

Bt 杀虫蛋白基因 cry8Ea2 的克隆、表达和活性

刘兴龙^{1,2},程林友²,李天龙¹,李长友²,李国勋^{1,2}

(1. 河北农业大学 河北省农作物病虫害生防工程技术中心,河北 保定 071001;

2. 青岛农业大学 无脊椎动物细胞培养和细胞工程中心,山东 青岛 266109)

摘要:根据已知 Bt cry8 类基因的全长序列设计一对特异性引物 JJX5 和 JJX3,以 Bt 菌株 B-DLL 的质粒 DNA 为模板扩增出 3.5 kb 大小的片段;将该片段插入大肠杆菌表达载体 pET21b 中,并完成了该片段的全序列测定。该基因编码区为 3 495 bp,编码的蛋白质由 1 164 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 131.8 kDa,等电点为 pH 4.71,为弱酸性蛋白。该基因(GenBank:EU047597)编码的氨基酸序列与 Cry8Ea1 的氨基酸序列同源性高达 99.31%,被国际 Bt 基因命名委员会正式命名为 cry8Ea2。经 IPTG 诱导后该基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中能够正常表达 130 kDa 的蛋白,表达产物对暗黑鳃金龟、琉璃弧丽金龟和柳蓝叶甲具有活性,在浓度为 8.98 µg/g 时对暗黑鳃金龟、琉璃弧丽金龟一龄幼虫 14 d 的校正死亡率分别为 46.67%和 55.56%;在浓度为 89.8 µg/mL 时对柳蓝叶甲三龄幼虫 96 h 的校正死亡率为 33.33%。

关键词:Bt; cry8Ea2 基因;基因克隆;蛋白表达;杀虫活性

中图分类号:Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)04-0001-04

Cloning, Expression and Insecticidal Activity of cry8Ea2 Gene from *Bacillus thuringiensis* Strain B-DLL

LIU Xing-long^{1,2}, CHENG Lin-you², LI Tian-long¹, LI Chang-you², LI Guo-xun^{1,2}

(1. Biocontrol Center of Plant Diseases and Pests of Hebei, Agricultural University of Hebei,

Baoding 071001, China; 2. A Center for Advanced Invertebrate Cell Culture and

Cell Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The full length cry8Ea gene was amplified by PCR using a pair of special primers JJX5 and JJX3, designed according to cry8-type genes sequences, and inserted into *E. coli* expression vector pET21b to obtain the recombinant plasmid. Nucleic acid sequence analysis showed that this gene was 3 495 base pairs encoding 1 164 amino acids, which were homolog of 99.31% compared with Cry8Ea1, the molecular weight of the protein was 131.8 kDa with isoelectric point pH4.71. This gene sequence had been registered in GenBank (accession number was EU047597), and named cry8Ea2 as a novel gene by *Bacillus thuringiensis* Delta Endotoxin Nomenclature Committee. The result of SDS-PAGE indicated that cry8Ea2 gene could be expressed as a 130 kDa protein in *E. coli* BL21 (DE3) strain induced by IPTG. Bioassay of the expression product from the cry8Ea2 gene showed evident toxic to the larvae of *Popillia flavosellata*, *Holotrichia parallela* and *Plagioderma versicolora*, with the corrected mortality of 46.67%, 55.56% and 33.33%, respectively.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; cry8Ea2 gene; Cloning; Protein expression; Insecticidal activity

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一类包括许多亚种并对多种昆虫具有高毒力的产晶体芽孢杆菌。由于其杀虫活性高、杀虫谱较广并且对人、畜、昆虫天敌及水生动物安全,自 1938 年该

菌第一个商品制剂在法国问世以来,其杀虫谱已达到包括鳞翅目、双翅目、鞘翅目、同翅目、膜翅目等 10 个目 500 多种害虫^[1]。目前, Bt 已被广泛应用于防治农业、林业、仓库和环卫害虫,并取得了显著的

收稿日期: 2008-04-18

基金项目: 国家“973”计划(2003CB114201); 山东省教育厅科技计划项目(J07YF12)

