

苏云金芽孢杆菌 SHJ-5 菌株杀虫晶体蛋白基因分析

杜立新¹,董明¹,王容燕¹,马铭泽²,王金耀¹,曹伟平¹,宋健¹,冯书亮¹

(1. 河北省农林科学院 植物保护研究所,河北省农业有害生物综合治理工程技术研究中心,河北 保定 071000;

2. 河北省农林科学院 河北 石家庄 050051)

摘要: 苏云金芽孢杆菌 SHJ-5 菌株是从黑龙江采集的土样中分离获得的新菌株,对其伴孢晶体形状、基因型、蛋白表达以及杀虫活性进行了系统研究。菌株 SHJ-5 产生的伴孢晶体形状为钝菱形;利用 PCR-RFLP 技术对该菌株的基因型进行鉴定,结果表明,该菌株含有 *cry1Aa*、*cry1Ea*、*cry1Be*、*cry1Ah*、*cry1Ai*、*cry2Ab*、*cry1I* 和 *vip3A* 基因;SDS-PAGE 晶体蛋白检测结果显示,该菌株表达 130~150 kDa 和 60 kDa 大小蛋白;生物活性测定表明,菌株 SHJ-5 对棉铃虫和小菜蛾有较高杀虫活性,校正死亡率分别为 100% 和 96.7%。

关键词: 苏云金芽孢杆菌;PCR-RFLP;克隆;杀虫活性

中图分类号: S476⁺.12 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-194-04

Identification of *cry* Gene from a Novel *Bacillus thuringiensis* Isolate SHJ-5

DU Li-xin¹, DONG Ming¹, WANG Rong-yan¹, MA Ming-ze², WANG Jin-yao¹,
CAO Wei-ping¹, SONG Jian¹, FENG Shu-liang¹

(1. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, IPM Centre of Hebei Province, Baoding 071000, China; 2. Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: The novel *Bacillus thuringiensis* SHJ-5 was isolated from the soil in Heilongjiang province. This paper was a study on the strain SHJ-5, including that the shape of the crystal, the *cry*-type, protein expression and insecticidal activity. It produced blunt diamond-shaped crystals. It was identified that strain SHJ-5 contained *cry1Aa*, *cry1Ea*, *cry1Be*, *cry1Ah*, *cry1Ai*, *cry2Ab*, *cry1I* and *vip3A* gene by PCR-RFLP. SDS-PAGE analysis indicated that the strain produced a 130~150 kDa protein and a 60 kDa protein. Bioassay showed that strain SHJ-5 had high insecticidal activity to *Helicoverpa armigera* and *Plutella xylostella*. The corrected mortality to the two target insects was 100% and 96.7%, respectively.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; PCR-RFLP; Clone; Insecticidal activity

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 作为一种对人畜安全、环境友好的杀虫微生物,在农林害虫的防治中发挥着越来越重要的作用,并成为国内外开发应用最成功的一种生物农药^[1]。随着生物化学、遗传学、分子生物学等学科的发展,对 Bt 杀虫基因鉴定与分析的方法得到迅猛发展,以 PCR 扩增为基础的鉴定方法主要有 PCR-RFLP、PCR-核酸测序、多重 PCR、Multiplex PCR 等^[2-7],其中 PCR-RFLP 技术以快速便捷的优点被广泛应用于 Bt 杀虫基因的鉴定与分析。而基因克隆技术作为

一种成熟的分子操作技术,也被用于 Bt 基因的研究。本研究从黑龙江采集的土样中分离出的菌株 SHJ-5,利用 PCR-RFLP 技术对基因型进行了初步分析,借助基因克隆的方法对基因较复杂的 *cry1* 类基因做了进一步研究,为较复杂菌株基因型的研究提供一种方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 菌株 SHJ-5 自黑龙江土壤中通过抗

收稿日期: 2011-01-27

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA10A203); 国家科技支撑项目(2006BAD08A02); 国家科技支撑项目(2008BADA5B07)

作者简介: 杜立新(1978-),男,河北武安人,助理研究员,在读博士,主要从事植物病害生物防治工作。

通讯作者: 冯书亮(1957-),男,河北邢台人,研究员,主要从事杀虫微生物研究。

生素筛选法分离并保存;大肠杆菌 DH5α 为本室保存。

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基 ,LB 固体培养基 ,LB 液体培养基 ,1/2 LB 固体培养基。

1.1.3 生化试剂 PCR 试剂、限制性核酸内切酶、Marker、pMD-19T 载体等均购自宝生物生物工程有限公司。

1.1.4 供试昆虫 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)、

小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 初孵幼虫。

1.2 方法

1.2.1 苏云金芽孢杆菌质粒 DNA 的提取^[8]。

1.2.2 PCR-RFLP 基因型分析 参考 KUO 等^[9]、宋福平等^[10] 方法分别用 K5un2/K3un2 和 K5un3/K3un3、*cryII*、*cry8*、*vip3A* 等 32 对引物对菌株 SHJ-5 进行基因型鉴定(表 1)。

