

苏云金芽胞杆菌 cry II 基因的克隆和表达

韩 明 喻子牛

(华中农业大学农业部农业微生物重点开放实验室 武汉 430070)

摘 要 分离的苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*) YBT-791 对鳞翅目小菜蛾(*Plutella xylostella*)有高毒力,将其质粒 DNA 提纯,经 Hind III 酶切后与杀虫晶体蛋白 cry II 基因探针杂交,显示出分子量分别为 5kb 和 9.4kb 两条 DNA 阳性片段。把 5kb 的 DNA 阳性片段克隆到 pUC18 的 Hind III 位点上并转化大肠杆菌 TG1,经酶切和杂交检测,证明斑点杂交阳性克隆子中含有 5kb 的 cry II 片段。把这个含 cry II 基因的 5kb Hind III 片段进行亚克隆,将 4kb 的 BamHI-PstI 酶切片段插入穿梭载体 pXI61 中,并用电脉冲法克隆于苏云金杆菌不产伴胞晶体的突变株中,得到产生单一 cry II 基因编码的杀虫晶体蛋白的克隆菌株 M-5。经电镜观察,该克隆菌株能形成出发菌 YBT-791 多种形态伴胞晶体中的一种方形伴胞晶体;经免疫双扩试验,它只能与 Cry II 晶体蛋白抗血清形成沉淀线;经 SDS-PAGE 电泳,克隆菌的伴胞晶体只含有一种 65kDa 的晶体蛋白。生物测定结果表明它既对鳞翅目小菜蛾(*Plutella xylostella*)有毒性,又对双翅目致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)有毒性。

关键词 苏云金芽胞杆菌, cry II 基因, DNA 克隆, 基因表达

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt 菌),是一种革兰氏阳性杆菌,它在形成芽胞的同时,在菌体的另一端形成多种形态的,对昆虫有特异毒性的伴胞晶体⁽¹⁾。伴胞晶体由杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal proteins, 简称 ICPs)组成。到目前为止,已有多多种 ICPs 基因被克隆。1989 年, Hofte 和 Whitele 根据基因核苷酸序列和产物的杀虫特异性,将 ICPs 基因分为 cry I, cry II, cry III, cry IV 和 cytA 五类⁽²⁾。其中 cry II 基因与大多数 ICPs 基因同源性较低,它所产生的 cry II 杀虫晶体蛋白对鳞翅目和双翅目昆虫都有毒性⁽³⁾,在 Bt 菌中形成方形伴胞晶体。

本文将对鳞翅目小菜蛾(*Plutella xylostella*)幼虫有高毒力的 Bt 菌 YBT-791 的 cry II 基因克隆于大肠杆菌。由于 cry II 基因在大肠杆菌中表达效率很低,因此将该 cry II 基因亚克隆于 Bt 菌不产伴胞晶体的突变株中,使其高效表达并形成晶体,随后对其表达产物的杀虫活性及其他特性进行了检测。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: Bt 菌 YBT-791 由本室分离, Bt 菌突变株 Bti · IPS · 78/11 (spo⁺ cry⁻) 和 *E. coli* TG1 由剑桥大学生化系提供;质粒 pUC18 和 pSELECT-cry II 亦由剑桥大学生化系提供;穿梭质粒 pXI61 由加州大学昆虫系提供。

1.1.2 培养基和培养条件: 培养基均采用 LB 培养基。培养温度: *E. coli* 为 37℃, Bt 菌为 30℃。

1.1.3 生化试剂:限制酶和其他核酸修饰酶主要购自华美公司;探针 DNA 标记采用 Boehringer Mannheim 公司 Digoxin 标记试剂盒。SDS-PAGE 分子量标准购自华美公司, Cry I 杀虫晶体蛋白抗血清由本室制备并提供。

1.1.4 供试昆虫:小菜蛾(*Plutella xylostella*)和致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)均由本室饲养。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取:参照 Sambrook J. 的碱法^[4],质粒纯化用苯酚、氯仿抽提替代氯化铯密度梯度离心。