作者简介: 刘兴龙(1981-),男,山东济宁人,硕士,主要从事害虫生物防治的研究工作。

通讯作者: 李长友(1969-),男,黑龙江佳木斯人,教授,主要从事害虫生物防治研究。

经济、社会和生态效益,已成为应用最成功的微生物杀虫剂。

金龟子类幼虫是一类世界性难防治的重要地下害虫,占地下害虫总量的 80% 以上。据近年来的调查,蛴螬的为害已排在各类地下害虫之首。因此,寻找抗金龟子类害虫的 Bt 杀虫蛋白基因并加以开发利用,生产生物工程杀虫剂和转基因植物,对这类农林害虫的防治将具有重要的理论和实践价值。1992 年 Ohba 等^[2]首次筛选获得了一株对多种金龟子幼虫具有特异杀虫活性的 Bt 新菌株 Buibui;随后,Sato 等^[3]从 Buibui 中克隆了对铜色丽金龟 (*Anomala cuprea*) 幼虫有活性的 *cry8Ca1* 基因。美国 Mycogen 公司从 Bt 熊本亚种 (subsp. *kumamotoensis*) 中分离克隆了对多种金龟子幼虫具有明显杀虫活性的 *cry8Aa1* 和 *cry8Ba1* 基因^[4],美国杜邦公司也分离克隆了对马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*) 和玉米根叶甲 (*Diabrotica virgifera*) 有显著杀虫活性的 *cry8Bb1* 和 *cry8Bc1* 基因^[5]。近几年,中国分离了几株对金龟子幼虫具有杀虫活性的新菌株^[6,7],中国农业科学院植物保护研究所先后克隆了对金龟子幼虫有活性的 *cry8Ca2*, *cry8Ea1*, *cry8Fa1*, *cry8Ga1* 和

cry8Ha1 等基因^[7-10],目前国际上已克隆了 19 个对不同种类金龟子幼虫具有特异杀虫活性的 *cry8* 基因^[11]。本研究对我室分离筛选的 1 株对多种金龟子具有活性的 Bt 菌株 B-DLL 中的 *cry8* 基因进行了克隆和表达,并对其编码的蛋白质的杀虫活性进行了测定,初步确定了 Cry8Ea2 蛋白对暗黑鳃金龟 (*Holotrichia parallela*)、琉璃弧丽金龟 (*Popillia flavosellata*) 和柳蓝叶甲 (*Plagioderma versicolora*) 等幼虫有活性,这将为以后构建工程菌和转基因植物防治这些鞘翅目害虫的研究和应用提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 供试菌株和质粒

菌株和质粒见表 1。暗黑鳃金龟、琉璃弧丽金龟、华北大黑鳃金龟 (*Holotrichia oblita*)、柳蓝叶甲、茄二十八星瓢虫 (*Henosepilachna vigintioctopunctata*) 为青岛市城阳区田间采集的成虫,室内饲养后产卵、孵化的幼虫供试。粘虫 (*Mythimna separata*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)、黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) 均由本实验室养虫室提供。

表 1 供试菌株和质粒

Tab. 1 Strains and plasmids

| 菌株和质粒 Strains and plasmids | 特征 Characterization | 来源 Origin |
|-------------------------------|---|---------------|
| <i>E. coli</i> DH5 | <i>supE44 lacU169</i> (80 <i>lacZ</i> M15) | This lab |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | <i>hsdS gal(cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7)</i> | This lab |
| <i>B. thuringiensis</i> B-DLL | Wild strain of <i>B. thuringiensis</i> | This lab |
| pET21b(+) | Amp ^R , T7 expression vector | This lab |
| pET21b- <i>cry8Ea</i> | Amp ^R , pET21b carrying <i>cry8Ea</i> gene | This research |

1.2 培养基与试剂

细菌培养基为 LB 培养基;蛋白分子量标准、限制性内切酶和 IPTG 购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶等购自 MBI 公司;DNA Marker、dNTP、KOD Dash DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司;DNA Fragment Purification Kit 购自 TIANGEN 公司,其他生化试剂均为市售分析纯。

1.3 Bt 菌株质粒的提取

Bt 菌株质粒 DNA 的提取参见 Gonzalez 等^[12]的方法。

1.4 *cry8Ea* 基因的克隆

对 GenBank 中公布的 *cry8* 类基因进行分析,设计一对 *cry8* 类特异性引物 JJX5:5'-CGGGATCCGATGAGTCCAAATAAT-3' 和 JJX3:5'-GCGTCTGACTTACTCTACGTC-3',在 2 条引物中分别插入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点(下划线),由上海生工生物工程有限公司合成。利用特异性引物 JJX5 和 JJX3,以 Bt 菌株 B-

DLL 质粒 DNA 为模板,进行 PCR 扩增:94 预变性 5 min;94 变性 1 min,54 退火 1 min,72 延伸 4 min,30 个循环;72 延伸 10 min,10 保存。

