

苏云金芽孢杆菌 4.0718 菌株的杀虫晶体蛋白基因分析

丁学知^{1,2} 刘全兰¹ 莫湘涛¹ 高必达² 夏立秋^{1*}

(¹ 湖南师范大学生命科学学院微生物学系 长沙 410081)

(² 湖南农业大学植物保护学院 长沙 410128)

关键词: 苏云金芽孢杆菌, 杀虫晶体蛋白基因, PCR

中图分类号: Q812 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)03-0413-05

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是一种分布广泛的革兰氏阳性细菌,在形成芽孢的同时能够产生由一种或几种杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins, ICP_s)组成的伴胞晶体。Bt 已作为最为有效的微生物杀虫剂广泛用于害虫的生物防治^[1]。Bt 菌株的杀虫活性与其携带的编码 ICP_s 的 *cry* 基因密切相关,这些基因一般定位于苏云金芽孢杆菌的大质粒上,几种不同的毒素基因可以共存于一个菌株中。鉴定 Bt 菌株的 *cry* 基因型对于研究 Bt 资源的多样性,预测其杀虫活性,快速筛选优良菌株以及分离克隆新的 *cry* 基因都具有十分重要的意义^[2,3]。

Crickmore 等在 1995 年提出了新的 *cry* 基因分类系统,到目前为止已确定并公布的 *cry* 基因有 128 种。为了对 Bt 分离株的 *cry* 基因进行快速有效的鉴定,国内外广泛利用 Bt 杀虫晶体蛋白不同基因型的特异混合引物,以 Bt 质粒为模板进行 PCR 分析。利用 PCR 反应不仅可以检测某一 Bt 菌株中含有的已知 *cry* 基因,而且可以发现未知的新基因^[4]。

随着 Bt 制剂应用的不断扩大,*cry* 基因编码产生的晶体蛋白均在不同程度上引发了昆虫抗性。为避免抗性昆虫所造成的损失,寻找新的高毒力菌株及杀虫基因是解决这个问题的有效途径。苏云金杆菌 4.0718 菌株(CCTCC NO :M200016)是本室选育的高毒力菌株,杀虫毒力显著高于生产上应用的由库斯塔克亚种(subsp. *kurstaki*)和蜡螟亚种(subsp. *galleriae*)制成的菌剂。Bt 4.0718 菌株能够产生双金字塔型和立方体型两种形态的伴胞晶体,它们分别由 130kD 和 65kD 的原毒素构成^[5,6]。该项研究对 Bt 4.0718 菌株的杀虫晶体蛋白基因进行分析,将有助于了解其杀虫特性和提供构建工程菌的新的 *cry* 基因资源。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

Bt 4.0718 菌株(CCTCC NO :M200016)为本室选育;Bt 库斯塔克亚种 HD-1 菌株由华中农业大学孙明博士赠。菌株培养采用 LB 培养基。

1.2 DNA 样品制备

分别挑取 Bt 4.0718 和库斯塔克亚种 HD-1 单菌落于 LB 液体培养基,30℃、250 r/min 培养 16 h,采用 Triton X-100 温和裂解法进行 DNA 的微量抽取。Bt 4.0718 质粒依据分子量大小顺序依次编号为 P₁、P₂、P₃ 和 P₄。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270037)、国家“863 计划”项目(2002AA245021);华中农业大学农业部农业微生物重点实验室项目(3-02-1-21)

* 通讯作者。Tel 86-731-8872298; Fax 86-731-8827260; E-mail: xialiqu2002@yahoo.com.cn

作者简介: 丁学知(1954-),女,湖南师范大学生命科学学院副教授,博士,从事微生物生物化学研究。

收稿日期: 2002-08-14, 修回日期: 2003-03-05

1.3 PCR 引物设计

对 GenBank 中所有 *cry1*、*cry2* 和 *cry3* 型基因的高度保守区进行同源序列分析,分别设计 3 对通用引物 UnI(d)UnI(r)、UnX(d)UnX(r)和 UnZ(d)UnZ(r),以扩增出所有可能的 3 类基因的 DNA 序列。用于鉴定 *cry1* 和 *cry2* 类型特异基因的专一引物分别根据两类基因的高变区设计,特异引物 S5un1/S3un1 (*cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1B*、*cry1Ca*、*cry1Cb*)和 S5un2/S3unZ (*cry2Aa*、*cry2Ab* 和 *cry2Ac*)能扩增任何可能的 *cry1* 和 *cry2* 类型基因的特异 DNA 序列。通用引物的序列为:

