

## 苏云金芽孢杆菌伴孢晶体 20kb DNA 中 *cry1Ac* 基因的克隆、高效表达和生物活性研究

胡宏源<sup>1</sup> 夏立秋<sup>1</sup> 史红娟<sup>1</sup> 孙运军<sup>1</sup> 高必达<sup>2</sup> 丁学知<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>(湖南师范大学生命科学学院微生物学系,长沙 410081)

<sup>2</sup>(湖南农业大学植物保护学院,长沙 410128)

**摘 要** 已经证实苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)伴孢晶体结合 20kb DNA,但其序列特异性及作用有待进一步研究阐明。研究了选择性溶解 Bt 4.0718 菌株 Cry1 类原毒素所形成的菱形伴孢晶体,从中抽提出与其结合的 20kb DNA。经 *Nde* I 酶切消化后亚克隆构建文库,通过 PCR-RFLP 及测序筛选出含 *cry1Ac* 基因的转化子。然后设计引物 PCR 扩增出 *cry1Ac* 基因的 ORF 并与 pET30a 连接,转化 *E. coli* BL21(DE3),高效表达了 141kD 蛋白。表达蛋白占总蛋白量的 50% 以上,且 90% 以上以包涵体形式存在。利用穿梭载体 pHT304 构建表达质粒 pHTX42,电转化 Bt 无晶体突变株 XBU001,获得重组菌株 HTX42,经 SDS-PAGE 分析,*cry1Ac* 基因得到强表达,蛋白质定量分析显示目的蛋白量占总蛋白量的 79.28%,且其在细胞中累积达细胞干重的 64.13%,比文献报道的 25% 左右高了 1 倍以上。原子力显微镜(AFM)检测显示,目的基因在大肠杆菌(*E. coli*)中表达的包涵体呈不规则形状且较小,而在无晶体突变株中表达的晶体呈典型菱形晶体,大小约为  $1.2 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$ 。生测结果显示,包涵体与晶体对小菜蛾(*Plutella xylostella*)幼虫均有高效杀虫活性。本研究为构建高效杀虫工程菌及进一步阐明 Bt 伴孢晶体中 20kb DNA 分子的来源、结构和功能奠定了重要的基础。

**关键词** 苏云金杆菌, 伴孢晶体, 20 kb DNA, *cry1Ac* 基因, 高效表达

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0656-06

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性(G<sup>+</sup>)细菌,它在形成芽孢的同时能产生伴孢晶体,又称杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins, ICPs)。伴孢晶体被敏感幼虫吞食后,在幼虫肠道碱性环境和蛋白酶的作用下释放出的毒性肽与昆虫中肠上皮细胞的特异受体发生结合并形成孔道,破坏细胞渗透压平衡,最终导致昆虫死亡<sup>[1-6]</sup>。自 1981 年第一个 ICPs 基因被克隆以来<sup>[7]</sup>,到目前已有近 280 种杀虫晶体蛋白被克隆和测序。目前,对 Bt ICPs 基因的表达调控机制、转基因、生物安全性和交叉抗性的研究已成为热点。特别是自 Bietlot 等 1993 年发现 Bt 晶体蛋白中含有 DNA 的证据以来<sup>[8]</sup>,Bt 晶体蛋白中 DNA 的来源及其功能研究无疑已成为近年来各国学者关注的一大热点。本文报道了以 Bt 4.0718 菌株(CCTCC No: M200016)为出发菌株<sup>[9]</sup>,从其伴孢晶体 20 kb DNA 分子中分离克隆了 *cry1Ac* 基因,并分别在大肠杆菌和 Bt 无晶体突变株

中得到高效表达,表达产物具有高效杀虫活性。本研究构建的高效杀虫工程菌具有巨大的潜在应用价值,同时为研究该 DNA 分子在晶体蛋白的形成和毒素结构稳定性中的具体作用奠定了重要的基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌株与质粒:见表 1

