

苏云金芽孢杆菌新菌株 S249 *cry2Ad2* 的克隆及特征分析

冯纪年^a, 李陇梅^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] 根据 GenBank 中 *cry2Ad* 基因序列设计 1 对特异性引物, 以苏云金芽孢杆菌新菌株 S249 质粒 DNA 为模板, 应用 PCR 扩增技术得到了 1 条大小约为 2.0 kb 的 DNA 片段(*cry2Ad2*)。通过引物步行法测定该片段长 1 919 bp, 其中开放阅读框(ORF)长 1 902 bp, 编码 633 个氨基酸; 经 DNASTAR 软件分析, 预测其蛋白分子量为 70.72 ku, 等电点 $pI=8.26$ 。序列比较结果表明, 该基因与 *cry2Ad* 类基因高度同源(同源性达 99%)。该基因已在 GenBank 中登录, 登录号为 DQ219823, 并被 Bt δ -内毒素基因国际命名委员会正式命名为 *cry2Ad2*。

[关键词] 苏云金芽孢杆菌; *cry2Ad2*; 微生物杀虫剂; PCR; 克隆; 序列分析

[中图分类号] Q781; S482.3⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)05-0093-04

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是目前应用最广、最有效的微生物杀虫剂^[1]。在过去的 30 多年中得到了广泛的研究和应用^[2]。Bt 杀虫的主要作用因子是其在芽孢形成期产生的杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins, ICPs)^[3]。根据 Crickmore 等^[4]的分类法, 可将 ICPs 基因分为 38 群、72 亚群、116 类、235 个亚类。其中 *cry2* 类基因有 *cry2Aa*, *cry2Ab*, *cry2Ac* 和 *cry2Ad* 4 类, 编码约 60~70 ku^[5]蛋白, 对给农业生产带来巨大损失的鳞翅目和双翅目昆虫具有高毒力^[6]。

自 Schnepf 和 whiteley 分离克隆到第 1 个 Bt *cry* 基因以来, 到目前为止, 国际上已经克隆了 325 种杀虫蛋白基因^[7]; 已将 *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Ab* 和 *cry3Aa* 等基因分别成功地导入玉米、棉花、土豆等植物和多种微生物中。

但是随着 Bt 应用的不断深入, Bt ICPs 基因均在不同程度上引发了昆虫的抗性, 而寻找新的高毒力菌株及基因是解决昆虫抗性问题的有效途径。为此, 本研究以苏云金芽孢杆菌新菌株 S249(*Bacillus thuringiensis* S249)的质粒 DNA 为模板, 根据 *cry2Ad* 类基因序列设计特异引物, 应用 PCR 扩增方法, 从该菌株中扩增得到 1 条大小约为 2.0 kb 的 DNA 片段, 并对其 5' 及 3' 端进行了测序及分析。现

将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株及培养基 苏云金芽孢杆菌新菌株 S249, 转化受体菌 *E. coli*. DH5 α , 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。所用培养基为 LB 培养基。

1.1.2 试 剂 克隆载体 pGEM-T Easy、PCR 相关试剂、限制性核酸内切酶、分子质量 Marker, Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒等分子生物学操作作用试剂, 均购自上海生工生物工程公司, IPTG、X-Gal 和氨苄青霉素等均购自 Amersco 公司。

1.2 方 法

1.2.1 苏云金芽孢杆菌质粒的提取 参考文献[8]的方法进行。

1.2.2 引物设计 根据发表的 Bt *cry2Ad* 核苷酸序列, 设计合成 1 对 PCR 引物(P₁: 5'-CGC GGA TCC ATG AAT AGT GTA TTG AAT-3'; P₂: 5'-CCC CAA GCT TAA TAA AGT GGT GAA AT-3')用于 *cry2Ad* 基因序列的克隆, 预计扩增片段的大小约为 2.0 kb。

[收稿日期] 2005-09-26

[基金项目] 国家“十五”攻关项目(2002BA516A04); 西北农林科技大学研究生创新计划项目(05ych007)

