

含 *cry7* 类基因的苏云金芽胞杆菌菌株的分析

宋 萍 郭丽伟 苏俊平 王勤英 王 晖

(河北农业大学 植物保护学院,河北 保定 071001)

摘要:对我室所保存的 18 株含 *cry7* 类基因的菌株进行晶体形状、生物活性和蛋白型基因型等进行分析。结果表明:这些菌株能产生菱形、小菱形和不规则形伴孢晶体,SDS-PAGE 检测主要蛋白的分子量是 130 kDa,PCR 扩增得到 1 300 bp 条带。对马铃薯瓢虫二龄幼虫的生物活性测定结果表明,菌株 WZ-9 具有很高的杀虫率,72 h 校正死亡率达到 93.1%;菌株 WCG-10 活性次之,72 h 校正死亡率达到 44.8%,而其他菌株杀虫活性低或没有活性。对杀虫活性最高的 WZ-9 菌株扩增全长基因,得到 *cry7Ab3* 基因(GenBank Number: BI 1015188)。

关键词:苏云金芽胞杆菌; *cry7* 基因; 马铃薯二十八星瓢虫

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0040-04

Analysis of *Bacillus thuringiensis* Strains Containing *cry7* Gene

SONG Ping, GUO Li-wei, SU Jun-ping, WANG Qin-ying, WANG Hui

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Based on PCR amplification using universal primers, 18 strains of Bt containing *cry7* gene were obtained and analysis further about crystal shape, bioassay, toxin protein and gene type. Bi-pyramidal and irregular crystal shape were presented in these strains. Toxin from Bt strain appeared to contain a prominent protein band at a molecular weight of 130 kDa on SDS-PAGE. Genotypic investigations showed that these strains possessed the *cry7* gene, and the amplified fragments were 1 300 bp. Bioassay results showed that the WZ-9 strain was only harmful to larvae of *Henosepilachna vigintioctomaculata*, corrected mortality was 93.1% at 72 h. And the strain WCG-10 showed weak toxicity, corrected mortality was 44.8% at 72 h. Other strains were no toxicity against this insect. The full length toxin gene *cry7Ab3*, was amplified and submitted to the committee of Bt toxin nomenclature (GenBank Number: BI 1015188).

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *cry7* gene; *Henosepilachna vigintioctomaculata*

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis* 简称 Bt)是一种分布极广且应用广泛的微生物杀虫剂,其杀虫活性主要来自伴孢晶体蛋白^[1],称为杀虫晶体蛋白(ICP)或 δ -内毒素(Delta-endotoxin)。无论是 Bt 制剂的直接使用还是转基因植物的种植主要是针对鳞翅目害虫的防治^[2,3],自 1983 年对鞘翅目昆虫有杀虫活性的 Bt 菌株被分离出来之后^[4],Bt 对鞘翅目害虫生物防治的研究引起关注^[5,6]。

马铃薯瓢虫(*Henosepilachna vigintioctomaculata*, 又名二十八星瓢虫)是为害马铃薯和茄科类作物的重要害虫,其幼虫和成虫都在叶背啃食叶肉,仅留表皮,严重时只留下叶脉,以致全株枯死^[7]。Bt 对该虫的生物防治研究较少,国际上没有研究报道,国内

仅有高梅影等^[8]在 1999 年报道一株 Bt 菌株的菌悬液对马铃薯瓢虫二龄幼虫有杀虫活性,但是有关该菌株的其他信息未见报道。本研究对我室所保存的 18 株含 *cry7* 类基因的菌株进行晶体形状、生物活性、蛋白型和基因型等进行分析,并对该虫有活性的菌株进一步分析,期望得到自主知识产权的高活性菌株和杀虫基因,为以后应用提供资源。

1 材料和方法

1.1 Bt 菌株和试虫

苏云金芽胞杆菌所有菌株是由河北农业大学害虫生防实验室提供。

马铃薯瓢虫成虫(*H. vigintioctomaculata*)采自

收稿日期:2010-06-27

基金项目:国家高技术研究发展专项经费资助

作者简介:宋 萍(1977-),女,山东潍坊人,讲师,在职博士,主要从事昆虫病原微生物研究。

通讯作者:王勤英(1962-),女,河北藁城人,教授,博士,主要从事昆虫病虫生物防治研究。

河北农业大学标本园内,在室内饲养,交配产卵后将带有卵块的叶片集中孵化,初孵化的幼虫用新鲜叶片饲养,二龄幼虫进行生物活性测定。

1.2 晶体形状与蛋白型分析

在 1/2LB 固体平板上培养 18 株 Bt 菌株,28℃ 培养 72 h 后,刮取少量菌落进行涂片,用碱性复红染色,在油镜下观察晶体形状、大小以及芽胞和晶体的分离率。

