

对鞘翅目害虫高毒力 Bt 基因 *cry3Aa7* 的 分离克隆及表达研究

张 杰¹, 宋福平¹, 李长友¹, 陈中义¹, 檀建新¹, 黄大日方²

(¹ 中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094;

² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 从国内分离的对鞘翅目叶甲科害虫高毒力的 Bt 菌株中克隆了 3.0kb *cry3Aa* 基因大片段, 完成了该片段的亚克隆和全序列测定。该基因编码区为 1932bps, 编码的蛋白质由 644 个氨基酸残基组成, 分子量 73.1ku, 等电点为 pI 5.165, 为弱酸性蛋白。该蛋白中 Ser、Leu、Thr 含量最高, 分别为 8.22%、8.07% 和 7.76%。通过穿梭载体将该基因导入 Bt 无晶体突变株中, 获得工程菌 Biot205。*cry3Aa7* 基因在其中能正常表达, 并形成扁方形晶体。工程菌 Biot205 对榆蓝叶甲 (*Pyrrhalta aenescens*) 校正死亡率为 86.21%。该基因序列已在 EMBL、GenBank 中登记, 并被国际 Bt- δ 内毒素基因命名委员会正式命名为 *cry3Aa7*。

关键词: 鞘翅目害虫; Bt; *cry3Aa7* 基因; 基因克隆; 杀虫活性

Cloning and Expression of *cry3Aa7* Gene from *Bacillus thuringiensis* Strain Toxic to Coleopteran Pests

ZHANG Jie¹, SONG Fu-ping¹, LI Chang-you¹, CHEN Zhong-yi¹, TAN Jian-xin¹, HUANG Da-fang²

(¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094; ² Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: A 3.0kb DNA fragment, containing *cry3Aa* full length gene, was cloned and subcloned from Bt wild strain isolated in China. Sequence analysis showed that the gene contained 1932bps, encoded 644 amino acid, in which the three most rich amino acids were serine, leucine, threonine, with content 8.22%, 8.07%, 7.76% respectively. Molecular weight of the protein was 73ku with isoelectric point pI 5.165. This *cry3* gene sequence was registered in GenBank (Accession Number was AJ237900), and designated *cry3Aa7* gene as a novel gene by Bt Delta Endotoxin Nomenclature Committee. The *cry3Aa7* gene, transformed into *Bacillus thuringiensis acrystalliferous* mutant strain cryB⁻, could express 73ku protein normally. The engineered strain, Biot205 was highly toxic to elm leaf beetle (*Pyrrhalta aenescens*) of Coleoptera.

Key words: Coleopteran pests; *B. thuringiensis*; *cry3Aa7* gene; Clone; Insecticidal activity

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 能产生具有强烈杀虫作用的晶体蛋白, 对目标害虫高效专一, 对非目标生物安全, 半个世纪以来已广泛应用于多种农业和林业害虫, 特别是鳞翅目害虫的生物防治。鞘翅目害虫在农业、林业上重要性不

亚于鳞翅目。例如, 叶甲科马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*) 每年可造成减产 30%~50%, 是全球马铃薯和蔬菜生产的最大威胁^[1]; 榆蓝叶甲 (*Pyrrhalta aenescens*) 等其它叶甲科害虫近年来对林木的危害亦有加重之势。因此, 筛选分离抗鞘翅

收稿日期: 2001-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39980028); 国家“九五”、“863”计划项目 (101-03-01-01)

作者简介: 张 杰 (1965-), 男, 安徽阜南人, 副研究员, 博士, 主要从事杀虫防病遗传工程微生物的研究。黄大日方为通讯作者, Tel: 010-68919842; E-mail: dfh313@public.bta.net.cn

目害虫的 Bt 基因并加以开发利用,对我国农林害虫进行生物防治,将具有重要的社会、生态和经济效益。

1983 年 Krieg^[2]首次发现对鞘翅目害虫有活性的 Bt 菌株 *B. t. subsp. tenebroidis*(Btt)。1987 年 Herrnstadt^[3]克隆了第 1 个对鞘翅目害虫有效的 *cry3Aa* 基因,随后,导入 *cry3Aa* 基因的工程菌剂和转基因马铃薯分别于 1991 年和 1995 年投放市场^[4,5],在马铃薯甲虫的防治中发挥了巨大作用。近年研究还相继发现 *cry7A*、*cry8* 和 *cry18A* 等基因也能编码对鞘翅目害虫有活性的毒蛋白^[6,7]。尽管杀鞘翅目害

