

苏云金杆菌以色列亚种杀蚊蛋白 Cyt1Aa 在离中不粘柄菌中的表达

郑大胜^{1,2}, Neil Crickmore³, 蔡亚君¹, 闫建平¹, 袁志明^{1*}

(¹ 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(² 中国科学院研究生院 北京 100039)

(³ University of Sussex, Brighton, BN1 9QG, United Kingdom)

摘 要: 在蚊幼虫生活水域里的离中不粘柄菌(*Asticcacaulis excentricus*, *Ae*)中已成功表达苏云金芽孢杆菌以色列亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, *Bti*)杀蚊蛋白基因 *cry11Aa* 的基础上, 将另一 *Bti* 杀蚊蛋白基因 *cyt1Aa* 转入 *Ae* 中表达。构建并转化了分别单独含有 *cyt1Aa* 基因、及同时含有 *cry11Aa* 基因的表达质粒 pSODCyt20 和 pSODCryCyt20, 蛋白免疫杂交检测相应的 *Ae* 重组子分别表达产生了 Cyt1Aa 和 Cry11Aa 蛋白。为了探究 *Ae* (pSODCryCyt20) 重组子不能表达 *cyt1Aa* 的原因, 提取了重组子总 RNA, 并与同是革兰氏染色阴性的大肠杆菌的总 RNA 比较, 结果显示两者 RNA 系统显著不同, 推测 *Ae* 中多个外源基因的表达, 可能要求每个基因必需一个启动子。

关键词: 离中不粘柄菌, 苏云金杆菌以色列亚种, Cyt1Aa, Cry11Aa, 多外源基因表达, 总 RNA

中图分类号: Q78, Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2007)02-0217-04

苏云金芽孢杆菌以色列亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 *Bti*)以其对蚊幼虫有特异性毒杀作用, 对人畜无毒、对环境安全, 而被广泛应用于蚊虫的综合防治中^[1]。但由于 *Bti* 制剂在蚊幼虫孳生地水体中会快速沉降, 蚊幼虫取食的表层水体中毒素蛋白含量逐渐减少^[2], 从而造成 *Bti* 制剂在蚊孳生地水体的持效期较短。将 *Bti* 杀蚊蛋白基因转入蚊幼虫孳生地水体中广泛分布的离中不粘柄菌(*Asticcacaulis excentricus*, 简称 *Ae*)中表达, 是克服 *Bti* 制剂的这一缺陷的一种有效方法。*Ae* 菌, 革兰氏阴性(G^-), 不仅具有良好的悬浮性, 而且还是蚊幼虫的食物来源之一, 因此被用作 *Bti* 杀蚊蛋白表达的自然宿主, 以提高毒素蛋白持效表达和提高杀蚊持效期^[3,4]。

Bti 在芽孢形成过程中, 能产生由多种杀蚊虫毒素蛋白组成的伴孢晶体, 其中分子量分别为 134、128、72 和 28kDa 的 Cry4A、Cry4B、Cry11A 和 Cyt1Aa 蛋白是主要的杀蚊活性蛋白^[5,6], 不同的晶体蛋白对不同蚊幼虫均有程度不同的毒性。其中, CryIV D (即 Cry11A) 对埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)毒力最高, LC_{50} 值达到 224ng/mL。Cyt1Aa 蛋白对蚊幼虫没有特异性毒杀作用, 但对哺乳动物具有非特异性溶细胞作用, 而且, 已证明 Cyt1Aa 蛋白同其它杀虫毒素蛋白具有很强的协同作用, 可显著提高其它 Cry 蛋白对蚊幼虫的毒杀作用, 特别是在克服蚊幼虫对 Cry

晶体蛋白产生的抗性方面发挥了重要的作用。只有当 *Bti* 杀蚊晶体蛋白共同存在时, 才表现出对敏感蚊幼虫的最大毒性。另外, 研究表明^[7], *Bti* 还产生分子量为 20kDa 的 P20 蛋白, 在提高晶体蛋白稳定性和表达量以及晶体的形成等方面具有分子伴侣作用。