[作者简介] 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昆虫分子生物学研究。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 反应体系为:10×Reaction Buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L, 4×dNTP Mix (2.5 mmol/L) 0.5 μ L, 上游引物(10 pmol/L) 2.5 μ L, 下游引物(10 pmol/L) 2.5 μ L, Polymerase (5 U/ μ L) 0.2 μ L, PCR 扩增总反应体积为 25 μ L。

混匀瞬间离心后进行热循环, 94℃预变性 3 min, 94℃变性 1 min, 52℃退火 1 min, 72℃延伸 3 min, 32 个循环, 72℃再延伸 6 min。PCR 产物用 10 g·L⁻¹ 琼脂糖电泳分析, Bio Rad Gel Doc 2000 凝胶成像仪成像。扩增产物的回收纯化参照 TaKaRa 公司的 Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒说明进行。

1.2.4 基因的克隆、筛选与鉴定 按 pGEM-T Easy 克隆载体试剂盒的操作说明进行操作, 用回收的 PCR 产物和 pGEM-T Easy 克隆载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 用含 IPTG、X-Gal 和氨苄青霉素的平板筛选克隆子, 重组克隆用 *Apa* I、*Sal* I 双酶切和单酶切, PCR 验证。质粒的提取、酶切、感受态细胞的制备及转化参考文献[9]的方法进行。

1.2.5 *cry2Ad* 基因的序列分析 提取克隆子质粒, 由大连宝生生物公司进行测序, 基因序列用在线

(www.ncbi.nlm.nih.gov) BLAST 软件、EBI (www.ebi.ac.uk) ClustalW 软件及 DNASIS 分析软件进行同源性比较分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

以 Bt 质粒 DNA 为模板, 用 *P*₁、*P*₂ 引物通过 PCR 扩增得到 *cry2Ad* 基因。为了尽可能减少 PCR 过程中普通 *Taq* 酶可能出现的错误, 本研究选用高保真的 Ex *Taq*TM DNA 聚合酶。电泳检测结果表明, 扩增产物可见 1 条约 2.0 kb 的条带, 与预计产物大小相符(图 1)。

2.2 阳性克隆的筛选与鉴定

挑取白色菌落(含阳性重组质粒)质粒 DNA, 经双酶切和单酶切, 其电泳结果见图 2。由图 2 可知, 双酶切的大片段为 3.0 kb, 与 pGEM-T Easy 大小一致; 小片段为 2.0 kb, 与 PCR 产物一致。初步分析所得重组质粒(pG2d)含有的克隆片段为 *cry2Ad* 基因。用设计的引物 *P*₁、*P*₂ 扩增阳性克隆获得 1 条 2.0 kb 的 DNA 片段, 进一步认定插入的为 PCR 产物。

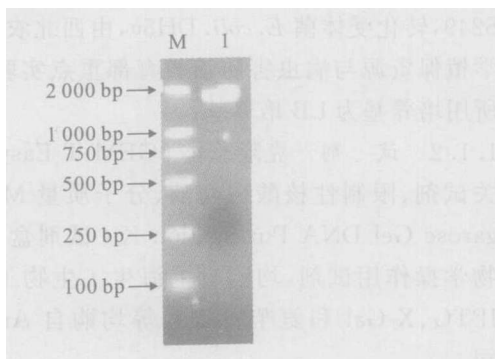


图 1 *cry2Ad2* PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

M. DL 2000 标准分子量; 1. PCR 产物

Fig. 1 PCR product of *cry2Ad2*

M. DL 2000 DNA Marker; 1. PCR product

2.3 *cry2Ad2* 的序列分析

测序结果表明, *cry2ad2* 编码区长 1 902 bp, 由 DNA 序列推导的氨基酸为 633 个。经 DNASTAR 软件分析, 预测其蛋白分子量为 70.72 ku, 等电点 *pI* = 8.26。序列比较结果表明: 该基因序列与 *cry2Ab* 基因(包括 *cry2Ab1*, *cry2Ab2*, *cry2Ab3*, *cry2Ab4*, *cry2Ab5*)的同源性为 93%, 与 *cry2Ab6* 基

