

PCR-RFLP 筛选 DNA 文库克隆 Bt *cry* 基因的研究

陈中义¹, 吴 限¹, 张 杰¹, 宋福平¹, 管 宇¹, 黄大昉^{1,2}

(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: Bt 菌株 C002 对水稻二化螟、甜菜夜蛾具有高毒力, PCR-RFLP 鉴定含有 *cry1Aa*、*cry2Ab*、*cry1Ca* 和未知杀虫蛋白基因 *cryX* 等, 其中 *cry1Ca* 位于染色体 DNA 6~9 kb 的 EcoR I 片段。染色体和质粒 DNA 分别经 EcoR I 完全酶切和 Sau3A I 部分酶切、电泳回收 6~9 kb 片段。E. coli-Bt 穿梭载体 pHT315 分别与目的 DNA 连接、转化大肠杆菌感受态细胞后获得了相应的 DNA 文库。约 50 个转化子合为一个转化子池, 采用 PCR-RFLP 方法快速检测, 分别从约 2 000 质粒 DNA 文库转化子和 400 个染色体文库转化子中筛选获得了 *cry1Aa*、*cry2Ab*、*cry1Ca* 和未知基因 *cryX* 的阳性克隆, 相应命名为 pHT-1Aa、pHT-1Ca、pHT-2Ab 和 pHT-X。限制酶切分析表明, 含有 *cry1Aa*、*cry1Ca* 和 *cry2Ab* 基因的克隆片段均含有相应基因的保守物理图谱。进一步将这些质粒分别导入 Bt 无晶体突变株 CryB⁻, SDS-PAGE 分析表明, 只有 *cry1Ca* 表达了约 130 ku 杀虫晶体蛋白。初步杀虫生测结果显示, *cry1Ca* 对甜菜夜蛾具有高毒力, 7 d 校正死亡率为 100%。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; DNA 文库; PCR-RFLP; 杀虫蛋白基因; 基因克隆

Cloning of Bt *cry* Genes by Rapid Screening of DNA Libraries with PCR-RFLP

CHEN Zhong-yi¹, WU Xian¹, ZHANG Jie¹, SONG Fu-ping¹,
GUAN Yu¹, HUANG Da-fang^{1,2}

(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: *Bacillus thuringiensis* (Bt) strain C002 contains *cry1Aa*, *cry2Ab*, *cry1Ca* insecticidal crystal genes and an unknown gene *cryX*, among which *cry1Ca* is located in a 6-9 kb EcoR I fragment of the chromosomal DNA. The total DNA and the plasmids DNA libraries of C002 were constructed in Bt-E. coli shuttle plasmid pHT315 by inserting 6-9 kb chromosomal and plasmid DNA fragments prepared respectively with EcoR I complete and Sau3A I partial digestion. On the basis of every 50 transformants pooled together from 5-10 tubes, the pools containing about 2 000 transformants from the plasmids DNA library and 400 transformants from the total DNA library were rapidly screened by PCR-RFLP. Clones containing *cry1Aa*, *cryX*, *cry1Ca*, and *cry2Ab* were isolated and named as pHT-1Aa, pHT-X, pHT-1Ca and pHT-2Ab respectively. Restriction analysis indicated that pHT-1Aa, pHT-1Ca and pHT-2Ab had the typical physical map of the homologous *cry* genes. Furthermore, each plasmid was transferred into Bt acrySTALLIFEROUS strain CryB⁻ by electroporation. SDS-PAGE result showed that transformant of pHT-1Ca expressed 130 ku protein and bioassay result proved its high toxicity against *Spodoptera exigua* 1st instar larvae with 100% corrected mortality.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; DNA library; PCR-RFLP; *cry* genes; Gene cloning

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是目前全球应用最广泛最有效的微生物杀虫

收稿日期: 2002-11-15

基金项目: 国家“十五”863 计划课题资助项目(2001-AA-214011)

作者简介: 陈中义(1967-), 男, 安徽宿松人, 博士, 副研究员, 从事微生物分子生物学与生物安全研究。Tel: 010-62817545; E-mail:

zhongyichen0920@hotmail.com

剂^[1]。Bt 对害虫的特异性毒杀作用主要是能够产生杀虫蛋白如 Cry 蛋白、Vip 蛋白。其中, Cry 蛋白为晶体蛋白, 目前已经报道的有 Cry1 ~ Cry40 等 40 类 200 多个^[2]。将 Bt *cry* 基因导入植物、微生物能够有效延长杀虫蛋白的田间持效期、扩大防治对象和提高防治效果, 其中抗虫棉花、玉米和一系列重组微生物农药产品已经产业化和商品化。

