

# W544F 定点突变提高苏云金杆菌 Cry1Ac 蛋白的稳定性

王发祥<sup>1</sup>, 夏立秋<sup>1,2</sup>, 丁学知<sup>1</sup>, 赵新民<sup>1</sup>, 单世平<sup>1</sup>, 莫湘涛<sup>1</sup>, 张友明<sup>1</sup>, 喻子牛<sup>2</sup>

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 长沙 410081;

2. 华中农业大学生命科学与技术学院, 农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要** W544 是 Cry1Ac 蛋白上独特于其它 Cry 类蛋白的一个氨基酸, 它与 F578 和 F604 一起组成一个“螺旋桨状”的疏水簇, 通过疏水相互作用维持蛋白的三维结构稳定. 本研究通过定点突变将 W544 保守地替换为苯丙氨酸, SDS-PAGE 分析结果表明其纯化的原毒素对紫外照射、胰蛋白酶处理和室温存贮的稳定性相对于野生 Cry1Ac 都有一定程度的提高; 经原子力显微镜观察, 发现 W544F 产生的晶体两个顶点间的垂直距离比野生型 Cry1Ac 约长 0.6  $\mu\text{m}$ , 且晶体表面不及野生型光滑; 此外, W544F 与野生 Cry1Ac 的杀虫活性相似, 但经过紫外光照射 9 h 后, 其保留的杀虫活性比野生型高 4 倍以上. W544F 突变较好地解决了 Cry1Ac 毒素蛋白田间应用不持久的问题, 具有重要的应用价值.

**关键词** Cry1Ac 蛋白; 定点突变; 色氨酸; 苯丙氨酸; 稳定性

**中图分类号** Q71; Q93

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2008)10-1999-04

Cry1Ac 蛋白是由苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)产生的一种  $\delta$ -内毒素, 是目前所知的对鳞翅目昆虫活性最强、研究和应用最广泛的杀虫晶体蛋白之一<sup>[1,2]</sup>. 然而, Cry 蛋白对日光的稳定性一直是制约其田间应用的一个主要问题, 当其暴露在日光下时, Cry 蛋白分子结构中的发色体(主要为色氨酸)会在紫外光的激发下和分子氧相互作用, 产生单线态氧攻击色氨酸的吲哚杂环, 从而造成蛋白结构的损害, 降低其生物活性<sup>[3,4]</sup>. Cry 蛋白都具有 3 个结构域<sup>[1]</sup>, 其中结构域 III 在维持其结构稳定性方面起到重要作用<sup>[5]</sup>. W544 是 Cry1Ac 蛋白结构域 III 中唯一的色氨酸, 其位置和特点在 Cry 类蛋白中比较独特. 本研究将 W544 保守地替换成苯丙氨酸(F), 在不影响其活性的前提下, 大大降低了 Cry1Ac 蛋白对紫外线的敏感性, 同时还一定程度上增强了其对蛋白酶的稳定性.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

BH-2 型显微镜, 日本 Olympus 公司; SPA-400 型原子力显微镜, 日本 Seiko 公司; 15W 紫外线发射灯管, 荷兰 Philips 公司; DYY-III-6B 型电泳仪, 北京六一仪器厂.

胰蛋白酶(Trypsin)、苯甲基磺酰氟(PMSF)和二硫苏糖醇(DTT)均购自美国 Amresco 公司; QuikChange 定点突变试剂盒购自美国 Stratagene 公司; 其它试剂均为国产或进口分装分析纯.

### 1.2 质粒和菌株

质粒 pHTAc35 为含有 *cry1Ac5* (Genbank 登录号: M73248)全长的 pHT315 重组质粒<sup>[6]</sup>, 由本室构建; Cry/B 为 Bt 库斯塔克亚种无晶体突变株, 用于野生和突变 Cry1Ac 的表达, 为本室保存.

### 1.3 突变子的构建和表达

引物 W544F-F: 5'-GGAAAAATGGATGAATTACCGAAATTAACGTTGAGGTGAATCGGGG, W544F-

收稿日期: 2008-02-28.

