

# 对鳞翅目害虫有活性的 *cry1C* 基因的克隆和表达

宋福平<sup>1</sup> 张杰<sup>1</sup> 韩岚岚<sup>1</sup> 高继国<sup>2</sup> 黄大昉<sup>3\*</sup>

(1. 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 100094; 2. 东北农业大学生命科学院, 哈尔滨 150030; 3. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

**摘要:** 在鉴定苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) Btc001 菌株 *cry* 基因型的基础上, 构建了 Btc001 菌株质粒 DNA *Hind* III 片段的文库, 并利用聚合酶链式反应-限制性酶切片段多态性 (PCR-RFLP) 方法筛选出含有 *cry1Cb* 全长基因的 13.5kb 大片段, 酶切分析得到该片段的物理图谱, *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切完成了 6.5kb 含全长基因的亚克隆, 并对这条 6.5kb 片段亚克隆、测序, 序列在国际核酸序列数据库 (GenBank) 登记 (AY007686), 并由 Bt 杀虫晶体蛋白基因国际命名委员会命名为 *cry1Cb2* 基因。根据序列设计了一对用于扩增全长基因的引物 S5B1CB 和 S3B1CB, 扩增产物插入表达载体 pET-21b 中, 诱导后在大肠杆菌 BL21(DE3) 中获得高效表达。表达产物对小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 表现出较高活性,  $LC_{50}$  达到 7.97  $\mu$ g/ml。

**关键词:** PCR-RFLP, *cry1Cb* 基因, 苏云金芽孢杆菌, 小菜蛾

苏云金芽孢杆菌是一种分布极其广泛的革兰氏阳性细菌。在形成芽孢的同时, 能产生蛋白性质的伴孢晶体 (parasporal crystal), 对多种昆虫、线虫、螨类和原生动物具有特异性的杀虫活性。这种杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, ICPs) 又称  $\delta$ -内毒素 (delta-endotoxin), 对人畜无害, 不污染环境, 因而 Bt 在害虫的生物防治中得到了最广泛的应用<sup>[1]</sup>。1988 年 Honee 等克隆了对甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hübner) 毒力最高的 Bt 杀虫基因 *cry1Ca1* 基因<sup>[2]</sup>, 1993 年 Kalman 等分离克隆了对甜菜夜蛾和粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 毒力较高的 *cry1Cb1*<sup>[3]</sup>。而我国还未正式报道有 *cry1C* 基因的克隆。研究表明, *Cry1C* 蛋白的结构域 III (Domain III) 决定对甜菜夜蛾的特异性, 通过与 *Cry1A* 蛋白的 Domain III 互换得到的融合基因比 *Cry1C* 的活性提高 2.4 倍<sup>[4,5]</sup>。从 Bt 中寻找高毒力的新的杀虫基因, 与 *Cry1C* 的 Domain III 进行替换, 构建高效的融合基因, 进一步培育转基因作物和构建

基金项目: 863 计划项目 (2001AA214011)

作者简介: 宋福平 (1970-), 男, 副研究员, 主要从事生防微生物的分子生物学研究 (E-mail: fpsong@21cn.com)

\* 通讯作者 (E-mail: dfh313@public.bta.net.cn); 收稿日期: 2002-04-16

遗传工程菌,是一条切实可行的防治害虫的新途径。

本研究克隆了我国第一个 *cry1Cb* 基因,并研究了其杀虫活性,首次发现其对鳞翅目重要害虫小菜蛾具有较高活性。为转基因抗虫植物和微生物杀虫工程菌的构建提供了新的基因来源,同时为进一步构建对甜菜夜蛾高毒力的融合基因提供了很好的材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株与质粒 供试菌株和质粒详见表 1。

