

苏云金杆菌 *vip3A* 基因的克隆、表达及杀虫活性分析

陈建武 唐丽霞 汤慕瑾 师永霞 庞 义*

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

摘 要 用全长 PCR 方法从野生型苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* ,Bt)菌株 S184 中克隆了 2.3 kb 大小的 *vip3A* 基因并进行了序列分析。将 *vip3A*-S184 基因插入表达载体 pQE30 构建了表达质粒 pOTP,转化大肠杆菌 M15,转化子经 1mmol/L IPTG 诱导后可表达 89 kD 大小的 Vip3A-S184 蛋白,并得到 Western blot 证实。蛋白可溶性试验表明,目的蛋白中约有 19% 是可溶的,用透射电镜观察到大多数蛋白是以包涵体形式存在的。因此,可以在自然条件下进行目的蛋白的纯化和对家兔进行免疫制备多克隆抗体,用于苏云金杆菌 Vip3A 蛋白表达的检测。利用 IPTG 进行诱导培养的菌液对甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、斜纹夜蛾(*S. litura*)和棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)等 3 种害虫的初孵幼虫进行生物测定,结果表明,Vip3A-S184 蛋白对夜蛾科害虫具有较高的杀虫活性。

关键词 苏云金杆菌, *vip3A* 基因, 克隆, 表达, 抗体

中图分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)06-0687-06

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* ,Bt)是世界上应用面积最广、研究最为深入的杀虫微生物,它能够在芽孢期形成由杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins ,ICPs)组成的伴孢晶体,ICPs 本身对昆虫不显示毒性,需经昆虫肠液酶消化或酶解成毒素才引起昆虫死亡^[1,2]。但是,Bt 也存在杀虫谱窄、毒力不高等问题^[1,3],而且,自 80 年代以来人们发现不同的害虫对 ICPs 以及转 ICPs 基因作物已经表现出不同水平的抗性^[1]。

许多夜蛾科害虫都是农林生产中难以防治且容易产生抗性的主要害虫^[4,5,6]。近年来,人们发现 Bt 在营养期分泌的一类新型杀虫蛋白即 Vip3A,对鳞翅目夜蛾科害虫具有广谱高效的杀虫活性^[7]。*vip3A* 基因敲除后的 Bt 菌株 HD-1 对小地老虎的毒力下降了 3 倍而对甜菜夜蛾的毒力下降了 9 倍多,这是因为 Vip3A 蛋白是引起“孢子效应”的主要成分之一^[8]。此外,Vip3A 蛋白和 ICPs 没有任何同源性^[7,9],而且其杀虫作用机理与 ICPs 也不相同^[10]。因此,Vip3A 蛋白的研究对于我国 Bt 的进一步开发利用具有重要意义,但是国内目前尚无有关 *vip3A*

基因研究的报道。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、质粒及菌种

DNA marker 和 pGEM-T Easy 载体系统购自 Promega 公司;限制酶均购自 TaKaRa 公司;高保真 PCR 试剂盒购自 Roche 公司;pQE30 高效表达及纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司;总蛋白定量试剂盒(CD Protein Assay Kit)购自 Bio-Rad 公司。大肠杆菌 TG1 和野生型 Bt 菌株 S184(H_{3a3b})^[11]均为本实验室保存。Bt 标准菌株 HD537 来自法国巴斯德研究所。

1.2 引物及聚合酶链式反应

按 Estruch 等^[7]发表的 *vip3A*(a)基因序列(GenBank 登录号为 L48811)设计一对引物用于扩增全长 *vip3A* 开放阅读框,分别在引物的 5' 和 3' 引入 BamHI 和 SalI 内切酶位点(表 1)。PCR 反应条件:94℃ 2min;94℃ 15s,50℃ 30s,72℃ 2min,10 个循环;94℃ 15s,50℃ 30s,72℃ 2min,20 个循环,每个循环中的延伸反应依次增加 5s;最后 72℃ 延伸 7min。

收稿日期 2002-06-29,修回日期 2002-09-03。

基金项目 国家转基因植物专项基金资助项目(No. J00-A-003),国家 863 计划(No. 2001AA214011)和广东省自然科学基金项目及研究团队项目。

* 通讯作者。 Tel 86-20-84113860, Fax 86-20-84037472, E-mail Jls12@zsu.edu.cn

本文涉及的 *vip3A*-S184 基因核苷酸序列已提交 GenBank, Accession No. AY074706。

表 1 用于 PCR 反应的引物

Table 1 PCR primers used for amplification

Primers	Positoin ^a	Primer sequences
Vip3A-S5	739-767	GGATCCATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGCAC
Vip3A-T3	3092-3118	GTCGACGATCCCGATCTTACTTAATAGAGACAT

a. Refers to the nucleotide sequence for the *vip3A* gene deposited in the GenBank data under the accession number L48811. GGATCC and GTCGAC in bold case refer to the introduced sequence for a unique *Bam*HI and *Sal*I site respectively. ATG and TTA underlined stand for the start codon and stop codon respectively.

