

## 研究报告

苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因在大肠杆菌中表达产物和生物活性韩岚岚<sup>1</sup>, 宋福平<sup>1</sup>, 李长友<sup>1</sup>, 张杰<sup>1\*</sup>, 赵奎军<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, 哈尔滨 150030; 3. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

**摘要:** 研究了几种 Bt *cry* 基因于大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达产物在 pH 10.0 的 50 mmol/L 碳酸钠和 20 mmol/L 乙醇胺溶液中的溶解性, 发现同样的 Cry 蛋白在碳酸钠中的溶解度大于乙醇胺。通过胰蛋白酶消化, 明确 Cry1Ca7、Cry1Ia8 酶解产物为 38kD 多肽; Cry1Ie1、Cry1Cb2、Cry2Ab4 酶解产物为 41kD 多肽; Cry1Ac 酶解产物为 60kD 多肽。采用 FPLC 层析方法对 6 种原毒素及其酶解后得到的毒素多肽进行了分离纯化, 比较了原毒素和毒素的杀虫活性的差异。其结果表明, Cry1Ac 的原毒素和毒素对棉铃虫初孵幼虫的校正死亡率均为 100%, Cry2Ab4 的原毒素的毒力高于其酶解毒素。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌; *cry* 基因; 原毒素; 毒素; 杀虫活性

**中图分类号:** Q 786 Q 789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-1542(2002)05-0005-05

**Purification and bioassay of some products of *Bacillus thuringiensis cry* genes expressed in *Escherichia coli* strain** HAN Lan-lan<sup>1</sup>, SONG Fu-ping<sup>1</sup>, LI Chang-you<sup>1</sup>, ZHANG Jie<sup>1</sup>, ZHAO Kui-jun<sup>2</sup>, HUANG Da-fang<sup>3</sup> (1. State Key Lab. of Biology for Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China; 2. North-Eastern Agricultural University, HarBin 150031, China; 3. Biotechnology Research Institute, CAAS, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The solubility of several Bt Cry proteins expressed in *Escherichia coli* strain in 50 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 20 mmol/L ethanolamine were compared and the solubility of all the Cry proteins in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were better than those in ethanolamine solution. After being digested by trypsin, a 38kD peptide was obtained from toxin Cry1Ca7 and Cry1Ia8, and a 41kD peptide was detected from Cry1Ie1, Cry1Cb2 and Cry2Ab4, but a 60kD fragment was found from Cry1Ac. Furthermore, the bioassay of all the protoxins and their activated-toxins digested by trypsin were performed against cotton boll worm larvae. No difference of toxicity could be found in protoxins and toxins activated by trypsin of Cry1Ac, but the toxicity of Cry2Ab4 was reduced in comparison with its protoxin.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; *cry* gene; protoxin; toxin; insecticidal activity

苏云金芽孢杆菌是目前最为有效的微生物杀虫剂。伴胞晶体蛋白(parasporal crystal protein)即  $\delta$  内毒素(delta-endotoxin), 是苏云金芽孢杆菌杀虫活性的主要来源。它对多种昆虫, 以及线虫、螨类和原生动物具有特异杀虫活性。这种杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal protein, ICP)对人畜安全, 不污染环境, 因而在害虫的生物防治中得到了广泛的应用<sup>[1,4]</sup>。

近年来, 随着生物技术的飞速发展, 许多克隆出来的 Bt *cry* 基因被导入其他微生物, 用于构建不同的工程菌, *cry* 基因在 *Escherichia coli* 等新的宿主中表达, 其自身性质有可能受到 *E. coli* 修饰限制系统的影响, 使得 ICP 的毒力不能完全发挥。本文就

