

***B.t.c. cry 1C* 全长基因的克隆及其在增产菌中的表达\***陈月华<sup>1\*\*</sup> 李红秀<sup>1</sup> 王津红<sup>1</sup> 蔡峻<sup>1</sup> 任改新<sup>1,2</sup>(南开大学生命科学学院 天津 300071)<sup>1</sup> (天津农业生物技术研究中心 天津 300192)<sup>2</sup>

**摘要:** 设计的一对引物, 对苏云金芽孢杆菌科默尔亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*) 15A3 菌株中的 *cry1C* 基因进行 PCR 扩增, 得到包括结构基因, 调节基因在内的全长为 4.0kb 的 PCR 产物。经两步克隆, 将此基因连接至穿梭表达载体 pHT315 上, 得到重组质粒 pHT-1C。通过电转化将其导入一株增产菌蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 9509 菌株, SDS-PAGE 检测到 1 条 60kD 左右的蛋白带, 镜检观察到菱形晶体, 生测结果表明, *cry1C* 基因的导入使 *Bc*9509 菌株获得了对甜菜夜蛾的杀虫活性。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌默尔亚种, *cry1C*, 增产菌, 杀虫活性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 01-0065-04

**CLONING OF FULL CRY1C GENE FROM B. T. C. AND EXPRESSION IN CROPS BENEFICIAL BACTERIA *BACILLUS CEREUS***

CHEN Yue-Hua LI Hong-Xiu WANG Jin-Hong CAI Jun REN Gai-Xin

(The College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract:** Specific primers 1CaA/1CaB for full *cry1C* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* strain 15A3 were designed. The 4.0kb PCR product included the whole ORF and regulation region of *cry1C* gene. This PCR product was linked with shuttle vector pHT315 by two cloning steps. The recombinant plasmid pHT-1C was electroporated into *Bacillus cereus* 9509, a kind of bacteria that beneficial to crops. The transformant could produce bipyramidal-shaped parasporal inclusions. The 60kD protein band was detected by SDS-PAGE. The bioassay result showed that the *cry1C* gene transformant of *Bc* 9509 had insecticidal activity to *Spodoptera exigua*.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, *cry1C*, *Bacillus cereus*, *Spodoptera exigua*

利用遗传工程技术构建多功能的微生物工程菌株是近年来的研究热点。本室从一株高效广谱的苏云金芽孢杆菌 (*Bt*) 15A3 菌株<sup>[1,2]</sup>中克隆到对甜菜夜蛾高效的杀虫蛋白 *Cry1C* 的全长基因, 并在一株增产蜡状芽孢杆菌 (*Bc*) 9509 菌株中表达出大量的晶体蛋白。由于增产菌对作物的生长具有增产, 优质和抗逆 3 大功能, 20 世纪 90 年代以来增产菌的应用在全国范围内迅速推广, 至 1993 年已在 7 亿多亩耕地和 50 多种作物上大面积应用, 获得显著成效<sup>[3]</sup>。孙良武等利用电穿孔方法将克隆有 *cry1Ac* 杀虫蛋白基因的质粒 pAMY 转入增产菌, 并获得对烟青虫有毒杀作用的转化子<sup>[4]</sup>。*Cry1Ac* 杀虫蛋白对棉铃虫, 烟青虫类害虫高效但对甜菜夜蛾几乎无效, 而 *Cry1C* 对甜菜夜蛾类害虫高效<sup>[5]</sup>。近几年来, 甜菜夜蛾在我国部分地区呈爆发趋势, 本室在开发 *Bt* 15A3 高效广谱杀虫剂的同时构建出杀甜菜夜蛾的增产菌, 期望利用多功能增产菌作为微生态制剂的

\*天津市科委, 天津市农业生物技术研究中心科技 (攻关) 资助项目 (No.033122111-1)  
天津市自然科学基金项目资助 (No.023608811)

\*\*联系人 E-mail: yhchen@nankai.edu.cn

收稿日期: 2003-01-24, 修回日期: 2003-03-30

同时也可以起到生物防治的作用。有关这类工程菌的构建还未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

*Bt* 15A3 为本室分离和保藏菌种, *Bc*9509 是本室自国内微生态商品制剂中分离并保藏, *E. coli* TG1, *E. coli* GM2163 为常规转化用菌种, 所用质粒 pUCm-T 购自上海生工, pHT315 来自法国巴斯德研究所, pUCm-1C, pHT-1C 为本论文构建。