1.1.2 主要试剂和仪器:限制酶均购自 MBI 公司,Pyrobest Taq 酶及 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司, IPTG、X-gal 购自 Promega 公司,脑心浸膏(brain heart infusion, BHI)培养基购自 DIFCO 公司,卡拉霉素、氨苄青霉素和红霉素购自 Amresco 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自维特洁生物公司。PCR 仪购自 Eppendorf 公司,电转化仪购自 Bio-Rad 公司,凝胶成像分析仪购自美国基因公司,SPA-400 原子力显微镜购自日本精工公司。

收稿日期:2004-02-09, 修回日期:2004-04-19。

基金项目:国家“863 计划”(No. 2002AA245021)、国家自然科学基金(No. 30270037)和湖南省自然科学基金(No. 03JJY3025)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-731-8872298; Fax: 86-731-8872298; E-mail: xzding123@tom.com

1.1.3 培养基:LB 培养基<sup>[10]</sup>,2×YT 培养基<sup>[11]</sup>,BHI 培养基,Bt 发酵培养基<sup>[12]</sup>。抗生素使用浓度:氨苄青霉素(Amp)100 μg/mL(液态),50 μg/mL(固态);卡拉霉素(Km)10 μg/mL;红霉素(Erm)25 μg/mL。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids		Characterization	Resource
Strains			
DH5α	<i>E. coli</i> strain		Dr. Zhang Jian
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> strain(λDE3 lysogen)		Lab Store
Bt 4.0718	Bt strain wild type(CCTCC No:M200016)		Lab Store
XBU001	Bt acrySTALLiferous strain		Lab Store
HT304	XBU001(pHT304)		This work
MDX37	DH5α(pMDX37)		This work
MDX35	DH5α(pMDX35)		This work
ETX35	BL21(DE3)(pETX35)		This work
MDX42	DH5α(pMDX42)		This work
HTX42	XMD001(pHTX42)		This work
Plasmid			
pMD18-T	Amp <sup>r</sup>		TaKaRa Co.
pET30a	Km <sup>r</sup>		Novagen Co.
pHT304	Amp <sup>r</sup> and Erm <sup>r</sup> , shuttle vector of <i>E. coli</i> and Bt		Dr. Sun Ming
pMDX37	pMD18-T carried 3.7 kb fragment digested with <i>Nde</i> I		This work
pMDX35	pMD18-T carried ORF of cry1Ac		This work
pETX35	pET30a carried ORF of cry1Ac		This work
pMDX42	pMD18-T carried 4.2 kb fragment from PCR		This work
pHTX42	pHT304 carried 4.2 kb fragment from PCR		This work

1.1.4 供试昆虫:采用小菜蛾(*Plutella xylostella*)3龄幼虫,由国家农药南方创制中心湖南基地提供和试验。

表 2 寡核苷酸引物序列

Table 2 Nucleotide sequences of oligonucleotide primers	
Primer	Sequence
Un1(d)	CATGATTTCATGCCGCAGATAAAC
Un1(r)	TGGTGACACTTCTGCTTCCATT
K5Un2	AGGACCAGGATTTACTGCTGG
K3Un2	GCTGTGACACGAAGGATAAGCCAC
ET001	TTATGCATAACAATCCGAACA
ET002	GACTCTTCTCCATAAGGAGTAA
PR-OF-1	GTCTACTGTCAGGTAATGGTTCTAA
PR-OF-2	GGATCCCAAAAACACCCTATTAGT

1.2 方法

1.2.1 引物合成:引物均由上海生工合成,序列见表 2。

其中引物对 Un1(d)、Un1(r)和 K5Un2、K3Un2 分别参考文献[13,14],结合 RFLP 用于 cry1 类基因鉴定,ET001 和 ET002 用于扩增 cry1Ac ORF,PR-OF-1 和 PR-OF-2 用于扩增含完整启动子和终止子的 cry1Ac 基因。

1.2.2 伴孢晶体中 20 kb DNA 分子的分离:Bt

4.0718 菌株培养条件为 28℃,72 h。晶体分离参照修改的王瑛的液体双相法<sup>[15]</sup>,毒素-20 kb DNA 复合物的获得及 20 kb DNA 的分离均在文献[8,16]基础上经过改进。