基金项目: 国家“八六三”计划(批准号: 2006AA02Z187, 2006AA10A212)、教育部博士点基金(批准号: 20060542006)和国家自然科学基金(批准号: 30670052)资助.

联系人简介: 夏立秋, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物分子生物学研究. E-mail: Xialq@hunnu.edu.cn

R: 5'-CCCCGATTCACCTCAACGTTAATTTTCGGTAATTCATCCATTTTTTCC(下划线为突变位点), 以质粒 pHTAc35 为模板, 按突变试剂盒说明书获得突变的质粒 pHTAc35-W544F, 热转化 *E. coli*. DH5 $\alpha$ , 测序鉴定正确后按文献[7]方法电转化 Cry'B 并筛选阳性突变子.

#### 1.4 蛋白纯化

以蔗糖梯度密度离心法<sup>[8]</sup>纯化野生 Cry1Ac 和 W544F 的晶体, 冻干后保存. 取 10 mg 冻干晶体, 加入 10 mL 50 mmol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH = 10.5), 100  $\mu$ L 100 mmol/L 的 DTT 和终浓度为 10 mmol/L 的 PMSF, 于 4  $^{\circ}$ C 溶解 5 h 后离心 (转速 12000 r/min, 1 min); 上清液用 2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH = 4.0) 调节 pH 值至 5.05 左右, 于 4  $^{\circ}$ C 沉淀过夜, 离心 (转速 13200 r/min, 10 min), 所得沉淀即为纯化了的原毒素.

#### 1.5 稳定性分析

纯化的原毒素以 50 mmol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH = 9.5) 重悬浮, 超声波处理 5 s. 分装 11 个管中 (20  $\mu$ L/管), 分别进行以下处理: (1) 对照: 取 1 管按文献[7]方法进行 SDS-PAGE 分析; (2) 紫外 (UV) 稳定性: 取 3 管于紫外灯下直射 3, 6, 9 h, 进行 SDS-PAGE 分析; (3) 蛋白酶稳定性: 取 4 管分别加入 1  $\mu$ L 10 mg/mL 的 Trypsin 处理 15, 30, 45, 60 h, 进行 SDS-PAGE 分析; (4) 贮存稳定性: 取 3 管置于室温静置 (不遮光), 不做任何处理, 分别在 24, 48, 72 h 进行 SDS-PAGE 分析.

#### 1.6 普通显微镜和原子力显微镜观察

将 5  $\mu$ L 培养 48 h 的菌液以结晶紫染色, 在普通光学显微镜下观察晶体形态; 纯化的晶体用无菌水重悬浮, 超声波处理 5 s, 取 5  $\mu$ L 均匀地滴加在云母片上, 用原子力显微镜观察晶体形态.

#### 1.7 生物活性测定

纯化的原毒素以 Bradford 法<sup>[9]</sup>测定蛋白含量, 配制成 10  $\mu$ g/ $\mu$ L 的母液, 用紫外线照射 9 h, 按文献[7]的方法测定对棉铃虫幼虫 (购自中科院武汉病毒所) 的半致死浓度 (LC<sub>50</sub>).

#### 1.8 Cry1Ac 蛋白三维结构预测分析

以 Cry1Ac5 (Genbank 登录号: AAA22339) 蛋白为目标, 按文献[10]的方法预测分析其三维结构.

## 2 结果与讨论

### 2.1 W544 在 Cry1Ac 三维结构中的作用

W544 位于连接  $\beta$ 18 和  $\beta$ 19 片层结构的环上, 这一特点在所有的 Cry 类蛋白中是独特的 [图 1(A)]. 从 Cry1Ac 的三维结构看, W544 的侧链伸向蛋白分子内侧, 与  $\beta$ 20- $\beta$ 21 loop 上的 F578 和  $\beta$ 22 上的 F604 一起, 形成一个大的深埋的疏水簇, 通过疏水相互作用维系着 Cry1Ac 蛋白的稳定. 而且, F578, F604 和 W544 的苯环伸向同一个中心, 排列成一个倒的螺旋桨形状, 这一组织形式很可能直接关系着 Cry1Ac 蛋白的稳定性和生物活性 [图 1(B)]. 根据这一特点, 将 W544 保守地突变为 F544, 理论上会使 3 个苯环间的作用力更平衡, 从而更好地维持这种“螺旋桨”构象.

