

苏云金芽胞杆菌营养期杀虫蛋白 基因的克隆及表达分析

蔡启良 刘子铎* 孙明 魏芳 喻子牛

(华中农业大学生命科学技术学院 农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

摘要 选择本实验室分离的苏云金芽胞杆菌李氏亚种 (subsp. *leesis*) 菌株 YBT-833、鮎泽亚种 (subsp. *Aizawai*) 菌株 YBT-1416 和库斯塔克亚种 (subsp. *Kurstaki*) 菌株 YBT-1535 为出发菌株,以营养期杀虫蛋白基因 PCR 扩增的特异片段为探针,进行总 DNA 酶切片段的 Southern 杂交定位。结果显示 3 株菌株的营养期杀虫蛋白基因,均位于经 *Xba*I 完全消化的 4~5kb 大小的 DNA 片段上。将该区域 DNA 片段回收后克隆到 pUC19 载体,建立了 3 个较基因组文库小的亚基因组文库。通过菌落原位杂交筛选和酶切鉴定分别得到 3 个相应的营养期杀虫蛋白基因 *vip*83、*vip*14 和 *vip*15,并对其测序。DNA 序列比较发现基因 *vip*83 与已知营养期杀虫蛋白基因存在 5 个差异碱基。将 *vip*83、*vip*14 基因亚克隆到苏云金芽胞杆菌-大肠杆菌穿梭载体 pHT315,分别得到重组质粒 pBMB8901 和 pBMB8902。将它们电转化到 *vip*⁻ 的 *B. t.* 受体菌 BMB171 和 4Q7,获得了相应的工程菌 BMB8901-171、BMB8902-171、BMB8901-4Q7 和 BMB8902-4Q7。SDS-PAGE 电泳检测均有 88kD 大小的蛋白表达。生物测定结果亦表明了,营养期杀虫蛋白 Vip83 和 Vip14 对鳞翅目棉铃虫、小菜蛾和甜菜夜蛾的三龄幼虫均有一定的杀虫活性;其中对小菜蛾的毒力最高,LC₅₀ 值分别为 28.6、31.6、45.4 和 37.6 μL/mL。该结果为构建高效广谱工程菌提供了实际材料和理论依据。

关键词 苏云金芽胞杆菌,营养期杀虫蛋白,基因克隆,棉铃虫,小菜蛾,甜菜夜蛾

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0578-05

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是一种革兰氏阳性细菌,在芽胞形成期间可产生包括 δ-内毒素 (即杀虫晶体蛋白,简称 ICP) 在内的晶体包含体。这类包含体能够在昆虫中肠上皮细胞溶解并释放 δ-内毒素,接着,在肠道内环境特异条件下降解毒蛋白产生活性肽,活性肽可与肠道受体结合形成膜穿孔,导致昆虫患败血症而死亡,从而表现出特异性的杀虫毒力^[5]。迄今为止,已经鉴定了许多不同杀虫谱的苏云金芽胞杆菌菌株,它们产生的 δ-内毒素也已经被广泛地用来制备杀虫剂。在防治害虫转基因植物方面也取得了很大的成效。部分转基因植物 (如转 BT 棉和转 BT 玉米) 亦已商品化^[6],挽回了农作物虫害造成的巨大经济损失。

但是,在实际应用中仍有许多重要农作物害虫对杀虫晶体蛋白毒素不敏感;另外,苏云金芽胞杆菌制剂的长期广泛使用,也已经引起了自然界中部分昆虫的抗性产生。最新研究发现,在苏云金芽胞杆

菌的对数生长前期存在着一种大量表达的可溶性胞外蛋白,即营养期杀虫蛋白 (Vegetative insecticidal protein, VIP)^[1]。该蛋白对一些对杀虫晶体蛋白不敏感的昆虫 (如小地老虎、草地贪夜蛾、甜菜夜蛾、烟蚜夜蛾等) 具有广泛杀虫活性。营养期杀虫蛋白的发现弥补了杀虫晶体蛋白的不足,为更加有效地使用杀虫晶体蛋白提供了优化的可能。