1.2.2 cry I 基因探针的制备:用 BamHI 和 KpnI 将质粒 pSELECT-cry I 的 cry I 基因不完整片段酶切分离,用六聚体引物法进行 Digoxin 标记,按 Boehringer Mannheim 公司试剂盒说明书进行。

1.2.3 Southern 转移,预杂交,杂交:按 Sambrook J. 等的方法^[4]。杂交显色按 Boehringer Mannheim 公司 Digoxin 试剂盒说明书进行。

1.2.4 从凝胶中回收 DNA 片段:按徐 洵等的电洗提法^[5]进行。

1.2.5 DNA 酶切、纯化、重组和细菌转化:均参照 Sambrook J. 等的方法^[4]。

1.2.6 斑点杂交:用 Sambrook J. 等的碱法少量抽提质粒 DNA,点在硝酸纤维素膜上,风干后按 Southern 方法^[6]处理 NC 膜,然后进行预杂交、杂交。

1.2.7 电脉冲法参照 Schurter W. 的方法^[7]。电脉冲仪为 Bio-Rad 公司产品,型号为 165-2075。

1.2.8 电镜观察:将胞晶混合物滴在碎盖玻片上,风干后镀金熏蒸,喷金,扫描电镜(日立公司产品,型号 S-450)观察。

1.2.9 免疫双扩试验:杀虫晶体蛋白抗原制备用孙明等的方法^[8],免疫双扩反应参照赵永芳的方法^[9]。

1.2.10 SDS-PAGE 电泳参照 Sambrook J. 的方法^[4]。

1.2.11 生物测定:参照沈鞠群的方法^[10],小菜蛾感染 24 小时,致倦库蚊感染 48 小时。

2 实验结果

2.1 Bt 菌 YBT-791 的 cry II 基因在大肠杆菌中的克隆

将 Bt 菌 YBT-791 的质粒 DNA 经碱法抽提并纯化,分别用 Hind III 和 BamHI 酶完全酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳。结果见图版 I-A。将上述酶切片段经 Southern 转移后,用 cry I DNA 探针进行杂交。在 Hind III 酶切片段中有两个杂交阳性带。其片段大小一个为 5kb,另一个为 9.4kb。

经琼脂糖凝胶电泳,在长波光紫外灯下将含有 5kb DNA 片段的凝胶切割下来,用电洗提法从凝胶中回收这些 DNA 片段,与经 Hind III 酶切成线状并经碱性磷酸酯酶处理的载体 pUC18 连接,用 CaCl_2 法转化大肠杆菌 TG₁,然后用涂布了 X-Gal 和 IPTG 的氨苄青霉素抗性平板筛选重组子。任意挑取 200 个白色菌落作斑点杂交,菌落 165 和 171 呈强的阳性反应。将这两个阳性克隆子分别命名为 pY-165 和 pY-171。

将阳性克隆子 pY-165 和 pY-171,任选的两个斑点杂交非阳性重组子 pY-160 和 pY-

190 以及 Bt 菌株 YBT-791 的质粒 DNA 提纯,经 Hind III 酶切后电泳。从图版 I-B 可以看出,这 4 个重组子都含有 5kb 的外源 DNA 片段。

将图版 I-B 的凝胶作 Southern 转移后与 cry II DNA 探针杂交,从图版 I-C 的结果可以看出,只有阳性克隆子 pY-165 和 pY-171 的 5kb 外源片段可以与 cry II DNA 探针杂交,而且与菌株 YBT-791 质粒的 5kb 阳性 Hind III 酶切片段大小相同,证明 YBT-791 的 cry II 基因 5kb 片段已被连接在 pUC18 内,并克隆于 pY-165 和 pY-171 中,将这个携带了 cry II 基因 5kb 片段的质粒命名为 pY-cry II。

由于 pUC18 不是表达载体,克隆于其中的 cry II 基因表达效率很低^[2],因而未进行表达产物检测。

2.2 cry II 基因片段在 Bt 菌突变株中的亚克隆

经酶切分析,得到重组质粒 pY-Cry II 的物理图谱(图 1)。将重组质粒 pY-Cry II 经 BamHI 和 PstI 双酶切产生的 4kb Cry II 基因片段插入穿梭质粒 pXI61 的多酶切位点接头上,得到含 4kb Cry II 基因片段的穿梭质粒 pX-Cry II。

