

苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素 *cryIA(c)* 基因 在大肠杆菌和变铅青链霉菌中表达

杨闰英^{1,2} 胡志浩¹ 邓子新¹ 李季伦²

(华中农业大学生命科技学院 武汉 430070)¹

(中国农业大学生物学院 北京 100094)²

摘要 利用合成的寡聚核苷酸片段,从质粒 pOS1000 中分离出具有适合克隆位点的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) δ -内毒素 *cryIA(c)* 全长基因。将该基因与大肠杆菌表达载体 pKK223-3 重组,并引入大肠杆菌 JM109 中,经 IPTG 诱导,获得了超量表达的 CryIA(c) 蛋白。将 *cryIA(c)* 全长基因插入链霉菌表达载体 pHZ1272 中,得到重组质粒 pHZ1256,将该质粒引入变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)JT46 中,经硫链丝菌素诱导,通过 Western blotting 测定表明,重组变铅青链霉菌 JT46(pHZ1256)已表达出相应的 CryIA(c) 蛋白。杀虫试验表明,大肠杆菌和链霉菌所表达出的 δ -内毒素 CryIA(c) 对小菜蛾均有毒杀作用,其致死率分别为 93% 和 57%。

关键词 链霉菌,大肠杆菌,*cryIA(c)* 基因表达

学科分类号 Q781

苏云金芽孢杆菌在形成芽孢的过程中也形成伴孢晶体。当伴孢晶体被某些昆虫吞食后,在昆虫肠道碱性环境和蛋白酶作用下,被分解成有毒性的肽,破坏昆虫上皮细胞,从而引起昆虫死亡。根据苏云金芽孢杆菌伴孢晶体毒素的杀虫谱及晶体蛋白基因的核苷酸序列的同源性,将编码晶体蛋白的基因分为 5 大类 14 亚类,其中的 13 个亚类称为狭义的晶体蛋白基因,即 *cry* 基因。*cry* 基因又分 4 群:对鳞翅目昆虫有特异性杀伤效果的是 *cry I* 基因;对鳞翅目和双翅目特异的是 *cry II*;对鞘翅目特异的是 *cry III*;对双翅目特异的是 *cry IV*^[1]。对 *cry I* 编码的蛋白研究的最多,其分子量为 130~140kDa,用胰蛋白酶处理可生成 60kDa 的毒素核心片段^[2]。*cry I* 晶体蛋白又分为 8 亚类,它们的 C-末端具有高度的保守性,N-末端差异较大,毒素核心片段邻近 N-末端。

本文报道 *cryIA* 亚类编码基因 *cryIA(c)* 分别在链霉菌和大肠杆菌中表达的研究结果。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

携带完整 *cryIA(c)* 基因的质粒 pOS1000(华中农大孙明博士赠);大肠杆菌表达载体

国家自然科学基金和国家教委资助课题。

收稿日期:1997-05-08,修回日期:1997-10-07。

pKK223-3(购自 Pharmacia 公司);链霉菌表达载体 pHZ1272(本室构建^[3]);质粒 pUC19、大肠杆菌 DH5 α 和 JM109,以及变铅青链霉菌 JT46(均为本室保存)。

1.2 培养基和使用的抗生素

常规的大肠杆菌培养基为 LB 和 LA;链霉菌液体培养基 YEME;链霉菌原生质体再生培养基为 R5^[4];固体产孢培养基为 2CM^[5],必要时在大肠杆菌培养过程中,使用氨苄青霉素的终浓度为 100 μ g/ml;培养链霉菌使用的卡那霉素的终浓度为 5 μ g/ml;在链霉菌中诱导基因表达所用的硫链丝菌素的终浓度为 5 μ g/ml。

