

广谱高效 Bt 菌株的筛选及其杀虫蛋白基因的克隆

钟万芳, 方继朝, 郭慧芳, 王节萍, 刘宝生

(江苏省农业科学院 植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:通过杀虫活性测定, 获得 1 株对菜青虫、小菜蛾、二化螟等多种鳞翅目害虫均有较高杀虫活性的高效苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 菌株, 命名为 X-2. 同时根据 Cry1 类蛋白 N 端部分氨基酸序列设计了 1 对简并引物, 以苏云金芽孢杆菌 X-2 菌株质粒 DNA 为模板, 应用 PCR 扩增技术得到一大小为 3 468 bp 的 DNA 片段 (Cry1Ab X-2). 该基因编码 1 155 个氨基酸, 相对分子质量为 130 780, 等电点 pI = 5.06. 序列比较表明该基因与 Cry1Ab 类基因高度同源 (达 95 % 以上), 该基因已在 GenBank 中登录, 登录号为 AY847289.

关键词:苏云金芽孢杆菌; Cry1Ab X-2; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 04-0040-03

Screening of *Bacillus thuringiensis* strain with broadspectrum and high toxicity and cloning of its insecticidal crystal protein gene

ZHONG Wan-fang, FANG Ji-chao, GUO Hui-fang, WANG Jie-ping, LIU Bao-sheng

(Plant Protection Institute, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: After the determination of insecticidal activity, one *Bacillus thuringiensis* strain, showing high toxic to *Pieris rapae*, *Plutella xylostella* and *Chilo suppressalis*, was obtained and named Bt X-2. Degenerate primers were designed based on the N-terminal partial sequence of Cry1 to amplify the corresponding DNA sequence by touchdown PCR. The amplified fragment, with the length of 3 468 bp, encoding 1 155 amino acid with $M_r = 130\ 780$ and pI = 5.06. The amino acid sequence of Cry1Ab X-2 gene showed more than 95% identity to other Cry1Ab, and it was registered in GenBank (Accession No. AY847289).

Key words: *Bacillus thuringiensis*; Cry1Ab X-2; cloning; sequence analysis

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 是目前世界上产量最大、应用最广最有效的生物杀虫剂, 其应用量占生物杀虫剂的 90% 以上, 且有逐渐增大的趋势. 其突出特征是在芽孢形成过程中, 可产生伴孢晶体; 伴孢晶体由一种或多种蛋白组成, 具有高度特异的杀虫活性, 这种蛋白通常被称为杀虫蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs) 或 δ -内毒素 (δ -endotoxins). 到目前为止, 已有 200 多种 ICP 基因被克隆. 尽管 Bt 有诸多优点, 但它在田间应用时也存在杀虫速度慢、残效期短、防效不稳定、对某些目标害虫不敏感等问题, 而且, 随着 Bt 应用量的不断扩大, Bt-ICPs 基因均在不同程度上引发了昆虫的抗性. 因

此, 寻找新的高效、广谱菌株并克隆其基因, 是解决昆虫抗性问题的有效途径^[1~4]. 笔者对分离筛选的苏云金芽孢杆菌的杀虫活性进行系列测定, 获得 1 株对多种鳞翅目幼虫 (包括菜青虫、小菜蛾、二化螟) 有高毒力的菌株, 同时根据 Cry1A 类基因序列设计 1 对简并引物, 应用 PCR 扩增方法, 从该菌株中扩增得到一大小约为 3.5 kb 的 DNA 片段, 并对其序列进行了分析.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Bt 1002、1003、SSA、X-2 等菌株由本实验室筛

收稿日期: 2004-12-20

作者简介: 钟万芳 (1978-), 男, 硕士. E-mail: wfzhong88@yahoo.com.cn

基金项目: 国家 973 计划资助项目 (2003CB114400); 国家自然科学基金资助项目 (30500341); 江苏省自然科学基金重点项目 (BK2005214); 江苏省农业科学院重点研究领域项目

选保存,转化受体菌 *E. coli* DH5 α 由本实验室保存. 克隆载体 pUCmT 购自上海生工生物工程公司.