将纯化的 pX-Cry II 质粒 DNA 经电脉冲法转化到 Bt 菌不产伴胞晶体突变株 Bti · IPS · 78/11 中,用四环素抗性平板筛选转化子。将任意挑取的 6 个转化子用 LB 液体培养基振荡培养 3 天后镜检,发现 5 个菌可以形成方形伴胞晶体。将这 5 个克隆菌株编号为 M-5, M-6, M-7, M-8, M-11。

将克隆菌株 M-5 的质粒 DNA 提纯,与质粒 pX-Cry II 一起经 PstI、BamHI 双酶切后电泳,从图版 I-D 可以看出, pX-Cry II 和 M-5 的质粒 DNA 经 PstI 和 BamHI 双酶切后,均产生 4kb 和 5.6kb 的两个片段。5.6kb 片段是穿梭载体 pXI61。

将上述双酶切电泳的凝胶作 Southern 转移,并与 Cry II DNA 探针杂交,从图版 I-E 的结果可以看出,经 PstI 和 BamHI 双酶切的 pX-Cry II 和 M-5 的质粒 DNA 所产生的 4kb 片段均与 Cry II DNA 探针杂交。由此可见,克隆子 M-5 的质粒就是转入突变株 Bti · IPS · 78/11 的 pX-Cry II 质粒。Cry II 基因片段已被亚克隆于 Bt 菌突变株 Bti · IPS · 78/11 中。

2.3 克隆菌 Cry II 基因的表达

将出发菌 YBT-791,受体菌 Bti · IPS · 78/11 和克隆菌 M-5 接种 LB 液体培养基, 30℃ 摇床振荡培养 3 天,制成摇瓶培养液。

2.3.1 电镜观察:将上述摇瓶培养液制片,扫描电镜观察。受体菌 Bti · IPS · 78/11 只形成芽胞,出发菌 YBT-791 除形成芽胞外,还形成各种菱形和小方形的伴胞晶体。而克隆菌

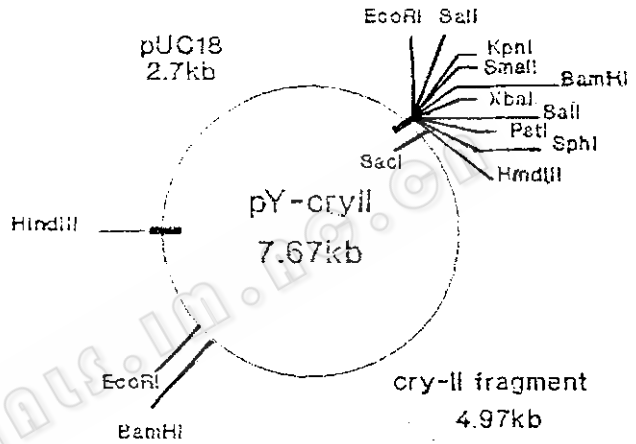


图 1 重组质粒 pY-Cry II 的物理图谱
Fig. 1 Restriction map of recombinant plasmid pY-Cry II

M-5 除形成芽胞外,主要形成大方形和小方形的伴胞晶体。

2.3.2 免疫双扩实验:将上述培养液制成晶体蛋白抗原,进行免疫双扩反应。受体菌 Bti · IPS · 78/11 抗原既不与 Cry I 又不与 Cry II 的晶体蛋白抗血清反应;出发菌 YBT-791 抗原既与 Cry I 又与 Cry II 的晶体蛋白抗血清形成沉淀线;而克隆菌 M-5 抗原只与 Cry II 晶体蛋白抗血清反应。因此,克隆菌 M-5 形成的晶体蛋白只具有 Cry II 杀虫晶体蛋白的抗原性。