然而,由于目前仅有 *vip*3A(a)、*vip*3A(b) 和 *vip*-s3 个基因,对营养期杀虫蛋白在苏云金芽胞杆菌中存在的位置、意义和作用、以及其杀虫机制和进化途径,尤其是营养期杀虫蛋白是否与杀虫晶体蛋白一样存在多种亚群和亚类等尚不清楚^[1,2],因此,从不同种属中或同一种属的不同个体中克隆营养期杀虫蛋白基因,分析营养期杀虫蛋白在不同苏云金芽胞杆菌中的存在情况,是非常必需的。此外,测定营养期杀虫蛋白对其它害虫的毒力高低,对于提高工程菌杀虫毒力,扩大杀虫谱等都具有一定的应用

价值。本论文从本室分离的不同菌株出发,克隆得到了3个营养期杀虫蛋白基因,并且对其进行了序列比较和一些杀虫晶体蛋白不易感病昆虫的杀虫毒力分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本实验所用菌株和质粒见表1。

1.2 培养基

菌株的培养采用 LB、TB 液体培养基。*E. coli* 菌株在 37℃ 培养, *Bt.* 菌株在 28℃ 培养。抗生素终浓度分别为: 氨苄青霉素, 100 μg/mL; 红霉素, 25 μg/mL。

1.3 Southern 杂交和菌落原位杂交均参照文献 [3]

1.4 营养期杀虫蛋白 *vip* 基因 PCR 分析

特异上游引物 5'-TGTTACAAAAACAG CTGAA-3'; 下游引物 5'-GATGGATCCCGATCTTACTT-3'

表1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>B. thuringiensis</i>		
YBT-833 subsp. <i>Leesis</i>	H ₃₃ serotype, wild type strain	Screened by our Lab.
YBT-1416 subsp. <i>Aizawai</i>	H ₇ serotype, wild type strain	Screened by our Lab.
YBT-1535 subsp. <i>Kurstaki</i>	H _{3ab} serotype, wild type strain	Screened by our Lab.
4Q7 subsp. <i>Israelensis</i>	H ₁₄ serotype ϵ cry ⁻ mutated strain	From Dr. H. Dean
BMB171 subsp. <i>Kurstaki</i>	H _{3ab} serotype ϵ cry ⁻ mutated strain	Screened by our Lab.
Non-plasmid mutated strain of YBT1463		
Plasmids		
pUC19	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp ^R	Stored in our Lab.
pHT315	<i>E. coli-Bt</i> shuttle vector. Erm ^R , Amp ^R	From Pasteur Institute D. Lereclus
pBMB8601	<i>Vip</i> 83 inserted into pUC19, Amp ^R	This study
pBMB8602	<i>Vip</i> 14 inserted into pUC19, Amp ^R	This study
pBMB8603	<i>Vip</i> 15 inserted into pUC19, Amp ^R	This study
pBMB8901	<i>Vip</i> 83 inserted into pHT315, Erm ^R , Amp ^R	This study
pBMB8902	<i>Vip</i> 14 inserted into pHT315, Erm ^R , Amp ^R	This study
Recombinant strains		
BMB8901-171	pBMB8901 transferred into receptor BMB171	This study
BMB8902-171	pBMB8902 transferred into receptor BMB171	This study
BMB8901-4Q7	pBMB8901 transferred into receptor 4Q7	This study
BMB8902-4Q7	pBMB8902 transferred into receptor 4Q7	This study

PCR 扩增条件为 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 2min, 25 个循环。

1.5 VIP 蛋白质 SDS-PAGE 分析^[1]

VIP 蛋白质样品制备: *B. thuringiensis* 工程菌株在 TB 培养基、30℃ 培养 36 h, 5000g 离心 2 min, 上清液加入 20 mmol/L 柠檬酸钠 (pH2.5) 滴定到 pH4.5, 在室温放置 30 min 后, 样品在 8000g 离心 10 min, 蛋白沉淀重新溶解于 250 mmol/L NaCl 溶液。

1.6 生物测定^[4]