1.2.3 克隆及表达载体的构建:质粒抽提,酶切反应,电泳鉴定,DNA 片段回收,连接反应,包涵体纯化均按分子克隆手册<sup>[10]</sup>。

菱形晶体中抽提的 20 kb DNA 分子经 *Nde* I 酶切消化,回收 3.0 kb 到 5.0 kb 左右片段,克隆至 pMD18-T 载体,经引物对 Un1(d)、Un1(r)和 K5Un2、K3Un2 扩增及 PCR-RFLP 分析,获得重组子 pMDX37。以重组质粒 pMDX37 为模板,ET001 和 ET002 为引物进行 PCR 扩增,产物克隆转化 DH5α,得重组子 pMDX35,pMDX35 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切的目的片段与经相同酶切的 pET30a 载体连接,转化 *E. coli* BL21(DE3),得重组菌株 ETX35。

直接以抽提的 20 kb DNA 为模板,以 PR-OF-1 和 PR-OF-2 为引物进行 PCR,产物克隆至 pMD18-T 载体获得重组子 pMDX42,pMDX42 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切所获得的的目的片段与经相同酶切的 pHT304 载体连接得重组质粒 pHTX42,pHTX42 参照文献[18]转化无晶体突变株 XBU001,得重组菌株 HTX42。

**1.2.4 *cry1Ac* 基因的表达及检测分析:**ETX35 菌株按 Novagen 公司 pET 表达载体系统手册说明书诱导表达,HTX42 菌株接种于含 25  $\mu\text{g/mL}$  红霉素的发酵培养基中 30 $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min, 培养 72 h 收集菌体。SDS-PAGE 检测两个菌株表达情况,使用美国基因公司 Gel-Pro Analyzer 软件定量分析蛋白质含量。

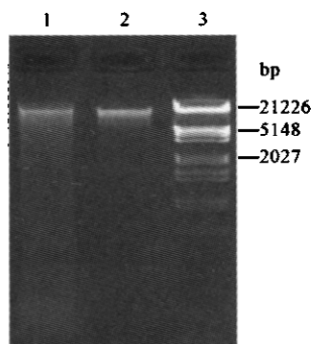


图 1 Bt 4.0718 Cry1A 类原毒素中的 20 kb DNA

Fig.1 20 kb DNA associated with Cry1A protein of *B. thuringiensis* strain 4.0718

1: toxin-20 kb DNA complex; 2: 20 kb DNA; 3: molecular weight markers ( $\lambda$ DNA/*Eco*R I and *Hind*III)

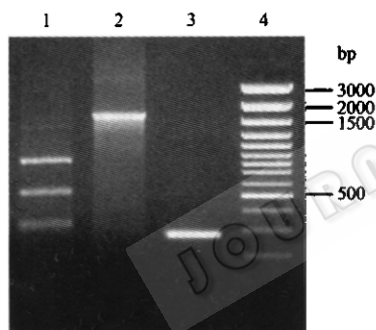


图 2 20 kb DNA 中克隆的 pMDX37 的 PCR-RFLP

Fig.2 PCR-RFLP of pMDX37 from 20 kb DNA

1: PCR-amplified fragments with oligonucleotide primers K5Un2 and K3Un2 were restricted *Pst* I and *Xba* I; 2: PCR amplification with oligonucleotide primers K5Un2 and K3Un2; 3: PCR amplification with oligonucleotide primers Un1(d) and Un1(r); 4: 100 bp DNA ladder Plus

**1.2.5 AFM 观察:**ETX35 菌株诱导表达的包涵体, Bt 无晶体突变株及 HTX42 菌株经发酵后的收集物, 均用超纯水反复洗涤, 稀释至合适浓度, 取悬液微量滴于云母片置超净工作台吹干, 以备 AFM 分析。

**1.2.6 生物测定:**生测样品为 ETX35 菌株发酵纯化的包涵体和 HTX42 菌株发酵纯化的晶体。以小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 3 龄幼虫为供试昆虫, 方法参考文献 [17] 的叶片浸泡法, 生测条件为相对湿度 80%, 温度  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 光/暗周期为 14 h/10 h, 光强 3000 lx。