UnI(d) 5'-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3' ;UnI(r) 5'-TTGTGACACTTCTGCTTCCATT-3'

UnX(d) 5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAGTGGG-3' ;UnX(r) 5'-CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT-3'

UnZ(d) 5'-CGTTATCGCAGAGAGATGACTTAAC-3' ;UnZ(r) 5'-CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT-3'

1.4 PCR 分析

洁净灭菌的 PCR 管中,加入 30 μ L 的反应物体系:过滤灭菌双蒸水 22.2 μ L, *Taq* 多聚酶 buffer 3 μ L, dNTP (10 mmol/L) 0.8 μ L, 引物 1 (15 μ mol/L) 1 μ L, 引物 2 (15 μ mol/L) 1 μ L, 质粒 DNA (30 pg/ μ L) 1 μ L, *Taq* 多聚酶 2.5 U。首轮采用 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 s,接着进行 25 个循环,其循环程序为:94 $^{\circ}$ C 45s, 54 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。反应完毕,取 5 μ L PCR 产物在 1.5% 琼脂糖胶中电泳。取出观察,凝胶成像扫描。

2 结果和分析

2.1 *cry* 基因通用引物的特异性

应用 PCR 方法检测 Bt 4.0718 菌株的 *cry* 型基因。通用引物检测可能含有 *cry1*、*cry2* 和 *cry3* 型基因的质粒。*cry1* 型基因 PCR 产物的预期大小 274 ~ 277bp; *cry2* 型基因扩增产物的分子量为 689 ~ 701bp; *cry3* 型基因产生 589 ~ 604bp 的 PCR 产物。质粒的扩增情况如图 1。图 1 中的 A ~ C 是质粒 P₁、P₂ 和 P₃ 的扩增情况,通用引物 UnZ(d)UnZ(r) 扩增时没有任何产物,UnI(d)UnI(r) 和 UnX(d)UnX(r) 扩增出两种产物,即 277 bp 和 689bp,分别对应于 *cry1* 和 *cry2* 型基因。图 1 中的 D 为质粒 P₄ 的扩增结果,3 类通用引物均无 PCR 产物。实验过程中,模板 DNA 样品用低熔点琼脂糖胶纯化,减少了样品间污染的可能性。由于 4.0718 菌株质粒 DNA 的引物中 GC 含量偏少(42%),其退火温度在 58 $^{\circ}$ C 以下。设置了一系列温度,发现 54 $^{\circ}$ C 时出现特异性产物。为了避免错误结果,PCR 反应以库斯塔克亚种 HD-1 菌株做标准,重复 3 次。如扩增出相应大小的片段,则表明该质粒含有相应基因。从图 1 可以看出质粒 P₁、P₂ 和 P₃ 含有 *cry1* 和 *cry2* 型基因。质粒 P₄ 在扩增时无阳性信号,表明它不含有这 3 类基因。这一步确定了质粒含有哪一大类基因型,但要对其亚类进行精细分析,必须设计特异引物,作进一步的 PCR 鉴定。

2.2 4.0718 菌株的 *cry1* 和 *cry2* 特异基因型鉴定

纯化分离的质粒 P₁、P₂ 和 P₃ 的 *cry1* 和 *cry2* 特异基因鉴定结果如图 2。研究中采用 4 套特异引物混合物(表 1)混合物 A 是特异引物 *cry1A*(*a* ~ *c*)混合物 B 是引物 *cry1B*,混合物 C 是专一性引物 *cry1C*(*a* ~ *b*)的混合物,混合物 D 是 *cry2A*(*a* ~ *c*)的混合物。这些引物混合物分别用来扩增所有可能的 *cry1A*、*cry1B*、*cry1C* 和 *cry2A* 基因的特定区域。这样,可以通过 PCR 产物分子量确定质粒所含的基因^[7,8]。质粒 P₁ 用混合物 A 扩增出 1 641bp 和 1 471bp 的 DNA 片段,其中 1 641bp 对应 *cry1Ac* 基因,1 471bp 是特异扩增条带,可能是新的 *cry* 基因(暂命名为 *cry4.5* 基因);用混合物 B、C 和 D 扩增时产生 1 623 和 1 219bp 片段,分别对应于 *cry1Cb* 和 *cry2Ac* 基因。质粒 P₂ 用混合引物扩增的 PCR 产物大小是 1 635、1 623 和 1 219bp,分别对应于 *cry1Aa*、*cry1Cb* 和 *cry2Ac* 基因。质粒 P₃ 扩增出 1 623、1 557 和 1 219bp 的产物,分别对应 *cry1Cb*、*cry1Ab* 和 *cry2Ac* 基因。