2.3.3 SDS-PAGE 电泳:将上述培养液制成电泳样品,进行 SDS-PAGE 电泳。从图版 I-F 可以看到:受体菌 Bti · IPS · 78/11 不形成伴胞晶体,没有任何多肽;出发菌 YBT-791 形成多种形态的伴胞晶体,电泳显示 130kDa 和 65kDa 两种多肽;克隆菌 M-5, M-6, M-7, M-8, M-11 只形成方形伴胞晶体,只含有出发菌 YBT-791 的 65kDa 一种多肽。可见,出发菌 YBT-791 的 Cry II 基因在受体菌中表达产生单一的 65kDa Cry II 杀虫晶体蛋白。

2.3.4 生物测定:将上述培养液分别对小菜蛾和致倦库蚊作生物测定,测定结果列于表 1。由表 1 可以看到,克隆菌 M-5 对小菜蛾和致倦库蚊都有毒性。

表 1 出发菌 YBT-791、受体菌 Bti · IPS · 78/11 和克隆菌 M-5 的生物测定结果

Table 1 Bioassay of original strain YBT-791, receptor Bti · IPS · 78/11 and cloned strain M-5

Test insect	Strains	Regressive equation $Y = ax + b$	50% lethal concentration $LC_{50}(\mu\text{g/ml})$	Relative coefficient r
<i>P. xylostella</i>	YBT-791	$Y = 0.531nx + 4.67$	1.85	0.96
	M-5	$Y = 0.701nx + 2.12$	60.98	0.98
	Bti · IPS · 78/11		not toxic	
<i>C. quinquefasciatus</i>	YBT-791	$Y = 0.551nx + 2.74$	60.66	0.99
	M-5	$Y = 0.571nx + 2.58$	68.84	0.99
	Bti · IPS · 78/11		not toxic	

3 讨 论

本文将 Bt 菌 YBT-791 菌株克隆于大肠杆菌的 5kb Cry II 基因片段经 BamHI 和 PstI 双酶切后,亚克隆于不产伴胞晶体的 Bt 菌突变株中,得到表达单一 Cry II 杀虫晶体蛋白的克隆菌 M-5。

将 Cry II 基因克隆于大肠杆菌后,未对其表达进行检测。这是因为 pUC18 不是表达载体,克隆于 pUC18 的外源基因表达量很低,不宜对表达产物进行检测和分析。

扫描电镜观察表明,克隆菌产生的伴胞晶体大多数比出发菌株的晶体大,说明克隆菌的表达效率高,这也被 SDS-PAGE 电泳所证实。相同条件下培养制样的样品,克隆菌的上样量仅为出发菌 YBT-791 的 1/10,可得到同样的多肽带(图版 I-F)。这为高毒力工程菌的构建打下了基础。

生物测定表明,出发菌对小菜蛾的毒性(LC_{50} 为 $1.85\mu\text{g/ml}$),比克隆菌的毒性(LC_{50} 为 $60.98\mu\text{g/ml}$)高 33 倍,这一结果是预料之中的,因为出发菌 YBT-791 还含有对鳞翅目昆虫有高毒力的 130kDa 的 Cry I 杀虫晶体蛋白(图版 I-F)。对致倦库蚊的生物测定表明,出发菌 YBT-791 的毒力(LC_{50} 为 $60.66\mu\text{g/ml}$)略高于克隆菌 M-5 的毒力(LC_{50} 为 $68.84\mu\text{g/ml}$),鉴于克隆菌 Cry II 蛋白表达量比出发菌 YBT-791 高,这个结果可能是由于