在油镜下观察已经胞晶分离的菌落,刮取少量菌苔充分溶于 100 μ L 灭菌水中,振荡重悬,离心(4℃、12 000 r/min、5 min),弃上清,将沉淀重悬于 20 μ L 灭菌水中,加入相同体积的 2 \times 上样缓冲液,混匀后,100℃ 煮沸 5 min,离心(4℃、12 000 r/min、1 min),取上清用于 SDS-PAGE 检测。

1.3 生物活性测定

1.3.1 悬浮液制备 分别将 18 株 Bt 菌株接种于 1/2 LB 固体平板上培养,28℃ 培养 72 h 后镜检,在产生大量晶体时,加入适量灭菌水,将菌体从平板上刮下,放入离心管中,充分混匀后制备成均匀的细菌悬浮液,离心(4℃、12 000 r/min、5 min),称取沉淀的重量,用灭菌水稀释成相同浓度,用于生物活性测定。

1.3.2 生物活性测定 采用浸叶法对马铃薯瓢虫二龄幼虫进行生物活性测定。将制备好的 Bt 孢晶混合菌悬液(5 mg/mL)(内含 0.3% 土温 80),均匀涂抹在新鲜的马铃薯叶片上,取出后自然晾干,放入无菌的培养盒中(10 cm 直径),每盒接入试虫 10 头,每个处理设 3 个重复,以无菌水为空白对照,置于(26 \pm 1)℃、14 h 光照的生化培养箱中培养,72 h 后观察试虫的生长状况,记录活虫数、死虫数,计算校正死亡率。

1.4 基因型分析

Bt 总 DNA 和质粒 DNA 提取参考 Narva 等^[9]方法。以总 DNA 为模板,先用 40 通用引物对 18 株菌株的 *cry* 基因进行 PCR 扩增鉴定^[10],初步确定其含有 *cry7* 基因。参照 GenBank 发表的 *cry7* 基因序列,利用 Premier Primer5 软件设计了 3 对 *cry7* 特异性引物,对高杀虫活性的 WZ-9 菌株质粒 DNA 进行 PCR 扩增,得到全长 *cry* 基因序列,使用 DNAMAN 软件分析基因序列并提交 Bt 基因国际命名委员会命名。

2 结果与分析

2.1 Bt 菌株晶体形状观察

18 株 Bt 菌株在 LB 固体培养基中 30℃ 培养生长,菌落呈乳白色,边缘皱折,营养体细胞呈杆状,从

光学显微镜和扫描电镜可以观察到,在培养 4 d 时开始,大部分菌株产生菱形伴胞晶体蛋白,菌株 SYY 和 WCG-40 产生菱形和不规则形伴胞晶体(图 1),菌株 WZ-9 产生小菱形晶体(图 2),但是随着培养时间的延长,从第 10 天开始菱形的晶体蛋白开始分解,形状不规则。

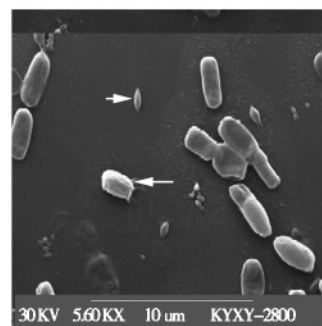


图 1 Bt 菌株芽胞(←)和小菱形晶体(→)的扫描电镜图片

Fig. 1 Electron scanning photography of the parasporal bodies(→) and spores (←)

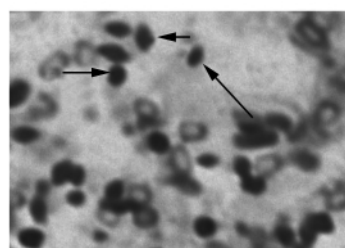


图 2 Bt 菌株芽胞(→)、菱形晶体(←)和不规则形晶体()的光镜图片

Fig. 2 The crystal of Bt toxin protein under optic microscope

2.2 Bt 菌株生物活性测定结果

从生测结果可以看出(表 1),18 株 Bt 菌对马铃薯瓢虫二龄幼虫的活性差异显著,得到 1 株高杀虫活性的菌株 WZ-9,其杀虫活性远远高于其他菌株,72 h 校正死亡率为 93.1%;菌株 WCG-40 的杀虫活性次之,72 h 校正死亡率为 44.8%;而其他菌株的杀虫活性很低甚至没有杀虫活性。

