



用昆虫病毒转移载体在大肠杆菌中 表达苏芸金杆菌 δ -内毒素基因

裴子飞 齐义鹏 黄永秀 沈 英*

(武汉大学病毒学系, 武昌 430072)

从八十年代初开始用昆虫核型多角体病毒(NPV)的多角体蛋白基因(ocu)构建转移载体^[1]以来,陆续表达了几十种外源基因^[2]。我们^[3]曾用大尺蠖核多角体病毒(BsNPV)的ocu基因构建了转移载体。苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*简称Bt)是一类经典的有效生物杀虫剂。Bt HD-73是一个杀虫谱和毒力与*B.t. kurstaki* HD-1相当的菌株(H3a3b)^[4]。Bt的 δ -内毒素基因(cry)在原核细胞中的克隆表达和抗虫转基因植物均有不少报道,但用昆虫病毒转移载体表达cry基因的文献极少。我们试图通过BsNPV转移载体将Bt的cry基因运送到病毒基因组中,构建双价重组病毒杀虫剂,开辟生物防治新途径。

材 料 和 方 法

(一) 材料

苏芸金杆菌*B.t. kurstaki* HD-73及纯化的伴胞晶体蛋白由中国科学院武汉病毒所李荣森研究员赠送。质粒pBt28^[5]及昆虫病毒转移载体pBsA39^[3]由我们自己构建。限制酶购于华美公司和中国医学科学院基础所 α -³²P-dCTP及缺刻转移药盒购于北京福瑞公司。小菜蛾幼虫由本室饲养。

(二) 方法

用煮沸法^[6]提取质粒DNA,用电洗脱法从琼脂糖凝胶回收质粒DNA或DNA片段。限制性消化用DNA 1—2 μ g,酶10—20单位,37 $^{\circ}$ C保温3h^[6,7]。

DNA重组、转化和阳性重组体的筛选以及Southern blot转膜杂交均按文献^[6,7]进行。

按文献^[8]提取亲本质粒及阳性重组质粒的胞内表达蛋白。

抗血清的制备是选健康雄性家兔一只,用提纯的Bt HD-73伴胞晶体蛋白注射,每周一次,连续三周,第一次皮下注射12mg,第二、三次肌肉注射12和16mg,第四周从颈动脉采血,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜,析出血清。用琼脂双扩进行抗原抗体的免疫沉淀反应。抗血清稀释1:100,加入中央孔,四周分别加入从阳性对照pBt28、重组质粒pBsBt70、pBsBt71和阴性对照pBsA39的细胞溶菌物中提取的总蛋白,37 $^{\circ}$ C反应24h后观察。

表达蛋白用SDS聚丙烯酰胺凝胶(PAG)电泳,考马斯亮蓝染色。为了观察清晰,在WX-86A型宽幅凝胶扫描仪上扫描,根据峰面积计算表达蛋白含量。DNA用琼脂糖凝胶电泳。

最后,进行表达蛋白的生物测定。即将重组质粒和亲本对照质粒的溶菌物涂于新鲜小白菜叶片上,饲养三龄健康小菜蛾幼虫,每组40头虫,每天换叶,观察死亡情况。

结 果 与 讨 论

(一) δ -内毒素基因片段的亚克隆

用Hind III消化质粒pBt28^[5],回收含cry基因的6.6kb片段与Hind III消化的转移载体pBsA39^[3]亚克隆,克隆位点在载体ocu基因启动子下游,即ATG上游-15bp处^[3],有两种插入方向,通过基因表达进行筛选。重组之后,将重

本文于1992年4月8日收到。

国家自然科学基金和国家教委博士点基金资助的课题。本文曾在1990年澳大利亚国际学术会上宣读。

*同济医科大学微生物教研室。

组DNA转化大肠杆菌HB101细胞,在Ap/LB和Ap-LB/Tc-LB平板相继筛选后,得到表型为Ap^r Tc^r的阳性转化子274个,其中9个是具有外源插入片段的阳性重组体。

用Hind III消化阳性重组体 pBsBt70 得到一条6.6kb的片段。经转膜后,与用Bt47MD质粒制备的探针杂交,在6.6kb位置有明显的杂交带,与阳性对照结果相同(图版I-1)

(二) cry基因在大肠杆菌细胞中的表达

收集pBsBt70, 71等的大肠杆菌细胞裂解液,提取总蛋白质,用SDS-PAGE电泳和凝胶扫描。结果表明,亲本转移载体pBsA39产生11条带(或峰)、重组质粒pBsBt70,71,72除有同样的11条带外,还多出分子量为68kDa和23kDa的两条带,而重组质粒pBsBt134,46,57仅多出一条68

kDa蛋白带。68kDa蛋白与提纯的Bt HD-73伴孢晶体蛋白的泳动速度一致(图版I-2,3)。通过凝胶扫描后的峰面积计算,两种表达蛋白的表达量分别为16.257μg/ml和11.335μg/ml。