## 2 结果

### 2.1 20 kb DNA 分子的抽提

选择性溶解 Bt 4.0718 菌株的菱形晶体, 所得 DNA 分子的结果见图 1, 分子大小为 20 kb 左右。

### 2.2 克隆及表达载体的构建

20 kb DNA 分子经 *Nde* I 酶切, 回收片段亚克隆构建文库后, 经 PCR-RFLP 筛选结果见图 2, 说明 pMDX37 中含有 *cry1Ac* 基因, pMDX37 经测序显示, 目的片段携带部分启动子序列和完整 *cry1Ac* 基因, 长度为 3770 bp, 其中 ORF 长 3534 bp, 经 BLAST 分析比较, 其 ORF 与 *cry1Ac5* (ACCESSION No. M73248) 基因序列 100% 同源。pETX35 的琼脂糖凝胶电泳结果显示 (图 3), 目的片段分子大小与预期值一致, 且经测序验证无突变引入, pHTX42 的琼脂糖凝胶电泳结果见图 4, 目的片段同样经测序显示片段长 4.2 kb 且无突变引入。

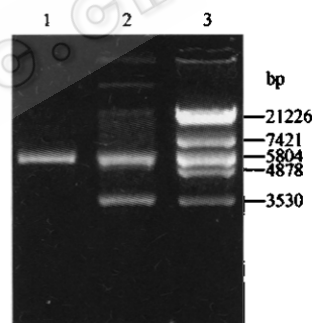


图 3 pETX35 的琼脂糖电泳检测

Fig.3 Agarose gel (1.2%) electrophoresis of pETX35

1: pET30a digested with *Bam*H I and *Sal* I; 2: pETX35 digested with *Bam*H I and *Sal* I; 3: molecular weight markers ( $\lambda$ DNA/*Eco*R I)

### 2.3 *cry1Ac* 基因的高效表达

ETX35 菌株在诱导后 1 h 达到最高表达, 表达检测结果见图 5。目的蛋白表达效果良好并形成包涵体, 表达水平达到 100 mg/L。pET30a N-端含有 54 个氨基酸, C-端有 17 个氨基酸, 目的基因编码的氨基酸数为 1177 个, 从理论上计算融合产物分子量为 141 kD, 实验结果与理论推算值高度相符。Gel-Pro Analyzer 软件定量分析结果显示, 目的蛋白表达占总蛋白量的 51.36%。

HTX42 菌株培养 72 h 后收集菌体及提纯晶体, 从 SDS-PAGE 结果 (图 6) 可看出, 目的基因得到超量表达并形成晶体, 且提纯的晶体纯度达 99% 以上。表达产物占发酵菌剂干重的 64.13%, 表达水平达 1.06 g/L, Gel-Pro Analyzer 软件定量分析结果显示目的蛋白表达量占总蛋白量的 79.28%。

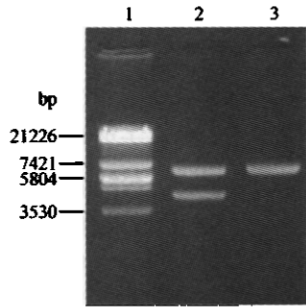


图 4 pHTX42 的琼脂糖电泳检测

Fig.4 Agarose gel (1.2%) electrophoresis of pHTX42  
1:molecular weight markers( $\lambda$ DNA/*EcoR* I); 2:pHTX42 digested with *Bam*HI and *Sal* I; 3:pHT304 digested with *Bam*HI and *Sal* I

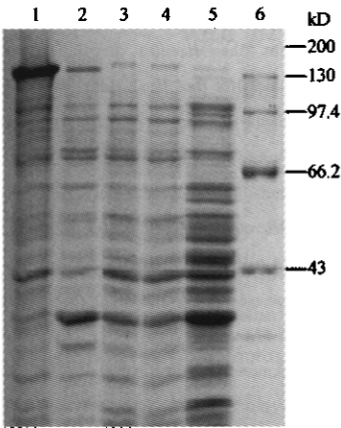


图 5 ETX35 融合蛋白的表达

Fig.5 Expression of ETX35 fusion protein  
1: precipitate of ETX35 strain induced; 2: supernatant of ETX35 strain induced; 3: ETX35 strain uninduced; 4: BL21 (DE3) strain carried pET30a; 5: BL21(DE3)strain; 6: protein markers