甜菜夜蛾是我国重要农业害虫, 不仅给蔬菜生产造成了巨大损失, 而且对棉花、玉米等重要农作物的危害也日趋严重。国内对棉铃虫、亚洲玉米螟、马铃薯甲虫等害虫高效基因的研究已有不少报道, 但对甜菜夜蛾等害虫高效的 *cry* 基因则比较少^[3-5]。因此, 有必要加强相关 *cry* 基因的分离克隆研究。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	基因型 Gene type	来源 Origin
菌株 Strains		
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>		
C002	野生型 Wild type	This lab
Cry B ⁻	AcrySTALLIFEROUS strain	This lab
Cry B ⁻ 315	Bt Cry B ⁻ with pHT315	This research
Cry B ⁻ 2Ab	Bt Cry B ⁻ with pHT-2Ab	This research
Cry B ⁻ 1Aa	Bt Cry B ⁻ with pHT-1Aa	This research
Cry B ⁻ 1Ca	Bt Cry B ⁻ with pHT-1Ca	This research
Cry B ⁻ X	Bt Cry B ⁻ with pHT-X	This research
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>		
JM110	<i>dam</i> <i>dcn</i> <i>supE44</i> <i>hsdR17</i> <i>thi</i> <i>leu</i> <i>rpsL</i> <i>lacY</i> <i>galK</i> <i>galT</i> <i>ara</i> <i>tonA</i> <i>thr</i> <i>tsX</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F ⁺ [<i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacI^q</i> <i>lacZM</i> Δ 15]	This lab
质粒 Plasmids		
pHT315	Amp ^r , Erm ^r , <i>E. coli</i> -Bt shuttle plasmid	Dr. D. Lerechus
pHT-2Ab	pHT315 carried DNA fragment with <i>cry2Ab</i> gene	This research
pHT-1Aa	pHT315 carried DNA fragment with <i>cry1Aa</i> gene	This research
pHT-1Ca	pHT315 carried DNA fragment with <i>cry1Ca</i> gene	This research
pHT-X	pHT315 carried DNA fragment with <i>cryX</i> gene	This research

1.1.2 培养基与抗生素 大肠杆菌和 Bt 分别采用 LB 和 1/2 LB 培养基。氨苄青霉素(Amp)和红霉素(Erm)为 Sigma 公司产品, 使用浓度分别为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (大肠杆菌)和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Bt); IPTG 和 X-gal 购自北京六合通生物工程公司。

1.1.3 酶与生化试剂 DNA 限制内切酶、T₄DNA 连接酶和蛋白质高分子量 Marker 购自 Gibco BRL 公司, dNTPs、Taq 酶等购自北京鼎国生物技术发展公司, PCR 引物 k5un2/k3un2、S5un2/S3un2 参照文献^[7, 8], 由上海生工生物工程有限公司合成; 其它试剂为市售分析纯产品。

1.1.4 供试昆虫与人工饲料 甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)标准试虫由本所棉铃虫组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 重组 质粒 DNA 提取、酶切电泳分

PCR 技术应用用于 Bt *cry* 基因鉴定具有快速、灵敏和简便的特点^[6-8], 但采用 PCR 技术筛选 DNA 文库分离克隆 Bt 基因的研究报道尚未见到。

笔者采用 PCR-RFLP 方法直接筛选 Bt DNA 文库, 从对甜菜夜蛾高毒力的国内 Bt 分离株 C002 中分离具有 *cry1Aa*、*cry1Ca*、*cry2Ab* 特异限制多态性和未知基因 *cryX* 的阳性克隆, 其中 *cry1Ca* 基因在 Bt 无晶体突变株中获得了有效表达, 并对甜菜夜蛾有高效毒杀作用。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株和质粒见表 1。

析、目的片段回收、连接和大肠杆菌遗传转化采用标准方法^[9]。Bt 质粒 DNA 和染色体 DNA 提取和遗传转化见文献^[10, 11]。

1.2.2 DNA 文库 PCR-RFLP 快速筛选 转化子每 5 ~ 10 个一组接入 5 ml LB 试管, 培养 8 ~ 10 h。5 ~ 10 管约 50 个转化子为一个转化子池(transformants pool), 每管取 100 μl 培养物混合, 收集菌体, 提取质粒, 溶于 200 μl 纯水。取 2 μl 按文献进行 *cry* 基因特异 PCR 检测^[8]。对含阳性克隆的转化子池的试管及试管中的单个转化子再进行 PCR 筛选, 直至获得阳性克隆。