1.2 供试昆虫

二化螟 *Chilo suppressalis* 为本实验室室内饲养, 菜青虫 *Pieris rapae*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫采自未施用农药的甘蓝菜地. 选取大小一致的 3 龄幼虫进行毒力测试试验.

1.3 酶及主要试剂

TaKaRa LA *Taq* 为宝生物工程(大连)有限公司产品,IPTG、X-gal 为 GIBCO-BRL 公司产品,E. Z. N. A. Gel Extraction Kit 为美国 Omega Bio-Tek 公司产品. 其他生化试剂为国产和进口分析纯.

1.4 方法

1.4.1 Bt 菌株的毒力测定 在 LB 固体培养基上挑取不同 Bt 菌株的单菌落接种于 5 mL 的 LB 液体培养基中,30 °C,180 r/min 振荡培养 72 h,调节 $D_{600\text{ nm}} = 1.0$. 以稀释 100 倍后的菌液作为待测液. 将大小一致的新鲜甘蓝叶片(及芦笋)浸入待测液中,50 r/min 振荡 5 min,取出自然晾干,供饲喂菜青虫、小菜蛾幼虫(及二化螟幼虫),分别于 24、48、72 h 后观察,记载死虫数并剔除死虫. 每处理 30 头幼虫,重复 3 次,设清水处理为对照. 取 3 次重复平均值进行统计分析.

1.4.2 引物的设计及 PCR 扩增 根据已知 *Cry1* 类基因序列设计 1 对简并引物,P1: ATG GAK AWY AAT CCG AAY ATY AAB SAA T;P2: YTA TTC YTY YAT RAG GAG TAR TTC CA. 预计扩增产物大小为 3.5 kb. 引物由上海生工生物工程技术有限公司(Sangon)合成. 模板 DNA 的制备、touchdown PCR、PCR 产物的回收、克隆等参考钟万芳等^[5-7]的方法进行.

1.4.3 核苷酸序列的测定和分析 核苷酸序列由上海生工生物工程技术有限公司(Sangon)用美国 PE 公司 ABI PRISM 377 全自动序列分析仪测定. 测序完成后,在 NCBI 服务器^[8]上用 BLAST 搜索工具进行同源性分析.

2 结果与分析

2.1 不同 Bt 菌株对菜青虫、小菜蛾及二化螟的毒力测定

在 20 ~ 25 °C 条件下,Bt X-2 菌株对菜青虫及小菜蛾的毒力最强,而且致死速度最快,其余各处理受感染幼虫均表现明显拒食、活动缓慢,清水对照处理幼虫取食活动正常. 72 h 后 Bt 1003 和 Bt X-2 菌株对菜青虫的致死百分率均达到 100% (表 1). Bt 1002、Bt 1003 和 Bt SSA 对二化螟完全没有效果,72 h 后二化螟存活率仍然为 100%,而且幼虫取食活动与清水对照处理相比,没有任何异常. Bt X-2 对二化

螟的毒杀作用明显,72 h 后致死率达到了 90%.

表 1 不同 Bt 菌株对菜青虫、小菜蛾及二化螟的致死率¹⁾
Tab. 1 Lethality rate of different Bt strains against *Pieris rapae*, *Plutella xylostella* and *Chilo suppressalis*

测试幼虫 tested larvae	Bt 菌株 Bt strain	死亡率 mortality of pest/%		
		24 h	48 h	72 h
菜青虫 <i>Pieris rapae</i>	1002	0	11.10d	22.20c
	1003	0	51.10b	100.0a
	SSA	0	40.00c	62.23b
	X-2	0	85.56a	100.00a
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	1002	10.00b	20.00d	37.78d
	1003	10.00b	66.67b	67.78b
	SSA	0c	35.46c	50.00c
	X-2	21.11a	85.56a	95.56a
二化螟 <i>Chilo suppressalis</i>	1002	0	0b	0b
	1003	0	0b	0b
	SSA	0	0b	0b
	X-2	0	52.23a	91.11a