1.3 遗传操作

常规 DNA 操作方法见文献[6];链霉菌遗传操作见文献[4];基因在链霉菌中的诱导表达及检测见文献[7]。

1.4 供试昆虫

小菜蛾(*Plutella xylostella*)由华中农大杀虫微生物研究室提供,杀虫毒性测定方法见文献[8]。

1.5 寡聚核苷酸的设计与合成

为了能从质粒 pOS1000 中分离出具有合适克隆位点的 *cryIA(c)* 全长基因,且不改变氨基酸的组成和符合链霉菌基因密码子的偏爱(第 3 位碱基多为 C 或 G),设计并合成了以下两个寡聚核苷酸的片段:



当这两个寡聚核苷酸链退火相互配对之后,会留下两个粘性末端。5'端(TCGA)能与 SalI 酶切所产生的粘性末端互补配对;3'端能与 NsiI 酶切位点(ATGCA)的粘性末端互补配对,但所设计的末端是 GTGCA,因此互补后不再形成 NsiI 的酶切位点。此外,寡聚核苷酸片段上还设计了一个 NdeI 的酶切位点(CATATG),其中的 ATG 为 *cryIA(c)* 的起始密码子。

DNA 序列分析采用 Promega 公司的 Taqtrack 试剂盒;SDS-PAGE 采用 6% 分离胶和 5% 浓缩胶。试验用酶购自 GIBCO-BRL, Promega 和华美生物工程公司。

2 结果与分析

2.1 苏云金芽孢杆菌 *cryIA(c)* 基因的亚克隆及改造

图 1 所绘的是 *cryIA(c)* 基因的亚克隆及改造路线,即质粒 pHZ1254 的构建过程。

用 NdeI 酶切 pOS1000,经 Klenow 补平后,电泳回收 *cryIA(c)* 的 3.7kb 的片段,与 XbaI 线性化后 Klenow 补平的 pUC19 连接,获得重组质粒 pHZ1253,其中的 *cryIA(c)* 基因携带有启动子部分序列。为了得到从起始密码子开始的 *cryIA(c)* 基因,将 pHZ1253 用 SalI 和 NsiI 双酶切后,与退火的寡聚核苷酸片段连接,再转化大肠杆菌 DH5 α ,从转化子中提取质粒,用 NsiI 酶切,选出不被 NsiI 酶切的与 pHZ1253 同等大小的质粒 pHZ1254。由于合成的寡聚核苷酸合成设计了类似 NsiI 酶切后产生的粘性末端(5'-ATGCA-3'),而不同于 NsiI 酶切产生的真正粘性末端(5'-GTGCA-3'),因而当它与 NsiI 酶切产生的粘性末端配对后,便不再形成 NsiI 的酶切位点。