早期的研究中已构建表达 *Bti* 的 Cry11Aa 蛋白、对蚊幼虫具有一定毒杀作用的重组 *Ae* 菌株^[8]。在此基础上, 本研究分别构建了含有 *cyt1Aa* 基因的表达质粒和按照大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达多个外源基因的操纵子结构^[9]而设计的含有 *cry11Aa* 及 *cyt1Aa* 基因的表达质粒, 以期获得能同时产生 Cry11Aa 和 Cyt1Aa 蛋白的 *Ae* 重组菌株, 得到杀蚊活性高、阻滞蚊虫产生抗性的工程菌株。该研究为深入研究新型杀蚊工程菌的构建奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 离中不粘柄菌(*Ae*) 4724 菌株及重组菌株的培养方法、用于在 *Ae* 中表达外源基因的质粒 pSODCry20 见文献 [8]; *E. coli* JM109 菌株用于不同基因的克隆, 在 LB 培养基中 37℃ 培养, 需要时加入浓度为 12.5μg/mL 的四环素(Tetracyclin)。

1.1.2 主要试剂和仪器: DNA 聚合酶购自 Roche Diagnostics 公司, 分子量标准、pGEM-T 克隆载体、Total RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 Promega

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-27-87198195, E-mail: yzm@wh.iov.cn

作者简介: 郑大胜(1970-)男, 湖北武汉人, 助理研究员, 在职博士研究生, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: dsn.zheng@163.com

收稿日期: 2006-09-25, 接受日期: 2006-12-08, 修回日期: 2006-11-27

公司,限制性核酸内切酶、碱性磷酸酶和 T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司,抗生素、辣根过氧化物酶标羊抗兔抗体和其他生化试剂购自 Sigma 公司。DNA 胶回收和质粒 DNA 小量回收试剂盒购自 Omega 公司。引物合成由 Promega 公司完成。电转化仪、电泳仪、电转膜仪均为 Bio-Rad 公司产品,PCR 扩增仪购自 Roche Diagnostics 公司。

1.2 表达质粒的构建

参照文献 [8] 构建含 *cryIIAa* 基因的表达质粒 pSODCry20 的方法,根据 *ctIIAa* 基因两端序列^[10]设计、合成引物,以 *Bti* 的总 DNA 为模板,采用 PCR 法扩增出带有合适酶切位点的 *cryIIAa* 基因开放阅读框(ORF)片段,扩增产物的 5'端都引入了新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)基因的核糖体结合位点(RBS)序列^[11]。经测序鉴定的扩增片段与 pSODCry20 质粒经酶切、连接,获得重组质粒 pSODCry20 和 pSODCryCyt20 质粒(图 1),分别转化大肠杆菌 JM109。

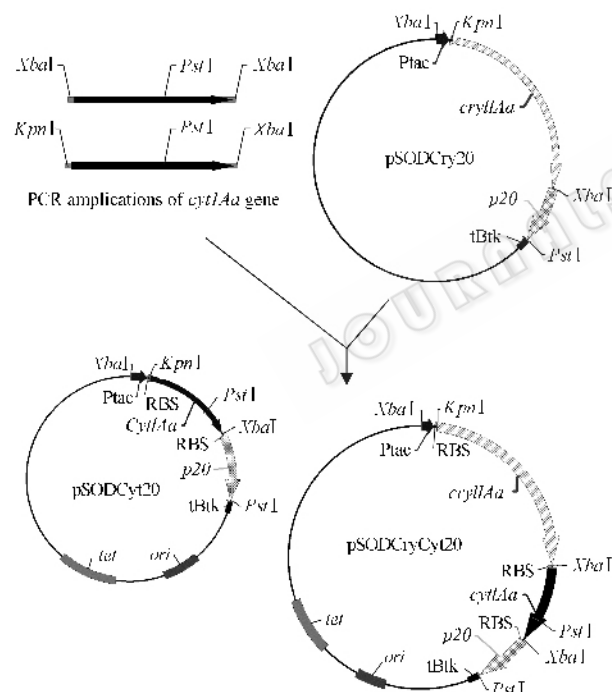


图 1 表达质粒 pSODCry20 和 pSODCryCyt20 的构建图

Fig. 1 The construction of expression vector pSODCry20 and pSODCryCyt20 which harbor the same promoter *Ptac* and terminator *tBtk* as in pSODCry20. The labels *tet* and *ori* stand for tetracycline-resistance gene and initial region of DNA replication, respectively.