### 1.2 cry1C 引物序列及 PCR 扩增条件

根据 Genebank 中收录的苏云金芽孢杆菌 *cry1Ca4* 的序列设计了特异性引物 1CaA, 1CaB, 其中 1CaA 位于起始密码子上游 400bp 的位置, 1CaB 位于终止密码子下游 12bp 的位置。引物序列为: 1CaA: 5'GAA TTC CAG TAC ACA TCT CAT3'; 1CaB: 5' AAC GTA TCT TAT TCC TCC AT3'。PCR 扩增条件见文献[6], 仪器为美国产 MJ-200 PCR 仪。

### 1.3 PCR 产物的克隆和亚克隆

用常规分子克隆技术。

### 1.4 蜡状芽孢杆菌的电转化

将活化好的菌体以 1% 接种量转接于 40mL 新鲜的 LB 培养基, 37℃ 振荡培养 3 ~ 3.5h 使  $OD_{600}$  为 0.3 左右, 4℃ 离心收集菌体, 将沉淀用预冷的无离子水洗两次, 每克细胞沉淀悬于 5mL 预冷的 20% PEG6000 中, 使菌体浓度约为  $10^{10}$  CFU/ mL, 可直接用于电转化或分装后置于 -70℃ 备用。吸取 50 $\mu$ L 上述菌悬液和 10 $\mu$ L 质粒 DNA 混合后冰浴 5 ~ 10min, 使用 BIO-RAD 电穿孔仪在 7.5 ~ 12.5kV/cm 条件下进行电穿孔转化, 一次电脉冲结束后迅速加入 1mL LB, 37℃ 缓慢震荡培养 2h, 取 200 $\mu$ L 菌液涂抗生素选择平板。

### 1.5 Cry1C 表达毒素蛋白的检测

按本室常规法制备晶体蛋白, 再用胰蛋白酶处理后进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.6 甜菜夜蛾生物测定

取培养 72h 菌体细胞悬于生测缓冲液, 浓度为  $OD_{600} = 1.0$ , 其它方法见文献 [1]。

## 2 实验结果

### 2.1 cry1C 基因在 *E. coli* 中的克隆

将 PCR 扩增到的 4kb *cry1C* 全长基因与 2.8kb 的 pUCm-T 连接, 构建出重组质粒 pUCm-1C, 将重组质粒转化大肠杆菌 TG1, 在含 Amp, IPTG-Xgal 平板上随机筛选 2 个白色菌落, 编号为 T1, T2。提取 2 个转化子的质粒 DNA, 分别用 *Eco*RI, *Sal*I 进行酶切鉴定。由于载体的多克隆位点上含有 *Eco*RI, *Sal*I 的切点, 而插入片段中不含有这两种切点, 故电泳检测到了 2.8kb 的质粒带和 4kb 的外源 DNA 带, 证明已获得 *cry1C* 全长基因的正确克隆 (见图 1 中的第 4, 5 样品)。

### 2.2 cry1C 基因在 *E. coli* 中的亚克隆

用 *Eco*RI, *Sal*I 同时处理穿梭表达载体 pHT-315 和重组质粒 pUCm-1C, 连接后得到重组质粒 pHT-1C, 见图 2。将重组质粒 pHT-1C 转化大肠杆菌 GM2163, 得到转化子 T3, T27。制备转化子质粒进行酶切鉴定, 电泳检测发现两条带分别为 4kb (*cry1C* 全长片段) 和 6.5kb (载体质粒)。说明转化子 T3, T27 中均含有 pHT-1C。电泳检测结果见图 1 中的第 2, 3 样品。

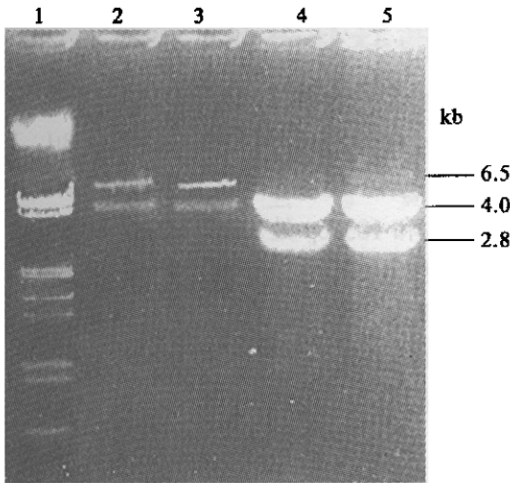


图1 转化子重组质粒的酶切鉴定  
1 λDNA (*Hind*III + *Eco*RI), 2、3 质粒 pHT-1C 的酶切片段, 4、5 质粒 pUCm-1C 的酶切片段

