

## 四种 *cry* 基因启动子在 *spoIIID* 基因突变株中的活性比较

王新梅<sup>1</sup>, 杜立新<sup>2,3</sup>, 彭琦<sup>2</sup>, 梁影屏<sup>2</sup>, 李杰<sup>1</sup>, 张杰<sup>2</sup>, 宋福平<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

<sup>2</sup> 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 100193

<sup>3</sup> 河北农林科学院植物保护研究所, 保定 071000

**摘要:** 【目的】分析 *spoIIID* 基因突变对苏云金芽胞杆菌 *cryI*、*cry3*、*cry4* 和 *cry8* 基因启动子 *PcryIAc*、*Pcry3A*、*Pcry4A* 和 *Pcry8E* 的影响, 比较以上启动子在无芽胞 *spoIIID* 基因突变体 (HD- $\Delta$ *SpoIIID*) 中的转录活性。【方法】分别构建了 *PcryIAc*、*Pcry3A*、*Pcry4A* 和 *Pcry8E* 与 *lacZ* 基因融合的转录分析载体, 并导入 HD-73 野生型菌株和 HD- $\Delta$ *SpoIIID* 突变株中测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活性; 通过高温诱变方法在 HD- $\Delta$ *SpoIIID* 基础上筛选出缺失 *cryIAc* 基因的 HD<sup>-</sup>- $\Delta$ *SpoIIID* 突变体; 构建了 4 种启动子与 *cryIAc* 基因融合表达载体, 分别将它们转入 HD- $\Delta$ *SpoIIID* 和 HD<sup>-</sup>- $\Delta$ *SpoIIID* 中, 分析 *CryIAc* 蛋白表达量及其生物活性。【结果】HD-73 和 HD- $\Delta$ *SpoIIID* 菌株中四个启动子转录活性由高到低分别为: *Pcry8E* > *PcryIAc* > *Pcry4A* > *Pcry3A*; *spoIIID* 基因的缺失未影响 *PcryIAc* 和 *Pcry8E* 转录活性, *Pcry3A* 在 HD- $\Delta$ *SpoIIID* 菌株中转录活性略有升高, *Pcry4A* 在 HD- $\Delta$ *SpoIIID* 菌株中转录活性在 T<sub>5</sub> 到 T<sub>10</sub> 略有降低。从翻译水平来看在 HD- $\Delta$ *SpoIIID* 中 *cry8E* 启动子略低于 *cryIAc* 启动子, 并高于 *Pcry4Aa*, *Pcry3A* 指导的 *CryIAc* 蛋白产量, 生物活性测定结果与蛋白表达量相符。【结论】*cry8E* 基因启动子 *Pcry8E* 在 *spoIIID* 突变体中在转录水平活性是最高的启动子, 而 *cryIAc* 启动子指导自身基因 *cryIAc* 表达时, 在翻译水平上略高于 *cry8E* 启动子指导的 *CryIAc* 产量。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌, *spoIIID* 基因突变株, *cry* 基因启动子, 转录活性, *Cry* 蛋白表达量

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 09-1075-10

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt), 革兰氏阳性菌, 芽胞杆菌属, 其最明显的特征是在芽胞形成的同时会产生具有杀虫作用的伴胞晶体, 其对鳞翅目、鞘翅目、双翅目、同翅目、膜翅目、直翅目等农林业害虫具有特异性的杀虫活性<sup>[1]</sup>, 目前成为国际上应用最广泛最成功的生物农药。商品化的苏云金芽胞杆菌制剂产品一般是杀虫晶体蛋白和

芽胞的混合物, 大型发酵生产, 应用叶面喷洒。但是芽胞对高温、低温、化学试剂、辐射、水解酶等不利条件具有很强的抗逆性<sup>[2]</sup>, Bt 制剂活芽胞的大量释放可能带来环境生态的潜在危险, 所以开发对生态与环境更安全的、新一代灭活的生物农药十分必要<sup>[3]</sup>。

无芽胞的苏云金芽胞杆菌可以产生晶体, 并具

基金项目: 国家“973”项目 (2009CB118902); 国家自然科学基金 (31070083)

\* 通信作者。Tel: +86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

作者简介: 王新梅 (1986-), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 主要从事苏云金芽胞杆菌功能基因的研究。E-mail: junjunwang25910@yahoo.cn

收稿日期: 2012-04-05; 修回日期: 2012-05-02

有与芽胞苏云金芽胞杆菌相当的活性,具有一定的应用潜力<sup>[3]</sup>。研究发现在芽胞的形成过程中,母细胞中4个全局调控因子 $\sigma^E$ 因子、SpoIIID、 $\sigma^K$ 因子、GerE,分别在芽胞不同的发育阶段起作用,控制芽胞形成的一系列基因的转录,其中 $\sigma^K$ 因子和 $\sigma^E$ 因子是转录起始因子,gerE基因和spoIIID基因类似,其表达产物为小型序列特异性DNA结合蛋白,主要对 $\sigma^K$ 因子或 $\sigma^E$ 因子控制的相关基因转录起特异性的激活或抑制作用<sup>[4-5]</sup>。在Bt中 $\sigma^E$ 因子对spoIIID基因具有正调控作用,同时SpoIIID蛋白对 $\sigma^K$ 因子的表达具有正调控作用,而 $\sigma^K$ 因子对 $\sigma^E$ 因子的表达具有负调控作用,重要的是spoIIID基因突变体可以产生伴胞晶体,但不产生芽胞<sup>[6]</sup>。

苏云金芽胞杆菌杀虫晶体的启动子主要分为以下几种类型:(1)重叠的双启动子BtI和BtII。BtI是一个强启动子,BtII是一个弱启动子,两个启动子在 $\sigma^E$ 和 $\sigma^K$ 的调控下协同作用起始cryIA基因的转录<sup>[7-9]</sup>。(2)非重叠的双启动子。cry4Aa基因具有两个启动子,下游启动子P1和上游启动子P2的-10区和-35区并未重叠且存在一定距离。P1和P2分别依赖 $\sigma^E$ 和 $\sigma^K$ 两个调控因子<sup>[10]</sup>,此外还受 $\sigma^H$ 因子的调控<sup>[11]</sup>。(3)单启动子。很多cry基因的启动子都只具有一个BtI类启动子。cry3A基因的启动子是单启动子中比较特别的一个启动子。cry3Aa基因