此作了一些探索研究, 从已分离克隆的多种 Bt *cry* 基因中, 选取具有代表性的 5 种基因, 在 *E. coli* 中表达之后, 研究了从 *E. coli* 中提取的 Cry 蛋白的溶解性、酶解情况和杀虫活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试剂: 胰蛋白酶(trypsin)、p-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸胺、Tris 购于 Gibco 公司。二硫代苏糖醇(DTT)和考马斯亮蓝 R-250 为 Sigma 公司产品, HiTrap Q (1 ml) 为瑞典 Pharmacia 公司产品。其他试剂均为国产分析纯试剂和生化试剂。

收稿日期: 2002-05-31; 修订日期: 2002-06-19

基金项目: “十五”863 计划项目(2001AA214011)

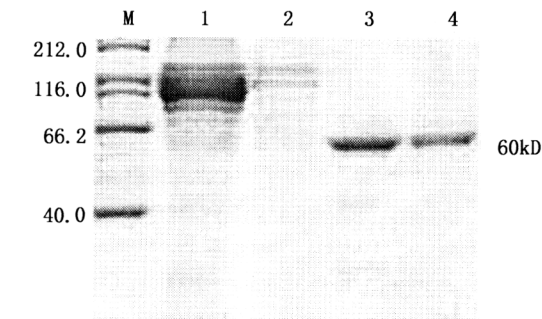
\* 通讯作者

试虫:棉铃虫为室内人工饲养多代的敏感品系,由本所棉花害虫组提供。

菌种:苏云金杆菌库斯塔克亚种 HD-73,含有 *cry1Ac* 基因。由本实验室克隆并在 *E. coli* 中表达的 *Bt* 杀虫蛋白基因: *cry1Ca7*、*cry1Cb2*、*cry1Ia8*、*cry1Ie1*、*cry2Ab4*,见表 1。

表 1 供试 Bt 杀虫晶体蛋白性质

| Bt 杀虫晶体蛋白种类 | 分子量(kD) | 等电点(pH) | 酸碱性 |
|-------------|---------|---------|-----|
| Cry1Ac      | 133.0   | 4.43    | 弱酸  |
| Cry2Ab4     | 70.7    | 9.11    | 弱碱  |
| Cry1Ia8     | 81.2    | 6.00    | 弱酸  |
| Cry1Ie1     | 81.0    | 5.91    | 弱酸  |
| Cry1Ca7     | 134.7   | 4.75    | 弱酸  |
| Cry1Cb2     | 133.0   | 4.32    | 弱酸  |

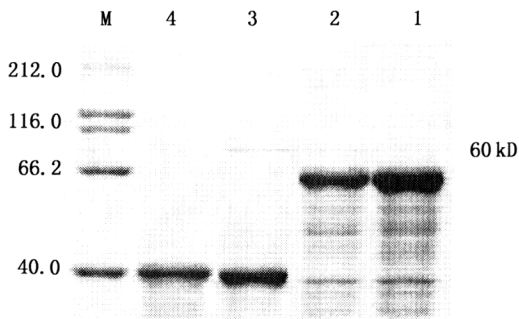


a. Cry1Ac

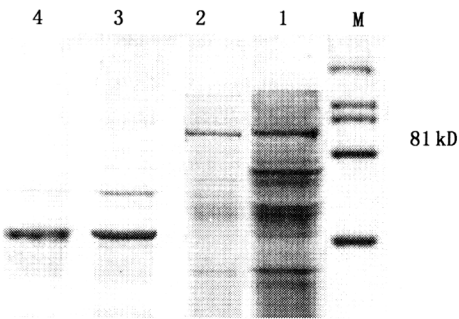
1.2 Bt *cry* 基因在 *E. coli* 中表达产物的制备  
方法同 Zhang 等<sup>[2]</sup>。原毒素的胰蛋白酶消化:分别取上面处理过的原毒素各 1.5 ml,装入试管中,调节 pH 使蛋白沉淀,12 000 r/min 离心,再溶于 1.5 ml 的 20 mmol/L 乙醇胺中,然后按胰蛋白酶:晶体蛋白 = 1:50 在 pH 8.0,37℃ 下酶解 6 h,获得毒素蛋白,最后通过 SDS-PAGE 检测分子量和含量。