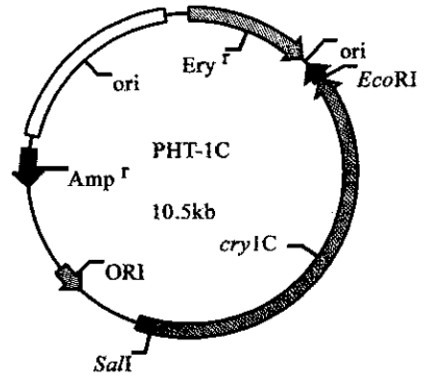


图2 重组质粒 pHT-1C 构建图

### 2.3 *cry1C* 全长基因在增产菌 *Bc9509* 中的表达

用含有全长 *cry1C* 基因的重组质粒 pHT-1C 电转化 *Bc9509*, 24h 后可以观察到大量的红霉素抗性菌落。用 *cry1C* 特异引物对转化子进行 PCR 检测, 均获得正确大小的扩增片段 (图略)。将这些菌落培养 72h 后镜检, 发现 *Bc9509-1C* 转化子可产生大量菱形的晶体蛋白 (图 3 B), 证明 *Bt 15A3* 的 *cry1C* 基因在蜡状芽孢杆菌中得到了很好的表达。选取其中的 2 个转化子 *Bc9509-1C1*, *Bc9509-1C2*, 供体株和受体株同时进行甜菜夜蛾杀虫活性测定和晶体蛋白 SDS-PAGE 分析。结果表明两个转化子都比受体菌多出了一条大小为 60kD 左右的蛋白带, 与亲本菌株完全相同 (图 4), 且都获得了杀甜菜夜蛾的活性 (表 1)。

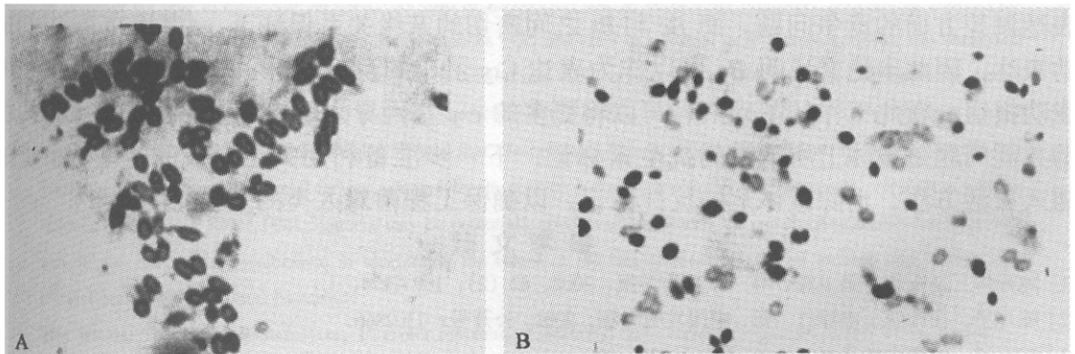


图3 受体菌 *Bc 9509* 的孢子和重组菌株的伴孢晶体形态  
A *Bc 9509* 的芽孢, B *Bc 9509-1C* 的芽孢和晶体

表 1 *Bc9509-1C* 转化子对甜菜夜蛾的生物初测结果

CK	<i>Bc 9509</i>	<i>Bc 9509-1C1</i>	<i>Bc 9509-1C2</i>	<i>Bt15A3</i>
0	2%	31.8%	53.3%	98%