1.5 *cry8Ea* 基因的序列测定和分析

DNA 测序工作由上海联合基因科技有限公司完成,DNA 及氨基酸序列采用 DNAMAN 软件进行分析。

1.6 其他分子生物学操作

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中质粒的提取、PCR 产物和 pET21b(+) 质粒载体的酶切、连接、转化、诱导表达等分子生物学操作,参见 Sambrook 等^[13]方法。DNA 纯化回收参见 TIANGEN 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒操作手册。

1.7 *cry8Ea* 基因表达产物的生物测定

1.7.1 表达产物的制备 由于表达的蛋白以包涵体形式存在,收集诱导表达 4 h 的大肠杆菌菌液,经超声波裂解后离心,初步纯化表达产物,SDS-PAGE

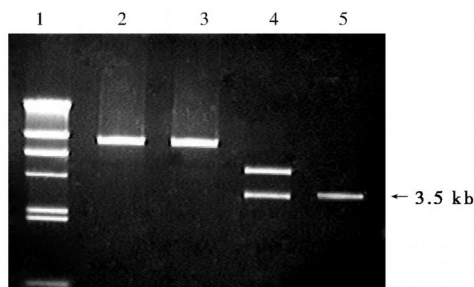
检测确认去除大部分杂蛋白后,将沉淀重新悬浮于无菌水中,表达产物浓度测定按照 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒说明进行,保存于 -20°C ,供生物测定。

1.7.2 生物测定方法 对琉璃弧丽金龟、暗黑鳃金龟和华北大黑鳃金龟的室内杀虫活性测定参照冯书亮等^[6]方法;对柳蓝叶甲(喂食柳叶)、茄二十八星瓢虫(喂食马铃薯叶)的室内杀虫活性测定,参见张杰等^[14]对榆蓝叶甲的生测方法。鳞翅目试虫以及黄粉虫的生物测定采用饲料混合法。将 200 μL 表达产物与 2 g 饲料充分混合,分装到 24 孔板中,每个处理 24 头初孵幼虫,重复 3 次,置 28°C 、RH70%~80% 的光照培养箱中培养 48、72、96 h,记录死虫数,并计算校正死亡率。

2 结果与分析

2.1 *cry8Ea* 基因的克隆

以 Bt 菌株 B-DLL 质粒 DNA 为模板, JJX5 和 JJX3 为引物, PCR 扩增出大约 3.5 kb 的条带。用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 PCR 产物和原核表达载体 pET21b(+), 回收后进行连接, 然后转化大肠杆菌 DH5⁺, 构建重组表达质粒 pET21b-*cry8Ea*, 经双酶切鉴定为阳性克隆, 结果见图 1, 证明该目的片段成功插入 pET21b(+) 载体中。



1. - *Hind* III DNA Marker; 2. *Bam*H I 酶切 pET21b-*cry8Ea*; 3. *Sal* I 酶切 pET21b-*cry8Ea*; 4. *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切 pET21b-*cry8Ea*; 5. PCR 产物。
1. - *Hind* III DNA Marker; 2. pET21b-*cry8Ea*/ *Bam*H I; 3. pET21b-*cry8Ea*/ *Sal* I; 4. pET21b-*cry8Ea*/ *Bam*H I and *Sal* I; 5. PCR product.

图 1 重组质粒 pET21b-*cry8Ea* 限制性酶切分析图谱

Fig. 1 Digestion analysis of the recombinant plasmid pET21b-*cry8Ea* by endonucleases

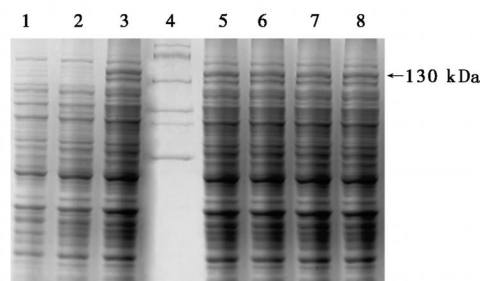
2.2 *cry8Ea* 基因的序列测定及分析

通过对插入片段序列的测定和分析, 该基因的编码框由 3 495 个碱基组成, 所编码的蛋白质由 1 164 个氨基酸组成, 其中碱性氨基酸占 10.22%, 酸性氨基酸占 12.29%, 疏水性氨基酸占 40.81%, 亲水性氨基酸占 36.67%, 所编码的蛋白质分子量为 131.8 kDa, 等电点为 pH 4.71, 为弱酸性蛋白质。通过比较, 该基因编码的氨基酸序列与 *Cry8Ea1* 的氨基酸序列同源性高达 99.31%, 其中在第 452、526、