用棉铃虫、小菜蛾和甜菜夜蛾三龄幼虫进行生物测定。

待测样品为工程菌发酵液经 5000 g 离心 1 min 后的上清液。

2 结果与分析

2.1 营养期杀虫基因在总 DNA 酶切片段中的定位

根据已知营养期杀虫蛋白基因设计特异引物, 抽提菌株 YBT-833、YBT-1416 和 YBT-1535 的总 DNA, 分别进行 PCR 扩增, 均得到 2.4kb 大小的特异扩增带 (资料未给出)。回收 3 种特异扩增 DNA 片段, 混合后用地高辛标记作为杂交探针。将抽提的 3 种总 DNA 分别用限制酶 *Xba*I、*Eco*RI 完全消化, 凝胶电泳并转移到硝酸纤维素滤膜上, 进行 Southern 杂交 (见图 1)。结果表明, 营养期杀虫蛋白基因在 3 种菌株总 DNA 酶切片段均定位在 *Xba*I 消化的约 4.4kb 或 *Eco*RI 消化的约 5.0kb 的 DNA 片段。

2.2 vip83, vip14 和 vip15 基因克隆与序列分析

为减少缩小基因片段的工作量,选择 3 种菌株 YBT-833、YBT-1416 和 YBT-1535 的总 DNA 经 *Xba*I 消化后的 4 ~ 5kb DNA 片段,分别插入 pUC19 的 *Xba*I 位点,建立了 3 种菌株的亚基因组文库。经菌落原位杂交筛选,PCR 和酶切鉴定,分别得到来自 YBT-833、YBT-1416 和 YBT-1535 的 VIP 克隆子 pBMB8601、pBMB8602 和 pBMB8603 (如图 2A 1, 2, 3 所示),所含营养期杀虫蛋白基因分别命名为 *vip83*、*vip14* 和 *vip15*。对所得到的 3 个基因进行了 DNA 序列测定,并通过网上 BLAST 软件序列比较,发现基因 *vip14* 和 *vip15* 与已报道的营养期杀虫蛋白基因 *vip3A(a)* 序列相同,而基因 *vip83* 则与目前仅有的 3 个营养期杀虫蛋白基因存在 5 个差异位点:其中与 *vip3A(a)* 基因比,有 3 个位点不同,即 C⁸⁵¹ → A⁸⁵¹, C⁸⁵² → A⁸⁵² 和 C²³⁰⁷ → T²³⁰⁷。C⁸⁵¹ → A⁸⁵¹ 的差异并未改变所编码的氨基酸残基,C⁸⁵² → A⁸⁵² 引起 Gln²⁸⁴ → Lys²⁸⁴ 的变化,而 C²³⁰⁷ → T²³⁰⁷ 引起 Pro⁸⁰⁴ → Ser⁸⁰⁴ 变化;与 *vip3A(b)* 基因比,存在两个碱基差异,即 C⁸⁷⁰ → A⁸⁷⁰ 和 G¹²¹⁵ → A¹²¹⁵。C⁸⁷⁰ → A⁸⁷⁰ 引起了 Pro²⁹¹ → Thr²⁹¹ 变化,而 G¹²¹⁵ → A¹²¹⁵ 引起了 Gly⁴⁰⁶ → Glu⁴⁰⁶ 变化;与 *vip-s* 基因比,不同的两个位点是 C⁸⁵¹ → A⁸⁵¹ 和 G²²²³ → A²²²³,其中 C⁸⁵¹ → A⁸⁵¹ 由于密码简并性氨基酸未发生改变,而 G²²²³ → A²²²³ 引起了 Gly⁷⁴² → Glu⁷⁴² 变化。*vip83* 基因 DNA 序列已在 GenBank 中登录,序列号为 AY044227。

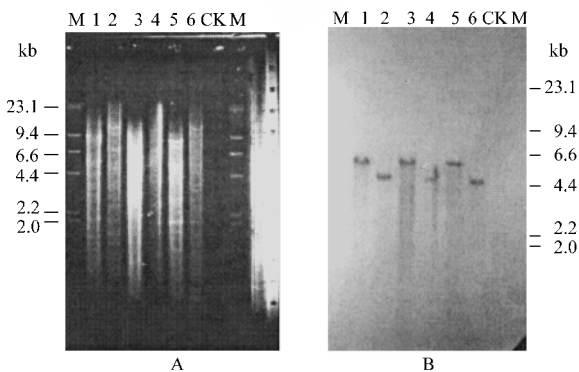


图 1 营养期杀虫蛋白基因在总 DNA 酶切片段中的定位
Fig.1 Site-detection of *vip* gene in fragments of total DNA digested by enzymes