的表达不依赖芽胞形成的特异 $\sigma$ 因子,但是依赖 $\sigma^A$ 因子<sup>[12]</sup>。(4)操纵子中的启动子。操纵子中的启动子主要分为操纵子中的单启动子BtI、操纵子中的单启动子BtII、操纵子中的双启动子BtI和BtII和操纵子中的双启动子<sup>[13]</sup>。cry8E属于操纵子中的双启动子,受 $\sigma^E$ 和 $\sigma^H$ 因子的调控<sup>[13]</sup>。以上类型启动子的活性高低及spoIIID对它们转录活性的影响仍不清楚。

本研究通过对cryIAC、cry3A、cry4A和cry8E基因启动子在spoIIID基因突变体中的转录活性、蛋白表达产量以及生物活性进行比较,分析了spoIIID基因缺失对各启动子活性的影响,并比较了各启动子的表达活性强弱。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养基:**表1为本研究所用菌株和质粒。苏云金芽胞杆菌的培养基分别采用LB培养基和SM培养基(营养肉汤8g,1.2% MgSO<sub>4</sub> 10 mL,10% KCl 10 mL,1 mol/L NaOH 1 mL蒸馏水定容至1 L,1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌20 min),高温诱导突变选用BP培养基(蛋白胨10 g,NaCl 5 g,Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.6 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g,蒸馏水定容至1 L,1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌20 min,现用现配,避光保存)。

表1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
<i>B. thuringiensis</i> HD-73	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , carrying <i>cryIAC</i> gene	This lab
HD-ΔSpoIIID	HD-73 Mutant, ΔSpoIIID	This lab
Bt22	Bt strain carrying <i>cry3A</i> gene	This lab
BtI	Bt strain carrying <i>cry4A</i> , <i>cry4B</i> , <i>cry11A</i> , <i>cytA</i> gene	This lab
Bt185	Bt strain carrying <i>cry8E</i> and <i>cry8F</i> gene	This lab
HD <sup>-</sup> -ΔSpoIIID	A crystalliferous mutant of Bt HD-ΔSpoIIID strain	This study
Plasmids		
pHT304-18z	Promoterless <i>lacZ</i> Vector, Ery <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup>	[14]
pHT304Pery1Ac	pHT304-18Z carrying <i>cryIAC</i> promoter	This lab
pHT304Pery3A	pHT304-18Z carrying <i>cry3A</i> promoter	This study
pHT304Pery4A	pHT304-18Z carrying <i>cry4A</i> promoter	This study
pHT304Pery8E	pHT304-18Z carrying <i>cry8E</i> promoter	This lab
pHT315	Amp <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup> , <i>E. coli</i> -Bt shuttle vector, 6.5 kb	[15]
pHTP1Ac	pHT315 carrying <i>cryIAC</i> promoter and <i>cryIAC</i> gene	This study
pHTP3A	pHT315 carrying <i>cry3A</i> promoter and <i>cryIAC</i> gene fusion	This study
pHTP4A	pHT315 carrying <i>cry4A</i> promoter and <i>cryIAC</i> gene fusion	This study
pHTP8E	pHT315 carrying <i>cry8E</i> promoter and <i>cryIAC</i> gene fusion	This study

**1.1.2 主要试剂和仪器:** Taq mix 购自博迈得生物技术公司, DNA 回收试剂盒购自 Axygen 公司, 相关的限制性内切酶和 T4 连接酶购自宝生物工程有限公司, 引物由上海生工生物工程公司合成(所用引物名称及序列见表 2), 蛋白定量试剂盒购自 Thermo fisher 公司。

表 2 引物序列

Table 2 Primes and sequences

Primer name	Sequences (5'→3')	Restriction site
P3A5'	AA <u>CTGCAG</u> GGGAGCTTAATTAAGATAATATCTTTG	<i>Pst</i> I
P3A3'	CGGGATCCTTTCTTCCTCCCTTTCTTATCAT	<i>Bam</i> H I
P4A5'	AA <u>CTGCAG</u> AAGGTCAACTCAAATTAAGGGCAC	<i>Pst</i> I
P4A3'	CGGGATCCATTGTTCTCCATACTCAATTTAGAT	<i>Bam</i> H I
Porf15'	AA <u>CTGCAG</u> TTTCAATAGAAAACAAAACGTTCT	<i>Pst</i> I
P8E3'	CGGGATCCCTATTTCTCTATACATACACAAGAT	<i>Bam</i> H I
LacZ5'	AA <u>CTGCAG</u> GCTTGAATTGATACACTAATGCTTTTAT	<i>Pst</i> I
LacZ3'	CCCAAGCTTTTATTTTGGACACCAGACCAACTG	<i>Hind</i> III
LP1Ac5'	GGGGTACCATTCAAGGTGAATTGCAGGTAAATG	<i>Kpn</i> I
LP1Ac3'	GCTCTAGAAAGTTACCTCCATCTCTTTTATTAAGAT	<i>Xba</i> I
LP3A5'	GGGGTACC GGGAGCTTAATTAAGATAATATCTTTG	<i>Kpn</i> I
LP3A3'	GCTCTAGATTTCTTCCTCCCTTTCTTATCAT	<i>Xba</i> I
LP4A5'	GGGGTACC AAGGTCAACTCAAATTAAGGGCAC	<i>Kpn</i> I
LP4A3'	GCTCTAG AATTGTTCTCCATACTCAATTTAGAT	<i>Xba</i> I
LPorf15'	GGGGTACC TTTCAATAGAAAACAAAACGTTCT	<i>Kpn</i> I
LP8E3'	GCTCTAG ACTATTTCTCTATACATACACAAGAT	<i>Xba</i> I
1Ac5'	CGGGATCC ATTCAAGGTGAATTGCAGGTAAATG	<i>Bam</i> H I
1Ac3'	ACCGGTCGACCTATTCCTCCATAAGGAGTAATCCAC	<i>Sal</i> I
3a1Ac5'	CGGGATCC GGGAGCTTAATTAAGATAATATCTTTGAAT	<i>Bam</i> H I
3A1Ac3'	CATAAGTTACCTCCCTTTCTTATCATAATACATAATT	
1Ac3A5'	TAAGAAAGGGAGGTAACCTTATGGATAACAATC	
4Aa5'	CGGGATCC AAGGTCAACTCAAATTAAGGGCAC	<i>Bam</i> H I
4Aa1Ac3'	TCCATAAGTTACCTCCACTACTCAATTTAGATA	
1Ac4Aa5'	GAGTATGGGAGGTAACCTTATGGATAACAATC	
8Ea5'	CGGGATCC TTTCAATAGAAAACAAAACGTTCTTATAC	<i>Bam</i> H I
8Ea1Ac3'	CATAAGTTACCTCCTATACATACACAAGATATAAAATTTT	
1Ac8Ea5'	GATATGATAGGAGGTAACCTTATGGATAACAATCC	
T1Ac3'	ATGGAAAAAGATTTAATTGAAGATG	
T1Ac5'	CTCTTATTTTCAATTTTTCGAAGT	

The underline and blackbody: the sequence of restriction site.