1) 同一列数字后不同字母表示 0.05 水平差异显著 (DPS 数据处理系统); 对照组害虫死亡率均为 0

2.2 PCR 扩增得到 *Cry1Ab* X-2 基因

以 Bt X-2 质粒 DNA 为模板,用 P1、P2 引物通过 PCR 扩增得到 *Cry1Ab* X-2 基因. 电泳检测 PCR 产物,可见 1 条约 3.5 kb 的条带,与预期产物大小相符. 在含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 培养基上挑取白色菌落,提取质粒,电泳筛选重组克隆. 重组克隆用设计的引物 P1、P2 扩增阳性克隆获得一 3.5 kb 的 DNA 片段,可以认定插入的为 PCR 产物. 将阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司进行测序.

2.3 *Cry1Ab* X-2 的序列分析

2.3.1 同源性分析 测序结果表明,*Cry1Ab* X-2 基因编码区长 3 468 bp. 该基因已在国际基因库 GenBank 中注册,登录号为 AY847289 (基因全序列可由此查询,本文略). 序列比较表明:该基因的核苷酸序列与 *Cry1Ab* 类基因有较高的同源性 (95% 以上),其中与 *Cry1Ab1*、*Cry1Ab3*、*Cry1Ab4*、*Cry1Ab5*、*Cry1Ab6*、*Cry1Ab7*、*Cry1Ab8*、*Cry1Ab9*、*Cry1Ab12*、*Cry1Ab13*、*Cry1Ab14*、*Cry1Ab15*、*Cry1Ab16* 等^[8]的同源性高达 99%.

2.3.2 氨基酸序列及蛋白质特性分析 *Cry1Ab* X-2 蛋白由 1 155 个氨基酸组成 (图 1),相对分子质量为 130 780,等电点 pI = 5.06,为弱酸性蛋白,亮氨酸 (Leu)、丝氨酸 (Ser)、谷氨酸 (Glu) 3 种氨基酸质量分数最高,分别为 8.05%、8.05% 和 7.79%,甲硫氨酸质量分数最低,仅为 0.95%. *Cry1Ab* X-2 蛋白原子组成为 C : H : N : O : S = 5 821 : 8 925 : 1 591 : 1 801 : 24,即 C_{5 821} H_{8 925} N_{1 591} O_{1 801} S₂₄,原子总数 =

18 162. 其中, Cry1Ab X-2 与 Cry1Ab1、Cry1Ab3、Cry1Ab4、Cry1Ab9、Cry1Ab12、Cry1Ab13、Cry1Ab15 都只有 4 个氨基酸残基差异,即第 385 位的 E 变为

G,第 631 位的 F 变为 S,第 905 位的 P 变为 A,第 1 154位的 K 变为 E.

```
MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLEFVPGAGFVLGLVDIIWGI FGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEE 90
FARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALT TAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVS VFGQ 180
RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELTLTVLDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTN 270
PVLENFDGSRGSAQGI EGSI RSPHLM DILNSIT IYTD AHRGEYYWSGHQIMASPVGFSGPFTFPLYGTMGNAAPQQRI VAQLGQGVYR 360
TLSSTLYRRPFNIGINNQQLSVLDETEFAYGTSSNLP S AVYRKSGTVDSLDEIPPQNNVPPRQGF SHRLSHVSMFRSGFSNSSVS IIRA 450
PMFSWIHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGP GFTGGDILRRTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTS 540
IDGRPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTT PNFNSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTS 630
FNQIGLKT DVTDYHIDQVSNLVECLSDEFCLDEKKELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQLDRGWRGSTDITI QGGDDVFKENYV 720
TLLGTFDECYPTYLYQKIDESKLKAYTRYQLRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGTGS L WPLSAPSPIGKCAHSHHFSLDIDVGC 810
TDLNEDLG VVWIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLEWETNIVYKEAKESVDALFVNSQYDRLQADTNI 900
AMIHPADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNA AIFEELEGRIFTAFSLYDARNVIKNGDFNGLSCWNVKGHVDVEEQNNHRSVLVPEWEAE 990
VSQEV RVCPRGYILRV TAYKEGYGEGCVTIHEIENNTDELKFSNCVEEVYPNNTVTCNDYTATQEEYEGTYTSRNRGYDGAYESNSSV 1080
PADYASAYEEKAYTDGRRDNPCESNRGYG DYTPLPAGYVTKELEYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLLMKE 1155
```