1.3 离中不粘柄菌菌株的转化及外源蛋白的表达

按照文献 [8] 方法将重组质粒分别电转化入 *Ae* 4724 菌株, *Ae* 转化子在含 6 μg/mL 四环素的 PYE 培养基(0.2% W/V 蛋白胨, 0.1% W/V 酵母粉)平板上 30℃ 培养 72h, 其质粒 DNA 用 Plasmid Miniprep Kit (QIAGEN) 制备, 再将此质粒重转化大肠杆菌 JM109

菌株, JM109 转化子的质粒 DNA 用相同方法制备, 并用合适的限制性内切酶消化, 消化产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 必要时测序鉴定 JM109 转化子的质粒 DNA。

1.4 CryIIAa 和 CytIIAa 蛋白免疫杂交

参照文献 [8] 的方法, 将鉴定了质粒 DNA 的 *Ae* 转化子在含 6 μg/mL 四环素的液体 PYE 培养基中 30℃、200r/min 摇床培养 72h, 培养液离心收集菌体, 经洗涤后超声波破碎细胞, 裂解出的蛋白分别以抗 CryIIAa 和抗 CytIIAa 的抗体进行 SDS-PAGE-免疫杂交测定(Western blot)。

1.5 总 RNA 的提取和电泳

从 *Ae* 4724 和大肠杆菌 JM109 菌株重组子中, 按照 RNeasy Total RNA Isolation System (Promega) 方法提取总 RNA。用甲醛-琼脂糖凝胶电泳检测比较 RNA。

2 结果

2.1 表达 *Bti* 杀蚊毒素的 *Ae* 重组子的构建

表达质粒 pSODCry20 和 pSODCryCyt20 构建后电转化入 *Ae* 4724 菌株, 为了鉴定 *Ae* 转化子的质粒, 将其质粒 DNA 提取后再转化至 *E. coli* JM109 菌株, 再将相应 JM109 转化株的质粒 DNA, 与构建的表达质粒经限制酶切比较, 结果表明是一致的(图 2), 然后进一步测序鉴定, 结果表明转化的 pSODCryCyt20 质粒上 *cryIIAa* 基因阅读框、RBS 及上、下游各 100bp 序列都与理论值相同。

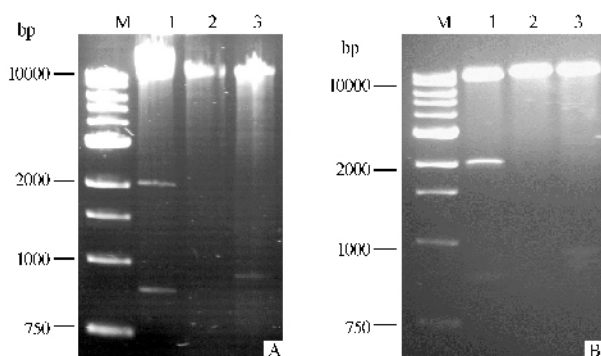


图 2 pSODCryCyt20 质粒 DNA 的酶切分析(质粒分别源自大肠杆菌重组子(A)和 *Ae* 重组子(B))。

Fig. 2 Restriction patterns of plasmid pSODCryCyt20 originated from recombinant *E. coli* (A) and recombinant *A. excrucians* (B) cells, respectively. The restriction pattern (A) was from plasmid DNA of *E. coli* JM109 (pSODCryCyt20). And (B), derived from the plasmid DNA extracted from recombinant *A. excrucians* (pSODCryCyt20) which was transformed into *E. coli* strain JM109 and the consequent plasmid DNA from *E. coli* recombinant was subject to restriction analysis. M, 1kb DNA Ladder with sizes indicated in bp on the left; 1, pSODCryCyt20/*Xba*I; 2, pSODCryCyt20/*Kpn*I; 3, pSODCryCyt20/*Pst*I.