## 1.2 细菌的培养条件

苏云金芽胞杆菌培养温度为 30℃, 摇床转速为 220 r/min。红霉素的使用浓度为 5 μg/mL。高温诱导突变温度为 45℃, 摇床转速为 200 r/min。

## 1.3 转录活性分析载体的构建

以 Bt22 菌株总 DNA 为模板, 用引物 P3A5'/P3A3' 配对 PCR 扩增 cry3A 基因 ATG 上游 570 bp 的启动子片段 (Access number: CAB41411.1)<sup>[16]</sup>; 以 Bti 菌株总 DNA 为模板, 用引物 P4A5'/P4A3' 扩增 cry4A 基因 ATG 上游 826 bp 的启动子 (Access number: CAD30148.1)<sup>[17]</sup> 片段; 以 Bt185 菌株总 DNA 为模板, 用引物 Porf1-5'/Pery8E3' 扩增 cry8E

基因 ATG 上游 1352 bp 的启动子 (Access number: AY329081.1) 片段。以上 PCR 片段纯化后分别经 *Pst*I 和 *Bam*H I 双酶切, 插入表达载体 pHT304-18Z 中 lacZ 基因的上游, 获得重组质粒 pHT304Pcry3A、pHT304Pcry4A 和 pHT304Pcry8E<sup>[13]</sup>。

将上述 3 个重组质粒及本研究室保存的质粒 pHT304Pcry1Ac<sup>[18]</sup> (含 cryIAc 基因启动子, ATG 上游 382 bp。Access number: AAB46989.1) 分别电击转化到 HD-73 和 HD-ΔSpoIIID 菌株中。获得菌株 HDPcry1Ac、HDPcry3Ac、HDPcry4A、HDPcry8E、SpoIIIDPcry1Ac、SpoIIIDPcry3Ac、SpoIIIDPcry4A 和 SpoIIIDPcry8E。

#### 1.4 $\beta$ -半乳糖苷酶活性分析

将 Bt 菌株按 1% 的接种量接至 50 mL 含红霉素的液体 SM 培养基中。从  $T_0$  ( $T_0$  为对数期终止时间,  $T_n$  是对数期终止后  $n$  小时) 开始, 每隔 1 小时取样 1 次, 每次取样 2 mL, 离心后立即置于  $-20^\circ\text{C}$  保存。 $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定参考文献<sup>[19]</sup>。每组数据重复 3 次。

#### 1.5 HD<sup>-</sup>- $\Delta$ SpoIIID 突变体的筛选

将 HD- $\Delta$ SpoIIID 按 1% 接菌量接于 50 mL BP 培养基,  $42^\circ\text{C}$ , 200 r/min 培养 48 h 后, 按 1% 接菌量接于 50 mL BP 培养基,  $42^\circ\text{C}$ , 200 r/min 培养 48 h 之后, 按 4% 接菌量接于 50 mL BP 培养基,  $45^\circ\text{C}$ , 200 r/min 培养 12 h 后取菌液涂布于固体 LB 培养基,  $30^\circ\text{C}$  倒置培养 48 h<sup>[20]</sup>。将得到的菌斑用 *cryIAc* 引物进行筛选, 选出无 *cryIAc* 的菌斑, 用鉴定 HD-73 野生菌株中的含 *cryIAc* 基因的大质粒 pHT73 的引物进行鉴定<sup>[21]</sup>, 选出 pHT73 质粒缺失的菌株, 命名为 HD<sup>-</sup>- $\Delta$ SpoIIID。

#### 1.6 融合表达载体的构建

以 HD-73 菌株基因组 DNA 为模板分别用引物 1Ac5'/1Ac3' 配对扩增 *cryIAc* 基因 (包含启动子区)。以 Bt22 基因组 DNA 为模板, 引物 3a1Ac5'/3A1Ac3' 配对扩增 *cry3A* 基因的启动子序列; 以 HD-73 菌株基因组 DNA 为模板, 引物 1Ac3A5'/1Ac3' 配对扩增 *cryIAc* 基因, 回收上述两个 PCR 产物, 以此为模板, 引物 3a1Ac5'/1Ac3' 配对进行第二次扩增获得 *cry3A* 基因启动子和 *cryIAc* 基因的重组片段; 同样方法, 以 Bti 菌株基因组 DNA 为模板, 引物 4Aa5'/4Aa1Ac3' 配对扩增 *cry4A* 基因的启动子序列, 以 Bt185 菌株基因组 DNA 为模板, 引物 8Ea5' 和 8Ea1Ac3' 配对扩增 *cry8E* 操纵子的启动子序列, 通过重叠延伸 PCR 获得 *cry4A* 基因启动子和 *cryIAc* 基因的重组片段和 *cry8E* 操纵子的启动子和 *cryIAc* 基因的重组片段。将重组片段经过 *Sal* I 和 *Bam*HI 酶切后, 插入表达载体 pHT315 相应的多克隆位点。将得到的四个重组质粒 pHTP1Ac、pHTP3A、pHTP4A 和 pHTP8E。

将 4 个重组质粒转化 *E. coli* SCS110 去甲基化后导入 HD- $\Delta$ SpoIIID 和 HD<sup>-</sup>- $\Delta$ SpoIIID 中, 获得菌株 SpoIIIDpHTP1Ac、SpoIIIDpHTP3Ac、SpoIIIDpHTP4A、SpoIIIDpHTP8E、HD<sup>-</sup>- $\Delta$ SpoIIIDpHTP1Ac、HD<sup>-</sup>- $\Delta$ SpoIIIDpHTP3Ac、HD<sup>-</sup>- $\Delta$ SpoIIIDpHTP4A 和 HD<sup>-</sup>-