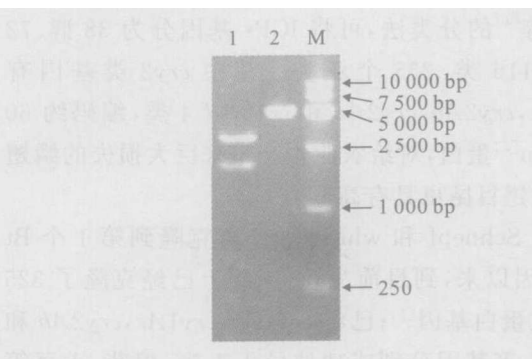


图 2 重组质粒的限制性内切酶分析结果

M. Marker M 标准分子量; 1. 重组质粒双酶切结果;

2. 重组质粒单酶切结果

Fig. 2 Restriction digestion of recombinant plasmid pG2d

M. Marker M; 1. pG2d/*Apa* I + *Sal* I; 2. pG2d/*Sal* I

因的同源性为 92%; 与 *cry2Aa* (包括 *cry2Aa1*, *cry2Aa2*, *cry2Aa5*, *cry2Aa8*, *cry2Aa9*, *cry2Aa10*) 的同源性为 89%; 与 *cry2Ad1* 基因的同源性最高, 达 99% (1900/1902), 彼此之间仅存在 1 个氨基酸的差别, 即 10 位上由 Asn 变成 Thr(图 3)。该基因已在 GenBank 中注册, 登录号为 DQ219823, 并被 Bt δ -内毒素基因国际命名委员会正式命名为 *cry2Ad2*。

<i>cry2Ad2</i>	MNSVLNSGRTTICDAYNVVVHDPFSFQHKSLDTIQKEWMEWKKDNHSLYVDPIVGTVASF	60
<i>cry2Ad1</i>	MNSVLNSGRNTICDAYNVVVHDPFSFQHKSLDTIQKEWMEWKKDNHSLYVDPIVGTVASF	60
<i>cry2Ad2</i>	LLKKLGSLIGKRILSELRNLIFFSGSTNLMEDILRETEKFLNQKLNTDTLSRVNAELTGL	120
<i>cry2Ad1</i>	LLKKLGSLIGKRILSELRNLIFFSGSTNLMEDILRETEKFLNQKLNTDTLSRVNAELTGL	120
<i>cry2Ad2</i>	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLSQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
<i>cry2Ad1</i>	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLSQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
<i>cry2Ad2</i>	ANLHLSFIRDVILNAEEWGISAATLRTYQNHLRNYTRDYSNYCIDTYQTAFRGLNTRLHD	240
<i>cry2Ad1</i>	ANLHLSFIRDVILNAEEWGISAATLRTYQNHLRNYTRDYSNYCIDTYQTAFRGLNTRLHD	240
<i>cry2Ad2</i>	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQLFTSQDWPFLYSLF	300
<i>cry2Ad1</i>	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQLFTSQDWPFLYSLF	300
<i>cry2Ad2</i>	QVNSNYVLSGFSGASLFTTFPNIGGLPGSTTTQALLAARVNYSGGITSGSIGGSNFNQNF	360
<i>cry2Ad1</i>	QVNSNYVLSGFSGASLFTTFPNIGGLPGSTTTQALLAARVNYSGGITSGSIGGSNFNQNF	360
<i>cry2Ad2</i>	NCNTISPPLSTSFVRSWLDSGSDRQGVNTVTNWQTESFETTSGLRCGAFTPRGNSNYYPG	420
<i>cry2Ad1</i>	NCNTISPPLSTSFVRSWLDSGSDRQGVNTVTNWQTESFETTSGLRCGAFTPRGNSNYYPG	420
<i>cry2Ad2</i>	YFIRNISGVSLVLRNEDLKRPLYNEKRNIESPSGTPGGARAYMVSVHNKKNNIYAVHEN	480
<i>cry2Ad1</i>	YFIRNISGVSLVLRNEDLKRPLYNEKRNIESPSGTPGGARAYMVSVHNKKNNIYAVHEN	480
<i>cry2Ad2</i>	GTMIHLAPEDNTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFESNTTARYTLRGNG	540
<i>cry2Ad1</i>	GTMIHLAPEDNTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFESNTTARYTLRGNG	540
<i>cry2Ad2</i>	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTASNVTNTTNDGVNDNGARFSDINIGNVVASSN	600
<i>cry2Ad1</i>	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTASNVTNTTNDGVNDNGARFSDINIGNVVASSN	600
<i>cry2Ad2</i>	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633
<i>cry2Ad1</i>	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633