虫 Bt 菌株的筛选在我国已开展多年,但在基因水平上缺乏深入研究,目前尚无基因克隆成功的报道。最近,笔者对国内 Bt 菌株的基因资源进行了筛选和鉴定,发现菌株 Bt22 含有 *cry3Aa* 基因,对鞘翅目叶甲科害虫榆蓝叶甲的毒力较标准菌株 Btt 高出 1 倍以上。在此基础上,从 Bt22 菌株中分离克隆了 *cry3Aa* 全长基因,并进行了表达研究。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株与质粒见表 1。

表 1 供试菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株/质粒 Strains/ plasmids	特性 Characterization	来源 Source
<i>E. coli</i> JM107	<i>El4⁻ (McrA⁻) thi⁻ 1 gyrA96 relA1 supE44</i>	本组保存 This lab
<i>E. coli</i> SCS110	<i>RpsI thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	法国 Dr. D. Lereclus 惠赠 Dr. D. Lereclus (France)
<i>B. thuringiensis</i> Bt22	自然菌株,含有 <i>cry3Aa</i> 基因 Wild strain of Bt containing <i>cry3Aa</i> gene	湖北省农业科学院 Bt 研究中心 Bt Research Center, Hubei Academy of Agri. Sci.
<i>B. thuringiensis</i> Btt	标准菌株,含有 <i>cry3Aa</i> 基因 Standard strain of Bt containing <i>cry3Aa</i> gene	美国 Dr. Dong Wu 惠赠 Dr. Dong Wu (USA)
<i>B. thuringiensis</i> Biot205	工程菌株,含有 <i>cry3Aa</i> 基因 Engineering strain containing <i>cry3Aa</i> gene	本研究构建 This study
pBlueSK(+)	<i>Amp^R, 3.0kb</i>	河北农业大学李国勋教授惠赠 Prof. Guoxun Li Hebei Agr. University
pBY33	<i>Amp^R cry3Aa, 6.0kb</i>	本研究构建 This study
pBY33-5/6/16	<i>Amp^R</i>	本研究构建 This study
pHT315	<i>Amp^R(E.coli), Er^R(Bt), 6.5kb</i>	法国 Dr. D. Lereclus 惠赠 Dr. D. Lereclus (France)
pHY512	<i>Amp^R(E.coli), Er^R(Bt), 9.5kb, cry3Aa7</i>	本研究构建 This study

LB 1/2 LB 培养基参见[8]; *E. coli* 质粒提取液参见[8]; Bt 质粒提取液溶液 I、II、III 参见[9]。内切酶、连接酶、琼脂糖等分别购自 Gibco、MBI 公司; DNA 回收柱购自 Supucol 公司; ³²P dCTP 购自福瑞公司,标记采用 Promega 公司的 Random Primer Kit。

1.2 研究方法

Bt 质粒 DNA 提取方法参见[9]; 从 Agarose 凝胶中回收 DNA 片段采用回收柱方法,参见 Supucol 公司产品说明。Southern Blotting 方法参见[8]; 探针制备按宋福平等方法^[10]进行 PCR 扩增,得到 *cry3Aa* 基因 1.38kb 片段,纯化后用 Random Primer Labeling Kit 标记; DNA 序列测定由宝生物公司 (TaKaRa) 完成; Bt 转化方法参见[11]; SDS-PAGE