(三) 表达蛋白的鉴定

图版I-2证明,Bt HD-73伴孢晶体蛋白已达到电泳纯。用其制备抗血清,与重组质粒pBsBt70,71、亲本质粒pBt28(阳性对照)和转移载体pBsA39(阴性对照)的表达蛋白进行琼脂双扩试验,结果见图版I-4。

图版I-4表明,重组质粒pBsBt70,71的细胞裂解液提取的蛋白能产生明显的沉淀线。进一步以杀虫试验检查了表达蛋白的生物活力,结果见表1。

表1 表达蛋白对小菜蛾幼虫的毒力试验

试验项目(头)	Bt内毒素	pBR322	pBt28	pBsA39	pBsBt70	试剂对照	空白对照 1	空白对照 2
供试幼虫	40	40	40	40	40	40	40	40
第二天死虫	11	3	8	3	12	2	3	3
第三天死虫	29	0	5	0	4	0	0	0
第四天死虫		0	12	0	11	0	0	0
第五天死虫		0	7	0	8	0	0	0
第六天死虫		0	8	0	5	0	0	0
终点死亡率(%)	100	7.5	100	7.5	100	5.0	7.5	7.5

从表1看出,Bt的纯化伴孢晶体蛋白在第三天、重组质粒pBsBt70的表达蛋白在第六天都能全部杀死小菜蛾幼虫。亲本质粒pBsA39和pBR322对照以及试剂对照、空白对照在投毒后第二天各发现死虫3条,可能是幼虫在第二天尚不能适应环境造成的死亡。

昆虫杆状病毒的晚期基因(如ocu)启动子属于真核类型。一般而言,在大肠杆菌细胞中不能被其RNA聚合酶识别。显然,本文报道的cry基因在大肠杆菌中的表达,我们认为是由Bt的cry基因自身的原核启动子驱动的。Kronstad

和Whiteley^[9]证明,Bt HD-73的cry基因长4.2 kb,全部序列(包括5'端调控序列)包含在Hind III 6.6kb片段之中,在此片段的第一个EcoRI位点前有cry基因的3个转录起始部位^[10],Bt I和Bt II适于在苏芸金杆菌中转录;中间的Ec适用于在大肠杆菌中起始转录。因而,在本文报道的克隆中,该片段的两种插入方向都能被起始转录。有人报道^[11,12],Bt HD-73只能产生单一蛋白,分子量为138kDa或90kDa。本文得到的表达蛋白为68kDa和23kDa两种,可能是通过降解产生的。

参 考 文 献

- [1] Smith, G. E., et al., *Mol. Cell Biology*, 3:183-192, 1983.
- [2] 齐义鹏: 病毒学报, 6(4):385-392, 1990.
- [3] Qi, Y. P. et al., The Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia, Proceeding and Abstracts, 265, 1990.
- [4] 寇云六: 杀虫微生物, Vol. I, II, 北京农业出版社, 北京, 1987.
- [5] 裴子飞等: 武汉大学学报, 12:29-33, 1990.
- [6] 齐义鹏等: 基因工程原理和方法, 四川大学出版社, 成都, pp.181-182, 203-208, 136, 1989.

- [7] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 114, 104, 250, 313, 366, 382, 1982.
- [8] 黄耀煌等: 生化与生物物理学报, 17: 469—474, 1985.
- [9] Kronstad, J. W. and Whiteley, H. R., *Gene*, 47: 29—40, 1986.
- [10] Schnepf, H. E. et al., *J. Biol. Chemistry*, 260: 6264—6272, 1985.
- [11] Thomas, W. F. and Ellar, D. J., *J. of Cell Science*, 60: 181—197, 1983.
- [12] Li Rongsen, Society for Invertebrate Pathology, Program and Abstracts, XX Annual Meeting, Gainesville, Florida, pp. 92—93, 1987.