$\Delta$ SpoIIIDpHTP8E。

#### 1.7 不同启动子指导的 *cryIAc* 蛋白产量分析

用 SM 培养基培养苏云金芽胞杆菌至细胞裂解前, 收集菌体将其冻干。将得到的冻干粉用 Tris-HCl 缓冲液溶解, 用破碎仪 (MINI-BEADBEATER, Biospec 公司) 机械震荡破碎 90 s 后, 加上样缓冲液, 沸水浴 10 min, 离心取上清液, 利用 Pierce<sup>®</sup> 660 nm protein Assay Kit 进行蛋白定量, 取相同蛋白量上样, 进行 SDS-PAGE 电泳。

#### 1.8 室内生物活性测定

用 SM 培养基培养 SpoIIIDpHTP1Ac、SpoIIIDpHTP3Ac、SpoIIIDpHTP4A 和 SpoIIIDpHTP8E 菌株至细胞裂解前, 收集菌体将其冻干。每份冻干粉称取出 0.02 g, 分别用 0.5 mL Tris-HCl 缓冲液溶解, 破碎 90 s。对小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 进行室内生物活性测定, 测定方法见参考文献 [22]。应用 POLO 软件计算得出  $LC_{50}$  和 95% 置信区间。重复 3 次。

## 2 结果和分析

### 2.1 *spoIIID* 基因缺失对 *cry* 基因启动子转录活性影响

分别构建了 4 种典型 *cry* 基因启动子 P*cryIAc*、P*cry3A*、P*cry4A* 和 P*cry8E* 与 *lacZ* 基因融合的质粒 pHT304P*cryIAc*、pHT304P*cry3Ac*、pHT304P*cry4A* 和 pHT304P*cry8E* (图 1), 并分别转化到 HD-73 和 HD- $\Delta$ SpoIIID 菌株中。 $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定表明 *cryIAc* 基因启动子 (P*cryIAc*) 在野生型菌株 HD-73 和 HD- $\Delta$ SpoIIID 菌株中  $T_3$  开始表达, 以后活性显著增强, 两者无显著差异 (图 2-A); *cry3A* 基因启动子 (P*cry3A*) 活性从  $T_1$  到  $T_{12}$  在 HD-73 菌株和 HD- $\Delta$ SpoIIID 菌株中随着培养时间的延长, 活性不断增强, 并且 *cry3A* 启动子在 *spoIIID* 突变体中的活性略高于 HD-73 菌株中的启动子活性 (图 2-B); *cry4A* 基因启动子 (P*cry4A*) 从  $T_3$  开始表达, 在  $T_5$  到  $T_{10}$  之间, *cry4a* 基因启动子在 HD-73 菌株中的转录活性略高于在 *spoIIID* 突变菌株中的转录活性 (图 2-C)。 *cry8E* 基因启动子 (P*cry8E*) 活性 (图 2-D)  $T_1$  到  $T_8$  上升明显, 在  $T_8$  到  $T_{12}$  之间, *cry8E* 基因启动子表达活性稳定在高水平上, 并且在 HD-73 菌株与 *spoIIID* 突变株相比, 酶活没有显著差异。以上结果说明 *spoIIID* 突变对 *cryIAc* 和 *cry8E* 基因启动子转录活性

没有显著影响, *cry3A* 启动子转录活性略有提高, 而对 *cry4A* 基因启动子影响较大。

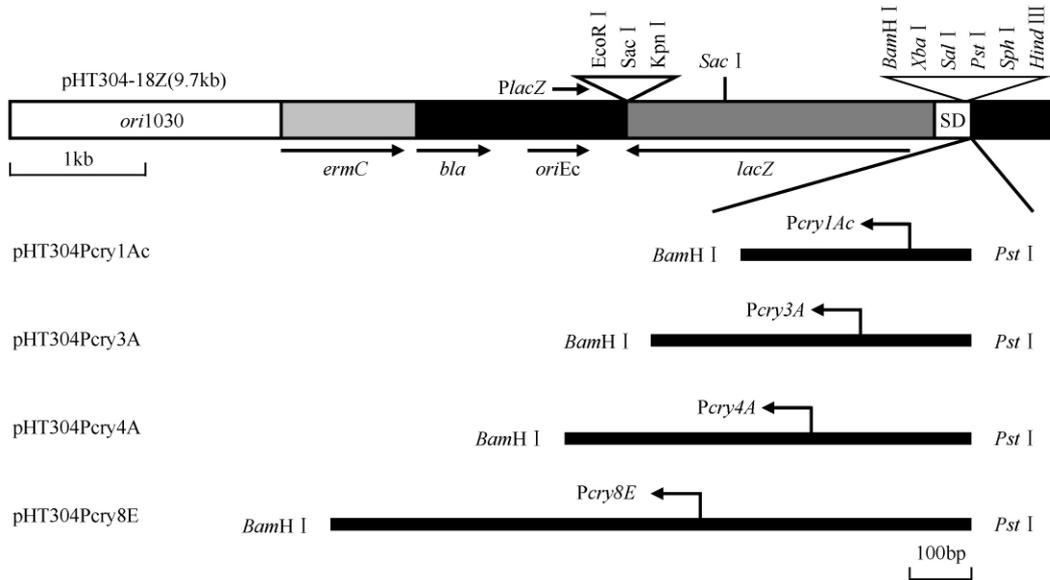


图 1 *cry* 基因启动子与 *lacZ* 融合表达质粒构建示意图

Fig. 1 Construction of the *cry* gene promoter fusions with *lacZ* gene.