1.2.3 蛋白 SDS-PAGE 分析 Bt 蛋白电泳样品制备和 SDS-PAGE 电泳按文献进行^[3]。

1.2.4 杀虫活性检测 供试 Bt 菌株接种 1/2LB, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 60 h。以菌液:人工饲料 1:10 比例混合

人工饲料,接入甜菜夜蛾初孵幼虫试虫,25~26℃培养,7 d 调查结果。

2 结果与分析

2.1 Bt C002 DNA 文库的构建

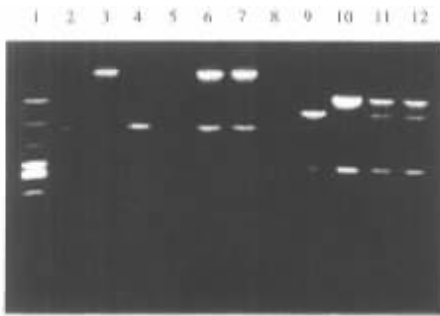
提取 Bt C002 菌株质粒和总 DNA,PCR-RFLP 鉴定表明,该菌株含有 *cryIAa*、*cryICa*、*cry2Ab* 和未知基因 *cryX* 等 4 种基因,其中 *cryICa* 位于染色体 6~9 kb EcoR I DNA 片段上。分别以 Sau3A I 部分酶切 C002 质粒 DNA 和 EcoR I 完全酶切总 DNA,回收 6~9 kb 片段。载体 pHT315 分别经 BamH I 和 EcoR I 酶切和碱性磷酸酶处理后与相应的回收产物连接转化大肠杆菌 JM110,涂布含 X-gal、IPTG 和青霉素平板,37℃培养。

2.2 PCR-RFLP 快速筛选阳性克隆

挑选白色转化子菌落,通过 PCR-RFLP 筛选了质粒 DNA 文库的 40 多个转化子池约 2 000 多个转化子,分别获得了 5'和 3'端特异引物均有 *cryIAa*、*cry2Ab* 和 *cryX* 特异扩增产物的克隆,并分别命名为 pHT-1Aa、pHT-2Ab 和 pHT-X。对染色体 DNA 文库进行筛选,在约 400 个转化子中即获得了 1 个 *cryICa* 阳性克隆,命名为 pHT-1Ca。

2.3 阳性克隆的鉴定

提取阳性克隆质粒,PCR-RFLP 鉴定结果(图 1)

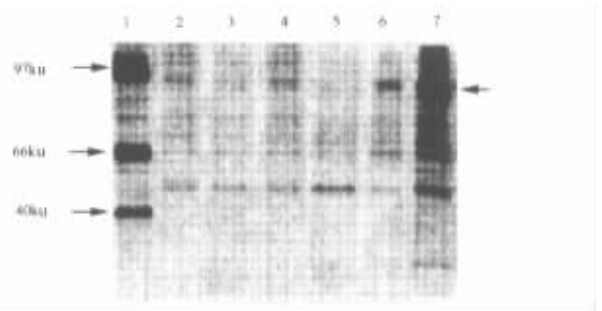


1: λ DNA/EcoR I 1301 ; 2: RFLP of PCR production of pHT315-2Ab with Hinc II + Msp I ; 3~7: RFLP of 3'-primers PCR production with Pst I + Xba I of pHT-1Aa, pHT-X, pHT-1Ca, and plasmids and genomic DNA from C002 respectively ; 8~12: RFLP of 5'-primers PCR production with EcoR I + Xba I of pHT-1Ca, pHT-1Aa, pHT-X, and plasmid DNA and genomic DNA from C002 respectively

图 1 Bt C002 菌株质粒、总 DNA 和阳性克隆的 PCR-RFLP 分析

Fig. 1 PCR-RFLP of the genomic DNA, plasmid DNA of Bt C002 and the positive clones

显示 4 个阳性克隆质粒均具有相应基因的特异带型。质粒 DNA 分别转化 Bt *CryB*⁻ 无晶体突变株后,显微观察和 SDS-PAGE 分析发现,只有 *cryICa* 转化子表达了约 130 ku 的杀虫蛋白(图 2)。限制酶切分析表明,pHT-1Aa、pHT-2Ab 和 pHT-1Ca 均含有相应全长基因保守物理图谱(结果从略)。



1: 蛋白分子量标准 Marker ; 2: Bt *CryB*⁻ ; 3: Bt *CryB*⁻ with pHT315 ; 4: Bt *CryB*⁻ with pHT-2Ab ; 5: Bt *CryB*⁻ with pHT-1Aa ; 6: Bt *CryB*⁻ with pHT-X ; 7: Bt *CryB*⁻ with pHT-1Ca

