 中 *cry1Ab* 型基因序列设计 1 对引物,并加入 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点。用全长基因 PCR 产物粘端定向克隆的方法,从苏云金芽孢杆菌 S249 菌株中扩增到 1 个苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白 *cry1Ab* 型基因 *cry1Ab22*,将其克隆到表达载体 pMAL-c2X 中,转化大肠杆菌 TB1,进行诱导表达,并对表达产物的杀虫活性进行检测。【结果】*cry1Ab22* 基因长度约为 3.5 kb;其与已知的 *cry1Ab3* 型基因同源性最高,所编码的蛋白质存在 5 个氨基酸差异。*cry1Ab22* 基因已在 GenBank 中登录,登录号为 EU220269,并被 Bt 毒素基因国际命名委员会正式命名为 *cry1Ab22*。SDS-PAGE 电泳结果表明,*cry1Ab22* 基因表达了 170 ku 左右的融合蛋白。*cry1Ab22* 蛋白对小菜蛾(*Plutella xylostella*)的 LC₅₀ 为 225.1 μg/mL。【结论】S249 菌株含有新型的 *cry1Ab* 基因,且该基因表达的蛋白具有较强的杀虫活性。

【关键词】 苏云金芽孢杆菌;杀虫晶体蛋白基因 *cry1Ab22*;生物杀虫活性

【中图分类号】 S482.3+98 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)01-0151-04

Cloning and expression of ICP *cry1Ab22* gene of *Bacillus thuringiensis*

WU Jin-yuan^a, FENG Ji-nian^a, ZHANG Xing^b

(a Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education,

b Research and Development Center of Bio rational Pesticide, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Cloning and expression of ICP *cry1Ab22* gene of *Bacillus thuringiensis* not only give a way to resolve insect resistance, but also provide the genetic material for constructing the new transgenic project fungus and transgenic plant. 【Method】According to *cry1Ab* gene sequences of 5'-terminal and 3'-terminal, a pair of primers for full-length *cry1Ab* gene on the GenBank was designed. The *cry1Ab* type gene was cloned into the *E. coli* expression vector pMAL-c2X, which was then transformed into *E. coli* TB1, induction expression for *Bacillus thuringiensis* and detected the activity for expression product. 【Result】PCR was performed to produce a *cry1Ab* type gene which was designated *cry1Ab22* in GenBank (Accession No. EU220269). The length of gene was about 3.5 kb, and the comparison showed the highest homology with the *cry1Ab3* and 5 amino acid differences existed in Encoded protein of *cry1Ab22*. The 170 ku fusion protein could be identified obviously by SDS-PAGE. Bioassay showed that the LC₅₀ of *cry1Ab22* against *Plutella xylostella* larve with a spread method was 225.1 μg/mL. 【Conclusion】There is a novel *cry1Ab* type in strain S249 and *cry1Ab22* protein has a stronger biological insecticidal activity.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; Insecticidal crystal proteins *cry1Ab22* gene; Biological activity

* [收稿日期] 2007-12-12
[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A04);西北农林科技大学研究生教育创新计划项目(05YCH007)
[作者简介] 伍金元(1982—),男,四川富顺人,在读硕士,主要从事苏云金芽孢杆菌分子生物学研究。
E-mail: wade@nwsuaf.edu.cn
[通信作者] 冯纪年(1957—),男,陕西白水人,教授,博士生导师,主要从事昆虫分类及分子生物学研究。

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是昆虫病原细菌,革兰氏染色呈阳性,其在形成芽孢的同时产生伴孢晶体^[1]。伴孢晶体由一种或几种蛋白组成,具有高度特异的杀虫活性,这种蛋白通常被称为 δ -内毒素(δ -endotoxins)或杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal proteins, ICPs)^[2]。根据 Neil-Crickmore 分类法,到目前为止,ICPs 基因有 55 群,98 类,167 种,407 亚种^[3],其中 *cry1Ab* 基因共有 22 个亚种^[4]。近年来,虽然在苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白基因工程研究领域取得了很大的成就,而且 Bt 杀虫剂作为公认的无公害农药,已在许多国家和地区推广使用,但是仍然存在着一定的局限性,主要表现为:杀虫谱窄、毒力不够强、易诱导昆虫产生抗性,从而限制和影响了 Bt 杀虫剂的进一步推广应用。因此寻找新的具有杀虫活性的基因,可以在一定程度上提高昆虫对毒蛋白的敏感性,延缓昆虫抗性的产生。本研究根据 *cry1Ab* 类基因序列设计特异引物,加入 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点,应用 PCR 方法对苏云金芽孢杆菌 S249 *cry1Ab22* 基因进行了扩增,并将其在大肠杆菌 TB1 中表达,对表达的 *cry1Ab22* 蛋白的生物活性进行了检测,以期寻找到新的杀虫蛋白。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、质粒及生化试剂