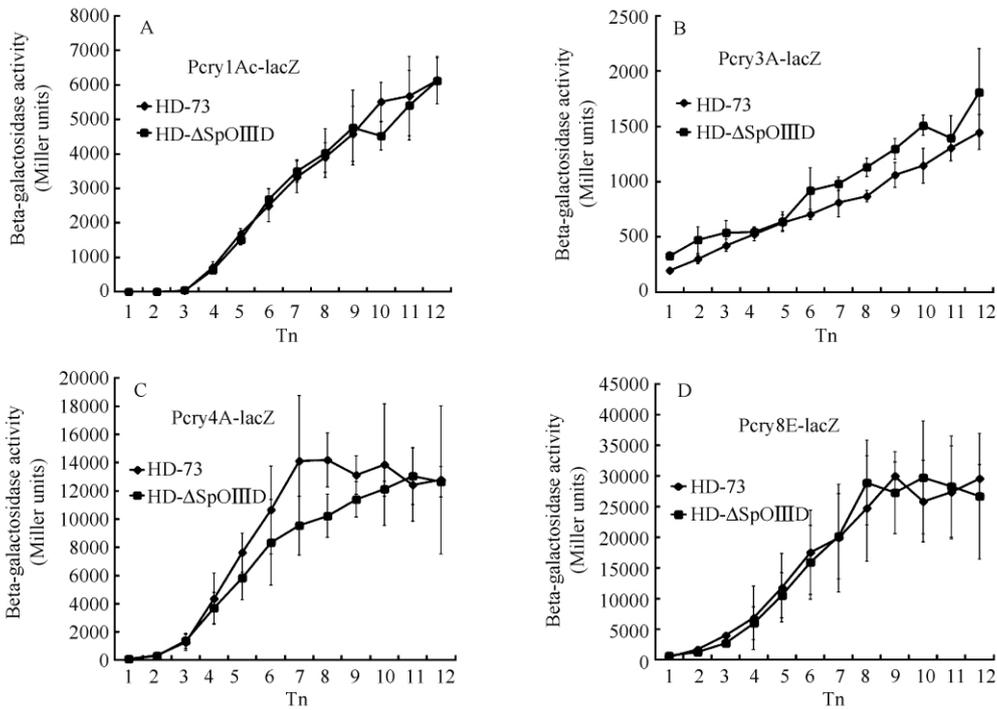


图 2 不同启动子在 HD-73 和 HD- $\Delta$ SpoIIID 突变株中的转录活性

Fig. 2  $\beta$ -galactosidase activity directed by *cry* gene promoter in HD-73 and HD- $\Delta$ SpoIIID. Tn: N hours after the termination of the logarithmic phase. A: *Pcry1Ac*, B: *Pcry3A*, C: *Pcry4A*, D: *Pcry8E*.

## 2.2 *cry* 基因启动子转录活性比较

在 HD-73 菌株中分析各启动子 T<sub>1</sub> 到 T<sub>12</sub> 的转录活性发现 *Pcry8E* 转录活性最高, *Pcry4A* 次之, 然后

是 *Pcry1Ac*, *Pcry3A* 转录活性最低 (图 3-A)。在 HD- $\Delta$ SpoIIID 菌株中四个启动子的转录活性 (图 3-B) 高低顺序与 HD-73 野生型菌株中一致。因此, *Pcry8E*

转录活性在 HD-73 菌株和 *spoIIID* 突变株都是最高的。

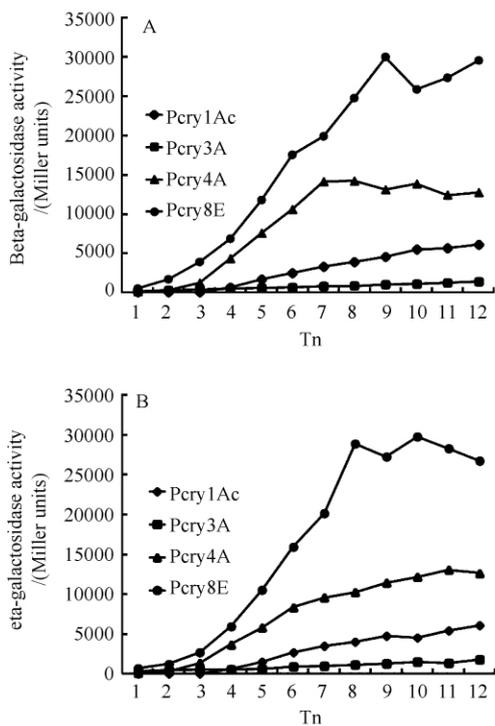


图3 不同启动子转录活性比较  
Fig. 3 Comparison of  $\beta$ -galactosidase activity directed by *cry* gene promoter. Tn: N hours after the termination of the logarithmic phase. A: HD-73, B: HD- $\Delta$ SpoIIID.

### 2.3 不同 *cry* 基因启动子指导的 Cry1Ac 蛋白产量分析

将 *cry* 基因启动子与 *cryIAc* 基因融合, 构建了 pHTP1Ac、pHTP3A、pHTP4A 和 pHTP8E 四个重组质粒 (图 4), 并转化 *E. coli* SCS110 去甲基化后转化进入 HD- $\Delta$ SpoIIID 中。用 SM 培养基培养 SpoIIIDpHTP1Ac、SpoIIIDpHTP3Ac、SpoIIIDpHTP4A 和 SpoIIIDpHTP8E 菌株至细胞裂解前, 收集菌体冻干。

将得到的冻干粉用 Tris-HCl 缓冲液溶解, 破碎, 加 loading buffer 煮样后离心取上清, 利用 660 nm 蛋白定量试剂盒对上清液中总蛋白定量, 取相同蛋白量上样, 进行 SDS-PAGE 电泳。结果表明 (图 5), 在 HD- $\Delta$ SpoIIID 菌株中, 总蛋白量相同的条件下, Pcry1Ac、Pcry8E 指导的 Cry1Ac 蛋白产量较高, Pcry4A 次之, Pcry3A 指导的 Cry1Ac 蛋白产量最低。

### 2.4 室内生物活性分析

测定 SpoIIIDpHTP1Ac、SpoIIIDpHTP8E、SpoIIIDpHTP4A 和 SpoIIIDpHTP3Ac 菌株对小菜蛾的室内生物活性, 结果表明 (表 3), 4 个菌株对小菜蛾活性由高到低分别是 SpoIIIDpHTP1Ac、SpoIIIDpHTP8E、SpoIIIDpHTP4A 和 SpoIIIDpHTP3Ac。与不同启动子指导的蛋白产量的分析结果一致。综合 Cry1Ac 蛋白量表达结果 (图 5) 说明 *cryIAc* 基因启动子指导自身