分析方法参见[8]。

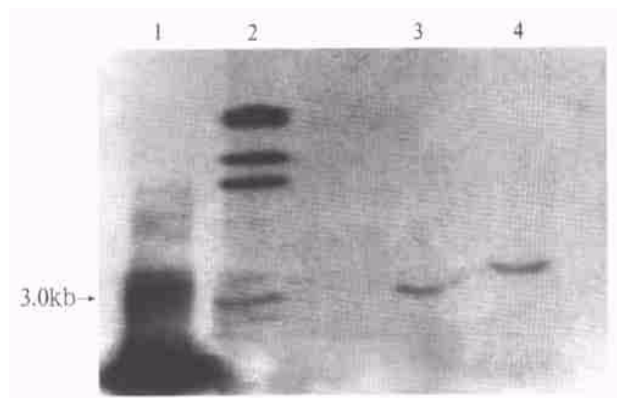
对榆蓝叶甲 (*Pyrrhulta aenescens*) 室内杀虫活性测定: Bt 菌株在 LB 液体培养基中活化过夜,以 1% 量接种于 1/2 LB 液体培养基中,230r/min 培养 30~40h,离心,无菌水洗沉淀 1 次,恢复到原体积备用。剪取合适的榆树枝叶,清洗,晾干,分别浸润 Bt 菌液 10s,取出,自然晾干,放入广口瓶中,在枝条基部裹以湿润棉球。每瓶分别接入 2~3 龄的榆蓝叶甲幼虫(黄褐色),用纱布、保鲜膜封口,室温放置 (25~28℃),24~120h 后调查幼虫死亡情况。

2 结果与分析

2.1 Southern Blotting 分析

以 S5un3/S3un3 引物对^[10]扩增 Bt22 质粒

DNA,琼脂糖电泳,回收 *cry3Aa* 基因的 1.38kb 扩增产物,用³²P dCTP 标记,作为探针,杂交质粒 Hind III 完全酶切片段,在 3.0kb 有 1 条阳性带,这个片段中可能含有 *cry3A* 全长基因,这个结果还说明在 Bt22 质粒上只有 1 个拷贝的 *cry3Aa* 基因存在。杂交结果见图 1。



1. *cry3Aa* gene 1.38kb; 2. λ DNA/ Hind III; 3. Bt22 plas mid/ Pst I; 4. Bt22 plas mid/ Hind III

图 1 Bt22 质粒 Southern Blotting 结果

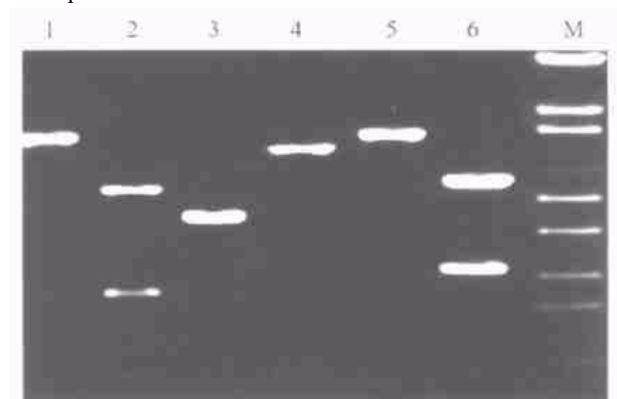
Fig.1 Southern Blot analysis of plasmid from Bt22 isolate

2.2 含 *cry3Aa* 基因 3.0kb 大片段的克隆

根据杂交结果,从凝胶中回收、纯化 Bt22- Hind III 3.0kb 片段,将此片段与 pBlueScript SK(+)-Hind III 脱磷酸化修饰的载体 2:1 相连接,转化 JM107,以 PCR 方法筛选得到含 *cry3Aa* 的阳性重组质粒,命名为 pBY33。图 2 为重组质粒 pBY33 (6.0kb) 的限制性酶切分析结果。