2.2 Ae 重组子表达蛋白的检测

从 pSODCyt20 和 pSODCryCyt20 的 *Ae* 重组菌株的免疫杂交结果(图 3)可以看出, *Ae*(pSODCyt20)重组菌蛋白样品能够与特异性抗 Cyt1Aa 的抗体结合(B 中的泳道 3),证明 *cyt1Aa* 在 *Ae* 菌株中能够稳定地表达;同时, *Ae*(pSODCryCyt20)重组子仅表达了 *cry11Aa*、没有表达 *cyt1Aa*(A 中的泳道 4 和 B 中的泳道 4)。

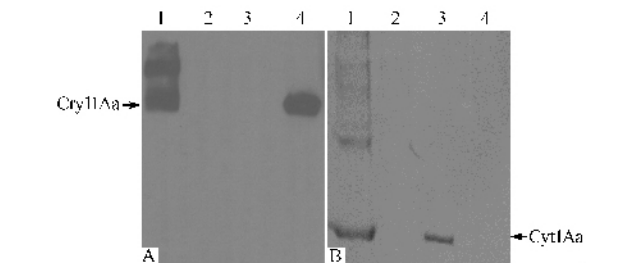


图 3 离中不粘柄菌重组子样品与 Cry11Aa 的抗体和 (A) 与 Cyt1Aa 的抗体 (B) 的免疫杂交

Fig. 3 Immunoblot analysis of *A. excrucians* transformants with either anti-Cry11Aa (A) or anti-Cyt1Aa (B) antibodies. 1. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*; 2. *A. excrucians* 4724; 3. *A. excrucians* (pSODCyt20); 4. *A. excrucians* (pSODCryCyt20).

虽然有 RBS 序列,但是 *cyt1Aa* 基因却仅不能在 pSODCryCyt20 质粒中与 *cry11Aa* 协同表达, RNA 水平的分析可能会揭示个中原因。

2.3 Ae 与大肠杆菌菌株总 RNA 的比较

从 *Ae* 与大肠杆菌总 RNA 的电泳(图 4)中可以看出,大肠杆菌的 23S 和 16S RNA 呈明显的两条带,而 *Ae* 的总 RNA 有 3 条带、都不比大肠杆菌菌株的 16S RNA 分子量大,说明同样是革兰氏阴性菌的 *Ae* 有着不同于大肠杆菌的 RNA 系统。

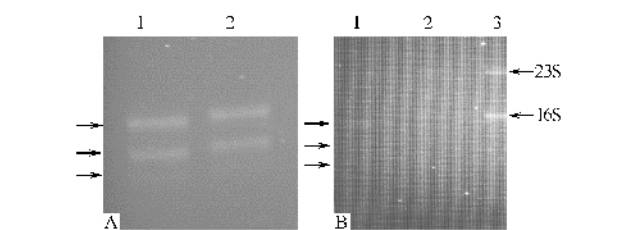


图 4 离中不粘柄菌与大肠杆菌菌株总 RNA 的比较

Fig. 4 Total RNA from *A. excrucians* (A , B) and *E. coli* (B) by formamide agarose gel electrophoresis with 16S and 23S RNA from *E. coli* illustrated on the right. A : 1. *A. excrucians* 4724 ; 2. *A. excrucians* (pSODCryCyt20). B : 1. *A. excrucians* (pSODCryCyt20); 2. *E. coli* JM109. 3. *E. coli* (pSODCryCyt20).

3 讨论

革兰氏阴性的水生细菌 *Ae* 作为杀蚊蛋白基因的宿主已经成功地表达了球型芽孢杆菌(*B. sphaericus*)二元毒素蛋白^[6]和 *Bti* 的 Cry11Aa 蛋白^[8],显示出比其他水生微生物宿主,比如

Caulobacter crescentus^[11,12]、*Ancylobacter Aquaticus*^[13]和 *cyanobacteria*^[14,15]等,更强的杀蚊活性;作为水生微生物, *Ae* 比芽孢杆菌在水中有着更显著的悬浮性, *Ae* 亦能作为蚊幼的唯一食物而不影响其生长发育^[7],从而使表达的杀蚊蛋白能够长时间与在水域表层生活的蚊幼接触。本研究的结果显示 *Ae* 重组菌株不仅能稳定地表达 *Bti* 杀蚊蛋白 Cry11Aa,而且也能表达和耐受 Cyt1A 蛋白,将很好地防止和抑制蚊幼对杀蚊蛋白产生抗性。这些都表明 *Ae* 很合适作为杀蚊蛋白基因的宿主、以克服芽孢杆菌杀蚊剂在水中迅速沉降的缺点。