1.3 Bt *cry* 基因在 *E. coli* 中表达产物的溶解性测定

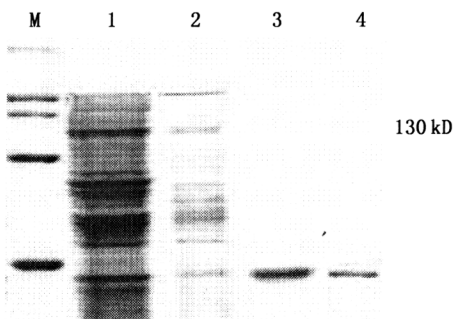
在相同条件下将表达产物和经胰蛋白酶处理过的产物分别溶于 pH 10.0 的 50 mmol/L 碳酸钠和 20 mmol/L 乙醇胺溶解液中,通过 SDS-PAGE 检测原毒素及毒素在不同溶液中的溶解度。



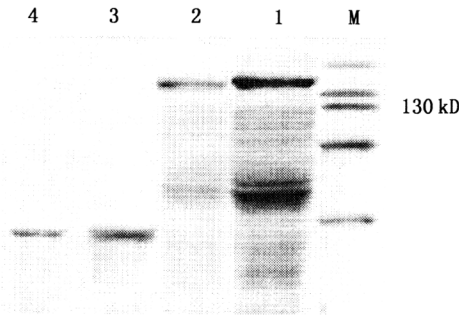
b. Cry2Ab



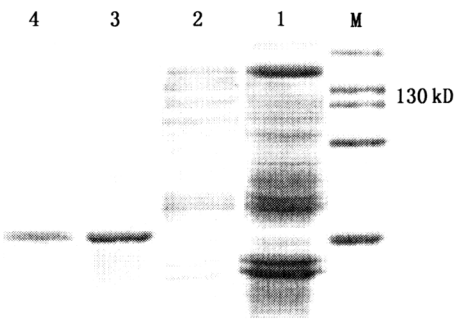
c. Cry1Ie1



d. Cry1Ia8



e. Cry1Ca7



f. Cry1Cb2

图 1 几种 Bt 杀虫晶体蛋白原毒素、毒素在 pH 10.0 的 50 mmol/L 碳酸钠和 20 mmol/L 乙醇胺中的溶解性  
a、b 原毒素; c、d 用胰蛋白酶处理 6 h 的毒素; a、c 溶于 50 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的溶液;  
b、d 溶于 20 mmol/L 乙醇胺溶液。