527、537、542、752、907 和 975 位等 8 个氨基酸不同。该基因的核苷酸序列已经在 GenBank 登录 (Accession number: EU047597), 提交国际 Bt- 内毒素命名委员会并被确认为一个新的杀虫蛋白基因, 正式命名为 *cry8Ea2*。

2.3 *cry8Ea* 基因的表达

将构建的重组表达质粒 pET21b-*cry8Ea* 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 以 1 mmol/L IPTG 诱导后不同时间取样, SDS-PAGE 分析结果见图 2。在诱导 2 h 后, *cry8Ea2* 基因已经表达了 130 kDa 大小的蛋白, 4、6、8、10 h 蛋白的表达量稳定, 变化不大。



1. BL21 (pET21b); 2. 未诱导的 BL21 (pET21b-*cry8Ea*); 3~8. 分别诱导 2、4、6、8、10 h 的 BL21 (pET21b-*cry8Ea*); 4. 蛋白分子量标准 (220、170、116、76、53 kDa)。

1. BL21 (pET21b); 2. uninduced BL21 (pET21b-*cry8Ea*); 3~8. Induced BL21 (pET21b-*cry8Ea*) of 2、4、7、8、10 h respectively; 4 Protein Marker (220、170、116、76、53 kDa)。

图 2 *cry8Ea2* 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed product of *cry8Ea2* gene

2.4 *Cry8Ea2* 蛋白的生物测定

以 pET21b 转化的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株为对照, 测定 *cry8Ea2* 基因表达产物对几种鞘翅目和鳞翅目害虫幼虫的毒力, 结果见表 2 和表 3。*Cry8Ea2* 表达产物对暗黑鳃金龟、琉璃弧丽金龟和柳蓝叶甲等幼虫具有杀虫活性, 而对华北大黑鳃金龟、茄二十八星瓢虫、黄粉虫、棉铃虫、甜菜夜蛾、粘虫等幼虫均未发现活性。当 *Cry8Ea2* 蛋白在浓度为 8.98 $\mu\text{g/g}$ (蛋白/土重量比) 时对暗黑鳃金龟、琉璃弧丽金龟 1 龄幼虫 14 d 的校正死亡率分别为 46.67%、55.56%; 浓度为 89.8 $\mu\text{g/mL}$ 时对柳蓝叶甲 3 龄幼虫 96 h 的校正死亡率为 33.33%。

3 讨论

近年对杀蛱蝶菌株的分离和新基因的发掘备受人们的重视。相关报道的对蛱蝶有活性的多种杀虫蛋白, 如 *Cry8Aa1*, *Cry8Ba1*, *Cry8Ca2*, *Cry8Da2*, *Cry8Ea1*, *Cry8Fa1*, *Cry8Ga1* 和 *Cry8Ha1* 等已经申请专利^[4,5,8,10], 有些杀虫蛋白基因已经开始用于生物杀

表 2 Cry8Ea2 蛋白对 3 种金龟子幼虫的杀虫活性测定(14 d)

Tab.2 Toxicity of Cry8Ea2 protein to three kinds of chafer larvae

| 试虫 Species | 浓度/($\mu\text{g/g}$) Concentration | 试虫数/头 Insect number | 重复 Repeat | 14 d 校正死亡率/% Corrected mortality after 14 d |
|-------------------------------|---|------------------------|--------------|--|
| 暗黑鳃金龟 <i>H. parallela</i> | 8.98 | 30 | 3 | 46.67 |
| 琉璃弧丽金龟 <i>P. flavosellata</i> | 8.98 | 30 | 3 | 55.56 |
| 华北大黑鳃金龟 <i>H. oblitera</i> | 8.98 | 30 | 3 | 0 |

表 3 Cry8Ea2 蛋白对柳蓝叶甲(*Plagioder a versicolora*) 的杀虫活性测定

Tab.3 Toxicity of Cry8Ea2 protein to *Plagioder a versicolora*

| 样品 Sample | 浓度/($\mu\text{g/mL}$) Concentration | 试虫数/头 Insect number | 重复 Repeat | 48 h 校正死亡率/% Corrected mortality after 48 h | 72 h 校正死亡率/% Corrected mortality after 72 h | 96 h 校正死亡率/% Corrected mortality after 96 h |
|--------------|--|------------------------|--------------|---|---|---|
| Cry8Ea2 | 89.86 | 20 | 3 | 18.33 | 30.00 | 33.33 |
| CK | | 20 | 3 | 0 | 0 | 0 |