图 3 *cry2Ad1*,*cry2Ad2* 氨基酸序列比对结果

Fig. 3 Results of amino acid sequence alignment of *cry2Ad1* and *cry2Ad2*

3 讨 论

由于在 PCR 扩增时特别使用了高保真的 Ex *Taq*TM DNA 聚合酶,其扩增误差只有 1×10⁶~1.6×10⁶;测序时又通过引物步行法测定了该基因的全长序列,从而减少了扩增和测序过程中的误差,为研究结果的准确性提供了保障。

本研究对苏云金芽孢杆菌新菌株 S249 进行 PCR 扩增获得了 *cry* 基因。从测序结果看,*cry2Ad2* 与已报道的 *cry2Ad1* 基因编码区的核苷酸序列及氨基酸序列同源性高达 99%,因此 *cry2Ad2* 应是 *cry2Ad* 的另一亚类分离物。*cry2Ad2* 基因的克隆及其在 GenBank 中的注册登录,不但为“*cry* 基因家族”增添了新成员,而且为构建新型转基因工程菌和

转基因植物,提供了更多的基因材料。关于其杀虫效果,还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Schnef E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775-806.
- [2] 钟万芳, 蔡平钟, 阎文昭, 等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因 *Cry1A* 的克隆及特征分析[J]. *西南农业学报*, 2004, 17(1): 38-40.
- [3] Tahashnik B E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*[J]. *Annual Review of Entomology*, 1994, 39: 47-79.
- [4] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62: 807-813.
- [5] Visik J E, Whiteley H R. Effect of a 20-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on production of the CytA protein by *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173: 1748-1756.
- [6] 罗 科, 张青文, 蔡青年. 苏云金杆菌的杀虫蛋白质和基因的结构、特点、分化及调控的研究(综述)[J]. *农业生物技术学报*, 1995, 3(3): 15-21.
- [7] Bradley D, Harkey M A, Kim M K, et al. The insecticidal *cry1B* crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *churingiensis* dual specificity to cloop teran and lepidopteran larvae[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1995, 65(2): 162-173.
- [8] 钟万芳, 蔡平钟, 阎文昭, 等. 苏云金芽孢杆菌大型质粒 DNA 的小量提取方法[J]. *遗传*, 2002, 24(6): 40-43.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科技出版社, 1998.

Cloning and characteristic analysis of *cry2Ad2* gene from Novel Strain S249 of *Bacillus thuringiensis*

FENG Ji-nian^a, LI Long-mei^a, ZHANG Xing^b

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

^b Research and Development Center of Biorational Pesticide,

Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *cry2Ad2* gene was cloned by PCR procedure from Novel Strain S249 of *Bacillus thuringiensis* plasmid with the primers designed according to the *cry2Ad* sequence in the GenBank. Sequencing was done to the fragments by using primer walking method and its length was 1 919 bp. *cry2Ad2* contained 1 902 bp ORF that predicted a protein of 633 amino acid with $M_r=70.72$ ku and $pI=8.26$. The amino acid sequence of *cry2Ad2* gene showed 99% identity to other *cry2Ad*, and the sequence was registered in GenBank (Accession Number is DQ219823) which was designated *cry2Ad2* gene as a novel gene by Bt delta-endotoxin nomenclature committee.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *cry2Ad2*; microbial pesticide; PCR; cloning; sequence analysis