1.3 表达载体 pOTP 的构建及 DNA 序列测定

质粒抽提、酶切反应、电泳鉴定、DNA 片段回收、连接反应和大肠杆菌的转化等步骤均按分子克隆实验手册^[12]。DNA 序列委托上海基康公司测定。

1.4 目的蛋白 Vip3A-S184 的诱导表达

挑取转化平皿上的单菌落接种于 10mL 含 100μg/mL 氨苄青霉素和 25μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 过夜培养。以 1:50 转接到 100mL 含有以上浓度抗生素的 LB 液体培养基,培养至 OD_{600nm} 为 0.5 ~ 0.7 时,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 进行诱导,分别培养 1、2、4、6 和 8 h,各取 1mL 培养液进行 SDS-PAGE 电泳以及 Western blot 分析。

1.5 表达产物的可溶性分析及包涵体的电镜观察

取 1mL 按以上方法诱导 5 h 的菌液,12 000r/min 离心 2min,收集菌体,加入 1mL 裂解缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄;300mmol/L NaCl;10mmol/L imidazole, pH8.0),加入溶菌酶至 1mg/mL 并在冰上放置 30min,然后进行超声波破碎,10 000r/min 离心 20min,吸取上清(含有可溶性蛋白的粗提液 A)并将沉淀重悬于 1mL 裂解缓冲液(含不可溶性蛋白的粗提液 B),各取 15μL 进行 SDS-PAGE 分析。为了更好的效果,菌体可以先用 0.25% Tween 20 和 0.1mmol/L EDTA 洗 3 遍,然后再按以上方法取粗提液 A'和 B'进行 SDS-PAGE 分析。取 1mL 经 IPTG 诱导 5 h 的菌液按有关文献^[12]进行透射电镜观察。

1.6 Vip3A-S184 蛋白的多克隆抗体制备

根据目的蛋白的可溶性情况,选择在自然条件下按照 pQE30 蛋白高效表达及纯化试剂盒提供的方法进行蛋白纯化。用纯化的目的蛋白 100μg 与等体积福氏完全佐剂充分混匀后免疫家兔,4 周后用 50μg 纯化的目的蛋白与等体积福氏不完全佐剂加强免疫 1 次,此后,每隔 2 周免疫 1 次,共 2 次,7d 后进行抗血清收集。按照分子克隆方法^[12]进行处理,

从抗血清中去除交叉反应性抗体。

1.7 蛋白定量

用 Imagemaster VDI Software V3.0(Pharmacia 公司)软件分析目的蛋白占总蛋白的百分比,而菌体总蛋白按照 CD Protein Assay Kit 提供的 Lowry 法进行定量。

1.8 生物测定

3 种夜蛾科害虫即甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、斜纹夜蛾(*S. litura*)和棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)均为本室饲养。按照已有文献^[12,14]对初孵幼虫进行生物测定,利用本实验室研制的昆虫毒力测定分析软件^[15]进行 LC₅₀ 分析。

2 结 果

2.1 vip3A-S184 基因的克隆及测序

以高毒力 Bt 野生菌株 S184 和标准菌株 HD537 的总 DNA 为模板进行 PCR,各获得一条大约 2.3 kb 条带(图 1),其中 HD537 作为阳性对照^[16]。回收 Bt