1. YBT-833 's total DNA/*Eco*R I ;
2. YBT-833 's total DNA/*Xba* I ;
3. YBT-1416 's total DNA/*Eco*R I ;
4. YBT-1416 's total DNA/*Xba* I ;
5. YBT-1535 's total DNA/*Eco*R I ;
6. YBT-1535 's total DNA/*Xba* I

2.3 vip83 和 vip14 基因 B. thuringiensis 工程菌的构建及蛋白质分析

将克隆到的 *vip83* 和 *vip14* 基因分别亚克隆到

穿梭载体 pHT315,构建重组质粒 pBMB8901 和 pBMB8902 (如图 2A 5, 6);所得的两个重组质粒分别电转化到苏云金芽胞杆菌 *vip*-受体菌 BMB171 和 4Q7 构建了含营养期杀虫蛋白基因的工程菌 BMB8901-171, BMB8902-171, BMB8901-4Q7 和 BMB8902-4Q7。

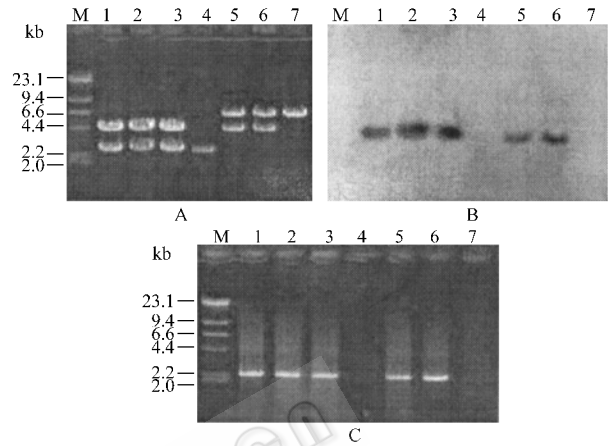


图 2 阳性转化子质粒酶切、southern 杂交及 PCR 扩增图谱

Fig.2 Profiles of positive transformants' plasmid enzyme-digestion, southern-blot and PCR-amplification

- A. *Xba* I -digestion B. Hybri-map of relative fig A C. PCR amplification
1. Plasmid pBMB8601
 2. Plasmid pBMB8602
 3. Plasmid pBMB8603 ;
 4. Vector pUC19
 5. Plasmid pBMB8901 ;
 6. Plasmid pBMB8902
 7. Shuttle vector pHT315

提取上述基因工程菌的营养期杀虫蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示营养期杀虫蛋白基因 *vip83* 和 *vip14* 在苏云金芽胞杆菌受体菌 BMB171 和 4Q7 中均能表达分子量约 88kDa 的蛋白,而且密度定量扫描结果显示营养期杀虫蛋白基因 *vip83* 和 *vip14* 在 BMB171 中的表达要高于在 4Q7 中的表达 (见图 3)。

2.4 生物活性测定

将构建的基因工程菌 BMB8901-171, BMB8902-171, BMB8901-4Q7 和 BMB8902-4Q7 在阴性对照情况下,按照 1.6 的方法进行生物毒力测定。结果发现营养期杀虫蛋白 Vip83 和 Vip14 对鳞翅目三龄幼虫小菜蛾、甜菜夜蛾和棉铃虫均有一定毒力,其中对小菜蛾毒力较高,在 *vip*-受体菌 BMB171 中 *vip83*、*vip14* 基因表达的营养期杀虫蛋白杀虫活性较高,对小菜蛾、甜菜夜蛾和棉铃虫的 LC₅₀ 值分别高出 0.55、0.20、0.11、0.09 和 0.26、1.80 倍 (如表 2 所示)。这一结果也可以解释 *vip83* 和 *vip14* 基因在 BMB171 中的表达量高于在 4Q7 中的原因。