出发菌含有别的杀蚊因子或 Cry I 蛋白的协同作用造成的^[11]。

根据杀虫晶体蛋白基因的分类及特性, Cry I 基因编码的产物既对鳞翅目又对双翅目昆虫有毒, 应归为 Cry I A 基因亚类^[2]。

致谢:在实验过程中, 戴经元副教授等制备并提供了抗血清, 刘子铎副教授和孙明讲师提出了很多好的建议, 罗曦和俞凌讲师在生物测定方面给予了热情帮助, 在此致以深深的谢意。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛主编, 苏云金杆菌, 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] Hofte H *et al.* Microbiol Rev, 1989, 53(2): 242-255.
- [3] Widner W R *et al.* J Bacteriol, 1989, 171(2): 965-974.
- [4] Sambrook J *et al.* Molecular Cloning (2nd edition) Cold spring harbour laboratory, Cold Spring Harbor NY, 1989.
- [5] 徐 洵等. DNA 重组技术. 北京: 科学出版社, 1990, P. 62-63.
- [6] Southern E M. J Mol Biol, 1975, 98: 503.
- [7] Schurter W *et al.* Mol Gen Gener, 1989, 218: 177-181.
- [8] 孙 明等. 杀虫微生物. 武汉: 武汉大学出版社, 1994, 4: 57-59.
- [9] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用, 武汉: 武汉大学出版社, 1988. p. 402-406.
- [10] 沈鞠群等. 生物防治通报(增刊), 1990, p. 12-16.
- [11] Chunjatuporchai W *et al.* Eur J Biochem, 1988, 173: 9-18.

Cloning and Expression of Cry I Gene of *Bacillus thuringiensis*

Han Ming Yu Ziniu

(Laboratories of Agromicrobiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract Isolated *Bacillus thuringiensis* strain YBT-791 is highly toxic to *Plutella xylostella* larvae. Hind III digested fragments from strain YBT-791 plasmid DNA were hybridized with Cry I DNA probe, which showed two positive bands of 5kb and 9.4kb. The 5kb fragments were ligated into the Hind III site of vector pUC18, and then transformed into *E. coli* TG1. Restriction and Southern blot analysis, showed that the positive-reacted clones of Dot blot analysis contained the 5kb Cry I gene fragment. By sub-cloning, a 4kb BamHI-PstI DNA fragment had been inserted into the poly-linker cloning site of shuttle vector pXI61 and transformed by electroporation into the *B. thuringiensis* acrySTALLIFEROUS mutant Bti · IPS · 78/11. The obtained strain M-5 with Cry I gene can express the pure Cry I insecticidal crystal protein. By electro-microscope, cubic crystals were seen formed by M-5 which could also be produced by YBT-791. Double-directed spread test showed antigen of M-5 could only react with Cry I protein antibody. SDS-PAGE showed the cubic crystals of M-5 contained pure protein of 65kDa. The result of

bioassay showed M-5 was not only toxic to *Plutella xylostella* larvae, but also toxic to *Culex quinquefasciatus* larvae.

Key words *Bacillus thuringiensis*, Cry I gene, DNA cloning, gene expression

图版 I 说明

Explanation of plate I

A. Gel electrophoresis of DNA fragments of digested Bt strain YBT-791 plasmid DNA by restriction enzymes

1. pSELECT-Cry I + Hind III
2. Bt strain YBT-791 plasmid DNA + BamHI
3. Bt strain YBT-791 plasmid DNA + Hind III
4. λ -Hind III marker

C. Southern blot analysis of agarose gel from plate I-B.

Samples in lane A-H were the same with I-B.