图 2 携带阳性克隆质粒的 Bt 无晶体突变株的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of Bt *CryB*⁻ strains carrying plasmids from positive clones

2.4 转化子杀虫生物活性检测

根据克隆基因在无晶体突变株表达结果,以 1/2 LB 培养基培养 *cryICa* 的 *CryB*⁻ 转化子,初步测定对甜菜夜蛾的杀虫活性,7 d 校正死亡率为 100% (表 2)。

3 讨论

3.1 DNA 文库的构建策略

构建 DNA 文库一般采用 cosmid 载体,外源 DNA 约 20 kb,而 Bt *cry* 基因大小约为 4.0 kb。本研究以 Bt-*E. coli* 穿梭质粒 pHT315 为载体,分子操作简单,且可直接将阳性克隆质粒导入 Bt 无晶体突变株,进行基因鉴定和表达研究。

Bt 质粒 DNA 大小一般从几个 kb 到 200 多 kb,占细胞总 DNA 的 10% 左右。如果 Bt C002 菌株质粒 DNA 总量以 600kb 计算,根据 Clarke 公式: $N = \ln(1-p) / \ln(1-x/y)^{121}$,对 6~9 kb DNA 片段,理论上以 99.99% 概率获得目的基因所需转化子数目为 609~916 个。为获得全长基因,笔者通过 Sau3AI 部分消化质粒 DNA,构建 6~9 kb DNA 文库。笔者获得了约 2 000 个克隆,理论上完全覆盖了

表 2 Cry1Ca 对甜菜夜蛾的杀虫活性

Table 2 Insecticidal activity of Cry1Ca against *Spodoptera exigua* 1 instar larvae

样本 Sample	虫数 Tested larvae	死亡 Death	死亡率 Mortality (%)	校正死亡率 Corrected M.(%)
CryB ⁻ 1Ca	60	60	100	100
CryB ⁻	60	25	41.7	-
H ₂ O	60	0	0	-

了全部质粒 DNA,并通过筛选,获得了相应 3 个 *cry* 基因阳性克隆。

对定位于染色体的 *cry1Ca* 基因,如果部分酶切建库,以总 DNA 为 5 000 kb 计算则至少需要 5 000 个克隆才能获得 1 个阳性克隆。根据该类基因无 EcoR I 位点的特点,笔者通过 EcoRI 完全酶切和 PCR-RFLP 检测,将该基因定位于 6~9 kb 的 EcoR I 片段。在约 400 个转化子中获得了 1 个全长基因的阳性克隆,既避免了 Southern 杂交基因定位的麻烦,又减少了工作量。

3.2 DNA 文库的筛选

PCR-RFLP 鉴定 Bt *cry* 基因始于 1993 年浅野真一郎^[6]和 Gleave^[13]对 Bt *cry2* 和 *cryV* 基因的研究,1996 年我国台湾学者 Kuo 建立了 *cryI* 的 PCR-RFLP 鉴定体系^[7]。在此基础上笔者和中山大学生物防治国家重点实验室也先后开展了有关研究^[6,8]。

Bt *cryI* 类基因编码区全长约 3.5 kb,这 2 对通用引物 PCR 产物覆盖了 3.0 kb 约 85% 的编码区^[7,8]; *cry2* 类基因编码区全长约 1.8 kb,这 1 对通用引物 PCR 产物覆盖了约 78% 的编码区^[8]。如果每试管接种转化子 10 个,每个转化子池含 50 个左右转化子,1 个 2 000 个转化子的文库可以分为近 40 个转化子池。对含 1 个基因的转化子池,则只需对 5 支试管进行进一步检测,最后从约 10 个转化子便可确定阳性克隆。本研究中目的 DNA 片段(6~9 kb)远大于目的基因(3.9 kb),且所用引物覆盖了目的基因绝大部分区域,有利于减少筛选工作量和获得完整基因克隆。

PCR-RFLP 筛选转化子池,避免了 Southern 杂交的麻烦,并能直接确定阳性克隆基因的种类。理论上通过转化子池、试管和试管中转化子 3 次 PCR 检测即可获得阳性克隆,方法简单、实用、快速。