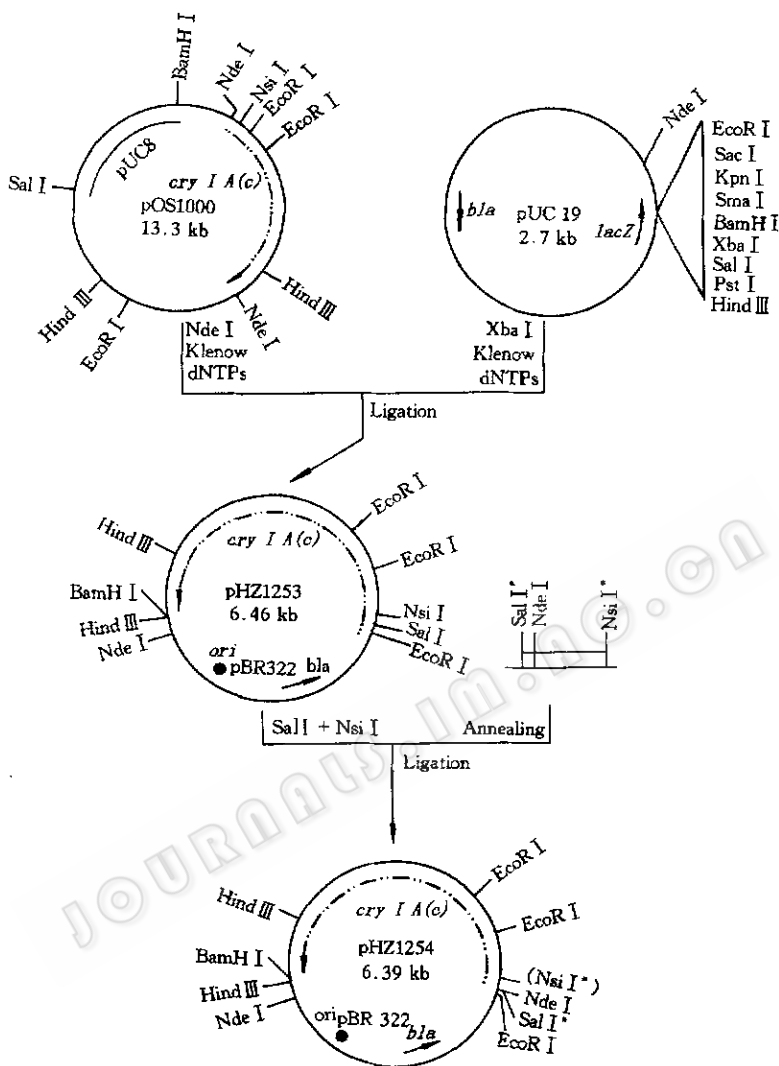


图1 质粒 pHZ1254 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pHZ1254

对 pHZ1254 上已改造的 *cryIA(c)* 基因进行部分 DNA 序列分析, 与原来未曾改造的序列相比基本一致:

原有的序列: 5'-.....ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT

改造后序列: 5'-TCGACAT ATG GAC AAC AAC CCG AAC ATC AAC GAG TGC T

说明已成功地克隆了从起始密码子开始的 *cryIA(c)* 基因, pHZ1254 上的 *cryIA(c)* 带有正确的阅读框架和适合的克隆位点。

2.2 苏云金芽孢杆菌 *cryIA(c)* 基因在大肠杆菌中的表达

根据 McLinden 等人^[9]的工作, 选用 pKK223-3 作为 *cryIA(c)* 基因在大肠杆菌中表

达的载体。将pKK223-3以EcoRI酶切后,经S1酶和Klenow处理,以保证所表达基因的起始密码子距RBS(核糖体结合位点)5~9个碱基;将pHZ1254经NdeI酶切,Klenow补平后,电泳回收含 $cryIA(c)$ 基因的片段,与上述EcoRI线性化的pKK223-3连接后,转化大肠杆菌JM109,从而获得重组子JM109(pHZ1255)。

重组子分别经IPTG诱导培养和未经IPTG诱导培养,定期取样,离心收集菌体,超声破碎后,离心得上清液,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果显示(图2),经诱导培养2h的JM109(pHZ1255)的细胞蛋白粗提物中,出现了与CryIA(c)蛋白大小(130kDa)相符的蛋白,其量随时间增加,至6h达到高峰;而未经IPTG诱导培养的JM109(pHZ1255)细胞蛋白粗提物中,未发现这种蛋白,说明苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因 $cryIA(c)$ 在大肠杆菌中成功地进行了表达。以大肠杆菌所表达出的CryIA(c)蛋白为抗原,免疫兔子制备抗体,经琼脂双向扩散法测定,该抗体的效价为8。

2.3 苏云金芽孢杆菌 $cryIA(c)$ 基因在链霉菌中表达

用NdeI和BamI双酶切质粒pHZ1254,回收 $cryIA(c)$ 基因的片段(约4kb),并与NdeI和BamI双酶切的pHZ1272连接,从而获得重组质粒pHZ1256。