由于从 *Ae* 重组子中提取的质粒 DNA,不能正常被限制性内切酶消化(数据未列出),所以将其 DNA 转入大肠杆菌菌株中、再提取所得转化子的质粒 DNA 进行限制酶切分析,以确证杀蚊毒素基因已转化入 *Ae* 菌株。这说明 *Ae* 细胞的修饰限制系统不同于大肠杆菌的,有可能对外源基因的表达产生不同的影响。

虽然本研究中所用的表达质粒都拥有相同的启动子和终止子序列,但是有着 RBS-*cyt1Aa* ORF 元件的 pSODCryCyt20 质粒,所对应的 *Ae* 重组子并不能有效表达 *cyt1Aa*,而在 *cyt1Aa* 基因的上游增加启动子后(即 pSODCyt20)才能表达。推测在 *Ae* 重组子中 *cyt1Aa* 的有效表达需要一个额外的启动子,该假说有待进一步试验确证。同理,对于本研究所涉及的表达质粒上的 *p20* 基因,由于只有 RBS 序列、并没有单独的启动子,也可能无法有效表达。在后续的研究中将进行 *Ae* 转化子中 P20 蛋白的检测。

在大肠杆菌菌株中,为了实现多个外源基因的协同表达,可以构建一个多重 RBS-ORF 结构、多个基因共享一个上游启动子的表达载体^[9,16]。但是,本研究表明, *Ae* 有着与大肠杆菌显著区别的总 RNA,可以推断其转录翻译系统也不尽相同,所以,多个 *Bti* 的杀蚊蛋白基因可以在大肠杆菌中共享启动子而共表达^[17,18],而在同是革兰氏阴性菌的 *Ae* 中则难以用同样的手段实现。

致谢 衷心感谢中国科学院提供赴外研修资助,感谢英国 Wellcome Trust 提供项目资助,感谢 Ali H. Sayyed 及 Mark J. Bruce 博士在研究工作中给与的支持与帮助!

参 考 文 献

[1] Priest FG. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Bacteriol*, 1992, **72**(5): 357 - 369.

[2] Merritt RW, Dadd RH, Walker ED. Feeding behaviour, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 1992; **37**: 349-376.