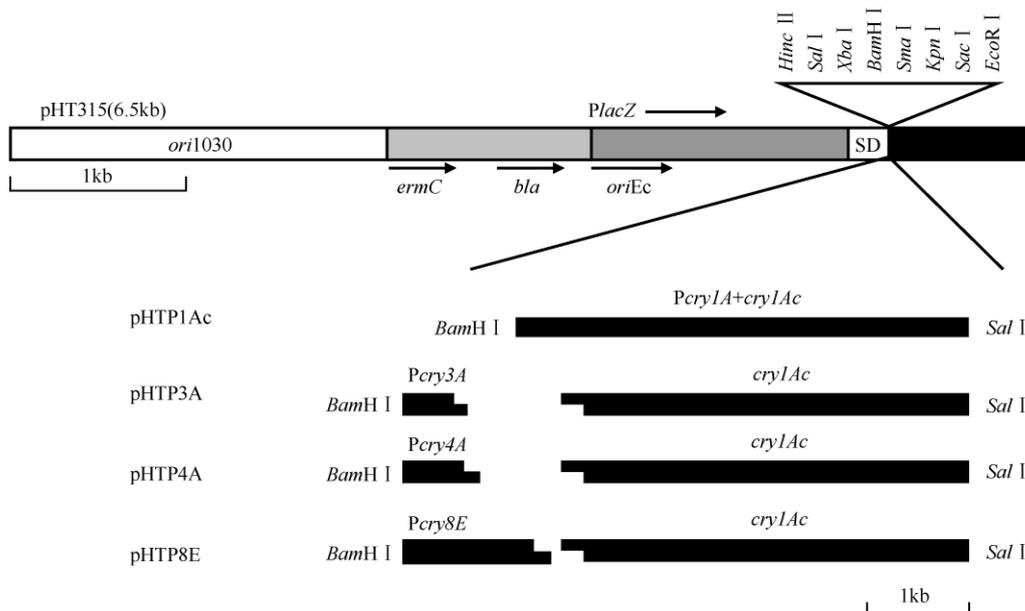


图4 不同启动子指导的 Cry1Ac 蛋白表达载体构建示意图  
Fig. 4 Construction of different *cry* gene promoter fusions with *cryIAc* gene.

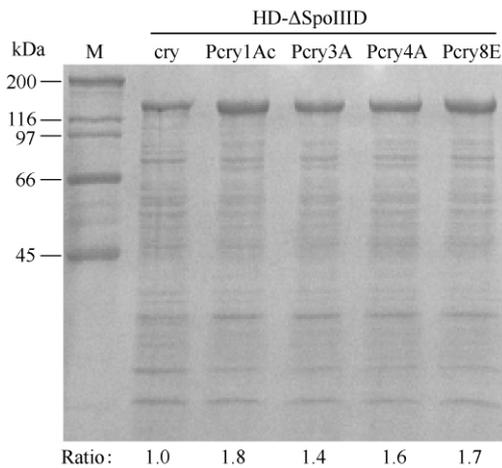


图5 不同启动子指导的 Cry1Ac 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of Cry1Ac protein directed by different *cry* promoter in HD- $\Delta$ SpoIIID. Ratio: The production of Cry1Ac protein directed by different *cry* promoter.

基因表达, 得到最高的 Cry1Ac 蛋白产量。而 *cry8E* 基因启动子指导的 Cry1Ac 蛋白产量接近 *cry1Ac* 基因启动子。

表3 HD- $\Delta$ SpoIIID 菌株对小菜蛾生物活性测定

Table 3 Insecticidal activity of HD- $\Delta$ SpoIIID strains

Samples	LC <sub>50</sub> / (mg/L)	95% Effective Dose
SpoIIIDpHTP1Ac	0.22	0.20 - 0.24
SpoIIIDpHTP3Ac	0.70	0.53 - 0.71
SpoIIIDpHTP4A	0.60	0.45 - 0.91
SpoIIIDpHTP8E	0.41	0.32 - 0.51

### 2.5 无晶体 *spoIIID* 突变体的筛选

*spoIIID* 突变体可以形成晶体, 但不产生芽胞。其含有 HD-73 菌株内生质粒 pHT73, 该质粒含有 *cry1Ac* 基因及其启动子的野生拷贝, 为了分析 *cry1Ac* 野生拷贝对不同 *cry* 启动子指导 *cry1Ac* 基因表达的影响, 在 *spoIIID* 突变体基础上通过高温诱变缺失了 pHT73 大质粒, 获得了无晶体无芽胞突变体 HD<sup>-</sup> $\Delta$ SpoIIID。用特异性鉴定 pHT73 质粒的引物 T1Ac5'/T1Ac3' 对 HD<sup>-</sup> $\Delta$ SpoIIID 突变体进行 PCR 鉴定 (图6), 结果表明, 对照菌株 HD-73 和 HD- $\Delta$ SpoIIID 可扩增出 100bp 左右的条带, 而 HD<sup>-</sup> $\Delta$ SpoIIID 菌株无 100bp 条带, 说明该菌株缺失 pHT73 大质粒。显微镜观察结果表明, 对照菌株 HD-73 中可观察到芽胞与杀虫蛋白晶体 (图7-A); HD- $\Delta$ SpoIIID 菌株中可观察到杀虫晶体蛋白, 而无芽胞 (图7-B); 而 HD<sup>-</sup> $\Delta$ SpoIIID 菌株中只观察到营养体细胞, 芽胞与杀虫晶体蛋白都不存在 (图7-C)。以上结果说明获得了无晶体、无芽胞 *spoIIID* 基因突变体。

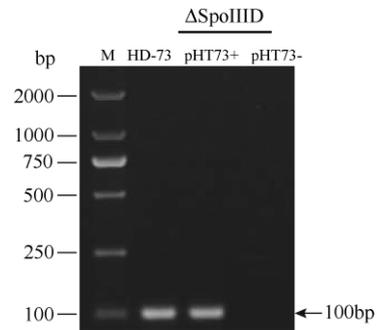


图6 pHT73 质粒缺失 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR identification of pHT73 mutant.

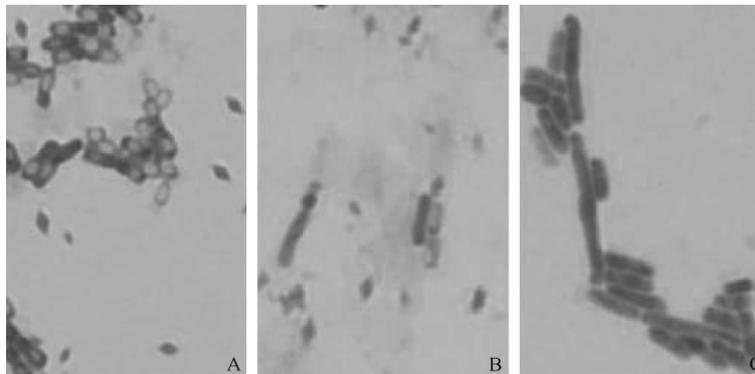


图7 不同菌株显微镜观察结果

Fig. 7 Microscopy observation of different strains. A: HD-73; B: HD- $\Delta$ SpoIIID; C: HD<sup>-</sup> $\Delta$ SpoIIID.