表 1 供试菌株与质粒  
Table 1 Test strains and plasmids

菌株/质粒 Strains/plasmids	特性 Characterization	来源 Source
<i>E. coli</i> JM107	<i>Ela<sup>+</sup> (McrA<sup>+</sup>) thi<sup>-1</sup> gyrA96 relA1 supE44</i>	本组保存 Preserved in this group
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i>	本组保存 Preserved in this group
Btc001	含有 <i>cry1Cb</i> 基因	湖北 Bt 中心 Hubei Bt center
pBluescript SK (+)	Amp <sup>R</sup> (3.0kb)	本组保存 Preserved in this group
pUCP19	<i>E. coli</i> -Pf Shuttle Vector (4.5kb), Amp <sup>r</sup>	本组保存 Preserved in this group
pETB-08CA	含有 Btc008 中全长 <i>cry1Ca</i> 基因(9.0kb)	本研究 From this study
pYCH58	含有 Btc001 中全长 <i>cry1Cb</i> 基因大片段(18kb)	本研究 From this study
pYCH58P1	含有 Btc001 中全长 <i>cry1Cb</i> 基因侧翼序列	本研究 From this study
pYCH58P5	含有 Btc001 中全长 <i>cry1Cb</i> 基因亚克隆片段	本研究 From this study
pYCH58PW	含有 Btc001 中全长 <i>cry1Cb</i> 基因侧翼序列	本研究 From this study
pYCH5855	含有 Btc001 中全长 <i>cry1Cb</i> 基因亚克隆片段	本研究 From this study
pYCH5855-8	含有 Btc001 中 <i>cry1Cb</i> 基因亚克隆片段	本研究 From this study
PYCH5855-26	含有 Btc001 中 <i>cry1Cb</i> 基因亚克隆片段	本研究 From this study
pET-21b	大肠杆菌高效表达载体(5.4kb)	清华大学郭淑元博士赠 Present by Dr. Guo Shuyuan
pETB-1CB	含有 <i>cry1Cb2</i> 基因全长序列(9.0kb)	本研究 From this study

### 1.2 基因型鉴定 菌株 Btc001 的基因型鉴定参见文献 6,7。

### 1.3 酶切、连接、转化 SDS-PAGE 分析方法参见文献 8。

1.4 基因克隆 以载体 pUCP19,选择 *cry1Cb* 基因中无切点的限制性内切酶 *Hind*III,构建了 Btc001 菌株质粒 DNA 文库。PCR 筛选到一个阳性克隆,酶切分析和 PCR 产物酶切分析证明克隆了一种 *cry1Cb* 基因,大片段长度 13.5kb,重组质粒命名为 pYCH58。选择 *Eco*RI、*Hind*III、*Bam*HI、*Pst*I 酶切分析 pYCH58,确定了含有 *cry1Cb* 全长基因的 13.5kb 大片段的物理图谱。根据图谱,*Bam*HI 酶切 pYCH58 产生 4.0kb、14kb 两个片段,将 4.0kb 片段插入 pBluescript SK(+) 的 *Bam*HI 位点,重组质粒命名为 pYCH58P1。14kb 自连得到 pYCH58P5。*Eco*RI 酶切 pYCH58P5 产生 5.8、8.0kb 两个片段,将 5.8kb 片段插入 pBluescript SK(+) 的 *Eco*RI 位点,重组质粒命名为 pYCH5855,8.0kb 自连得到 pYCH58PW。限制性内切酶 *Pst*I 消化 pYCH5855 产生 2.6、2.1、4.1kb 的三个片段,这三个片段上均含有部分 *cry1Cb* 基因,2.6kb 片段插入 pBluescript SK(+) *Pst*I 位点,得到重组质粒命名 pYCH585526,连有 2.1 和 4.1kb 片段的重组质粒命名为 pYCH58558。

### 1.5 引物设计 根据 *cry1Cb2* 基因的两侧序列,设计了扩增全长 *cry1Cb2* 基因的一对引

物,并在 5'端引物加进 *Bam*HI 切点,3'端引物加进 *Sal*I 切点,序列如下:

*Bam*HI  
S5B1CB:5'-CGCGGATCCGATGGAGAATAATATTCAA-3'

*Sal*I  
S3B1CB:5'-ACGCGTCGACGGTTCCTCCATAAGGAGTAATTCC-3'

**1.6 *cry1Cb2* 基因表达** 以 pYCH58 为模板,用 S5B1CB/S3B1CB 扩增得到 *cry1Cb2* 全长基因,插入 pET-21b 载体 *Bam*HI 和 *Sal*I 位点,构建成 pETB-1CB 表达载体。转化 pETB-1CB 于受体菌 BL21(DE3)中,32℃,120r/min,0.7mmol/L 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG)诱导 6h。