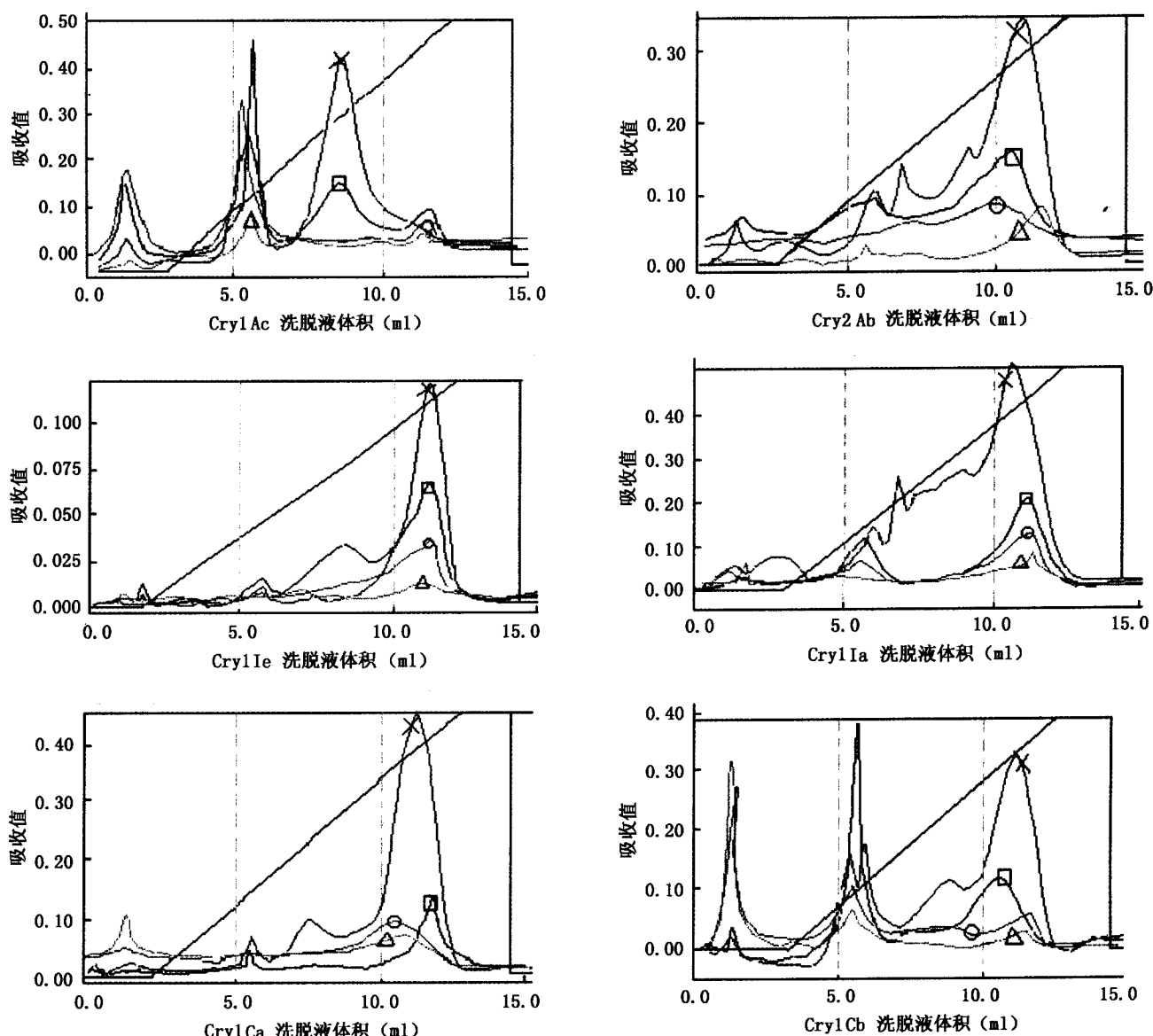


图 2 几种 Bt 杀虫晶体蛋白原毒素、毒素经 HiTrap Q 柱层析在 280 nm 下吸收值

× 以碳酸钠为溶解液的原毒素; □ 以乙醇胺为溶解液的原毒素;  
○ 以碳酸钠为溶解液的毒素; △ 以乙醇胺为溶解液的毒素。

#### 1.4 杀虫蛋白的纯化

将溶于 pH 10.0 的 50 mmol/L 碳酸钠和 20 mmol/L 乙醇胺溶解液中的毒素及原毒素经 HiTrap Q 柱层析, 在 280 nm 下收集不同峰值的洗脱液<sup>[3]</sup>。

#### 1.5 生物活性测定

称取 3 g 人工饲料置一灭菌培养皿中, 加入过柱洗脱下来的毒蛋白溶液 0.2 ml, 充分混匀, 分装于经消毒(5% 福尔马林浸泡)的 24 孔细胞培养板中, 用毛笔轻轻接入棉铃虫初孵幼虫, 每孔 1 头, 每处理重复 3 次, 放置 25℃ 光照培养箱中, 培养 72、96 h 后调查死、活虫数, 称重, 计算死亡率、校正死亡率。