## 2.6 *cry* 启动子指导 *cry1Ac* 基因在无晶体 *spoIIID* 突变体中的产量分析

将 pHTP1Ac、pHTP3A、pHTP4A 和 pHTP8E 四个重组质粒转入 HD<sup>-</sup>Δ*SpoIIID* 菌株中,在 SM 培养基中培养至细胞裂解前,收集菌体分析蛋白产量。总蛋白量相同的条件下,Pcry1Ac、Pcry8E 指导的 *cry1Ac* 蛋白产量较高,Pcry4A 次之,Pcry3A 指导的 Pcry1Ac 蛋白产量最低(图8),与 HD-*SpoIIID* 菌株中的蛋白表达情况一致。说明含有 *cry1Ac* 野生拷贝对于分析不同 *cry* 类型启动子强弱顺序无影响,但是 *cry1Ac* 野生拷贝失去以后蛋白产量的差异更明显。

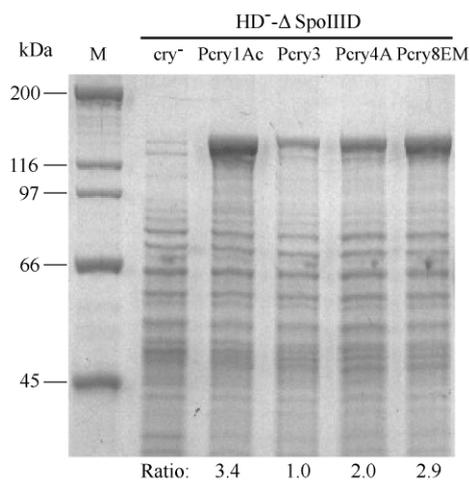


图8 HD<sup>-</sup>Δ*SpoIIID* 中不同启动子指导的 *Cry1Ac* 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of *Cry1Ac* protein directed by different *cry* promoter in HD<sup>-</sup>Δ*SpoIIID*. Ratio: The production of *Cry1Ac* protein directed by different *cry* promoter.

## 3 讨论

*cry1Ac* 启动子和 *cry4A* 启动子都是由芽胞期转录起始因子  $\sigma^E$  和  $\sigma^K$  控制<sup>[11, 23-24]</sup>,  $\sigma^E$  控制 *spoIIID* 基因的活性,*spoIIID* 基因是  $\sigma^K$  激活所必需的,本研究发现在 *spoIIID* 基因缺失突变株中,*cry1Ac* 启动子的转录活性未受影响,而 *cry4A* 基因启动子的活性在 T<sub>5</sub> 到 T<sub>10</sub> 之间低于在野生型 HD-73 中的活性,说明 *SpoIIID* 对 *cry4A* 可能具有调控作用,这方面需要进一步的深入研究。*cry3A* 和 *cry8E* 基因启动子均不受  $\sigma^K$  控制<sup>[12-13, 25]</sup>,因此在 *spoIIID* 基因缺失突变

株,其转录活性均未降低。

本研究比较了 *cry1Ac*、*cry3A*、*cry4A* 和 *cry8E* 基因启动子的活性,发现 P*cry8E* 在转录水平具有最高的活性,翻译水平上也接近 *cry1Ac* 启动子指导的 *cry1Ac* 基因的表达,说明 P*cry8E* 是一个强启动子。研究中发现 *cry1Ac* 启动子的转录活性低于 P*cry8E*,而在翻译水平上 *cry1Ac* 自身启动子指导 *cry1Ac* 表达略高于 P*cry8E*,在转录和翻译水平上出现了不一致的现象。本研究所用 *cry1Ac* 启动子区与以前报道的启动子区完全一致,包含 *cry1Ac* 重叠的双启动子 Btl 和 BtlII,分别受  $\sigma^E$  和  $\sigma^K$  控制<sup>[7-9, 18]</sup>。本研究的发现说明 *cry1Ac* 启动子具有更复杂的调控机制,初步研究表明 *cry1Ac* 基因 5'-编码区可以提高 *cry1Ac* 启动子的活性(未发表资料),这可能是造成 *cry1Ac* 启动子与 *cry8E* 启动子活性比较在转录和翻译水平上不同的原因。

HD-Δ*SpoIIID* 菌株是通过缺失芽胞期母细胞调控因子 *spoIIID* 基因获得的,对晶体蛋白产量影响较小,不产生芽胞的突变株,该思路可以用于研发新型灭活的微生物杀虫剂<sup>[6]</sup>。本研究在此基础上得到的 HD<sup>-</sup>Δ*SpoIIID* 菌株,是将 HD-Δ*SpoIIID* 菌株中带有 *cry1Ac* 基因的 pHT73 质粒高温诱导缺失后得到的,是一个无芽胞,无晶体的突变株,是一种有价值的分析外源 *cry* 基因表达的遗传材料;通过在 *spoIIID* 基因突变株分析不同类型 *cry* 基因启动子活性,筛选出了在此菌株适合表达外源基因的高活性启动子 *cry8E* 基因的启动子,为构建高效表达体系奠定了基础,同时也为新农药的开 发提供了表达元件。

## 参考文献

- [1] Raymond B, Johnston PR, Nielsen-Ieroux C, Lereclus D, Crickmore N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen. *Trends Microbiology*, 2010, 18 (5) : 189-194.
- [2] Errington J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 2003, 1 (2) : 117-126.
- [3] Sanchis V, Gohar M, Chaufaux J, Arantes O, Meier A, Agaisse H, Cayley J, Lereclus D. Development and Field Performance of a Broad-Spectrum Nonviable Asporogenic Recombinant Strain of *Bacillus thuringiensis* with Greater Potency and UV Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. 1999, 4032-4039.