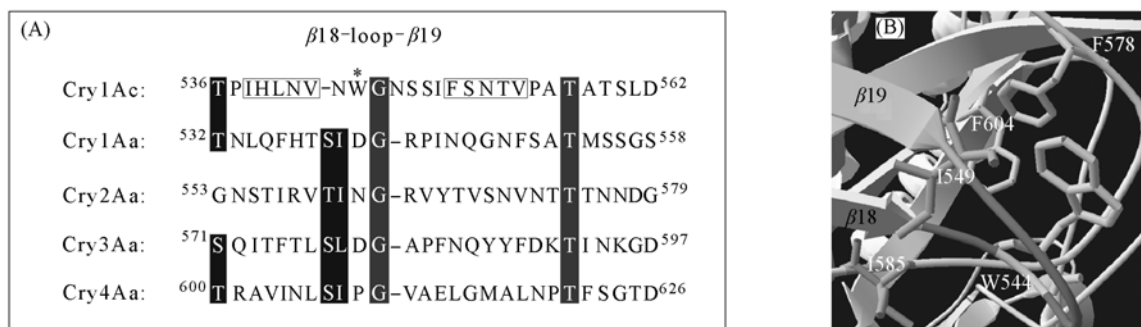
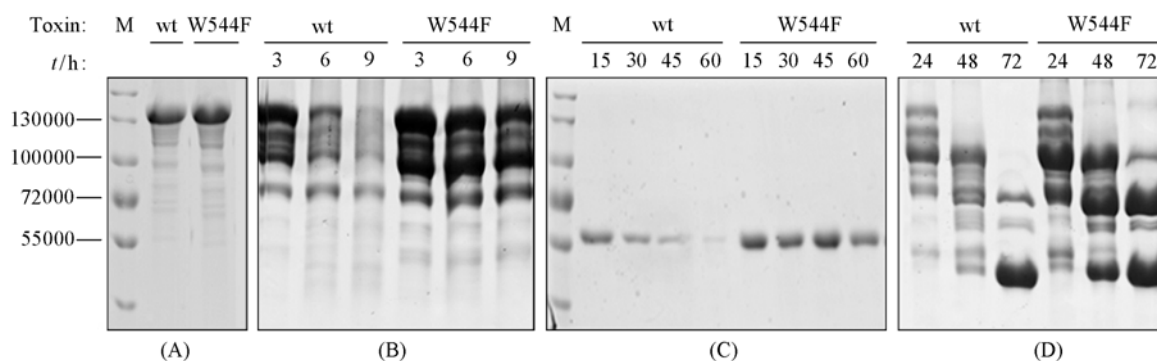


Fig. 1 Part sequence alignments of Cry1Ac with other Cry proteins(A) and part of the Cry1Ac crystal structure showing residue W544 contacting with their surrounding residues(B)

### 2.2 W544F 与野生型 Cry1Ac 的稳定性比较

以等电点沉淀法纯化野生型 Cry1Ac 和突变子 W544F 的原毒素, SDS-PAGE 分析没有明显差异

[图 2(A)]. 经过紫外线照射处理后, 产生不同程度的降解带. 但处理 3 h 后差别不明显; 处理 6 h 后, W544F 对紫外线的稳定性明显优于野生型 Cry1Ac; 当处理 9 h 后, 野生型 Cry1Ac 几乎完全降解, 而 W544F 则与处理 6 h 时相似[图 2(B)]. 可见, W544F 突变提高了 Cry1Ac 蛋白对紫外光的稳定性.



**Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the stability of purified protoxins of wide-type (wt) Cry1Ac and W544F**

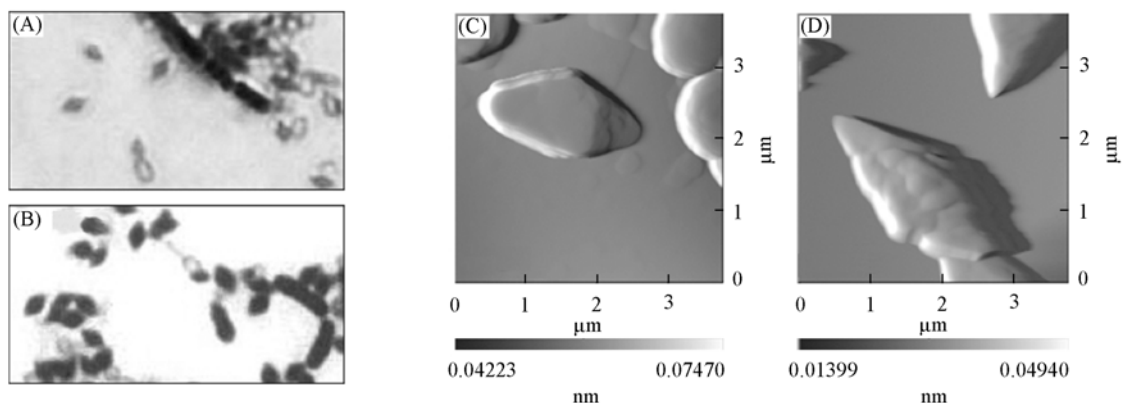
(A) No treatment; (B) treated with UV; (C) treated with trypsin; (D) preservation at room temperature.

W544F 突变还增强了 Cry1Ac 蛋白对胰蛋白酶的稳定性. 由图 2(C) 可见, 野生型 Cry1Ac 用胰蛋白酶处理 15 h 后 SDS-PAGE 分析仅可见到 65000 左右的蛋白带, 随着处理时间的增加, 65000 的蛋白带逐渐减弱; 而 W544F 则比较稳定, 随着处理时间的变化几乎无明显减弱.

在室温保存的条件下, W544F 也比野生型 Cry1Ac 稳定, 因为存贮 72 h 后, 与野生型 Cry1Ac 相比, W544F 尚有一条较大分子量的蛋白带没有完全降解[图 2(D)].

### 2.3 W544F 与野生型 Cry1Ac 晶体的形态比较

在普通显微镜[图 3(A)和(B)]下, 野生型 Cry1Ac 和 W544F 的晶体都为菱形, 形态差异不明显, 但 W544F 染色较深. 在原子力显微镜[图 3(C)和(D)]下, W544F 的晶体明显较野生型 Cry1Ac 的大, 其两个顶点间的垂直距离分别约为 2.4 和 1.8  $\mu\text{m}$ . 突变后晶体变大很可能与 Cry1Ac 蛋白分子内或分子间的作用力改变有关, 而晶体越大, 理论上对原毒素的保护作用会越大. 有趣的是, W544F 的晶体表面非常粗糙, 而野生型 Cry1Ac 的晶体表面相对较光滑, 这很可能是 W544F 在普通显微镜下观察染色较深的原因.



**Fig. 3 Morphologic observation by optics microscope (A, B) and atomic force microscope (C, D)**

(A) and (C) wide-type Cry1Ac; (B) and (D) W544F.

### 2.4 生物活性分析

由表 1 可见, W544F 和野生型 Cry1Ac 在紫外线照射之前对棉铃虫的杀虫活性相当. 经过紫外线处理 9 h 后, 野生型 Cry1Ac 的毒力显著下降, 其  $LC_{50}$  值大于 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 而 W544F 的  $LC_{50}$  值为 8.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 仍然保留着 68% 的杀虫活性 ( $LC_{50}$  之比), 是野生型的 4 倍以上. 因此, W544F 突变可较好地解决 Cry1Ac 田间应用中对紫外线不稳定的问题, 具有一定的应用价值.

W544 位于 Cry1Ac 三维结构的分子表面, 容易受到紫外光的影响, 这可能是突变效果显著的原因

之一. 另外, 将 W544 突变丙氨酸(A)、酪氨酸(Y)或半胱氨酸(C)后, 其对棉铃虫的活性大大降低; W544Y 和 W544C 突变还减弱了其对蛋白酶的稳定性(数据未列出). 这进一步证明了该位点疏水侧链的重要性, 而 W544F 突变可能改善了分子内部这一位点的疏水作用, 从而增强了稳定性.