E. Southern blot analysis of the agarose gel from plate I-D.

1. M-5 plasmid DNA + PstI + BamHI
2. Recombinant plasmid pX-Cry I + PstI + BamHI
3. λ -Hind III marker

B. Photo of recombinant plasmid DNA digested by Hind III

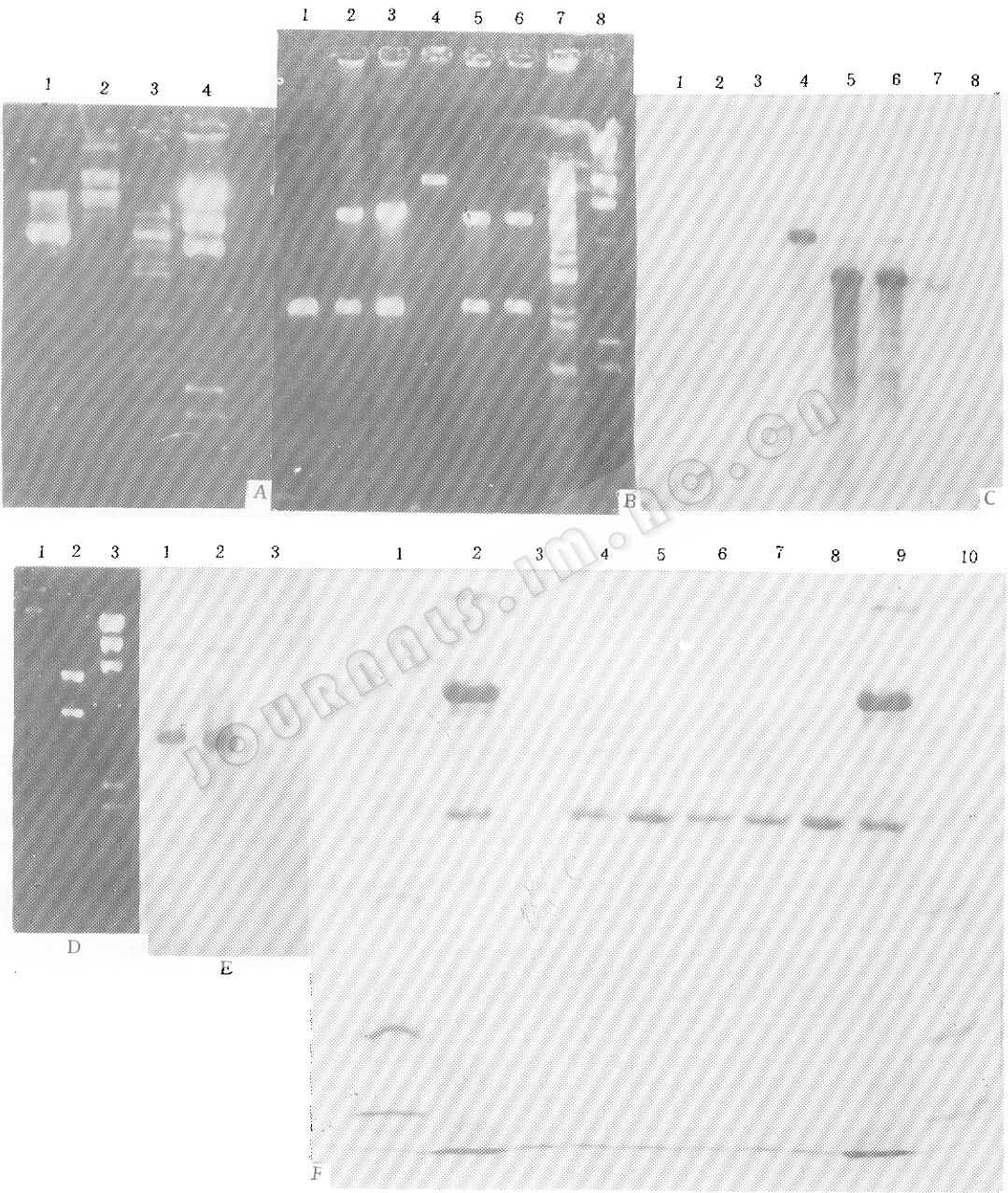
1. Vector pUC18 + Hind III
2. Recombinant pY-190 plasmid + Hind III
3. Recombinant pY-160 plasmid + Hind III
4. Positive control, pSELECT-Cry I + Hind III
5. Recombinant pY-171 plasmid + Hind III
6. Recombinant pY-165 plasmid + Hind III
7. Bt strain YBT-791 plasmid + Hind III
8. λ -Hind III marker

D. Restriction analysis of cloned strain M-5 plasmid DNA

1. M-5 plasmid + PstI + BamHI
2. Recombinant plasmid pX-Cry I + PstI + BamHI
3. λ -Hind III marker

F. SDS-PAGE of cloned strain

- 1 and 10, Molecular standard
- 2 and 9, Original strain YBT-791
- 3—7, Cloned strains M-5, M-6, M-7, M-8, M-11
- 8, Receptor strain Bti • IPS • 78/11



图版说明见 p. 172.