© 中国微生物菌种保藏委员会 编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [3] Liu JW , Yap W , Thanabalu T , *et al.* Efficient synthesis of mosquitocidal toxins in *Asticcacaulis excentricus* demonstrates potential of gram-negative bacteria in mosquito control. *Nature Biotechnol* , 1996 , **14** (3) : 343 – 347 .
- [4] Romero M , Gil FM , Orduz S . Expression of mosquito active toxin genes by a Colombian native strain of the gram-negative bacterium *Asticcacaulis excentricus* . *Mem Inst Oswaldo Cruz* , 2001 , **96** (2) : 257 – 63 .
- [5] Ward ES , Ellar DJ . *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin : Nucleotide sequence and characterization of the transcripts in *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* . *J Mol Biol* , 1986 , **191** (1) : 1 – 11 .
- [6] Crickmore N , Bone EJ , Williams JA , *et al.* Contribution of the individual components of the delta-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* . *FEMS Microbiol Lett* , 1995 , **131** : 249 – 254 .
- [7] Manasherob R , Zaritsky A , Ben-Dov E , *et al.* Effect of accessory proteins P19 and P20 on cytolytic activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Escherichia coli* . *Curr Microbiol* , 2001 , **43** (5) : 355 – 364 .
- [8] Armengol G , Guevara OE , Orduz S , *et al.* Expression of the *Bacillus thuringiensis* Mosquitocidal Toxin Cry11Aa in the Aquatic Bacterium *Asticcacaulis excentricus* . *Curr Microbiol* , 2005 , **51** (6) : 430 – 433 .
- [9] Makrides SC . Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli* . *Microbiol Rev* , 1996 , **60** (3) : 512 – 538 .
- [10] Dervyn E , Poncet S , Klier A , *et al.* Transcriptional regulation of the cryIVD gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* . *J Bacteriol* , 1995 , **177** (9) : 2283 – 2291 .
- [11] Yap W , Thanabalu T , Porter AG . Influence of transcriptional and translational control sequences on the expression of foreign genes in *Caulobacter crescentus* . *J Bacteriol* , 1994 , **176** (9) : 2603 – 2610 .
- [12] Thanabalu T , Hindley J , Brenner S , *et al.* Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus* , a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. *Appl Environ Microbiol* , 1992 , **58** (3) : 905 – 910 .
- [13] Yap W , Thanabalu T , Porter AG . Expression of mosquitocidal toxin genes in a gas-vacuolated strain of *Ancyllobacter aquaticus* . *Appl Environ Microbiol* , 1994 , **60** (11) : 4199 – 202 .
- [14] Angsuthanasombat C , Panyim S . Biosynthesis of 130-kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 . *Appl Environ Microbiol* , 1989 , **55** (9) : 2428 – 2430 .
- [15] de Marsac NT , de la Torre F , Szulmajster J . Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 . *Mol Gen Genet* , 1987 , **209** : 396 – 398 .
- [16] Ringquist S , Shinedling S , Barrick D , *et al.* Translation initiation in *Escherichia coli* : sequences within the ribosome binding site. *Mol Microbiol* , 1992 , **6** (9) : 1219 – 1229 .
- [17] Khasdan V , Ben – Dov E , Manasherob R , *et al.* Toxicity and synergism in transgenic *Escherichia coli* expressing four genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* . *Environ Microbiol* , 2001 , **3** (12) : 798 – 806 .
- [18] Tanapongpipat S , Luxananil P , Promdonkoy B , *et al.* A plasmid encoding a combination of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* confers toxicity against a broad range of mosquito larvae when expressed in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* , 2003 , **228** : 259 – 263 .

Expression of mosquitocidal Cyt1Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Asticcacaulis excentricus*

ZHENG Da-sheng^{1,2} , CRICKMORE Neil³ , CAI Ya-jun¹ , YAN Jian-ping¹ , YUAN Zhi-ming^{1*}

(¹ Wuhan Institute of Virology , Chinese Academy of Sciences , Wuhan , 430071 , China)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences , Beijing , 100039 , China)

(³ School of Life Sciences , University of Sussex , Brighton , BN1 9QG , UK)

Abstract : *Asticcacaulis excentricus* , who lives in upper-layer waters providing food resource to the mosquito larvae and has been proven to be a successful host to produce the mosquitocidal binary toxins or Cry11Aa toxin from *Bacilli* (Liu *et al.* , 1996 , *Nat Biotech* 14 : 343 ; Armengol , *et al.* , 2005 , *Curr Microbiol* 51 : 430) , was developed to express *cyt1Aa* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*). Two *A. excentricus* transformants were constructed with the attempt of producing Cyt1Aa alone and alongside with Cry11Aa , respectively . Detection of expressed Cry11Aa and Cyt1Aa proteins by immunoblot in the recombinant *A. excentricus* clones showed that either *cry11Aa* or *cyt1Aa* was expressed well solely but not simultaneously although both restriction analyses of plasmid DNA and DNA sequencing showed that the transformed plasmid was identical to scheme . To investigate the reason why the recombinant *A. excentricus* harboring both genes and their ribosome binding site (RBS) sequences expressed only Cry11Aa , the total RNA of *A. excentricus* cells was extracted and revealed three-band pattern in which all RNA molecule weights are not greater than 16S RNA of *Escherichia coli* by formamide agarose gel electrophoresis , indicating that different RNA systems within these two Gram-negative strains required distinguishingly organised constructs to express multiple foreign genes . It is hypothesized that an extra promoter upstream of RBS sequence is required to express *cyt1Aa* in the *cry11Aa-cyt1Aa* tandem plasmid .

Keywords : *Asticcacaulis excentricus* ; *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* , Cyt1Aa ; Cry11Aa ; expression of multiple foreign genes ; total RNA

* Corresponding author . Tel/Fax : 86-27-87198195 ; E-mail : yzm@wh.iov.cn