## 2 结果

### 2.1 酶解作用和溶解性

分析 SDS-PAGE 结果(图 1), 发现 *cry1Ca7*、*cry1I8a* 基因表达的蛋白经胰蛋白酶作用后, 均得到约 38kD 的片段, *cry1Cb2*、*Cry1Ie1*、*Cry2Ab4* 基因表达的蛋白处理后均为 41kD, 其中 *Cry1Ia8* 和 *Cry1Ie1* 蛋白的胰蛋白酶解分析研究国内外尚无正式报道, *Cry1Ac* 经胰蛋白酶处理后约为 60kD 的多肽, 与前人报道相符<sup>[4]</sup>。

在相同温度和搅拌条件下, 图 1a-f 中 1、3 的电泳条带较 2、4 条带宽。即同样的加样量, 1、3 中的蛋白含量高于 2、4 中的蛋白含量, 从而说明原毒

素、毒素在 50 mmol/L 碳酸钠 (pH 10.0) 的溶解度比在 20 mmol/L (pH 10.0) 乙醇胺溶解液中的溶解度大。由于本研究所用的 5 种 Cry 蛋白等电点 pH 为 4.32~6.00, 因此它们在碱性的碳酸钠缓冲液中能较好的溶解。其中图 1c 中 Cry1Ie1 可以看到在 41kD 上面还有一条约为 60kD 的带, 该条带不稳定, 胰蛋白酶作用时间延长, 该片段消失。

## 2.2 杀虫晶体蛋白纯化

6 种 Cry 蛋白虽然等电点不同, 但经 HiTrap Q 柱层析分离结果表明, 当氯化钠浓度增至 0.2 mol/L 以上时, Bt 的原毒素和毒素分别被洗脱下来, 从 280 nm 有吸收值分析, 碳酸钠 (pH 10.0) 溶液溶解的原毒素和毒素的量均大于乙醇胺 (pH 10.0) 溶液, 说明选用碳酸钠作为 Bt 原毒素、毒素的溶剂, 有利于蛋白的提取, 这一结果与 SDS-PAGE

结果相符合, 见图 2。

## 2.3 杀虫活性测定

将在 280 nm 有吸收峰的层析样品 (原毒素、毒素) 分别进行生物测定的结果见表 2, Cry2Ab 和 Cry1Ac 的原毒素和毒素对棉铃虫的毒杀作用明显。其中 Cry2Ab 在 10~11.5 ml 处的洗脱峰 9 号样品毒力最强, 校正死亡率达 100%; 而 Cry1Ac 蛋白是在 5~6 ml 处的洗脱峰毒力最大, 5、6 号样品毒力最大。其他 Bt Cry 蛋白原毒素和毒素对棉铃虫的毒力不明显。经胰蛋白酶酶解的上述原毒素, CryAc 5、6 号样品酶解成 60kD 的多肽毒力最强, 校正死亡率同样可达 100%, 而 Cry2Ab 的酶解产物毒力有所降低。其他样品酶解后毒力仍较低, 说明 Cry1Ac、Cry2Ab 毒素是防治棉铃虫的理想材料。