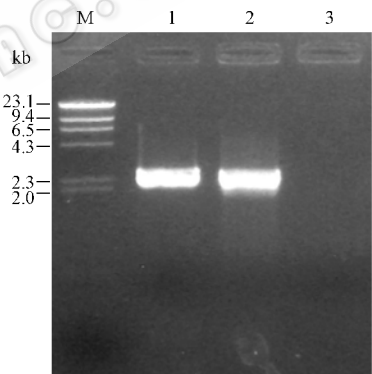


图 1 PCR 产物的电泳分析结果

Fig.1 Analysis of PCR products

M. λDNA/ EcoRI; 1. S184; 2. HD537; 3. H₂O

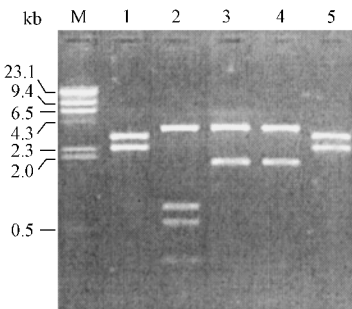


图 2 重组质粒 pTvip3A 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid pTvip3A by restriction enzyme assay

M. λDNA/ EcoRI; 1. pTvip3A/ EcoRI; 2. pTvip3A/ HindIII; 3. pTvip3A/ PstI; 4. pTvip3A/ SpeI; 5. pTvip3A/ BamHI + SalI

S184 的 PCR 产物,并与 T 载体连接后转化大肠杆菌

菌TG1 筛选转化子 ,用 *Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I、*Spe*I 和 *Bam*HI/*Sal*I 酶切鉴定(图 2) ,将正确的克隆子进行测序。序列分析结果表明 ,*vip3A*-S184 与 *vip3A*(a) 只有 4 个核苷酸不同及 2 个氨基酸不同(Q284→K , Y464→H)。

2.2 重组质粒 pOTP 的构建及表达

重组质粒 pOTP 构建的流程图如图 3 所示 ,将克隆有 *vip3A*-S184 基因的重组质粒 pTvip3A 和表达载体 pQE30 分别用 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切并回收 2.3

kb 大小目的片段和 3.4 kb 载体片段 ,进行连接并转化大肠杆菌 TG1 ,从转化子中提取的质粒用 *Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I 和 *Bam*HI/*Sal*I 酶切鉴定后(图 4) ,将重组质粒 pOTP 转化大肠杆菌 M15 进行表达。转化子经 1mmol/L IPTG 诱导后 ,在 1 ~ 8 h 间目的蛋白的表达量随时间而增加 ,到第 8 h 时 ,目的蛋白约占总蛋白的 25% (图 5) ,这说明 *vip3A*-S184 基因在 pQE30 表达载体系统中得到高水平表达。