表 1 菌株 SHJ-5 *cryI* 基因鉴定结果

Tab. 1 Identification results of *cryI*-type gene of Bt strain SHJ-5

<i>cryI</i> 基因型 <i>cryI</i> type	PCR 产物 (K5un2/K3un2) PCR product (K5un2/K3un2)		PCR 产物 (K5un3/K3un3) PCR product (K5un3/K3un3)	
	产物大小/bp Size	<i>Pst</i> I 和 <i>Xba</i> I 酶切片段/bp Digested by <i>Pst</i> I 和 <i>Xab</i> I	产物大小/bp Size	<i>Eco</i> R I 和 <i>Pst</i> I 酶切片段/bp Digested by <i>Eco</i> R I 和 <i>Pst</i> I
<i>cryIAa</i>	1 635	1 117 518	1 463	726 493 244
<i>cryIBa/cryIBe</i>	1 686	1 014 655	1 457	NP
<i>cryIEa</i>	1 635	743 518 218 140 16	1 445	986 238 221
<i>cryIAh</i>	1 581	741 518 322	1 460	970 431 95

注:/. 表示或的意思;NP. 表示无产物。
Note:/. Shows or; NP. Shows no product.

1.2.3 *cryI* 类基因部分序列克隆测序 利用 *cryI* 类通用引物 K5un2/K3un2 进行 PCR 扩增,回收 PCR 产物与 pMD-19T 载体连接,转化到大肠杆菌 DH5α 中。对阳性克隆子再提取 DNA,进行 PCR 扩增,用 *Pst* I 和 *Xba* I 对 PCR 产物进行双酶切,确定每个克隆子含有不同的 *cryI* 类基因,委托上海生物工程公司进行序列测定,DNA 序列采用 NCBI BLAST 和 DNAMAN 软件进行分析。

1.2.4 SDS-PAGE 电泳 将 Bt 菌株 SHJ-5 转接到 1/2 LB 固体培养基上,30℃ 培养 2 d,用显微镜观察伴孢晶体,晶体脱离后,刮菌少量于 Eppendorf 管中,用 1 mol/L NaCl 洗涤 2~3 次,再用去离子水洗 2~3 次,加入样品缓冲液备用。SDS-PAGE 方法参考文献《分子克隆实验指南》^[11]。

1.2.5 室内生物测定 棉铃虫生测:参见郭予元等^[2]的方法;小菜蛾生测:参见戴莲韵等^[13]的方法。

2 结果与分析

2.1 PCR-RFLP 基因型鉴定

利用 PCR-RFLP 鉴定体系,用 *cryI* 类的两对通用引物 K5un2/K3un2 和 K5un3/K3un3 进行 PCR 扩增,分别扩增出 1.6 ,1.4 kb 的阳性条带(图 1),PCR 产物分别用 *Pst* I /*Xba* I 和 *Pst* I /*Eco*R I 进行双酶切分析,结果见图 2。由于菌株 SHJ-5 酶切较复杂且特殊,根据酶切图和鉴定体系酶切多态性分析,确定该菌株含有 *cryIAa*、*cryIEa* 和 *cryIAh* 基因,不能

确定所含的其他 *cryI* 类基因,并推测可能含有新基因类型。

1. 引物 S5un8/S3un8 PCR 产物;2. 引物 K5un2/K3un2 PCR 产物;
3. 引物 K5un3/K3un3 PCR 产物;4. 引物 S5un2/S3un2 PCR 产物;5.
引物 S5un11/S3un11 PCR 产物;6. 引物 Vip3AF/Vip3AS PCR 产物;
M. Marker λ/*Eco*T 14 (19329 ,7743 ,6223 ,4254 ,3472 ,2690 ,1882 ,
1489 925 421 bp)。
1. PCR product with primer S5un8/S3un8; 2. PCR product with primer
K5un2/K3un2; 3. PCR product with primer K5un3/K3un3; 4. PCR
product with primer S5un2/S3un2; 5. PCR product with primer S5un11/
S3un11; 6. PCR product with primer Vip3AF/Vip3AS; M. Marker λ/
*Eco*T 14.