**Table 1 Bioassay of protoxins of wt Cry1Ac and W544F against *H. armigera* larvae**

Protoxin	LC <sub>50</sub> (95% fiducial limits)/(μg · mL <sup>-1</sup> )		Relative toxicity after UV treatment (%)
	Before UV treatment	After UV treatment for 9 h	
wt Cry1Ac	5.60 (4.76—6.73)	>32	<17
W544F	6.07 (5.17—7.30)	8.95 (7.08—12.03)	68

## 参 考 文 献

- [1] Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., *et al.*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* [J], 1998, **62**: 775—806
- [2] WU Zhi-Ping(吴志平), XU Bu-Jin(徐步进), SHU Qing-Yao(舒庆尧), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2002, **23**(6): 1081—1085
- [3] Puzstai M., Fast P., Gringorten L., *et al.*. *Biochem. J.* [J], 1991, **273**: 43—47
- [4] Padilla C., Pardo-Lopez L., de la Riva G., *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.* [J], 2006, **72**(1): 901—907
- [5] Nishimoto T., Yoshisue H., Ihara K., *et al.*. *FEBS Lett.* [J], 1994, **348**(3): 249—254
- [6] Arantes O., Lereclus D. *Gene*[J], 1991, **108**(1): 115—119
- [7] Sun Y., Wei W., Ding X., *et al.*. *Arch. Microbiol.* [J], 2007, **188**(4): 327—332
- [8] Liao C., Heckel D. G., Akhurst R. *J. Invertebr. Pathol.* [J], 2002, **80**(1): 55—63
- [9] Bradford M. M. *Anal. Biochem.* [J], 1976, **72**: 248—254
- [10] Liu X. S., Dean D. H. *Protein Eng. Des. Sel.* [J], 2006, **19**(3): 107—111

## Stability Improvement of the Cry1Ac Protein by Site-directed Mutagenesis of W544F

WANG Fa-Xiang<sup>1</sup>, XIA Li-Qiu<sup>1,2\*</sup>, DING Xue-Zhi<sup>1</sup>, ZHAO Xin-Min<sup>1</sup>, SHAN Shi-Ping<sup>1</sup>,  
MO Xiang-Tao<sup>1</sup>, ZHANG You-Ming<sup>1</sup>, YU Zi-Niu<sup>2</sup>

(1. *Key Laboratory for Molecular Biology of Microorganism of Hunan Province, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China*; 2. *National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

**Abstract** One major problem in the field applications of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins is that their exposure to sunlight can bring about reduced bioactivity, mainly because of the most vulnerable indole ring of tryptophan(W) residue. W544 is the unique tryptophan in the domain III of Cry1Ac toxin, which forms part of a buried hydrophobic cluster involving the conserved F578 and F604, and are organized in a “propeller-like” pattern, playing a clear structural role in protein stability. In this study, W544 was conservatively substituted with phenylalanine(F) to determine whether its stability was affected in the resulting mutant. Comparative analysis results by SDS-PAGE show that the protoxin of W544F was more stable than the wild-type Cry1Ac, when treated with ultraviolet irradiation, trypsin and preserved at room temperature. The distance between two vertex of crystals of W544F were 0.6 μm longer and unsmooth when compared with that of the wild-type Cry1Ac under an atomic force microscope. Additionally the mutation W544F had similar insecticidal activity to wild-type Cry1Ac, but when treated with ultraviolet irradiation for 9 h, it still maintained more than 4 times higher toxicity against *Helicoverpa armigera* than the wild-type Cry1Ac. In conclusion, the W544F mutation can enhance the stability of the Cry1Ac protein and may contribute to solving the major problem of the field applications of Cry1Ac toxin.

**Keywords** Cry1Ac protein; Site-directed mutagenesis; Tryptophan; Phenylalanine; Stability

(Ed.: H, J, Z)