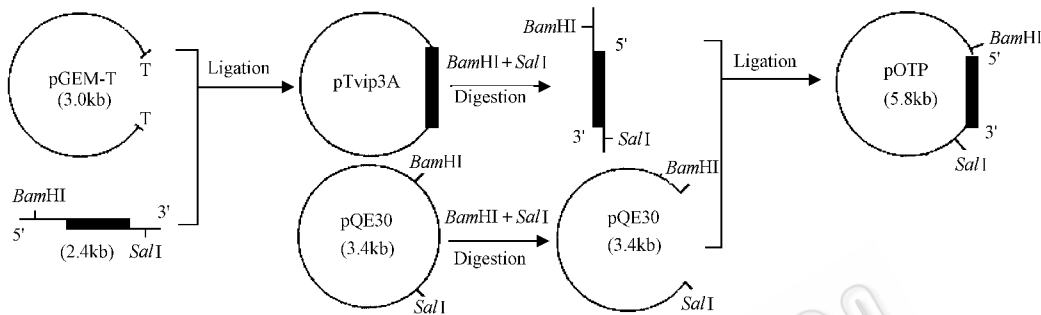


图 3 重组质粒 pOTP 的构建流程图
Fig.3 Construction of recombinant plasmid pOTP

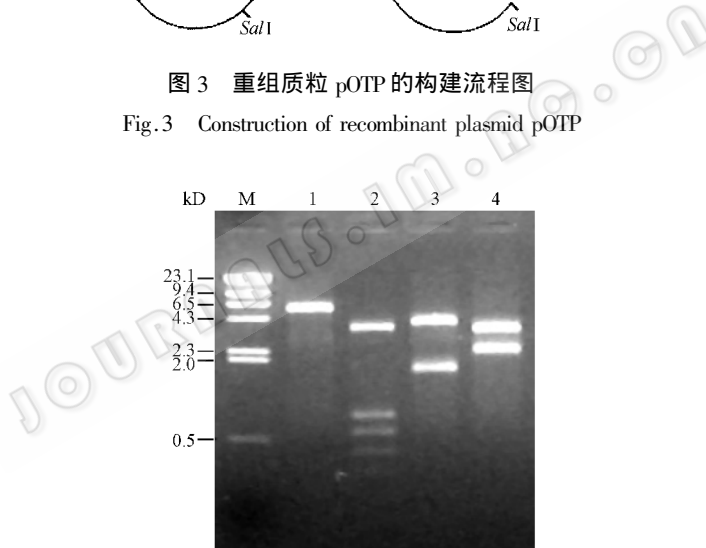


图 4 重组质粒 pOTP 的酶切鉴定

Fig.4 Identification of the recombinant plasmid pOTP by restriction enzyme assay
M. λDNA/*Eco*RI ;1. pOTP/*Eco*RI ;2. pOTP/*Hind*III ;3. pOTP/*Pst*I ;4. pOTP/*Bam*HI + *Sal*I

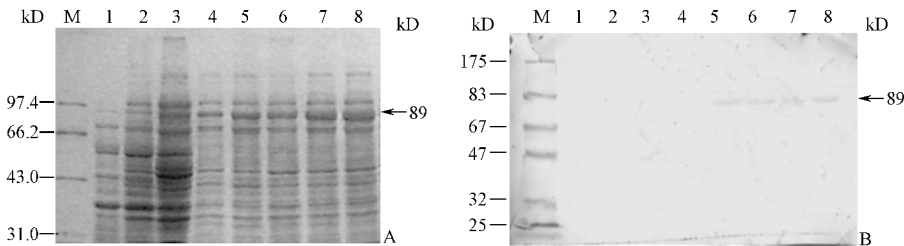


图 5 Vip3A-S184 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE(A)和 Western-blo(B)分析

Fig.5 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of Vip3A-S184 expressed in *E. coli*

M. Marker ;1. M15 [pQE30] without IPTG induction ;2. M15 [pQE30] with IPTG induction ;3. M15 [pOTP] without IPTG induction ;4. M15 [pOTP] for 1 h cultivation with IPTG induction ;5. M15 [pOTP] for 2 h cultivation with IPTG induction ;6. M15 [pOTP] for 4 h cultivation with IPTG induction ;7. M15 [pOTP] for 6 h cultivation with IPTG induction ;8. M15 [pOTP] for 8 h cultivation with IPTG induction

2.3 目的蛋白的可溶性及包涵体观察

将含有可溶性蛋白的粗提物 A 与含有不可溶性蛋白的粗提物 B 以及经过 0.25% Tween 20 洗涤 3

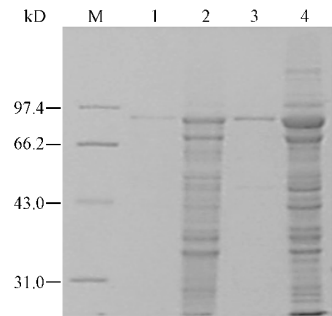


图 6 目的蛋白可溶性实验

Fig.6 Determination of target protein solubility

M. Standard protein marker ; 1. Crude extract A ; 2. Crude extract B ; 3. Crude extract A' ; 4. Crude extract B'

次后菌体的粗提物 A'和粗提物 B'分别进行 SDS-PAGE。结果如图 6 所示 ,可溶性蛋白占目的蛋白总量约为 19% ,而取上清液进行蛋白电泳时未见有目的蛋白条带。

将转化空白质粒 pQE30 和重组质粒 pOTP 的大肠杆菌 M15 经 IPTG 诱导 5h ,后者还用溶菌酶以及超声波破碎后分别进行透射电镜观察。与大肠杆菌 M15 [pQE30] (图 7A)相比 ,发现大肠杆菌 M15 [pOTP] 菌体两端均有明显的包涵体形成(图 7B) 经过超声波破碎后菌体破裂而将包涵体释放出来(图 7C)。这说明此目的蛋白主要以不可溶形式即包涵体存在。