Expression of Endotoxin Gene from *Bacillus thuringiensis* with Insect Baculovirus Transfer Vector in *Escherichia coli*

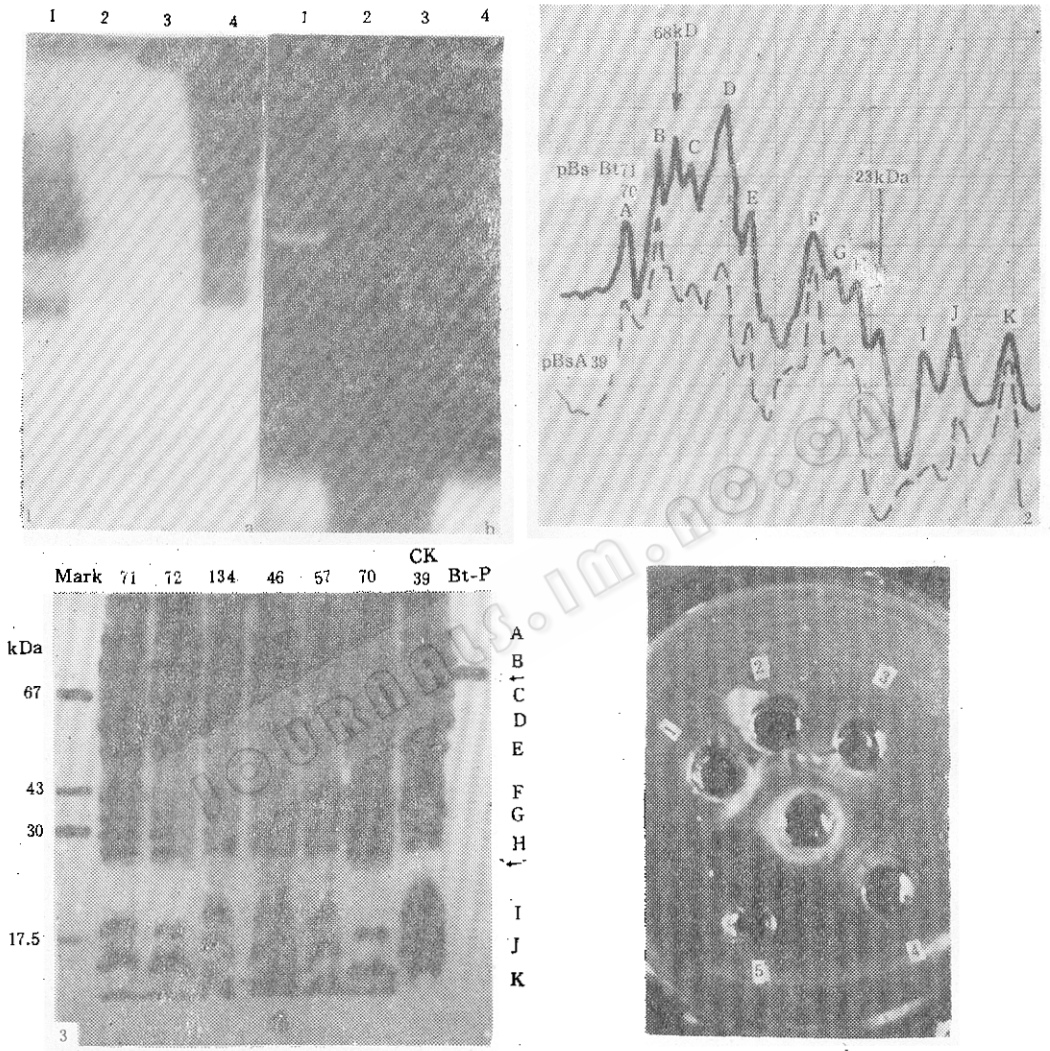
Pei Zifei Qi Yipeng Huang Yongxiu Sheng Ying

(Department of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

After a 6.6kb fragment carried δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-73 was obtained from plasmid pBt28 by Hind III, it was subcloned into downstream of polyhedrin gene promoter in baculovirus transfer vector pBsA39. The δ -endotoxin gene as inserting fragment is present in chimeric vector by Southern blot hybridization.

The δ -endotoxin gene on the chimeric vector pBsBt70 etc. is able to express two proteins with MW of 68 and 23 kDa and yield of 16.257 μ g/ml and 11.335 μ g/ml respectively in *E. coli* cells. Expression proteins from chimeric vector are able to immunoprecipitate with antibody prepared by purified HD-73 crystal proteins. Upon biological toxicity test to cabbage caterpillar by lysate, the expression proteins were toxin with a mortality of 100% on 6th day to the 3 instar larvae. It is demonstrated that the expression proteins which probably are decompositional products from protoxin with MW of 138kDa, or 90kDa, are Bt HD-73 crystal protein with biological function.

Key words Insect baculovirus; Polyhedrin gene transfer vector; *Bacillus thuringiensis*; δ -endotoxin gene.



1. 重组质粒pBsBt 70 DNA的琼脂糖凝胶电泳(b)和Southern blot 杂交(a)
 2. 3. Bt cry基因表达蛋白的SDS-PAGE电泳(3)和凝胶扫描(2)
 4. 表达蛋白与抗Bt伴孢晶体蛋白(中心孔)产生的免疫沉淀反应