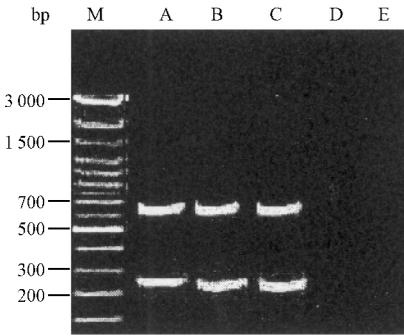


图 1 通用引物的 PCR 产物电泳图

M. 标准分子量；

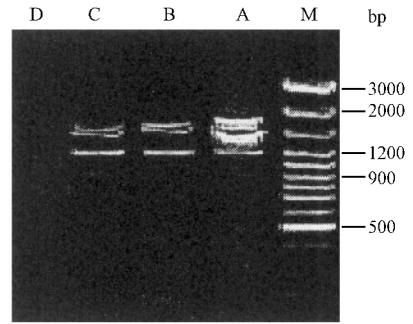
A ~ C. 质粒 P₁、P₂ 和 P₃ 的扩增产物；D. 质粒 P₄ 的扩增产物 ; E. 对照 (水)。

图 2 特异引物扩增的 PCR 产物电泳图

M. 标准分子量；

A ~ C. 质粒 P₁、P₂ 和 P₃ 的扩增产物；D. 质粒 P₄ 的扩增产物 ; E. 对照 (水)。

表 1 PCR 反应特异引物序列及其特性

引物和基因	序列和引物 ^a	位置 ^b	产物大小/bp
S5un1	AGGA-CCAGGATTACAGGAGG		
<i>cry1Aa</i>	AGGA-CCAGGATTACAGGAGG	1994 ~ 2014	1 635
<i>cry1Ab</i>	AGGA-CCAGGATTACAGGAGG	1611 ~ 1631	1 557
<i>cry1Ac</i>	AGGA-CCAGGATTACAGiGG	1854 ~ 1871	1 641
<i>cry1B</i>	AGGA-CCAGGATTACiGGiGG	1554 ~ 1574	1 686
<i>cry1Ca</i>	AGGA-CCAGGATTACAGGAGG	1504 ~ 1524	1 671
<i>cry1Cb</i>	AGGA-CCAGGATTACAGGAGG	1753 ~ 1773	1 623
S3un1	GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC		
<i>cry1Aa</i>	GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC	3603 ~ 3627	1 635
<i>cry1Ab</i>	GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC	3143 ~ 3167	1 557
<i>cry1Ac</i>	GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC	3470 ~ 3494	1 641
<i>Cry1B</i>	GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC	3215 ~ 3239	1 686
<i>cry1Ca</i>	GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC	3150 ~ 3174	1 671
<i>cry1Cb</i>	GCTGTaACACGAAGGATATAGCCAC	3300 ~ 3324	1 623
S5un2	GGAAGAACTACTATTTGTGATGC		
<i>ery2Aa</i>	GGAAGAACaACTATTTGTGATGC	177 ~ 199	1 231
<i>ery2Ab</i>	GGAAGAAaTACTATTTGTGATGC	22 ~ 44	1 231
<i>ery2Ac</i>	GGAAGAACTACTATTTGTGATGC	2146 ~ 2168	1 219
S3un	AATAGTTTGAATTACCGCGAGC		
<i>ery2Aa</i>	AATAGTTTGAATHCCGCGAGC	1407 ~ 1386	1 231
<i>ery2Ab</i>	AATAGTTTGAATTACCGCGAGC	1252 ~ 1231	1 231
<i>ery2Ac</i>	AAaAGTTcGAATTACCaCGAGC	3364 ~ 3344	1 219

注 : a. 基因序列中的小写字母表示与引物序列不匹配的碱基 ; 短线表示基因序列中此位置无碱基 ;

b. 引物扩增所得的 PCR 产物在基因序列中的位置 .