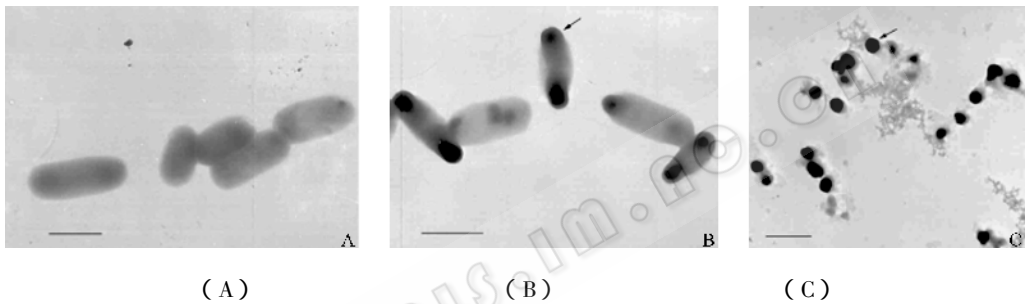


图 7 目的蛋白包涵体的透射电镜观察

Fig.7 Transmission electron micrography of inclusion bodies

A. *E. coli* M15 [pQE30] ; B. *E. coli* M15 [pOTP] ; C. *E. coli* M15 [pOTP] by sonication
Arrows indicated the inclusion body. Bars represent 1μm

2.4 目的蛋白的纯化及多克隆抗体的制备

因为部分目的蛋白是可溶的 ,所以可以在自然条件下利用表达蛋白的 N 端带有 6 × His 寡聚多肽的咪唑基团与 Ni-NTA 胶的结合对目的蛋白进行柱层析纯化 ,其中最后 2 次洗脱得到的样品较纯(图

8A) ,达到 95% 以上 ,经 Western-blot 证实所纯化的蛋白即为目的蛋白(图 8B)。利用所纯化的蛋白免疫家兔以制备多克隆抗体。对培养 20 h 的 Bt 菌株 S184 和 HD537 进行 Western blot(图 9A ,B) ,结果表明 ,在 89 kD 大小处各有一条特异性杂交带。

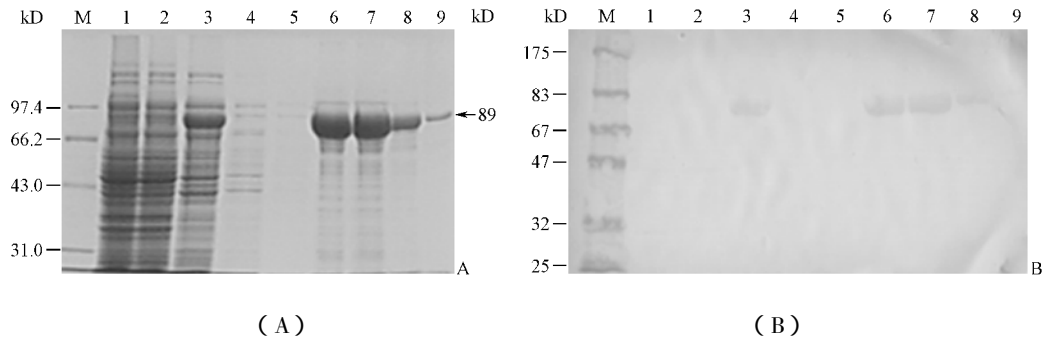


图 8 纯化的目的蛋白 SDS-PAGE (A) 和 Western-blot (B) 分析

Fig.8 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of purified target proteins

M. Standard protein marker ; 1. M15 [pQE30] without IPTG induction ; 2. M15 [pOTP] without IPTG induction ; 3. Cell lysate ; 4, 5. Wash fractions ; 6 ~ 9. Elution fractions

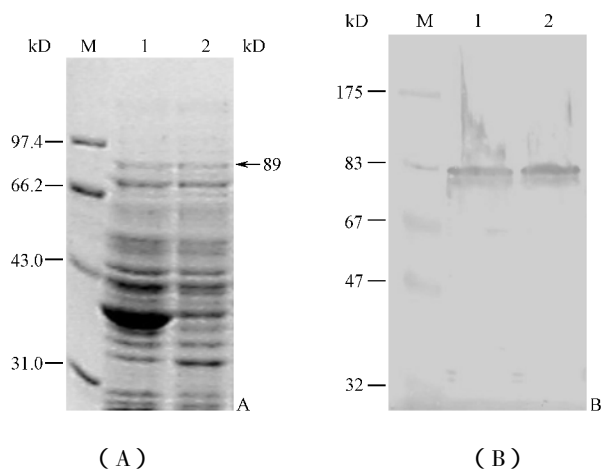


图9 Bt 菌株 S184 和 HD537 的 Vip3A 蛋白 SDS-PAGE (A) 和 Western blot 分析 (B)

Fig.9 SDS-PAGE (A) and Western-blot (B) analysis of Vip3A protein from the *B. thuringiensis* strain S184 and HD537