以pHZ1256转化变铅青链霉菌JT46,获得重组子JT46(pHZ1256)。重组子经硫链丝菌素诱导培养后,离心收集菌体。菌体经超声波破碎后,离心得上清液,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后转膜,以CryIA(c)的抗体进行Western blotting分析,结果表明,在诱导后的JT46(pHZ1256)细胞粗提液中出现了一条特异的杂交带(130kDa),而未经诱导培养的JT46(pHZ1272)细胞粗提液中却不出现这条特异的杂交带(图3),说明苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素基因已在变铅青链霉菌JT46(pHZ1256)中进行了表达。

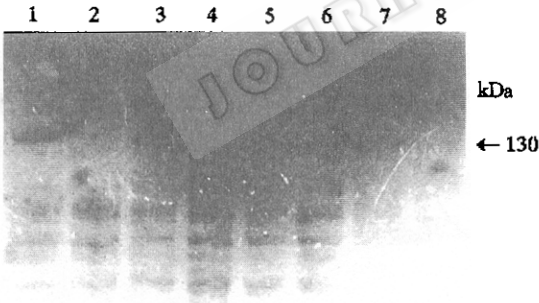


图2 大肠杆菌产生苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素CryIA(c)的SDS-PAGE图谱

Fig.2 SDS-PAGE of CryIA(c) protein produced by *E. coli* JM109 (pHZ1255) after IPTG induction

1,3,5,7: CryIA(c) (130kDa) produced by *E. coli* JM109 (pHZ1255) after 8,6,4 and 2 h induction respectively;
2,4,6,8: No production of CryIA(c) protein in *E. coli* JM109 (pHZ1255) without induction

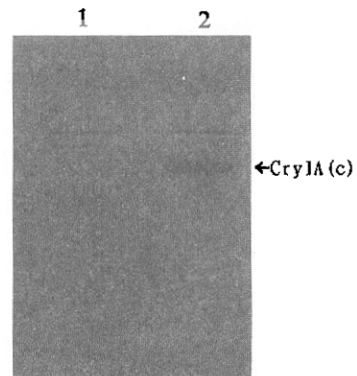


图3 变铅青链霉菌JT46(pHZ1256)表达CryIA(c)蛋白的免疫检测

Fig.3 Western blotting analysis of CryIA(c) protein produced by *Streptomyces lividans* JT46(pHZ1256)

1. *S. lividans* JT46(pHZ1272), as control;
2. *S. lividans* JT46(pHZ1256)

2.4 大肠杆菌和链霉菌所表达的 *cryIA(c)* 蛋白的生物活性测定

分别收集由 IPTG 诱导培养的大肠杆菌 JM109(pHZ1255)和 JM109(pKK223-3)的细胞,以及由硫链丝菌所诱导培养的变铅青链霉菌 JT46(pHZ1256)和 JT46(pHZ1272)的细胞。经超声波破碎,离心后各取上清液 0.5ml,分别加到 4.5ml 昆虫饲料中,混匀后喂食小菜蛾(*Plutella xylostella*)。对照组以 MPBS 缓冲液代替各种上清液。喂食两天后观察(表 1):大肠杆菌表达的 CryIA(c)蛋白对小菜蛾的致死率为 93%;链霉菌表达的 CryIA(c)蛋白的致死率为 57%,但未死的虫体也变黑,明显小于对照组,而且行动迟缓。

表 1 由大肠杆菌和链霉菌分别表达的苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素 CryIA(c)对小菜蛾的毒杀效果
Table 1 Toxic effect of δ -endotoxin CryIA(c) produced by *E. coli* and *S. lividans* on *Plutella xylostella*

Treatments Fed fodder with	Number of survival insects			Mortality /%
	(A)	(B)	(C)	
MPBS as blank control	10	10	10	0
Cell extract of				
<i>E. coli</i> JM109 (pKK223-3)	10	10	10	0
<i>E. coli</i> JM109 (pHZ1255)	1	0	1	93
<i>S. lividans</i> JT46 (pHZ1272)	10	10	10	0
<i>S. lividans</i> JT46 (pHZ1256)	4	5	4	57