2.3 Bt 菌株蛋白型和基因型分析

刮取少量在油镜下观察已经胞晶分离的菌落,充分溶于灭菌水中,制备好的样品用于 SDS-PAGE 检测晶体蛋白分子量。结果表明(图 3),大部分 Bt 菌株主要表达了 1 条 130 kDa 左右的蛋白主带,菌株 BQZ-42 产生 80 kDa 和 70 kDa 表达蛋白,同时菌株 BQZ-8 产生 130 kDa 和 80 kDa 表达蛋白。

以每个 Bt 菌株的总 DNA 为模板,先用 40 对通用引物进行 PCR 扩增,得到 1 300 bp 的扩增条带(图 4),确定其含有 *cry7* 基因,没有其他引物对能扩增出 PCR 产物,说明不含有 GenBank 中已知的其他 *cry* 基因。然后以高活性菌株 WZ-9 质粒为模板,分别利用自己设计的 3 对 *cry7* 特异性引物进行扩

增,扩增序列测序后进行拼接和分析,获得了1条总长为3 781 bp 基因序列,其中包含了一个3 414 bp 的开放读码框,其编码的蛋白由1 138 个氨基酸残基组成,推导的理论分子量为129.64 kDa,等电点

为4.97,为强酸性蛋白,该基因被Bt杀虫晶体蛋白命名委员会命名为cry7Ab3(登录号为BI 1015188)。

表1 Bt菌对马铃薯瓢虫杀虫活性测定结果(72 h)

Tab.1 The insecticidal activity of Bt strain against *H. vigintioctomaculata* (72 h)

菌株名称 Strains	晶体形状 Crystal shape	基因型 Gene	蛋白型/kDa Protein	校正死亡率/% Corrected mortality
QZ-7	菱形	cry7	130	0
BQZ-8	菱形	cry7	130, 80	0
HAU-5	菱形	cry7	130	0
HLY-6-3	菱形	cry7	130	0
HND-7	菱形	cry7	130	0
QYW-2	菱形	cry7	130	0
ZKB-3	菱形	cry7	130	0
SYT	菱形, 不规则形	cry7	130	3.45
HAU-12	菱形	cry7	130	3.45
HAU-9	菱形	cry7	130	3.45
BQZ-12	菱形	cry7	80, 70	10.34
SON-1	菱形	cry7	130	10.34
WCG-2	菱形	cry7	130	13.80
BDB	菱形	cry7	130	13.80
LYZ-1	菱形	cry7	130	17.24
ZJK-3	菱形	cry7	130	27.59
WCG-10	菱形, 不规则形	cry7	130	44.83
WZ-9	菱形	cry7	130	93.10

注: CK 平均死亡率 3.33%。

Note: The average mortality rate of CK is 3.33%.

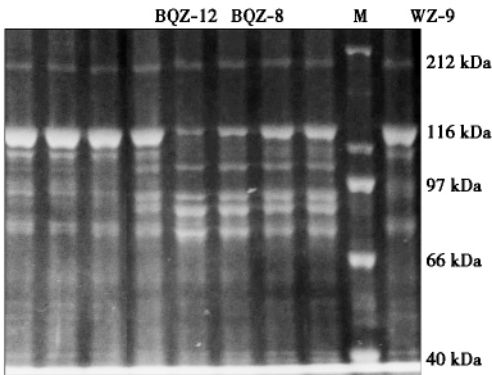


图3 Bt菌株毒素蛋白SDS-PAGE图

Fig.3 SDS-PAGE analysis of Bt toxin protein

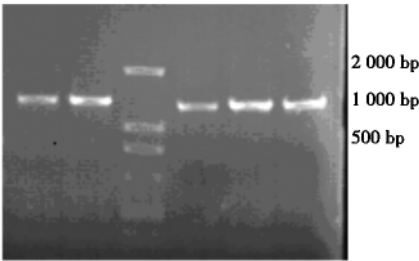


图4 Bt菌株的PCR扩增图谱(cry7)