图 1 菌株 SHJ-5 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of Bt strains SHJ-5

用 *cry2*、*cryII*、*cry 8* 和 *vip3A* 等其他通用引物进行 PCR 扩增(图 1),*cry2*、*cryII* 和 *vip3* 类基因扩增出阳性片段,其余基因型并未扩增出相应大小的阳性条带。根据酶切体系,对 *cry2*、*cryII* 和 *vip3A* 的 PCR 产物做酶切分析,确定该菌含有 *cry2Ab*、*cryII*、*vip3Aa1* 基因。

2.2 *cryI* 类基因部分序列克隆测序

回收 *cryI* 类 PCR 产物,与 pMD-19T 载体连接后转化到大肠杆菌,筛选得到阳性克隆子。通过对阳性克隆子的酶切分析(图 3),确定了该菌含有

cry1Be 基因,并发现了新的基因 *cry1Ai*。选取 5 个分别含有不同的 *cry1* 类基因的阳性克隆子测序,测序结果与酶切分析结果一致,即该菌含有 5 个 *cry1* 类基因,分别为:*cry1Aa*,*cry1Ea*,*cry1Be*,*cry1Ah* 和 *cry1Ai*。

克隆得到的 *cry1* 类基因部分序列分别与其模式基因进行同源性比较,序列同源性均在 95% 以上,没有发现较新的 *cry1* 类基因。

1. *Pst* I 和 *Xba* I 酶切片段;2. *Pst* I 和 *EcoR* I 酶切片段;M. 100 bp DNA Ladder。
1. RFLP patterns of PCR product with primer K5un2/ K3un2 digested by *Pst* I /*Xba* I ; 2. RFLP patterns of PCR product with primer K5un3/ K3un3 digested by *Pst* I /*EcoR* I ; M. 100 bp DNA Ladder.

图2 菌株 SHJ-5 *cry1* 类基因酶切图

Fig.2 PCR-RFLP patterns of the *cry1* genes

1. *cry1Aa* 基因酶切图谱;2. *cry1Ea* 基因酶切图谱;3. *cry1Ai* 基因酶切图谱;4. *cry1Ah* 基因酶切图谱;5. *cry1Be* 基因酶切图谱;M. 100 bp DNA Ladder。
1. RFLP patterns of *cry1Aa* digested by *Pst* I /*Xba* I ; 2. RFLP patterns of *cry1Ea* digested by *Pst* I /*Xba* I ; 3. RFLP patterns of *cry1Ai* digested by *Pst* I /*Xba* I ; 4. RFLP patterns of *cry1Ah* digested by *Pst* I /*Xba* I ; 5. RFLP patterns of *cry1Be* digested by *Pst* I /*Xba* I ; M. 100bp DNA Ladder.

图3 阳性克隆子的酶切分析

Fig.3 RFLP of positive clone

2.3 Cry 蛋白晶体形态观察与 SDS-PAGE 分析

从黑龙江采集的土样中分离出菌株 SHJ-5,经石炭酸复红染色,显微镜观察,该菌伴孢晶体形状为钝菱形,如图 4 所示。通过 SDS-PAGE 分析,菌株 SHJ-5 所表达 ICPs 分子量大小为 130 ~ 150 kDa 和约 60 kDa(图 5)。

2.4 生物活性测定

以棉铃虫和小菜蛾初孵幼虫为供试昆虫,进行室内生物活性测定,结果表明菌株 SHJ-5 对棉铃虫和小菜蛾均具有较高杀虫活性,校正死亡率分别为

100% 和 96.7%。

图4 菌株 SHJ-5 晶体形态

Fig.4 The crystal shape of Bt strain SHJ-5

1. SHJ-5 菌株;M. Marker (200 130 97 66 43 kDa)。

1. Bt strain SHJ-5; M. Marker.

图5 菌株 SHJ-5 晶体蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of Bt strains SHJ-5

3 讨论

采用 PCR-RFLP 鉴定体系对 Bt 菌株进行 *cry1* 类基因型的鉴定时,由于其基因的序列同源性较高, RFLP 图谱的相似程度很高,很难对其基因型进行准确的判读。而部分 Bt 菌株中含有多种 *cry1* 类基因,在刘汝^[14]、黄志雄^[15]的研究中均发现多种 *cry1* 类基因同时存在,这就进一步加深了基因判读的难度。在本研究中,菌株 SHJ-5 含有 5 个 *cry1* 基因,比已报道的 *cry1* 基因型复杂。PCR-RFLP 进行基因型分析时,不能确定所含 *cry1Be* 基因,还会忽略掉基因 *cry1Ai*,通过借助于基因克隆的方法,准确的确定了该菌株所含的多个 *cry1* 类基因,为含有多个基因的复杂菌株的基因型分析提供一种方法。