1.1.1 供试菌株和质粒 苏云金芽孢杆菌 S249 和转化受体菌 *E. coli*. DH5 α ,均由西北农林科技大学植保资源与病虫害防治教育部重点实验室保存;*E. coli*. TB1 和 pMAL-c2X,均由西北大学惠有为教授惠赠。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Pst* I 购自 England BioLab 公司, *Bam*H I 购自 Fermentas 公司; T₄ DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司; pGEM-T Easy 载体试剂盒和 PCR 试剂盒均购自 Promega 公司; Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司。其他试剂均为分析纯或电泳纯级。

1.2 Bt *cry1Ab22* 基因的 PCR 扩增与序列分析

1.2.1 基因的提取及 *cry* 基因的鉴定 苏云金芽孢杆菌质粒 DNA 的提取参照钟万芳等^[5]的方法进行。*cry* 基因的鉴定参照宋福平等^[6]的方法进行。

1.2.2 引物的设计与合成 参考已知 *cry1Ab* 型基因序列^[7],设计 1 对引物:

Sense: 5'-CGC GGA TCC ATG GAT AAC AAT CCG A-3';

Anti-sense: 5'-AAA ACT GCA GTT ATT CCT CCA TAA GGA G-3'。

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, Sense 和 Anti-sense 的下划线部分分别为 *Bam*H I 与 *Pst* I 酶切位点。

1.2.3 Bt *cry1Ab22* 基因的 PCR 扩增 以苏云金芽孢杆菌 S249 质粒 DNA 为模版,采用高保真的 Ex Taq™ 聚合酶进行扩增,具体方法参照 PCR 试剂盒说明书进行。PCR 反应条件:94 ℃ 3 min;94 ℃ 10 s,50 ℃ 30 s,68 ℃ 2.5 min,10 个循环;94 ℃ 10 s,50 ℃ 30 s,68 ℃ 2.5 min,20 个循环,每个循环延伸时间递增 10 s;68 ℃ 8 min。参照 TaKaRa 公司的 Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒说明,对扩增产物进行纯化回收。

1.2.4 PCR 产物的克隆与鉴定 目的片段的克隆按 pGEM-T Easy 载体试剂盒的操作说明进行。将回收的 PCR 产物和 pGEM-T Easy 克隆载体于 4 ℃ 连接过夜,构建 pGEM-T Easy-*cry1Ab22* 质粒,转化大肠杆菌 DH5 α ,用含 IPTG、X-Gal 和氨苄青霉素的 LB 平板筛选克隆子。提取筛选得到的克隆子质粒,进行 PCR 和 *Bam*H I、*Pst* I 双酶切鉴定,证明所得重组子含有所需的克隆片段,阳性重组质粒命名为 pG1a。试验中质粒的提取、感受态细胞的制备及转化按《分子克隆实验指南》的方法进行操作^[8]。将阳性克隆子送上海生工生物工程技术有限公司测序。对测序结果应用 ExPASy (<http://au.expasy.org/>) 推断其氨基酸序列、计算预测 *cry1Ab22* 蛋白的分子质量和等电点的理论值;采用 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源性比较分析。

1.3 Bt *cry1Ab22* 基因表达载体的构建与鉴定

将 pG1a 质粒和 pMAL-c2X 质粒分别用限制性内切酶 *Bam*H I、*Pst* I 双酶切,琼脂糖凝胶回收线性 *cry1Ab22* 和 *pMAL-c2X* 片段,于 16 ℃ 用 T₄ DNA 连接酶连接 10 h,用热休克法将连接产物转化 DH5 α ,挑取单菌落,进行 PCR 扩增鉴定。最后提取 PCR 鉴定阳性克隆的质粒,进行 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切鉴定后,送上海生工公司进行正、反向序列测定,以确定读码框的正确性。重组质粒命名为 pM1a。

1.4 Bt *cry1Ab22* 基因的表达

将重组质粒 pM1a 转化大肠杆菌 TB1。将含 *cry1Ab22* 基因的重组大肠杆菌 TB1 接种于 LB 培养基(含 100 mg/L Amp)中,于 37 ℃、200 r/min 振

荡培养过夜。以 1 : 20(体积比)的比例转接到新鲜 LB 液体培养基中,于 37 ℃、200 r/min 振荡培养。分别用 0.05,0.1,0.5,1.0 mmol/L IPTG 进行诱导表达,于诱导前及诱导后 4 h 各收集 1 mL 培养物,12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,沉淀重悬于 2×SDS 样品缓冲液中,冷冻备用。按常规方法对样品进行 SDS-PAGE 检测^[8]。