**1.7 杀虫活性测定** 分别测试了对甜菜夜蛾、棉铃虫、亚洲玉米螟、大豆食心虫和小菜蛾的杀虫活性。试虫为 2~3 龄小菜蛾,采用浸叶法,将甘蓝叶片用清水洗净晾干,选取鲜嫩一致的甘蓝叶片切成大小相近的块状,在稀释好的待测样品中浸泡 10min,晾干,放入生测瓶中,每瓶接 2~3 龄幼虫 20 头,每个处理重复 3 次,25℃生化培养箱中保温,培养 96h 后调查死、活虫数。

## 2 结果与分析

**2.1 *cry1Cb* 基因的克隆与亚克隆** 鉴定 Btc001 菌株中的 *cry* 基因型,发现含有 *cry1Aa*、*cry1Cb*、*cry1Fb*、*cry2Ac*、*cry1Ib* 等多种基因。用 pUCP19 载体构建了 Btc001 菌株质粒 DNA 的 *Hind*III 文库,通过 PCR 方法筛选到一个阳性克隆,图 1 是该阳性克隆插入片段的物理图谱。该片段的亚克隆参见方法 1.4。

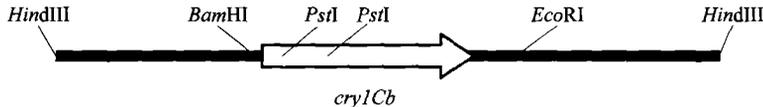


图 1 13.5kb 片段的物理图谱

Fig. 1 Physical map of 13.5kb fragment

**2.2 *cry1Cb* 基因的序列分析** pYCH58558、pYCH585526 和 pYCH58P1 插入的 *cry1Cb* 基因片段由北京六合通公司进行序列测定,该序列已在 GenBank 登记,登记号 (Accession number) 为 AY007686。通过序列分析,该 *cry1Cb* 基因编码的蛋白质由 1176 个氨基酸组成,分子量 133kDa,等电点为 pH4.32。由 Bt 杀虫晶体蛋白基因国际命名委员会正式命名为 *cry1Cb2*。

**2.3 *cry1Cb2* 基因的表达** 以 pYCH58 为模板,用 S5B1CB/S3B1CB 扩增得到 *cry1Cb2* 全长基因,插入 pET-21b 载体 *Bam*HI 和 *Sal*I 位点,构建成 pETB-1CB 表达载体。表达载体 pETB-1CB 中的 *cry1Cb* 基因经序列测定,证明与 *cry1Cb2* 完全相同。图 2 为 *cry1Cb2* 基因表达产物的 SDS-PAGE 电泳图谱,分析表明 *cry1Cb2* 基因表达产物,超声破碎后不在沉淀里,而是溶解在上清液里,证明其表达了可溶性蛋白,而不形成包涵体。

**2.4 *cry1C* 基因的表达产物活性测定** 提取 *Cry1Cb2* 蛋白,SDS-PAGE 电泳 确定蛋白含

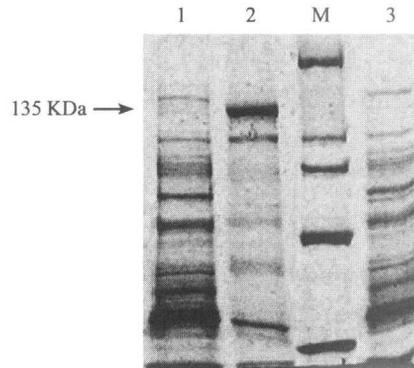


图2 *cry1Cb2* 基因表达产物分析

Fig. 2 Expression product analysis of *cry1Cb2* gene  
注: M. 蛋白分子量标记 Protein marker (212, 116, 97, 66, 40kDa); 1. 超声破碎后的沉淀 precipitate; 2. 超声破碎后的上清液 supernatant; 3. 受体菌 BL21(pET-21b)。

表2 Cry1Cb 蛋白的杀虫活性

Table 2 The activity of Cry1Cb toxin against insect larvae

试虫 Sample	浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Concentration	校正死亡率(%) Corrected mortality	LC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 50% Lethal concentration	置信限(95%) Confidence
<i>Plutella xylostella</i>	—	—	7.97	2.28 ~ 575.69
<i>Helicoverpa armigera</i>	100	8.30	—	—
<i>Spodoptera exigua</i>	100	10.67	—	—
<i>Ostrinia furnacalis</i>	100	1.50	—	—
<i>Leguminivora glycinivorella</i>	200	18.20	—	—

量。测定对几种试虫的生物活性。Cry1Cb2对小菜蛾显示了较高的杀虫活性, LC<sub>50</sub>为7.97  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (表2)。而对棉铃虫、甜菜夜蛾和大豆食心虫的活性较低, 对亚洲玉米螟无毒力。