表 2 用不同 *cry1* 和 *cry2* 型基因特异引物对 4.0718 菌株的 PCR 分析

质粒	不同引物的 PCR 扩增产物										
	<i>cry1Aa</i>	<i>cry1Ab</i>	<i>cry1Ac</i>	<i>cry1B</i>	<i>cry1Ca</i>	<i>cry1Cb</i>	<i>cry2Aa</i>	<i>cry2Ab</i>	<i>cry2Ac</i>	<i>cry4.5</i>	<i>cry3</i>
P ₁	NP	NP	1641	NP	NP	1623	NP	NP	1219	^a 1471	NP
P ₂	1635	NP	NP	NP	NP	1623	NP	NP	1219	NP	NP
P ₃	NP	1557	NP	NP	NP	1623	NP	NP	1219	NP	NP

注: a. 表示具有特异长度的 PCR 产物; NP. 表示没有 PCR 产物.

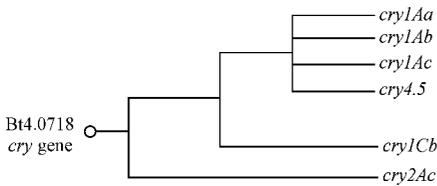
图 3 4.0718 菌株的 *cry* 基因序列同源关系

表 2 列出了质粒 P₁、P₂ 和 P₃ 含有的 *cry* 型基因。质粒的基因类型较丰富,并且都含有 *cry1Cb* 和 *cry2Ac* 基因。质粒 P₁ 产生分子量特异的 PCR 产物,预示它可能含有新基因。采用不同的引物组合,重复 3 次,混合物 A 每次都扩增出相同的特异产物(1471bp),说明这一结果是可靠的。至于这些质粒是否存有其他类型的基因,还有待进一步鉴定。按照 1998 年 Crickmore 等^[3]提出 *cry* 基因的新分类原则,*cry* 基因分成 4 个等级。图 3 列出了 4.0718 菌株质粒 P₁、P₂ 和 P₃ 的 *cry* 型基因之间的同源关系:*cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac* 和新基因 *cry4.5* 之间的序列有 75%~95% 同源,*cry1Cb* 与 *cry1A* 基因的序列有 45%~75% 的同源区,*cry2Ac* 基因与 *cry1A* 和 *cry1Cb* 基因的同源序列小于 45%。4.0718 菌株具有丰富的杀虫晶体蛋白基因型,基因序列的微小差别会导致杀虫活性极大不同,这些 *cry* 基因编码的蛋白可以产生协同作用,形成比单独一种蛋白更强的复合杀虫活性,这与 4.0718 菌株的高杀虫毒力和较宽杀虫谱具有密切关系。

3 讨论

本研究采用 PCR 方法确定 4.0718 菌株可能含有的鳞翅目活性的特异基因,快速高效地分析其杀虫的遗传机理。4.0718 菌株的 *cry* 基因含量丰富,分布广泛^[9]。质粒含有 3 个已知的 *cry1Aa*、*cry1Ab* 和 *cry1Ac* 基因,编码产生不同亚类的 Cry 蛋白,这些蛋白对鳞翅目幼虫表现出专一的毒杀活性^[6],其中 *cry1Ac* 基因是对鳞翅目幼虫总体上毒力最高的基因,是构建杀虫工程菌和转基因植物的理想基因。此外,还发现一新的 *cry4.5* 基因,对照菌库斯塔克亚种 HD-1 中没有发现相同的特异扩增片段。4.0718 菌株新基因的碱基序列和结构特征有待于进一步研究。毒力生测实验表明 4.0718 菌株对小菜蛾和棉铃虫毒力比库斯塔克亚种 HD-1 菌株高。对鳞翅目幼虫有毒杀活性的 *cry* 基因主要是 *cry1* 型。4.0718 菌株较 HD-1 多新基因 *cry4.5* 和 *cry1C*,*cry1C* 基因是对海灰翅夜蛾 (*Spodoptera littoralis*) 毒力较高的基因,这说明新基因 *cry4.5* 在提高 4.0718 菌株的毒力方面起显著作用,它编码产生的蛋白与其他蛋白相互协作,提高杀虫效果。*cry* 型基因的鉴定从分子角度证明 4.0718 菌株具备潜在的重要研究价值。