M. Standard protein marker ; 1. S184 ; 2. HD537

2.5 生物测定

收集大肠杆菌 M15[pQE30]和 M15[pOTP]菌体各 10mL ,对照组以空载菌培养液替代。将菌体进行超声波破碎后对甜菜夜蛾、棉铃虫和斜纹夜蛾等 3 种夜蛾科害虫的初孵幼虫进行生测 ,结果如表 2 所示。Vip3A-S184 对棉铃虫的毒力最高 ,对甜菜夜蛾的毒力最低 ,LC₅₀ 值达到 0.74 μg/mL ,这与已报道的结果^[7]基本一致。

表 2 Vip3A-S184 蛋白的毒力测定				
Table 2 Toxicity of Vip3A-S184 proteins				
Pests	LC ₅₀ (μg/mL)	Regression equation	95% fiducial limits(μg/mL)	
<i>Spodoptera exigua</i>	0.74	$y = 3.4446 + 1.7928x$	0.55 - 0.98	
<i>Helicoverpa armigera</i>	0.16	$y = 4.0122 + 0.8140x$	0.089 - 0.30	
<i>Spodoptera litura</i>	0.27	$y = 3.5385 + 1.0202x$	0.15 - 0.46	

3 讨 论

从野生型 Bt 菌株 S184 克隆的 vip3A-S184 基因与已报道的 vip3A(a)基因具有很高的同源性。利用表达 vip3A-S184 基因的大肠杆菌进行生物测定结果表明 ,Vip3A-S184 与 Vip3A(a)一样对多种夜蛾科害虫具有和 ICPs 类似的杀虫活性 ,但其杀虫范围要比 ICPs 广泛得多 ,对夜蛾科害虫具有较广谱的杀虫作用。而许多夜蛾科害虫的防治是农林生产中比较棘手的问题之一。因此 ,对 vip3A-S184 基因进行研究为夜蛾科害虫的防治提供了新的途径。

Vip3A 蛋白的 N 端具有典型的芽孢杆菌分泌蛋白的信号肽序列 ,但蛋白在分泌过程中其 N 端信号肽不被加工^[7]。而在 G⁺ 细菌中分泌蛋白的 N 端不被加工的情况还比较少见 ,所以 Vip3A 蛋白是否存在一类新的分泌机制还有待探讨。而在大肠杆菌中所表达的目的蛋白能够与 6× His 抗体相结合 ,在 89 kD 大小处产生阳性信号 ,这说明了位于 N 端的 6× His 标志未被切除 ,结果表明了 Vip3A 蛋白在大肠杆菌中与在 Bt 中一样 ,其 N 端信号肽也未被切除 ,因此推测 Vip3A 蛋白在 G⁻ 和 G⁺ 细菌中可能存在类似的分泌机制。然而 ,所表达的大多数蛋白还是以包涵体形式存在 ,这可能是因为转化子经 IPTG 诱导后大量表达目的蛋白 ,蛋白质来不及进行正确折叠而形成包涵体的缘故。当 N 端信号肽编码区缺失后的 vip3A-S184 基因插入表达载体 pQE30 并转化大肠杆菌 M15 进行表达时 ,其重组蛋白均以不可溶形式存在而且失去对害虫的杀虫活性(结果另文发表) ,因此可以推测 Vip3A 保留其 N 端信号肽具有特殊意义。

Vip3A 新蛋白还可能不断被发现 ,Vip3A 新杀虫谱也有待于进一步测试 ,所以 ,Vip3A 蛋白可能和 ICPs 一样形成一个家族 ,具有多样性的杀虫蛋白和不同的杀虫活性。Vip3A 和 ICPs 是两类完全不同特性的 Bt 杀虫毒蛋白 ,所以 ,Vip3A 的应用可以作为害虫抗性管理策略之一。此外 ,它对于提高 Bt 杀虫毒力和拓宽 Bt 杀虫谱等方面也具有重要意义。

REFERENCES(参考文献)

[1] Schnepf E ,Crickmore N , Van R J *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* ,1998 **62** :775 ~ 806

[2] YU Z N(喻子牛). *Bacillus thuringiensis* . Beijing : Science Publication Press ,1990 pp. 306 ~ 307

[3] Hofte H , Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* . *Microbiol Rev* ,1989 **53** :242 ~ 255