### 3 讨论

用 pET-21b 载体构建了 *cry1Cb2* 基因的表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中获得高效表达, 在 32℃, 120r/min, 0.7mmol/L IPTG 诱导下, 产生的表达产物溶解在上清液中, 由于溶解性对 Cry 蛋白的毒性有很大的影响, 这种可融性蛋白有利于生物活性的研究。

从 Bt 菌株 Btc001 中分离的 Cry1Cb2 蛋白与 Cry1Cb1 具有 100% 的同源性, Cry1Cb1 对甜菜夜蛾和粉纹夜蛾具有杀虫活性, LC<sub>50</sub> 分别为 34000 和 8000ng/ml<sup>[3]</sup>。未见该基因对小菜蛾的活性测定的报道, 笔者首次确定了其对小菜蛾的杀虫活性。而 *cry1Cb2* 基因表达产物对甜菜夜蛾的杀虫活性较低, 可能是由于本研究表达的 Cry1Cb2 蛋白是一融合蛋白, 造成对甜菜夜蛾的活性降低, 但并未影响对小菜蛾的杀虫活性。

比较 Cry1Ca 与 Cry1Cb 蛋白活性区的 5 个保守区, 发现第 5 保守区位置上存在差异, Cry1Ca7 在 605 ~ 614 氨基酸之间, Cry1Cb 在 592 ~ 601 氨基酸之间。这两种基因保守区 5 在位置上存在 14 个氨基酸残基的差异, 而此保守区位于 Domain III 区域内, Cry1C 的 Do-

main III 决定了对甜菜夜蛾的高毒力,因此深入研究这种保守区位置上的不同对结构与功能的影响,具有十分重要的理论意义。

### 参 考 文 献

- 1 Schnepf E, Crickmore N, *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein. *Microbiol. and Molecular Biology Review.*, 1998, 62: 775 – 806
- 2 Honée G, van der Salm T, and Visser B. Nucleotide sequence of crystal protein gene isolated from *B. thuringiensis* subspecies *entomocidus* 60.5 coding for a toxin highly active against *Spodoptera* species. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16:6240
- 3 Kalman S, Kiehne K L, Libs J L, *et al.* Cloning of a novel *cry1C*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59, 1131 – 1137
- 4 de Maagd R A, Bakker, Weemen-Hendriks M, *et al.* *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C Domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(4): 1559 – 1563
- 5 de Maagd R A, Kwa M S G, van der Klei H, *et al.* Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62:1537 – 1543
- 6 Kuo W S and 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62: 1369 – 1377
- 7 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. *中国农业科学*,1998,31(3):13 – 18
- 8 金冬雁,黎孟枫译(J. 萨姆布鲁克著). *分子克隆实验指南*. 北京:科学出版社,1992,第二版

## Cloning and expression of *cry1C* gene from Bt strain active to Lepidoptera pests

Song Fuping<sup>1</sup> Zhang Jie<sup>1</sup> Han Lanlan<sup>1</sup> Gao Jiguo<sup>2</sup> Huang Dafang<sup>3</sup>

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China; 2. Department of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. Institute of Biotechnology Research, CAAS, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Based on the identification of *cry* genotypes in strain Btc001 of *Bacillus thuringiensis* (Bt), the library for plasmid DNA fragment of this strain restricted with restriction enzyme *Hind*III was constructed. A 13.5kb fragment containing full length of *cry1Cb* gene was screened by applying CAPS, and its physical map was determined with different restriction enzymes. After further restricted with *Bam*HI and *Eco*RI, a 6.5kb fragment containing full length of *cry1Cb* gene was subcloned and sequenced. This DNA sequence was registered in GenBank with accession number AY007686 and the *cry1Cb* gene was designated as *cry1Cb2* by Bt *cry* gene nomenclature committee. A pair of primers S5B1CB/S3B1CB was designed to amplify full length of *cry1Cb2* gene, and it was inserted into vector pET-21b and highly expressed in *E. coli* strain BL21(DE3). The expressed products were highly toxic to *Plutella xylostella* larvae, the  $LC_{50}$  was 7.97 $\mu$ g/ml.

**Key words:** PCR-RFLP, *cry1Cb* gene, *Bacillus thuringiensis*, *Plutella xylostella*