2.3 *cry3Aa* 基因亚克隆

pBY33 *EcoRI* 完全酶切得到 3 种片段 0.67、

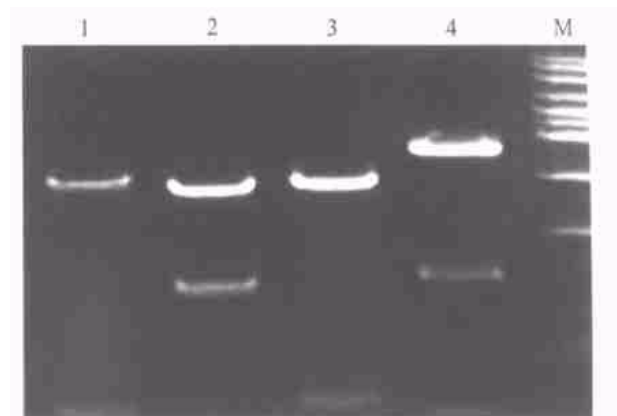


1. pBY33/ BamHI; 2. pBY33/ EcoRI; 3. pBY33/ Hind III; 4. pBY33/ Pst I; 5. pBY33/ Sal I; 6. pBY33/ Xba I; M. λ DNA/ EcoRI 301

图 2 重组质粒 pBY33(6.0kb) 的限制性酶切分析

Fig.2 Restriction Enzyme analysis of recombinant plasmid pBY33

1.6 和 3.7kb,与载体连接后,转化 JM107,筛选得到重组质粒分别为 pBY33-5 (0.72kb)、pBY33-16 (0.67kb) 和 pBY33-6 (1.6kb),图 3 为亚克隆重组子酶切鉴定结果。



1. pBY33-16/ EcoRI; 2. pBY33-6/ EcoRI; 3. pBY33-5/ EcoRI + Hind III; 4. pBY33/ EcoRI; M. 1 kb ladder (1.0 - 9.5kb)

图 3 3 种亚克隆重组质粒酶切分析结果

Fig.3 Restriction enzyme analysis of subclone plasmids

2.4 *cry3Aa* 基因序列测定与分析

亚克隆 pBY33-5、pBY33-6、pBY33-16 由北京宝生物公司负责序列测定。本研究克隆的 *cry3Aa* 基因编码区为 1932bps。与已发表的 *cry3Aa4* 相比,本研究克隆的 *cry3Aa* 与其同源率为 99%,该基因核苷酸序列已在 EMBL 和 GenBank 中登记,Accession number 为 AJ237900,并由国际 Bt- δ -内毒素基因命名委员会正式命名为 *cry3Aa7*。

2.5 *Cry3Aa7* 氨基酸序列及蛋白质特性分析

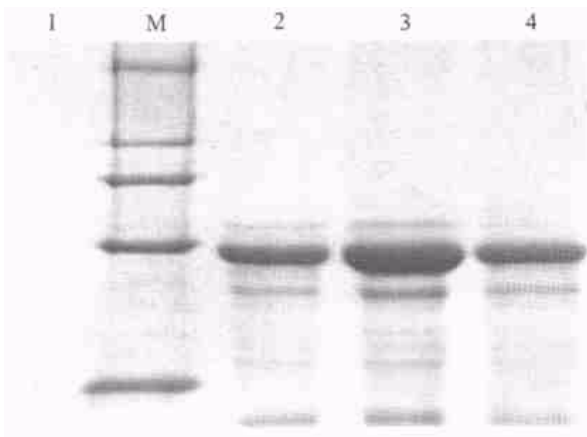
Cry3Aa7 蛋白由 644 个氨基酸组成(由 DNA 序列推导的氨基酸序列结果从略),分子量为 73.1 ku。该蛋白等电点为 pH5.165,属弱酸性蛋白,丝氨酸(Ser)、亮氨酸(Leu)、苏氨酸(Thr) 3 种氨基酸含量最高,分别为 8.22%、8.07%、7.76%。

2.6 *cry3Aa7* 基因表达载体的构建

将 *cry3Aa7* 基因克隆于 *E. coli*-Bt 穿梭载体 pHT315 上,得到重组质粒 pHY512,电击转化 Bt 无晶体突变株 *cryB⁻*,经过质粒酶切分析、PCR 鉴定,筛选出阳性转化子。

2.7 SDS-PAGE 分析结果

挑选上述阳性转化子,进行光学镜检,观察到方形晶体存在。刮取菌苔进行 SDS-PAGE 电泳,可见 *cry3Aa7* 基因在 Bt 无晶体突变株中能正常表达,产生 67ku 的蛋白条带(体内蛋白酶解造成的),结果见图 4。该转化子命名为 Biot205。