3.3 Bt *cry* 基因的表达与杀虫活性

本研究获得的 4 个阳性克隆中, *cry1Ca* 在无晶体突变株表达了 130 ku 的杀虫蛋白,并显示了对甜菜夜蛾高效,为进一步构建高效重组微生物和转基因

植物提供了新的基因来源。pHT-1Aa 和 pHT-2Ab 都具有相应全长基因的保守物理图谱, *cry2Ab* 为沉默基因,在 CryB⁻ 中不表达是正常的^[14],该基因的序列分析和融合表达及毒力测定已经完成^[15]。笔者对 *cry1Aa* 进行部分序列测定发现在其 5' - 编码区 200 氨基酸处插入了一段强终止密码子序列(结果未显示),因此,该基因可能是转座或插入突变的结果。这与 C002 菌株对棉铃虫和玉米螟初孵幼虫毒力很低(未发表结果)相符。对 *cry1Ca*、pHT-X 的深入研究正在进行中。

致谢:本所棉花害虫组提供了甜菜夜蛾试虫和所需人工饲料,在此致以衷心的感谢。

References

- [1] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775 - 806.
- [2] Crickmore N. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2002, <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt/index.html>.
- [3] 张杰,宋福平,李长友,陈中义,檀建新,黄大昉.对鞘翅目害虫高毒力基因 *cry3Aa7* 的分离克隆. *中国农业科学*, 2002, 35(6): 650 - 653.
Zhang J, Song F P, Li C Y, Chen Z Y, Tan J X, Huang D F. Cloning and expression of *cry3Aa7* gene from *Bacillus thuringiensis* strain toxic to Coleopteran. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(6): 650 - 653. (in Chinese)
- [4] 檀建新,张杰,宋福平,陈中义,王开梅,黄大昉.苏云金芽孢杆菌 *cry1Ab13* 基因的克隆及表达研究. *微生物学报*, 2002, 42(1): 40 - 44.
Tan J X, Zhang J, Song F P, Chen Z Y, Wang K M, Huang D F. The study on cloning and expression of Bt *cry1Ab13* gene. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(1): 40 - 44. (in Chinese)
- [5] 孙明,吴岚,刘子铎,喻子牛.利用苏云金芽孢杆菌非芽胞特异性的启动子表达 *cry1Ac10* 和 *cry1C* 基因. *农业生物技术学报*, 2000, 8(3): 229 - 232.
Sun M, Wu L, Liu Z D, Yu Z N. Expression of *Bacillus thuringiensis cry1Ac10* and *cry1C* genes under the nonsporulation-dependent promoter. *Journal of Agricultural Biotechnol-*

- gy, 2000, 8(3):229-232. (in Chinese)
- [6] 林毅, 黄志鹏, 陈建武, 黄必旺, 关雄. 苏云金芽孢杆菌 ICP 基因 PCR 鉴定的策略与进展. 农业生物技术学报, 2000, 8(1):56-58.
- Lin Y, Huang Z P, Chen J W, Huang B W, Guan X. Strategies and advances on PCR identification for insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2000, 8(1):56-58. (in Chinese)
- [7] Kuo W S, Chak J F. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62(4):1369-1377.
- [8] 宋福平, 张杰, 丁之铨, 黄大昉, 谢天健, 杨自文, 戴莲韵, 李国勋. Bt cry 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立. 中国农业科学, 1998, 31(3):13-18.
- Song F P, Zhang J, Ding Z Q, Huang D F, Xie T J, Yang Z W, Dai L Y, Li G X. Establishment of PCR-RFLP identification system of cry-type genes from *Bacillus thuringiensis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 1998, 31(3):13-18. (in Chinese)
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Lab Press, 1989.
- [10] Kronstad J W, Schnepf H E, Whiteley H R. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Journal of Bacteriology*, 1983, 154:419-428.
- [11] Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, Lecadet M. Transformation and expression of a cloned delta endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 51(1):211-217.
- [12] Clarke L, Carbon J. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, 1976, 9:91-97.
- [13] Gleave A P, Williams R, Hedges R J. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of cryV-like insecticidal protein genes and characterization of a cryV gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59(5):1683-1687.
- [14] Widner W R, Whiteley H R. Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172:2826-2832.
- [15] 陈中义, 李长友, 刘加宝, 张杰, 黄大昉. 苏云金芽孢杆菌沉默基因 cry2Ab3 在大肠杆菌中表达及杀虫活性研究. 微生物学报, 2002, 42(5):561-566.
- Chen Z Y, Li C Y, Liu J B, Zhang J, Huang D F. Expression and insecticidal activities analysis of silent gene cry2Ab3 from *Bacillus thuringiensis* C002 strain. *Microbiologica Sinica*, 2002, 42(5):561-566. (in Chinese)

(责任编辑 孙雷心)