Fig.4 PCR result of Bt strain using cry7

3 讨论

从光学显微镜下观察到大部分Bt菌株产生菱形伴胞晶体蛋白,菌株SYT和WCG-10产生菱形和不规则形伴胞晶体,使用40通用引物进行PCR扩增时只得到了cry7基因的扩增产物,没有其他基因的扩增产物。可能这2个菌株中含有其他未知cry基因。本试验只对马铃薯瓢虫上进行生物活性测定,对鞘翅目其他昆虫的活性状况,还需要进一步测定。

在本研究中发现同样属于cry7类基因的Bt菌株,晶体蛋白对马铃薯瓢虫幼虫的杀虫活性差异显著,最高的杀虫活性在72 h校正死亡率达到了93.1%,而多数菌株没有表现出活性,这可能与编码晶体蛋白的开放读码框(ORF)中基因序列有关。Bt最初的分类是1989年Höfte和Whiteley根据杀虫晶体蛋白的杀虫活性和一级结构,将当时已知的杀虫晶体蛋白分为五大类^[11]。由于氨基酸序列和杀虫谱之间不存在简单的相关关系,同时大量的不同杀虫晶体蛋白的发现,到1998年Crickmore等^[12]提出了一种新的Cry杀虫晶体蛋白分类方法,根据氨基酸同源性进行分级分类,形成了一个开放式分类系

统。氨基酸同源性在 45% 以下的,为第一等级,用阿拉伯数字表示;所以,该试验所用的 18 株 Bt 菌株同属 *cry7* 类基因,其氨基酸同源性不足 45%,其他大于 50% 氨基酸序列可能存在差异,导致了在昆虫中肠内原毒素蛋白不能被中肠蛋白酶酶解,不能暴露出毒素活性区,导致了不能有效的结合在中肠结合位点^[13],无法发挥作用。这 18 株 Bt 菌株的 ORF 的基因序列还需要进一步克隆,进行基因序列比对。

参考文献:

- [1] Schnepf N, Crickmore J, Van Rie Lereclus *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein [J]. Microbiol And Molecular Biology, 1998, 62: 3775 – 3806.
- [2] Izabela Swiecicka, Dennis K Bideshi, Brian A Federici. Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of *trichoplusia ni* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(4): 923 – 930.
- [3] Chambers J A, Jelen A, Gilbert M P, *et al.* Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* [J]. J Bacteriol, 1991, 173(13): 3966 – 3976.
- [4] Krieg A, Huger A M, Langenbruch G A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of Coleoptera [J]. Journal of Applied Entomology, 1983, 96: 500 – 508.
- [5] Shu C, Yan G, Wang R *et al.* Characterization of a novel *cry8* gene specific to Melolonthidae pests: *Holotrichia oblita* and *Holotrichia parallela* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 84(4): 701 – 707.
- [6] Storer N P, Babcock J M, Edwards J M. Field measures of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) mortality caused by Cry34/35Ab1 proteins expressed in maize event 59122 and implications for trait durability [J]. Journal of Economic Entomology, 2006, 99(4): 1381 – 1387.
- [7] 李含毅, 魏信平, 栗均平. 马铃薯瓢虫发生规律及其防治研究 [J]. 陕西农业科学, 1996(3): 24 – 25.
- [8] 高梅影, 李荣森, 戴顺英, 等. 杀鞘翅目苏云金芽胞杆菌新菌株及其杀虫剂的研究 [J]. 微生物学报, 1999, 39(6): 515 – 520.
- [9] Narva, Kenneth E, Payne J M, *et al.* Novel *Bacillus thuringiensis* microbes active against nematodes, and genes encoding novel nematodes-active tooxin from *Bacillus thuringiensis* isolates [P]. European Patent Office, EP0462721, 1991.
- [10] 苏旭东. 苏云金芽胞杆菌菌株的分离和 *cry* 基因的鉴定 [M]. 保定: 河北农业大学, 2005.
- [11] Hofte H, Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* [J]. Microbiol Rev, 1989, 53(2): 242 – 255.
- [12] Crickmore N. Http: //epunix. biols. Susx. ac. uk/Home/Neil Crickmore/Bt/index. html.
- [13] Li H, Gonzalez-Cabrera J, Oppert B *et al.* Binding analyses of Cry1Ab and Cry1Ac with membrane vesicles from *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(1): 52 – 57.