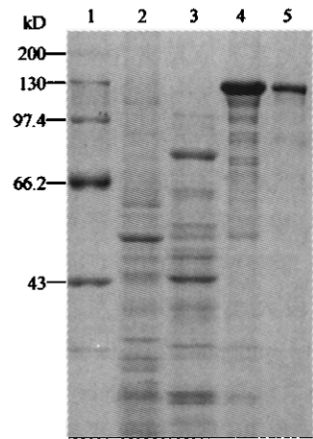


图 6 HTX42 蛋白在 Bt 无晶体突变株 XMD001 中的表达

Fig.6 Expression of HTX42 protein in XBU001

1: protein markers; 2: XBU001 strain; 3: HT304 strain; 4: HTX42 strain; 5: purified protein

2.4 AFM 观察

ETX35 菌株表达的包涵体、XBU001 菌株和 HTX42 菌株镜检结果见图 7, 可看出包涵体形状不规则且形体较小, 长约 100 nm, 宽约 60 nm。XBU001 菌株只有芽孢无法形成晶体, 而经电转化后形成典型的菱形晶体, 且个体巨大, 规格约为  $1.2 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$ , 而野生型菌株晶体大小约为  $0.5 \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$ 。

2.5 生物测定

生测结果表明, ETX35 菌株诱导表达的包涵体和 HTX42 菌株发酵产生的晶体对小菜蛾均有高效毒杀效果, 其中包涵体以 2 d 的  $\text{LC}_{50}$  为  $20.5 \mu\text{g/mL}$ , 晶体以 2 d 的  $\text{LC}_{50}$  为  $6.25 \mu\text{g/mL}$ 。

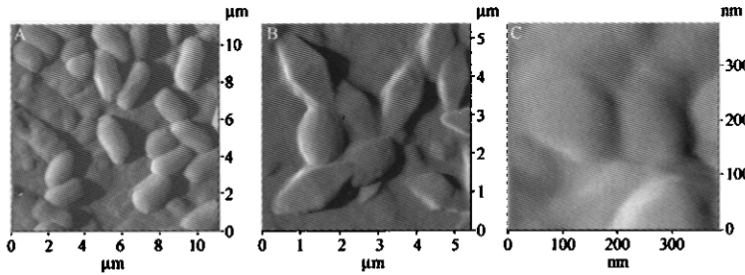


图 7 XBU001、HTX42 和 ETX35 的原子力显微镜观察

Fig.7 Atomic Force Microscopy of XBU001、HTX42 strain and inclusion bodies from ETX35 strain  
A: XBU001; B: HTX42; C: ETX35

3 讨论

Bt subsp. *kurstaki* HD-73、HD-1、subsp. *Alesi*、subsp. *entomocidus*、subsp. *Tolworthis*、subsp. *galleria* 以及含有 *cry1Aa*、*cry1Ab* 和 *cry1Ac* 基因的 *E. coli* 产生的包涵体中都发现有 20 kb DNA 片段<sup>[8,16]</sup>, 并且

*Cry1A* 原毒素能与 20 kb DNA 发生紧密结合。根据已有研究表明<sup>[19]</sup>, 伴孢晶体在形成过程中, DNA 分子在其中发生聚集。依据大量实验数据, 提出晶体蛋白中原毒素通过 N 端而不是 C 端与 DNA 分子发生结合, DNA 分子连着一“串”原毒素分子, 这一模型被称之为“Clairmont”结合模型。20 kb DNA 分子与