[4] YU S Q(于思勤). A preliminary study on fauna of Noctuidae(Lepidoptera :Ditrysia) insects in China. *Entomotaxonomia*(昆虫分类学报) ,1998 **20** (1) :44 ~ 50

[5] HUANG S J(黄水金). Progress of the research on the control of *Prodenia Litura* Fabricius . *Acta Agriculturae Jiangxi*(江西农业学报) ,1998 **10** (3) :65 ~ 69

[6] WANG X H(王晓容) ,LI Y Z(黎永栈) ,LU H H(卢辉红). The progress of study in beet armyworm(*Spodoptera exigua* Hübner). *Journal of Zhongkai Agrotechnical College*(仲恺农业技术学院学报) ,1995 **8** (2) :87 ~ 93

[7] Estruch J J ,Warren G W ,Mullins M A *et al.* Vip3A , a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 ,

- 93 5389 ~ 5394
- [8] Donovan W P , Donovan J C , Engleman J T. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *J Invertebr Pathol* 2001 **78** 45 ~ 51
- [9] Selvapandiyan A , Arora N , Rajagopal R *et al.* Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 2001 **67** 5855 ~ 5858
- [10] Yu C G , Mullis M A , Warren G W *et al.* The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl Environ Microbiol* 1997 **63** 532 ~ 536
- [11] JIANG D H (蒋冬花) , DENG R Q (邓日强) , PANG Y (庞义) *et al.* The new *Bacillus thuringiensis* isolates highly toxic to *Prodenia litura* larvae and their characterization. *Microbiology* (微生物学通报) , 1995 **24** (5) 262 ~ 265
- [12] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed , New York , Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [13] Yu J X , Pang Y , Tang M J *et al.* Highly toxic and broad-spectrum insecticidal *Bacillus thuringiensis* engineered by using the transposon Trn917 and protoplast fusion. *Curr Microbiol* 2001 **43** 112 ~ 119
- [14] ZENG X H (曾晓慧) , ZHANG H Y (张宏宇) , YU Z N (喻子牛) *et al.* Bioassay method of evaluating of *Bacillus thuringiensis* against larvae of *Spodoptera exigua*. *Chinese Journal of Biological Control* (中国生物防治) , 1998 **14** (4) : 172 ~ 175
- [15] CHEN Q X (陈其津) , LI G H (李广宏) , LIN Y F (林扬帆) . Rapid statistics and analysis of insecticidal bioassay data by computer. *Supplement to the Journal of Sun Yatsen University* (中山大学学报论丛) 2000 **21** (3) 39 ~ 43
- [16] Rice W C. Specific primers for the detection of *vip3A* insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. *Let in Appl Microbiol* , 1999 **28** 378 ~ 382

Cloning and Expression Product of *vip3A* Gene from *Bacillus thuringiensis* and Analysis of Inseceicidal Activity

CHEN Jian-Wu TANG Li-Xia TANG Mu-Jin SHI Yong-Xia PANG Yi *

(State Key Laboratory for Biocontrol , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China)

Abstract The *vip3A* gene in a size of 2.3kb amplified from wild-type *Bacillus thuringiensis* strain S184 by PCR was cloned into pGEM-T Easy vector and its sequence was analysed by DNASTAR. The plasmid pOTP was constructed by inserting *vip3A*-S184 gene into the expression vector pQE30 and then was transformed into *E. coli* M15. *E. coli* M15 cells harbouring the plasmid pOTP were induced with 1mmol/L IPTG to express 89kD protein which was confirmed to be Vip3A-S184 by Western blot. Experiments showed that about 19% of Vip3A-S184 proteins were soluble and others were insoluble proteins and formed inclusion bodies observed by transmission electron microscopy (TEM). The target protein was purified under the native condition and the polyclonal antibody was prepared by immunizing rabbits. The polyclonal antibody was used to detect Vip3A proteins expressed in *Bacillus thuringiensis*. Bioassay showed that Vip3A-S184 showed a high toxicity against 3 tested insect larvae including *Spodoptera exigua* , *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera* .

Key words *Bacillus thuringiensis* , *vip3A* gene , cloning , expression , antibody

Received : 06-29-2002

This work was supported by grants from the State Special Funds for Transgenic Plant (No. J00-A-003) , National 863 Project (No. 2001AA214011) and Natural Science Foundation of Guangdong Province.

* Corresponding author. Tel 86-20-84113860 , Fax 86-20-84037472 , E-mail 1-12@zsu.edu.cn

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