不同的 Bt 基因编码的蛋白对不同的靶标害虫具有杀虫活性。在菌株 SHJ-5 所含的 *cry* 基因中, *Cry1Aa*、*Cry1Ea* 和 *Cry1Ah* 类杀虫蛋白对甜菜夜蛾,玉米螟等多种鳞翅目昆虫具较高的杀虫活性^[16]; *cry2Ab* 虽为沉默基因,对其进行异源表达发现 *Cry2Ab* 对棉铃虫初孵幼虫具有高毒力,能明显抑制二化螟二龄幼虫生长^[17,18]; *Cry1I* 蛋白主要是对鳞翅目夜蛾科 (Noctuidae)、卷叶蛾科 (Tortricidae)、菜蛾科 (Plutellidae) 和鞘翅目叶甲科 (Chrysomelidae) 的害虫有效^[19,20];营养期杀虫晶体蛋白 Vip3A 蛋白也具有广谱的杀虫活性,尤其对小地老虎 (*Agrotis ypsilon*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 等对 Cry 蛋白

不敏感的害虫有效。因此,本研究所分离得到的菌株 SHJ-5 具有较好的应用前景,既可作为原始菌株进行发酵及田间应用,也可为构建杀虫工程菌和培育抗虫转基因植物提供高毒力的候选基因。但由于本实验室供试昆虫有限,没有对其他昆虫进行室内生物活性测定,不能确定其对其他种类害虫的杀虫活性。

菌株 SHJ-5 蛋白电泳图谱上显示了 130 ~ 150 kDa 和约 60 kDa 两条蛋白条带。*cryI* 类基因表达 130 ~ 150 kDa 的蛋白,说明 *cryI* 类基因得到正常表达。而 *cry2* 类基因表达约 60 kDa 的蛋白^[21],报道 *cry2Ab* 基因一般沉默不表达,但在蛋白图谱上发现约 60 kDa 的蛋白,推测是由 *cry2Ab* 基因编码的蛋白。

参考文献:

- [1] 顾宝根,姜 辉.我国微生物农药的现状及其问题[M].北京:科学出版社,2000:13-20.
- [2] Carozzi N B, Kramer V C, Warren G W *et al.* Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(11): 3057-3061.
- [3] Juarez-Perez V M, Ferrandis M D, Frutos R. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* *cry* genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63:2997-3002.
- [4] Kalman S, Kiehne K L, Libs J L *et al.* Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis subsp. galleriae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59:1131-1137.
- [5] Song F P, Zhang J, Gu A X *et al.* Identification of *cryII*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cryII*-type gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69:5207-5211.
- [6] 宋 萍,郭丽伟,苏俊平,等.含 *Cry 7* 类基因的苏云金芽孢杆菌菌株的分析[J].华北农学报,2010,25(4):40-43.
- [7] 吴会贤,宋 萍,王勤英,等.苏云金芽孢杆菌 *Cy1* 菌株的 *cry* 基因分析[J].华北农学报,2007,22(4):180-183.
- [8] Narva K E. Novel *Bacillus thuringiensis* microbe active against Nematodes, and genes encoding novel nematode-active cloned from *Bacillus thuringiensis* isolates[P]. EP 0462721 A2. 1991.
- [9] Kuo W S, Chak K F. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 1369-1377.
- [10] 宋福平,张 杰,黄大昉,等.苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立[J].中国农业科学,1998,31(3):13-18.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] 郭予元.棉铃虫的研究[M].北京:中国农业出版社,1998:326.
- [13] 戴莲韵,王学聘.苏云金芽孢杆菌研究进展[M].北京:科学出版社,1997:53.
- [14] 刘 汝,闫建平,袁志明.苏云金芽孢杆菌 *cryI* 基因的 PCR-RFLP 鉴定分析[J].华中师范大学学报,2005,39(1):88-92.
- [15] 黄志鹏,关 雄.苏云金杆菌新菌株 WB9 *cryI* 基因型的 PCR-RFLP 分析[J].福建农业大学学报,2001,30(3):304-308.
- [16] 姚 江,张 杰,陈中义,等.对鳞翅目害虫高毒力的 Bt *cryIAa* 基因的分离克隆及表达[J].昆虫学报,2003,46(2):150-155.
- [17] 陈中义,李长友,刘加宝,等.苏云金芽孢杆菌沉默基因 *cry2Ab3* 在大肠杆菌中表达及杀虫活性研究[J].微生物学报,2002,42(5):561-566.
- [18] Jain D, Udayasuriyan V, Arulselv P I *et al.* Cloning, characterization and expression of a new *cry2Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* strain 14-4 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 128(3):185-194.
- [19] Escudero I R, Estela A, Porcar M *et al.* Molecular and insecticidal characterization of a *CryII* protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae and Chrysomelidae[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7):4796-4804.
- [20] Diego H S, Jorge S, Alejandra B *et al.* Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against bean shoot borer (*Epinotia aporema* Wals.) larvae, a major soybean pest in Argentina [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 94:125-129.
- [21] 张 杰,宋福平,左雅慧,等.31株苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因型鉴定及表达产物研究[J].微生物学报,2000,34(4):372-377.