虫剂的开发和转基因植物的研究^[10,15],具有巨大的应用潜力和广阔的应用前景。本试验成功地对本室分离保存的 Bt 菌株 B-DLL 中的 *cry8Ea2* 基因进行了克隆和表达,并检测了表达产物的杀虫活性。发现 Cry8Ea2 蛋白主要对鞘翅目中的暗黑鳃金龟、琉璃弧丽金龟等具有活性,因此,该基因可以作为构建防治以上害虫的工程菌和转基因植物的新型基因资源。研究发现,该基因对鳃金龟科的华北大黑鳃金龟没有活性,而天然野生菌株 B-DLL 对华北大黑鳃金龟具有杀虫活性,其中可能还含有其他对华北大黑鳃金龟有活性的基因,还需进一步分离和克隆。

本研究在生物测定时还发现大肠杆菌中表达的 Cry8Ea2 蛋白有部分降解的现象,可能影响到其活性的大小和生测的结果。分析 Cry8Ea2 蛋白的氨基酸序列,其中,只有 4 个半胱氨酸,分别位于第 245,569,697 和 841 位。相关报道的 Cry1 类杀虫蛋白由于其保守的 C-端富含半胱氨酸而使分子间形成二硫键有助于晶体的稳定^[16],C-端半胱氨酸含量低进而形成的二硫键较少可能是 Cry8Ea2 蛋白部分降解的一个因素,是否还存在其他因素还需要进一步探索。因此,如何稳定该杀虫蛋白的结构、提高防治效果和延长持效期,是下一步需要研究的问题。

参考文献:

[1] Roh J Y,Choi J Y,Li M S, *et al.* *Bacillus thuringiensis* as a specific,safe,and effective tool for insect pest control[J].J Microbiol Biotechnol,2007,7(4):547-559.

[2] Ohba M,Iwahana H,Asnao S, *et al.* A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles[J].Lett Appl Microbiol,1992,14(2):54-57.

[3] Sato R,Takeuchi K,Ogiwara K, *et al.* Cloning heterologous expression and localization of a novel crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui toxic to scarabaeid insects[J].Curr Microbiol,1994,28:15-19.

[4] Michaels T E,Narva K E,Foncerrada L. *Bacillus thuringiensis* toxins active against scarab pests:USP 5554534[P].1996-09-10.

[5] Abad A R,Duck N B,Feng X, *et al.* Genes encoding novel proteins with pesticidal activity against coleopterans:WO 02/34774 A2[P].2002-05-02.

[6] 冯书亮,任国栋.苏云金芽孢杆菌 HB-F1 及其在有害金龟治理中的应用[M].北京:中国农业科学技术出版社,2005.

[7] Yu H,Zhang J,Huang D F, *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the asian cockchafer: *Holotrichia parallela* [J].Current Microbiology,2006,53:13-17.

[8] 宋福平,张杰,冯书亮,等.对鞘翅目害虫高效的苏云金芽孢杆菌菌株和基因:CN1323159C[P].27-6-2007.

[9] Shu C,Liu R,Wang R, *et al.* Improving toxicity of *Bacillus thuringiensis* strain contains the *cry8Ca* gene specific to *Anomala copulenta* larvae [J].Current Microbiology,2007,55:492-496.

[10] 束长龙,宋福平,王容燕,等.对鞘翅目害虫高效的苏云金芽孢杆菌 *cry8H* 基因、蛋白及其应用:CN101130762A[P].27-2-2008.

[11] Crickmore N. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature[BD].<http://www.Boils.susx.ac.uk/home/Neil-Crickmore/Bt/toxins2.html>.2008.

[12] Gonzalez J M,Brown B J,Carlton B C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids encoding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus* [J].Proc Natl Acad Sci USA,1982(79):6951-6955.

[13] Sambrook J,Fritschand E F,Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory manual [M].2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2002.

[14] 张杰,宋福平,李长友,等.对鞘翅目害虫高毒力 Bt 基因 *cry3Aa7* 的分离克隆及表达研究[J].中国农业科学,2002,35(6):650-653.

[15] Bixby A,Alm S R,Power K, *et al.* Susceptibility of four species of turfgrass-infesting scarabs (Coleoptera: Scarabaeidae) to *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui[J].J Econ Entomol,2007,100(5):1604-1610.

[16] Agaisse H,Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? [J].J Bacteriol,1995,177:6027-6032.