原毒素形成复合物,并与其毒肽结构稳定性和毒性功能具有密切关系。原毒素在失去 DNA 分子以后,用胰蛋白酶处理时将发生过度降解,而不能产生毒性多肽,这样就导致杀虫效果降低。至今,未见有报道阐明 20 kb DNA 分子的来源,其重要的一个原因是由于很难获得 20 kb DNA 分子的序列信息。本文对与 Cry1A 原毒素结合的 DNA 进行了抽提和电泳分析,DNA 片段大小为 20 kb 左右。首次从中克隆出对鳞翅目(Lepidoptera)昆虫棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)和小菜蛾毒力最高的 cry1Ac 基因<sup>[20]</sup>,并且分别在 *E. coli* 和 Bt 无晶体突变株中高效表达。其中包涵体的毒力测定结果显示其对小菜蛾具有高效毒杀作用。以前的报道中 cry 基因在大肠杆菌中的表达一般使用基于 Plac、Ptac、T7 或使用自身携带的启动子的表达系统且表达水平不高。本文首次使用含 T7lac 启动子的 pET30a 作为表达载体,得到迄今文献报道所知最高的超量表达,可能是因为 T7lac 为强启动子,保证了目的基因的高水平转录。另一方面,启动子本身受到高度严紧控制,诱导前可有效防止背景水平的表达而对宿主菌产生毒性影响生长,诱导后则保证靶蛋白最大限度表达而宿主蛋白几乎停止表达,从而提高表达效率。这对其它 cry 基因在大肠杆菌内的高效表达具有重要的借鉴意义。HTX42 菌株经发酵形成的晶体比野生型菌株的晶体大一倍以上,并且晶体占细胞干重的 64.13%,远高于一般文献报道的 25% 左右<sup>[6]</sup>。HTX42 菌株高产的原因可能是自身携带的 Bt I、Bt II 双启动子是极适于在 Bt 无晶体突变株中表达的强启动子。另一方面,其高效表达的机理还有赖于对受体菌 XBU001 的内生质粒的数量及拷贝数, mRNA 的稳定程度以及限制修饰能力等遗传背景的进一步揭示。同时显示出来源于晶体中 20 kb DNA 片段中的 cry1Ac 基因与其原毒素的结合可能具有更好的“亲和性”,因此更有利于晶体组装,形成更大晶体,获得更高产量。毒力测定结果显示,其对小菜蛾有极强的毒杀效果。本研究所构建的工程菌因其高产与高毒力而具有良好的应用前景,特别是其独有的启动子-载体-宿主菌系统,可望为其它基因在 Bt 无晶体突变株中的高效表达提供了一个有效的技术平台。

本研究从 Bt 4.0718 菌株菱形晶体 20 kb DNA 中克隆表达的 cry1Ac 基因,定位于 Bt 4.0718 菌株 P1 大质粒上<sup>[21]</sup>,这样就无可辩驳地证明了至少 Bt4.0718 菌株菱形伴孢晶体 20 kb DNA 中部分片段

来源于质粒。若再从 ETX35 菌株所形成的包涵体或 HTX42 菌株所形成的晶体中抽提 DNA,并进一步深入研究,就可最终确定 20 kb DNA 的来源,以及分析与原毒素结合的 DNA 分子的序列和特异性结构,以便更清楚地阐明与原毒素结合的 DNA 片段在晶体形成和原毒素激活中所起的作用,进而揭示 Bt 杀虫晶体蛋白的高效表达机制和杀虫作用机理以及探索提高其杀虫活性的途径。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Aronson A. Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol Life Sci*, 2002, **59**: 417 - 425
- [2] Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J *et al*. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 807 - 813
- [3] Feitelson JS, Payne J, Kim L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology*, 1992, **10**: 271 - 275
- [4] Höfte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, 1989, **53**: 242 - 255
- [5] Pfannenstiel MA, Ross EJ, Kramer VC *et al*. Toxicity and composition of protease-inhibited *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals. *FEMS Microbiol Ecol*, 1984, **21**: 39 - 42
- [6] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J *et al*. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 775 - 806
- [7] Schnepf HE, Whiteley HR. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(10): 2893 - 2897
- [8] Bietlot HP, Schernthaner JP, Milne RE *et al*. Evidence that Cry I A protein from *Bacillus thuringiensis* is associated with DNA. *J Biol Chem*, 1993, **268**(11): 8240 - 8245
- [9] Ding XZ(丁学知), Xia LQ(夏立秋). Selection of a high toxic insecticide strain 4.0718 of *Bacillus thuringiensis*. *Chinese Journal of Biological Control*(中国生物防治), 2001, **17**(4): 163 - 166
- [10] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [11] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE *et al*. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed, New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995
- [12] Sanchis V, Agaisse H, Chauvaud J *et al*. *J Biotech*, 1996, **48**: 81 - 96
- [13] Eitan B-D, Arie Z, Edith D *et al*. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4883 - 4890
- [14] 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. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 1369 - 1377
- [15] Wang Y(王瑛), Bai C(白成), Wen J(温洁). Research of separation crystal and spore from *Bacillus thuringiensis*. *Acta*