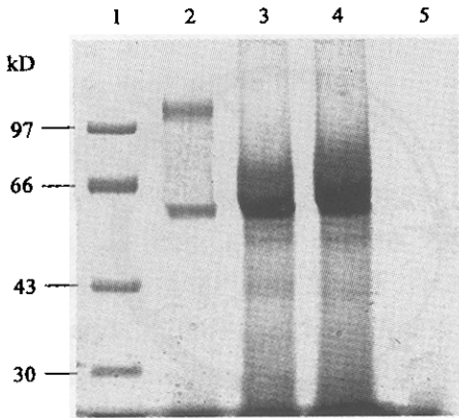


图4 *Bc9509-1C* 转化子活性毒素 SDS-PAGE 分析图

Lane 1 Marker, 2 *Bt 15A3*, 3、4 *Bc 9509-1C1*, 2, 5 *Bc 9509*

### 3 讨论

基因表达水平的高低决定于对转录和翻译过程的调节, *cry1C* 基因的转录受双启动子 *BtI*, *BtII* 的调控。*BtI* 的-10区和-35区分别位于起始密码子上游 82 bp 和 103 bp 处。*BtII* 的-35区位于起始密码子上游 95 bp 处<sup>[7]</sup>。另外, 启动子上游区在转录调控中也起了重要的作用。Walter (1995) 研究了在 *cry1Ab* 启动子前加或不加 308bp 上游区对 *cry1Ab-LacZ* 融合基因表达的影响, 发现在库斯塔克亚种 80-21 菌株中, 有上游区比不含上游区的  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性高 4 倍<sup>[8]</sup>。Cheng 等 1999 年的研究也得到了类似的结果。De-Souza (1993) 等报道在苏云金芽孢杆菌中只克隆包括 *cry3A* 启动

子及其下游终止密码子片断时其表达量很低, 而位于启动子上游的 400bp 片断可使其产物的表达量增加 25 倍<sup>[9]</sup>。可见启动子上游区可以通过某种方式调控转录。目前认为这种调控作用是通过调节蛋白与启动子上游区域间的结合实现的<sup>[10]</sup>。本文根据上述研究结果所设计的用于全长 *cry1C* PCR 扩增的上游引物 1CaA 位于起始密码子上游 400bp 处, 因此得到的 PCR 产物除了含有 *cry1C* 基因的编码区外, 还含有其自身的启动子以及在转录调控中起重要作用的启动子上游区域。

蜡状芽孢杆菌与苏云金芽孢杆菌基因组极为相近, 除 *Bt* 能产生伴孢晶体而不同于 *Bc* 外, 二者其他性状没有太大差别。将带有杀虫蛋白基因的重组质粒 pHT-1C 电转化增产蜡状芽孢杆菌 *Bc9509* 后, 得到大量的转化子, 说明 *Bc9509* 具有很高的接受外源 *cry* 基因的能力, 原因很可能是 *Bc* 本身不含有任何种类的 *cry* 基因, 因而无各类 *cry* 基因在表达调控方面的竞争问题。而 *Bc* 与 *Bt* 之间密切的亲缘关系保证了 *cry* 基因在 *Bc* 中的成功表达, 因此本论文证明 *Bc* 可以作为表达 *Cry* 蛋白的良好受体。文献[4]也有相关的成功报道。在此工作的基础上, 可以将更多的 *cry* 基因导入增产菌。目前构建工程菌株的共同问题是载体上所携带的抗生素标记, 下一步准备利用人工合成的转座子系统的插入灭活方法, 消除载体上的抗性标记, 以确保工程菌对人类的安全。

### 参考文献

- [1] 陈月华, 任改新, 吴卫辉, 等. 微生物学报, 2002, 42 (2): 169~174.
- [2] 陈月华, 任改新, 王津红, 等. 中国发明专利, 2001, 公开号: 1302866.
- [3] 汪大泽. 安徽农业通报, 1996, 2 (1): 36~39.
- [4] 孙良武, 梁平彦, 田颖川, 等. 生物工程学报, 1994, 10 (1): 1~6.
- [5] Entwistle P E. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1993, 9~10.
- [6] 陈月华, 关海山, 曾林, 等. 南开大学学报 (自然科学版), 1999, 32 (1): 19~22.
- [7] Baum J A, Malvar T. Mol Microbiol, 1995, 18: 1~12.
- [8] Walter T. Regulation of *cry* gene transcription in *Bacillus thuringiensis* by DNA binding protein which recognize DNA elements upstream of the *cry1Ab*, *cry1C* and *cry1D* gene promoter (PH D dissertation), 1995.
- [9] De-Souza M T, Lecadet M, Lerecus D. J Bacteriol, 1993, 175: 4732~4738.
- [10] Walter T, Aronson A. J Biol Chem, 1999, 12: 7901~7906.