图1 Cry1Ab X-2 蛋白的氨基酸序列

Fig. 1 Amino acid sequence of Cry1Ab X-2

对 Cry1Ab X-2 蛋白的氨基酸序列进行 CDD (conversed domain database) 分析,发现 3 个保守结构域(图 2),分别为位于毒素分子 N 端的结构域 I (Ile36 ~ Thr254)、位于 C 端的结构域 III (Ile471 ~

Glu608)及位于结构域 I 和结构域 III 之间的结构域 II (Thr259 ~ Glu460),其中 N 端结构域参与了细胞膜的穿孔和芽孢的形成,后两者则参与了与膜受体蛋白的识别与结合.

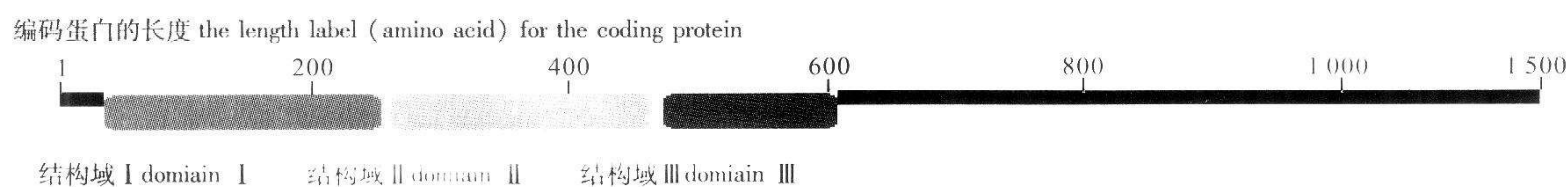


图2 Cry1Ab X-2 蛋白保守结构域图谱

Fig. 2 Converged domains of insecticidal crystal protein Cry1Ab X-2

3 结论

苏云金芽孢杆菌作为生物杀虫剂的主力军,在过去的半个多世纪中得到广泛的研究和应用,但是该杀虫剂仍然存在杀虫谱窄、持效期短、毒力不强、害虫产生抗性等问题.在进行杀虫活性测定的基础上,笔者以对菜青虫、小菜蛾、二化螟等多种鳞翅目害虫有高毒力的 Bt X-2 为供体菌,扩增获得 Cry1Ab X-2 基因. Cry1Ab X-2 基因的克隆,不仅为“Cry 基因家族”增添了新成员,同时为进一步构建新型转基因工程菌和转基因植物提供了良好的基因材料.关于该基因的杀虫效果,笔者将作进一步的研究.

参考文献:

- [1] TAHASHNIK B E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis* [J]. Annual Review of Entomology, 1994, 39:47 - 79.
- [2] TAHASHNIK B E, LIU Y B, MALVAR T, et al. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamond-

back moth resistance to *Bacillus thuringiensis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94:12 780 - 12 785.

- [3] McGAUGHEY W H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis* [J]. Science, 1985, 229: 193 - 195.
- [4] TAHASHNIK B E, FINSON N, GROETERS F R, et al. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 4 120 - 4 124.
- [5] 钟万芳,蔡平钟,阎文昭,等.苏云金芽孢杆菌大型质粒 DNA 的小量提取[J].遗传,2003, 25(1):71 - 72.
- [6] 钟万芳,姜丽华,阎文昭,等.苏云金杆菌以色列亚种几丁质酶基因的克隆及序列分析[J].遗传学报,2004, 30(4):364 - 369.
- [7] 钟万芳,吴洁,蔡平钟,等.苏云金芽孢杆菌猝倒亚种 Cry1Aa13 基因的克隆及序列分析[J].四川大学学报,2004, 41(5):1 050 - 1 053.
- [8] National Center for Biotechnology Information. BLAST2. 2. 10[DB/OL]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. 2004.

【责任编辑 周志红】