1. *cryB*⁻; 2. Btt; 3. Bt22; 4. Biot205; M. Protein marker (212, 116, 97, 66, 40ku)

图 4 *cry3Aa7* 基因在 Bt 无晶体突变株中的表达

Fig. 4 Expression of *cry3Aa7* gene in Bt acrySTALLIFEROUS mutant *cryB*⁻

表 2 Biot205 对榆蓝叶甲室内杀虫活性测定

Table 2 Bioassay result of engineered Bt strain Biot205 to *Pyrrhalta aenescens*(result of 96 hours)

样品 Sample	处理(稀释倍数) Dilution	重复 Repeat	总虫数 Larvae number	死虫数 Died larvae	死亡率(%) Mortality	校正死亡率(%) Coorrected mortality
1/2LB	1 ×	2	30	1	3.33	/
<i>CryB</i> ⁻	1 ×	2	30	0	0	/
Bt22	1 ×	2	30	30	100	100
	10 ×	2	30	28	96.67	96.56
Btt	1 ×	2	30	30	100	100
	10 ×	2	29	10	34.48	32.22
Biot205	1 ×	2	30	26	86.67	86.21
	10 ×	2	30	4	13.33	10.34

易被源蛋白酶的降解为 67ku 的多肽^[4]。在细胞生长 8 ~ 20h 这段时间内,能检测到 73ku 的全长蛋白,随后,这些蛋白就相继被降解为 67ku 等多肽(结果从略)。

References

- [1] Plant Protection Station, Ministry of Agriculture . Potato Leaf Beetle . Beijing : China Agriculture Press , 1994 . (in Chinese) 农业部植保站植检处 . 马铃薯甲虫 . 北京 : 中国农业出版社 , 1994 .
- [2] Krieg A , Huger A M , Lange G A , Schnetter W . *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebroidis* , a new pathotype effective against larvae of Coleoptera . *J. Appl. Entomology* , 1983 , 96 : 500 - 508 .
- [3] Herrnstadt C , Gilroy T E , Sobie D A , Bennett B D , Gaertner F . A novel *cry* gene from the strain of *Bacillus thuringiensis* with active against coleopteran insects . *Gene* , 1987 , 57(1) : 37 - 46 .
- [4] Entwistle P F , Cory J S , Bailey M J . *Bacillus thuringiensis* , An Environmental Biopesticide : Theory and Practice . UK : Wiley Chichester Press , 1993 : 125 - 146 .
- [5] Nicholas D , Stephen E . Transgenic Plant and Insect Pests Biocontrol . USA : John Wiley & Sons Press , 1997 : 1 - 18 .
- [6] Wasano N , Yasunaga A C , Sato R , Komato T . Spherical parasporal inclusions of the lepidoptera-specific and coleoptera-specific Bt strains : a comparative electron microscopic study . *Curr. Microbiol* , 2000 , 40(2) : 128 - 131 .
- [7] Zhang J , Schairer H U , Lereclus D , Agaisse H . Cloning and analysis of the first *cry* gene from *Bacillus popilliae* . *J. Bacterial* . 1997 , 179 : 4336 - 4341 .
- [8] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning : a Laboratory Manual* , Second Edition , Cold Spring Harbor Lab Press , 1989 .
- [9] Narva K E , Payne J M , Schwab G E , Kenneth E . Novel Bt microbes active against nematodes , and genes encoding novel nematode active toxins cloned from Bt isolates . EP0462721 A2 , 1991 : 8 .
- [10] Song F P , Zhang J , Chen Z Y , Huang D F . Establishment of PCR-RFLP identification system of *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* . *Scientia Agricultura Sinica* , 1998 , 31(3) : 13 - 18 . (in Chinese) 宋福平 , 张 杰 , 陈中义 , 黄大日方 . 苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立 . 中国农业科学 , 1998 , 31(3) : 8 - 13 .
- [11] Lereclus D , Arantes O , Chauvaux J , Lecadet M . Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in Bt . *FEMS Microbiology Letters* , 1989 , 60 : 211 - 217 .