1.5 Bt *cry1Ab22* 基因生物活性的测定

向 LB 液体培养基中加氨苄青霉素 100 μg/mL,按 1 : 100(体积比)的比例接种含重组质粒 pM1a 的大肠杆菌 TB1,对照不加抗生素(接种大肠杆菌 TB1),37 ℃、200 r/min 振荡培养至在 600 nm 处吸光度达 0.6 时,加 IPTG 至 0.5 mmol/L,诱导 5 h。收集菌体,与等体积蒸馏水配制成菌悬浮液,再将菌悬浮液用 250 W 超声波机破碎至显微镜检查菌体全部破碎为止,用蒸馏水将其稀释,4 ℃ 保存备用。

采用浸叶法对小菜蛾(*Plutella xylostella*)3 龄幼虫进行生物测定^[9],以转入 pMAL-c2X 质粒的 TB1 为对照。将甘蓝叶片用清水洗净晾干,选取鲜嫩一致的甘蓝叶片,在稀释好的待测样品中浸泡 10 s,晾干,放入生测瓶中,每瓶接 3 龄幼虫 20 头,每个处理重复 3 次,于 25 ℃养虫室中饲养,每隔 24 h 检

查幼虫死亡情况,求出致死中浓度(LC₅₀)、置信水平(P)。

2 结果与分析

2.1 Bt *cry1Ab22* 基因的 PCR 扩增

以苏云金芽孢杆菌 S249 质粒 DNA 为模板,用高保真的 Ex TaqTM 聚合酶进行 PCR 扩增,得到长度约为 3.5 kb 的片段(图 1)。

2.2 重组质粒 pG1a 的酶切鉴定

对重组质粒 pG1a 进行 *Bam*H I、*Pst* I 双酶切鉴定,结果得到 3.0 和 3.5 kb 左右的 2 条片段(图 2),与对应的载体和插入的目的片段长度一致。

2.3 Bt *cry1Ab22* 基因的序列分析

测序结果表明,*cry1Ab22* 基因编码区全长 3 468 bp,编码 1 155 个氨基酸,编码蛋白质分子质量为 130.7 ku,等电点 pI 为 5.04。BLAST 软件同源性比较分析结果显示,*cry1Ab22* 基因与 *cry1Ab3* 基因的同源性最高,达 99%,其编码的蛋白存在 5 个氨基酸的差异,分别为:Ser¹⁷⁶→Leu、Val⁸²¹→Glu、Gly^{1 069}→Arg、Ser^{1 078}→Phe、Tyr^{1 125}→Cys。*cry1Ab22* 基因已在 GenBank 中登录(登录号为 EU220269),并被 Bt 毒素基因国际命名委员会正式命名为 *cry1Ab22*^[3]。

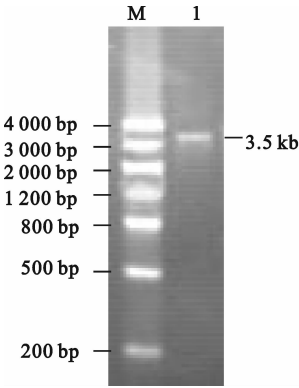


图 1 Bt *cry1Ab22* 基因的 PCR 扩增
M. DNA Marker 3;1. PCR 产物
Fig. 1 PCR product of *cry1Ab22*
M. DNA Marker 3;1. PCR product

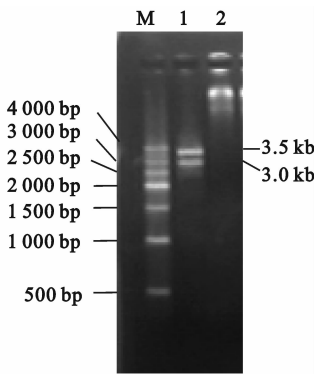


图 2 重组质粒 pG1a 的双酶切鉴定
M. 500 bp Marker;1. pG1a 的 *Bam*H I、*Pst* I 双酶切产物;
2. pG1a 质粒 DNA
Fig. 2 Restriction analysis of the recombinant plasmid pG1a
M. 500bp marker;1. pG1a/*Bam*H I + *Pst* I ;
2. Plasmid DNA of pG1a