表 2 杀虫晶体蛋白 Cry1Ac、Cry2Ab 对棉铃虫幼虫的毒力测定

| 处理 <sup>1)</sup> | 总虫量<br>(头) | 存活量<br>(头) | 死亡率<br>(%) | 校正死亡率<br>(%) |
|------------------|------------|------------|------------|--------------|
| Cry2Ab9 #        | 24×3       | 0          | 100.00     | 100.00       |
| Cry2Ab8 #        | 24×3       | 21+24+20   | 9.72       | 8.45         |
| Cry2Ab7 #        | 24×3       | 24+24+22   | 2.78       | 14.10        |
| Cry2Ab5 #        | 24×3       | 24×3       | 0          | 0            |
| Cry2Ab9 # E      | 24×3       | 12+20+15   | 34.72      | 33.80        |
| Cry2Ab5 # E      | 24×3       | 23+22+24   | 41.67      | 40.85        |
| Cry1Ac1 #        | 24×3       | 24×3       | 0          | 0            |
| Cry1Ac3 #        | 24×3       | 20+20+23   | 12.50      | 11.50        |
| Cry1Ac5 #        | 24×3       | 0          | 100.00     | 100.00       |
| Cry1Ac6 #        | 24×3       | 0          | 100.00     | 100.00       |
| Cry1Ac1 # E      | 24×3       | 24+24+23   | 1.39       | 0            |
| Cry1Ac3 # E      | 24×3       | 23+23+21   | 6.94       | 5.63         |
| Cry1Ac5 # E      | 24×3       | 0          | 100.00     | 100.00       |
| Cry1Ac6 # E      | 24×3       | 6+3+4      | 81.94      | 81.69        |
| CK               | 24×3       | 24+24+23   | 1.39       | —            |

<sup>1)</sup>Cry2Ab、Cry2AbE、Cry1Ac、Cry1Ac E 分别为原毒素和酶解毒素; 表中毒力测定值为 7 d 平均值。

## 3 讨论

Bt 杀虫晶体蛋白的作用机制中两个很重要的方面就是原毒素在害虫中肠的溶解, 以及原毒素的有效酶解。因此研究 Cry 毒素的体外溶解和酶解特性对于 Bt Cry 蛋白的生物活性研究具有重要的理论意义。本研究采用的几种在 *E. coli* 中表达的苏云金芽孢杆菌 Cry 蛋白在胰蛋白酶作用 6 h 后, 主要得到 41kD、38kD 大小的毒素, 而 Cry1Ac 则得到 60kD 大小的毒素。但这仅仅是体外试验的结果, 而害虫取食 Bt 原毒素之后, 原毒素在其中肠的降解情况与体外的差异尚不清楚, 虽然国外有报道, 但对于由本实验室发现的 Cry1Ie1、Cry1Ia8 等新毒素, 还

有许多工作要做。

不论是从 SDS-PAGE 分析, 还从 FPLC 图谱分析, 都可以得到相同的结论。这几种在 *E. coli* 中表达的 Cry 蛋白和野生菌株 HD-73 的 Cry 蛋白在碳酸钠 (pH 10) 溶液中的溶解度均大于乙醇胺 (pH 10) 溶解液中的溶解度。而在做柱层析实验时用碳酸钠溶液作溶解液的, 其穿透峰峰值较高, 蛋白不易结合上, 此时选取乙醇胺溶解液作溶解液, 能够得到较好的结果。

上面的生测结果表明同样 Cry 蛋白的不同洗脱峰, 活性存在着差异, 这可能是 Cry 蛋白在 *E. coli* 表达过程被宿主修饰, 有可能引起等电点的变化。

这种假设可以通过同样的 *cry* 基因分别在 Bt 和 *E. coli* 中进行表达,然后通过研究其生理生化性质等方法来证实。

### 参考文献:

- [1] Hofte H, Whiteley H R. Insecticidal crysecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* [J]. Microbiological Reviews, 1989, (53): 242 - 255.
- [2] Zhang J H, Wang C Z, Xiang X F. Effect of dissolution and degradation on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to cotton boll worm[J]. Entomologia Sinica, 1977, 4(4): 357 - 363.
- [3] N Selvamuthu Kumaraswami, Takeshi Maruyama, Sakiko

Kurabe, *et al.* Lipids of brush border membrane vesicle (BBMV) from *Plutella xylostella* resistant and susceptible to Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* [J]. Comparative Bio and Physiology Part B, 2001, (129): 173 - 183.

- [4] Sangdala S, Walters F S, English L H. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(c)  $\delta$ -endotoxin toxin binding and  $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$  dfflux in vitro[J]. J Biol Chem, 1994, 269(13): 10088 - 10092.
- [5] Lily Chang, Rian Grant, Arthur Aronson. Regulation of Packaging of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxins into Inclusions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, (67): 5032 - 5036.