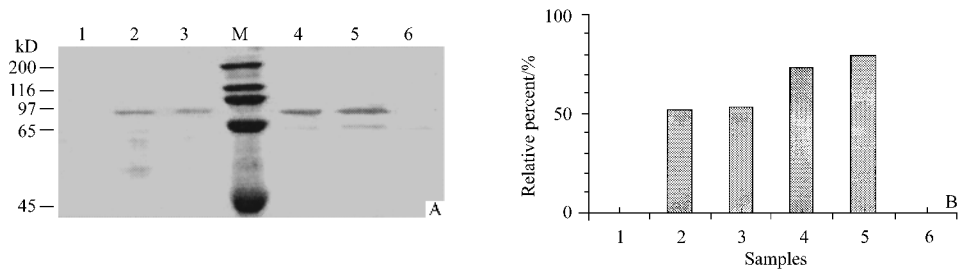


图3 营养期杀虫蛋白基因 *vip83* 和 *vip14* 在 BMB171 和 4Q7 中的表达

Fig.3 The expression of gene *vip83* and *vip14* in receptor BMB171 and 4Q7, respectively

A. SDS-PAGE; B. Column map of 88kD protein band density scanning

1. 4Q7 2. *vip83*/4Q7 3. *vip14*/4Q7 4. *vip14*/BMB171;

5. *vip83*/BMB171 6. BMB171

表2 营养期杀虫蛋白 Vip83 和 Vip14 不同工程菌杀虫活性的生物测定

Table 2 The bioassay results of several engineered strains contained vegetative insecticidal protein Vip83 or Vip14, respectively

Tested insect	Engineered strain	Toxic regression formula	Relation coefficient(<i>r</i>)	Value of LC ₅₀ /(μ L/mL)
<i>Plutella xylostella</i>	BMB8901-171	$Y = 3.18 + 1.25X$	0.99	28.6
	BMB8902-171	$Y = 3.44 + 1.04X$	0.99	31.6
	BMB8901-4Q7	$Y = 3.31 + 1.02X$	0.97	45.4
	BMB8902-4Q7	$Y = 3.33 + 1.06X$	0.99	37.6
<i>Heliothis armigera</i>	BMB8901-171	$Y = 3.38 + 1.07X$	0.99	32.7
	BMB8902-171	$Y = 3.22 + 1.04X$	0.98	51.5
	BMB8901-4Q7	$Y = 2.59 + 1.58X$	0.92	33.5
	BMB8902-4Q7	$Y = 2.49 + 1.40X$	0.97	62.1
<i>Spodoptera exigua</i>	BMB8901-171	$Y = 3.67 + 0.77X$	0.98	53.4
	BMB8902-171	$Y = 3.54 + 0.96X$	0.98	33.2
	BMB8901-4Q7	$Y = 3.64 + 0.75X$	0.98	65.0
	BMB8902-4Q7	$Y = 3.05 + 1.00X$	0.96	89.1

Note: with receptor BMB171, 4Q7 containing relative antibiotic in LB as control.

3 讨论

从 DNA 序列分析结果可以看出,克隆到的基因 *vip83*、*vip14* 和 *vip15* 与已知营养期杀虫蛋白基因存在很高同源性。其中 *vip83* 基因同样存在着已知营养期杀虫蛋白基因的 5 个差异位点,暗示了这 5 个位点在营养期杀虫蛋白结构上,可能位于较为灵活的空间位置,对营养期杀虫蛋白功能影响不大。而来自不同亚种的基因 *vip14* 和 *vip15* 与营养期杀虫蛋白基因 *vip3A(a)* 序列完全相同,提示营养期杀虫蛋白基因可能与杀虫晶体蛋白不一样,不具有多样性,在遗传上比较保守,可能是苏云金芽胞杆菌菌株某种功能所需的关键基因,对其深入研究可望获得更加有效的基因工程菌,解决杀虫晶体蛋白杀虫特异性的极限问题。