表 1 可见,由大肠杆菌重组子和变铅青链霉菌重组子所分别表达的苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素蛋白 CryIA(c)都有生物活性。链霉菌重组子所产生的毒素对小菜蛾的致死率之所以低,可能是它表达的 CryIA(c)蛋白量较低。

3 展 望

苏云金芽孢杆菌制剂是国内外应用最多的微生物杀虫剂。它对鳞翅目、双翅目和膜类等节肢动物具有特异杀虫活性,且不污染环境、不破坏生态平衡和不影响农产品的品质。该菌编码毒素蛋白的 *cry* 基因,大多定位在大小不同的质粒上。已有 50 多种 *cry* 基因被克隆和鉴定。苏云金杆菌产生的晶体蛋白 CryIA(c)的毒效很高,其杀虫范围主要集中在鳞翅目昆虫,如棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、烟青虫(*H. assulta*)、烟草夜蛾(*H. virescens*)和谷食夜蛾(*Heliothis zea*)等,它们危害严重。*cryIA(c)*基因已分别被引入枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、农杆菌、大肠杆菌和高等植物中,但该基因在链霉菌中表达成功尚属首次。

有些链霉菌可产生具有杀虫活性的抗生素,如杀螨素、阿维菌素、莫能菌素、马杜拉菌素等,这些抗生素都具有一定的杀虫范围。如在这些链霉菌中引入并表达出苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素,可望拓宽它们的杀虫谱。此外,也有可能提高链霉菌发酵后的废料利用效率。

致 谢 华中农业大学喻子牛教授和博士生曾晓慧在杀虫生测方面给予极大帮助;美国 E. R. Squibb & Sons 公司的 J. Lucania 博士惠赠硫链丝菌素,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Hofte H, Whiteley H R. *Microbiol Rev*, 1989, **53**:242~255
- 2 Whiteley H R, Schnept H E. *Ann Rev Microbiol*, 1986, **40**:549~576
- 3 杨闰英, 胡志浩, 邓子新等. *生物工程学报*, 1998, **14**(1):6~12
- 4 霍甫伍德 著, 邓子新、唐纪良译. *链霉菌遗传操作实验手册*, 长沙:湖南科学技术出版社, 1988
- 5 袁丽蓉. *抗生素*, 1983, **8**(6):380~387
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- 7 Takano E, White J, Bibb M J. *Gene*, 1995, **166**(1):133~137
- 8 喻子牛等编. *苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用*, 北京:农业出版社, 1993, 178~182
- 9 McLinden J H, Sabourin J R, Clark B D *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1985, **50**:623~628

Expression of δ -endotoxin *cryIA(c)* Gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*

Yang Runying^{1,2} Hu Zhihao¹ Deng Zixin¹ Li Jilun²

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)¹

(China Agricultural University, Beijing 100094)²

Abstract The *cryIA(c)* gene of *Bacillus thuringiensis* was isolated from plasmid pOS1000. In order to obtain a proper cloning site and open reading frame, some DNA sequences preceeding the initiating codon of the gene were replaced by synthetic oligonucleotide sequences. The isolate *cryIA(c)* was cloned into *E. coli* expression vector pKK223-3, and the production of CryIA(c) protein was detected after induction by IPTG. A recombinant plasmid, pHZ1256, was constructed by insertion of the *cryIA(c)* gene into *Streptomyces* vector pHZ1272. pHZ1256 was introduced into *Streptomyces lividans*, and the production of CryIA(c) protein was confirmed by Western blotting after thiostrepton induction. Bioassay experiment showed that the CryIA(c) protein produced by *E. coli* and *S. lividans* caused 93% and 57% mortality to *Plutella xylostella*, respectively.

Key words *cryIA(c)* gene, expression, *E. coli*, *Streptomyces lividans*