- Microbiol Sin* (微生物学报), 1980, 20(3): 285-288
- [16] Clairmont FR, Milne RE, Pham VT *et al.* Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem*, 1998, 273(15): 9292-9296
- [17] Yu ZN(喻子牛) *et al.* Production and application of preparation from *Bacillus thuringiensis*. Agriculture Press, 1993
- [18] Park HW, Ge B, Bauer La *et al.* Optimization of Cry3A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3932-3928
- [19] Xia LQ(夏立秋), Sun YJ(孙运军), Mo XT(莫湘涛). Interaction between insecticidal crystal protein and DNA molecule from *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2003, 43(1): 127-131
- [20] Palidam M. The insecticidal crystal protein Cry1A(c) from *Bacillus thuringiensis* is highly toxic for *Heliothis armigera*. *J Invertebr Pathol*, 1992, 59: 109-111
- [21] Ding XZ(丁学知), Liu QL(刘全兰), Mo XT(莫湘涛) *et al.* Characterization of insecticidal crystal proteins genes from *Bacillus thuringiensis* 4. 0718 strain. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2003, 43(3): 413-417

## Cloning and Superexpression of Cry1Ac Gene from 20kb DNA Associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1A Crystal Protein

HU Hong-Yuan<sup>1</sup> XIA Li-Qiu<sup>1</sup> SHI Hong-Juan<sup>1</sup> SUN Yun-Jun<sup>1</sup> GAO Bi-Da<sup>2</sup> DING Xue-Zhi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>(Department of Microbiology, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

<sup>2</sup>(College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract** The Cry1A Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis* is associated with DNA, but the role and sequences of these DNA molecules are unknown. Cry1A bipyrimal crystals from *B. thuringiensis* strain 4.0718 was selectively dissolved and associated DNA was extracted from protoxin. The DNA was digested with *Nde* I to obtain 3 to 5 kb fragments and then the fragments were subcloned into pMD18-T vector, screening of recombinants were done by PCR-RFLP and sequencing. The ORF of cry1Ac gene was amplified by primers designed and then subcloned. The 3.5 kb *Bam*H I and *Sal* I fragments of pMDX35 was inserted into the pET30a vector, giving 8.9 kb recombinant plasmid, pETX35. ETX35 strain were obtained by transformed pETX35 into BL21 (DE3). A 141 kD fusion protein was superexpressed as inclusion bodies. Quantitative protein analysis indicated that the amount of 141 kD protein was above the level of 51.36% of total cellular protein. Plasmid pHTX42 constructed from shuttle vector pHT304 was transformed *B. thuringiensis* acrySTALLIFEROUS strain XBU001 with electroporation to obtain the recombinant HTX42. The recombinant protein was found with a molecular mass of 130 kD on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Scanning analysis indicated that the expressed protein accounted up to 79.28% of total cellular proteins and accumulated in the cells mounted up to 64.13% of cellular dry weight. Under Atomic Force Microscopy (AFM), typical bipyrimal crystals from HTX42 strain were found with a size of 1.2  $\mu$ m  $\times$  2.0  $\mu$ m. Bioassay showed that these inclusion bodies of ETX35 strain and crystals from HTX42 strain were highly toxic against the larvae of *Plutella xylostella*. On such a base, constructing insecticidal recombinant and analyzing the source, structure, and function of the 20 kb DNA can be further achieved.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*, parasporal crystal, 20 kb DNA, cry1Ac gene, superexpression

Received: 02-09-2004

This work was supported by Grant from Chinese National Natural Science Foundation (No. 30270037), Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002AA245021) and Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (No. 03JJY3025).

\* Corresponding author. Tel: 86-731-8872298; Fax: 86-731-8872298; E-mail: xzding123@tom.com