蛋白质表达结果证实了所克隆的基因 *vip83*、*vip14* 和 *vip15* 是营养期杀虫蛋白基因,并且能够在 *vip⁻* 的苏云金芽胞杆菌无晶体突变株中表达。在不同血清型的 Bt 受体菌 BMB171 中比在 4Q7 中的表达量高的现象,说明了 *vip* 基因的表达量可能与受体菌的血清型有一定的关系,其具体的关系有待进一步研究。

营养期杀虫蛋白 Vip83 和 Vip14 的生物活性测定结果表明:营养期杀虫蛋白基因除了对鳞翅目昆虫甜菜夜蛾和棉铃虫有杀虫毒力外,对小菜蛾也有活性,且敏感性高于前两者。这一结果为广谱工程菌的构建提供了依据。

REFERENCES (参考文献)

[1] Estruch J J, Warren G W, Mullins M A *et al.* Vip3A, a novel Bacil-
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- lus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against *Lepidopteran insects*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 5389 ~ 5394
- [2] Selvapandian A, Bhatnagar R K. <http://www.Ncbi.Nucleotide.GenBank/Entrez> Accession :Y17158
- [3] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [4] SHEN J (沈鞠群), WANG J (王锦举), YU Z (喻子牛) *et al.*. The method and standard procedure of *Bacillus thuringiensis* reagent. *Biological Control Bulletin* (生物防治通报) (Supplement), 1990 **6**: 12 ~ 16
- [5] Gill S S, Cowles E A, Pietrantonio P V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol*, 1992, **37**: 615 ~ 636
- [6] Koziel M G, Beland G L, Bowman C *et al.* Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biol Technology*, 1993, **11**: 194 ~ 200

The Analysis of *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Gene Cloning and Expression

CAI Qi-Liang LIU Zi-Duo* SUN Ming WEI Fang YU Zi-Niu

(College of Life Science and Technology, Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract Three kinds of *Bacillus thuringiensis* serotype-subsp. *Leesi* (H₃₃) strain YBT-833, subsp. *Aizawa* (H₇) strain YBT-1416 and subsp. *Kurstak* (H_{3ab}) strain YBT-1535, which were isolated by our lab, are chosen as original strain to clone vegetative insecticidal protein gene. Southern hybridization showed that *vip* genes are all localized at roughly 4 ~ 5 kb size-fractionated *Xba*I fragments of total DNA from YBT-833, YBT-1416 and YBT-1535. Three subgenomic libraries containing the *vip* gene fragment, were constructed with pUC19 as vector. Then, three vegetative insecticidal protein gene *vip83*, *vip14* and *vip15* are obtained from the libraries through the methods of colony-blot-in-situ screening and enzyme-cut detection. Comparison of DNA sequence made out that only *vip83* gene exist five different base pairs with known *vip* genes. Because the sequences of *vip14* and *vip15* are the same, two of the three genes, *vip83* and *vip14*, were subcloned to shuttle vehicle pHT315 to get recombinant plasmids pBMB8901 and pBMB8902 in turn. The plasmids were separately transformed into *vip*⁻ Bt. receptors BMB171 and 4Q7 to obtain four engineered strains BMB8901-171, BMB8902-171, BMB8901-4Q7 and BMB8902-4Q7. SDS-PAGE results indicated that all recombinant strains express 88kD vegetative insecticidal protein. Bioassay also showed that the proteins of genes *vip83* and *vip14* both have certain toxicity to *Lepidopteran* insect larvae such as *Heliochis armigera*, *Spodotera exigua* and *Plutella xylostella*. While the toxicity of *vip* protein from four engineered strains to *Plutella xylostella* are highest, whose LC₅₀ value is 28.6, 31.6, 45.4 and 37.6 μL/mL respectively. This study will contributed to construct high efficacy and wide spectrum engineered strains on theory and reality.

Key words *Bacillus thuringiensis*, vegetative insecticidal protein, gene cloning, *Heliochis armigera*, *Plutella xylostella*, *Spodotera exigua*

Received : 03-21-2002

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China (No. 39970423) and Chinese National 863 Plan (No. 2001AA214011 and 2001AA212301).

* Corresponding author. Tel : 86-27-87285679 ; E-mail : ziduo@ima.org.sg

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.ima.ac.cn>