2.4 Bt *cry1Ab22* 基因的表达

将重组质粒 pM1a 转化大肠杆菌 TB1,SDS-PAGE 电泳结果表明,*cry1Ab22* 基因表达了约 170 ku 的融合蛋白(图 3)。

2.5 Bt *cry1Ab22* 蛋白的生物活性测定

室内毒力测定结果表明,含重组质粒 pM1a 的大肠杆菌 TB1 对小菜蛾有较高的杀虫毒性,72 h 的 LC₅₀ 为 225.1 μg/mL。

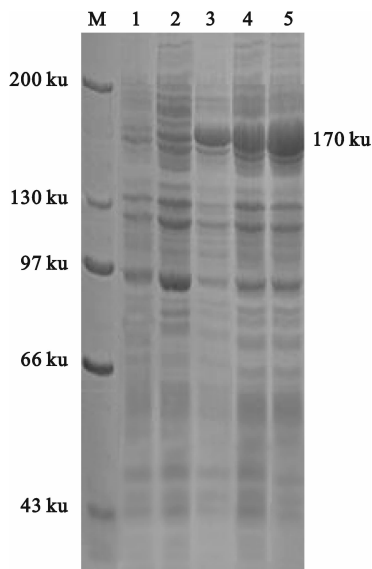


图 3 不同 IPTG 诱导浓度对 *cry1Ab22* 基因表达的影响
M. 蛋白 Marker; 1. 0.1 mmol/L IPTG 诱导的 pMAL-c2X;
2~5. 分别为 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的 pM1a
Fig. 3 Effects of different IPTG inducing concentrations on
expression of *cry1Ab22* gene protein
M. Protein Maker; 1. pMAL-c2X induced with 0.1 mmol/L IPTG;
2-5. pM1a induced with different IPTG concentrations
(0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mmol/L) 4 h.

3 讨 论

在苏云金芽胞杆菌质粒提取时,由于其细胞壁较厚、质粒 DNA 的超螺旋结构所占比例较高,所以本试验在 Sambrook 的碱裂解法的基础上,通过延长菌体培养时间,适当加大提取过程中 3 种溶液的比例及延长作用时间,摸索出一种适合于提取苏云金芽胞杆菌质粒 DNA 的方法。

在以往报道中,杀虫晶体蛋白表达产物易形成包涵体^[10]。为了解决这一问题,本研究将 *cry1Ab22* 基因构建到高效的蛋白融合表达载体 pMAL-c2X 中,pMAL-c2X 能够高水平地将外源蛋白与麦芽糖结合蛋白(MBP)进行融合表达,有利于外源蛋白折叠形成可溶性蛋白,为下一步表达产物的分离、纯化奠定了基础。

本研究从苏云金芽胞杆菌 S249 菌株中克隆了

cry1Ab22 基因,由于此类基因多存在于不稳定的质粒上,最有可能发生变异,因此其编码产物的杀虫活性范围也可能不同^[11],对此尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Hofte H,Whitely H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* [J]. Microbiol Rev,1989,53:242-252.
- [2] Tahashnik B E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis* [J]. Annual Review of Entomology,1994,39:47-79.
- [3] Crickmore N, Zeigler D R,Feitelson J,et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature' [EB/OL]. 2007-11-15. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.
- [4] Schnepf E,Crickmore N, Van R J,et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins[J]. Microbiol Molec Biol Rev,1998,62:775-806.
- [5] 钟万芳,蔡平钟,阎文昭. 苏云金芽胞杆菌大型质粒 DNA 的小量提取方法 [J]. 遗传,2002,24(6):40-43.
Zhong W F,Cai P Z,Yan W Z. The small amounts of *Bacillus thuringiensis* plasmid DNA extraction method [J]. Genetic, 2002,24(6):40-43. (in Chinese)
- [6] 宋福平,张 杰. 苏云金芽胞杆菌 cry 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的鉴定 [J]. 中国农业科学,1998,31(3):1-4.
Song F P,Zhang J. PCR_RFLP system Identification of the cry gene of *Bacillus thuringiensis* [J]. Chinese Agricultural Science,1998,31(3):1-4. (in Chinese)
- [7] Wabiko H,Raymond K C,Bulla L A. Jr. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis [J]. DNA,1986,5(4):305-314.
- [8] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular cloning:A laboratory manul [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.
- [9] 喻子牛. 苏云金杆菌 [M]. 北京:科学出版社,1990.
Yu Z N. *Bacillus thuringiensis* [M]. Beijing: Science Press, 1990. (in Chinese)
- [10] Crickmore N,Zeigler D R,Feitelson J,et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. Microbiol Molec Biol Rev,1998,62:807-813.
- [11] 程 萍. 苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 cry1 的转录调控机制 [D]. 湖北武汉:华中农业大学,1998.
Cheng P. The transcriptional regulation mechanism of cry1 type gene of *Bacillus thuringiensis* [D]. Hubei Wuhan: Hua-zhong Agricultural University,1998. (in Chinese)