- [4] Wang L, Perpich J, Driks A. Maintaining the transcription factor Spo Ó level late during sporulation causes sperm defects in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (20) : 7302-7309.
- [5] Eichenberger P, Fujita M, Jensen ST, Erin MC, David ZR, Stephanie TW, Caitlin F, Koki H, Tsutomu S, Jun SL, Richard L. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biology*, 2004, 2 (10) : 1664-1683.
- [6] 张茜茜, 束长龙, 张杰, 黄大昉, 宋福平. 苏云金芽孢杆菌 *SpoIID* 基因缺失突变株的特点. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49 (9) : 1165-1170.
- [7] Komano T, Takabe S, Sakai H. Transcription of the insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Annual Review*, 2000, 5 : 131-154.
- [8] Mohamed AI, Griko N, Junker M, Bulla LA. *Bacillus thuringiensis*: A genomics and preteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1 (1) : 31-50.
- [9] Zhang J, Schairer HU, Schnetter W, Lereclus D, Agaisse H. *Bacillus popilliae* cry18Aa operon is transcribed by  $\sigma^E$  and  $\sigma^K$  forms of RNA polymerase from a single initiation site. *Nucleic Acids research*, 1998, 26 (5) : 1288-1293.
- [10] Kant S, Kapoor R, Banerjee N. Identification of a catabolite-responsive element necessary for regulation of the cry4 gene of subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (14) : 4687-4692.
- [11] Poncet S, Dervyn E, Klier A, Papoport G. Spo0A represses transcription of the cry toxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, 1997, 143 (8) : 2743-2751.
- [12] Agaisse H, Lereclus D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIIIa toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. *Journal of Bacteriology*. 1994, 176 (15) : 4734-4741.
- [13] 杜立新. 苏云金芽孢杆菌 *cry8E* 基因转录调控机制研究. 河北农业大学博士学位论文, 2011.
- [14] Agaisse H, Lereclus D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cryIIIa toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 1994, 13 (1) : 97-107.
- [15] Arantes O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 1991, (108) : 115-119.
- [16] 余健秀, 蒙国基, 曾少灵, 谢瑞瑜, 谭乐, 庞义. 苏云金芽孢杆菌 *cry3Aa* 启动子的克隆和营养期表达载体的构建. 高技术通讯 (*High Technology Letters*), 2001. 3 : 5-14.
- [17] Yoshisue H, Sakai H, Sen K, Yamagiwa M, Komano T. Identification of a second transcriptional start site for the insecticidal protein gene *cryIVA* of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Gene*, 1997, (185) : 251-255.
- [18] Herrera G, Snyman SJ, Thomson JA. Construction of a Bioinsecticidal Strain of *Pseudomonas fluorescens* Active against the Sugarcane Borer, *Eldana saccharina*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, 60 (2) : 82-690.
- [19] 孙长坡, 宋福平, 张杰, 黄大昉. 苏云金芽孢杆菌 G03 *spoIVF* 操纵子敲除对芽孢和晶体形成的影响. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47 (4) : 583-587.
- [20] Geman PG, Regina B, Jorge EI. Potential effect of a putative  $\sigma^{H-driven}$  promoter on the over expression of the toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 140-146.
- [21] Kronstad JW, Whiteley HR. Inverted Repeat Sequences Flank a *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene. *Journal of Bacteriology*, 1984, 95-102.
- [22] 任莹博, 李国勋, 王勤英, 黄大昉, 宋福平, 张杰. Bt *cryIAa4* 基因的克隆和表达. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2004, 12 (2) : 188-191.
- [23] Bravo A, Agaisse H, Salamitou S, Lereclus D. Analysis of *cryIAa* expression in *sigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 1996, 250 (6) : 734-741.
- [24] Yoshisue H, Ihara K, Nishimoto T, Sakai H, Komano T. Expression of the genes for insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*: *cryIVA*, not *cryIVB*, is transcribed by RNA polymerase containing sigma H and that containing sigma E. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 127 (1-2) : 65-72.
- [25] Malvar T, Baum JA. Tn5401 disruption of the *spo0F* gene, identified by direct chromosomal sequencing, results in CryIIIa overproduction in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176 (15) : 4750-4753.

## Activity of four *cry* gene promoters in *spoIIID* mutant of *Bacillus thuringiensis*

Xinmei Wang<sup>1</sup>, Lixin Du<sup>2,3</sup>, Qi Peng<sup>2</sup>, Yingping Liang<sup>2</sup>, Jie Li<sup>1</sup>, Jie Zhang<sup>2</sup>, Fuping Song<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect pests, Institute of Plant Protection Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

<sup>3</sup> Institute of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

**Abstract:** [Objective] We studied the influence of *spoIIID* gene deletion on the activity of *cryIAc*, *cry3A*, *cry4A* and *cry8E* gene promoters in *Bacillus thuringiensis* and compared the activity among these promoters in *spoIIID* mutant (HD- $\Delta$ SpoIIID). [Methods] We constructed 4 promoter fusions with *lacZ* gene and transformed them into wild-type strain HD-73 and HD- $\Delta$ SpoIIID to analyze their transcriptional activity. We constructed a *spoIIID* gene mutant (HD<sup>-</sup>- $\Delta$ SpoIIID) with deletion of the *cryIAc*-harboring native plasmid based on HD- $\Delta$ SpoIIID strain. We constructed four promoter fusions with *cryIAc* gene and transformed them into HD- $\Delta$ SpoIIID and HD<sup>-</sup>- $\Delta$ SpoIIID to perform Cry protein quantization and bioassay. [Results] By Beta-galactosidase assay we found that the activities of the four promoters were, in decreasing order, *Pcry8E* > *PcryIA* > *Pcry4A* > *Pcry3A* in both HD-73 and HD- $\Delta$ SpoIIID strains. The deletion of *spoIIID* had no effect on transcriptional activity of *PcryIAc* and *Pcry8E*. The transcriptional activity of *Pcry3A* in HD- $\Delta$ SpoIIID was slightly higher than that in HD-73. The transcriptional activity of *Pcry4A* in HD- $\Delta$ SpoIIID was decreased compared to HD-73. The CryIAc protein production directed by *PcryIAc* was as much as *Pcry8E* in HD- $\Delta$ SpoIIID and higher than that by *Pcry4A* and *Pcry3A* in accordance with the bioassay result. [Conclusion] The *cry8E* gene promoter is the strongest promoter among four promoters in *spoIIID* gene mutant at transcriptional level. The CryIAc protein production directed by *PcryIAc* is almost equal to that by *Pcry8E*.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, *spoIIID* gene mutant, *cry* gene promoter, transcriptional activity, CryIAc protein production

(本文责编:张晓丽)

---

Supported by Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2009CB118902) and by the National Natural Science Foundation of China (31070083)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

Received: 5 April 2012/Revised: 2 May 2012