在充分考虑了上述实验条件的基础上,4.0718 菌株质粒 DNA 的 PCR 扩增结果是可靠的。PCR 扩增的数据表明 4.0718 菌株含有多个与 *cry* 家族有关的杀虫基因。该菌的同一杀虫蛋白基因可位于不同质粒上,同一质粒可含有多个杀虫蛋白基因。这种基因分布方式有重要意义。目前,基因型丰富的菌株报道尚少,这说明 Bt 4.0718 菌株具有广阔的应用前景,对构建高效杀虫工程菌提供了可靠依据。

由于 PCR 扩增系统只产生特异引物,因此可以应用该系统检测 Bt *cry* 型基因的拷贝数。PCR 扩增发现,模板浓度相同时,新基因 *cry4.5* 亮度最强(图 2),其次依次是 *cry1Ac* 和 *cry1Aa* 等。当模板浓度较低时,不能扩增出 *cry1Ab* 基因的产物。因此,可以初步认为 4.0718 菌株的 *cry* 型基因中,*cry4.5* 基因的拷贝数最高,*cry1Ac* 基因的拷贝数次之,*cry1Ab* 基因的拷贝数最少。

参 考 文 献

[1] Hofte H, Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Micro Rev*, 1980, 53(2): 242-255

- [2] Schnepf E, Crickmore N, Lereclus D, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(3):775 ~ 806.
- [3] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(4):807 ~ 813.
- [4] Ballester V, Granero F, Bosch D, et al. Role of *Bacillus thuringiensis* toxin domains in toxicity and receptor binding in the diamondback moth. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(5):1900 ~ 1903.
- [5] 夏立秋, 孙运军, 莫湘涛, 等. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白毒性片段的结构域在毒杀昆虫中的作用. *生物工程进展* 2002 **22**(1):73 ~ 76.
- [6] 丁学知, 夏立秋. 苏云金杆菌高毒力菌株 4.0718 的快速选育. *中国生物防治* 2001, **17**(4):163 ~ 166.
- [7] Ceron J, Ortiz A, Quintero R, et al. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(11):3826 ~ 3831.
- [8] 宋福平, 张杰, 谢天健, 等. 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):13 ~ 18.
- [9] 夏立秋, 张何, 刘全兰, 等. 苏云金杆菌 4.0718 质粒上杀虫晶体蛋白基因的 PCR 分析. *生物技术通报* 2002, (2):35 ~ 37.

Characterization of Insecticidal Crystal Proteins Genes from *Bacillus thuringiensis* 4.0718 Strain

Ding Xuezhi^{1, 2} Liu Quanlan¹ Mo Xiangtao¹ Gao Bida² Xia Liqiu^{1*}

(¹ Department of Microbiology, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

(² Department of Plant Protection, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract : In this study, we rapidly identified *Bacillus thuringiensis* 4.0718 strain that harbored the known *cry1* and *cry2* type genes by a PCR strategy. Three pairs of universal oligonucleotide primers were designed to detect all known *cry1*, *cry2* and *cry3* type gene sequences. Then the DNA of the positive strain 4.0718 was probed with a set of specific primers. One feature of this screening method was that each gene was expected to produce a PCR product having a precise molecular weight. PCR products having different sizes probably represented the gene was a potentially novel gene. Differentiations among these genes was determined on the basis of the electrophoresis patterns of PCR products. Finally, five *cry1* type genes (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Cb*, a novel *cry4.5* type genes) and one *cry2Ac* type gene had been detected from *Bacillus thuringiensis* 4.0718 strain.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, Insecticidal crystal protein gene, PCR

Foundation item : Chinese National Science Fund(30270037); Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2002AA245021); Huazhong Agricultural University Key Lab Project of Agromicrobiology of Ministry of Agriculture(3-02-21)

* Corresponding author. Tel 86-731-8872298 Fax 86-731-8827260 E-mail xialiqu2002@yahoo.com.cn

Received date 08-14-2002

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>