

## 苏云金芽孢杆菌 *vip3A* 基因的检测及保守性分析

陈建武 唐丽霞 宋少云 袁美姝 庞 义\*

(中山大学生物防治国家重点实验室 昆虫学研究所 广州 510275)

**摘 要** Vip3A 蛋白是苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)在营养期分泌的一类新型杀虫蛋白。用 PCR 方法从 114 个 Bt 菌株和 41 个 Bt 标准菌株中筛选到 39 株即约 25% 的菌株含有 *vip3A* 基因。利用所制备的 Vip3A 蛋白的多克隆抗体对以上含有 *vip3A* 基因的 Bt 菌株进行 Western 印迹分析,发现多数 PCR 反应为阳性的菌株都产生 89 kD 大小的蛋白,其中有 4 株没有 Vip3A 蛋白的表达。从以上菌株中挑选 2 个对夜蛾科害虫具有较高和较低毒力的菌株,即 S101 和 611,并分别进行 *vip3A* 基因的克隆和测序,再与 GenBank 上所登录的其它 6 个全长 *vip3A* 基因和 2 个已报道的但未登录 GenBank 的 *vip3A* 基因进行核苷酸和氨基酸序列比较,结果表明, *vip3A* 是一个极其保守的基因。将以上所克隆的 2 个 *vip3A* 基因即 *vip3A*-S101 和 *vip3A*-611 分别插入表达载体 pQE30 构建了表达质粒 pOTP-S101 和 pOTP-611,转化到大肠杆菌 M15,经 1 mmol/L IPTG 诱导后均表达 89 kD 大小的 Vip3A 蛋白。蛋白可溶性试验表明, Vip3A-S101 和 Vip3A-611 分别有 48% 和 35% 的蛋白是可溶的。将 Vip3A-S101 和 Vip3A-611 蛋白和已报道的 Vip3A-S184 蛋白对初孵斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)幼虫进行生物测定,结果表明,3 个 Vip3A 蛋白对斜纹夜蛾幼虫毒力没有显著性差异,这说明了 Vip3A 个别氨基酸的变化对蛋白的杀虫活性没有影响。

**关键词** 苏云金杆菌, *vip3A* 基因, 克隆, 表达

**中图分类号** Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)05-0538-07

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性细菌,其特点是在芽孢期形成具有特异杀虫活性的伴孢晶体<sup>[1,2]</sup>。杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal proteins, ICPs)主要分为 Cry 和 Cyt 两类蛋白<sup>[3]</sup>,但是许多 ICPs 蛋白对一些农业重要害虫没有杀虫作用(如小地老虎等<sup>[4]</sup>)或者已经诱导某些害虫产生抗性<sup>[1,5]</sup>。

近年来,人们发现 Bt 在营养期分泌的一类新型杀虫蛋白即 Vip3A,对鳞翅目夜蛾科害虫(如小地老虎、草地贪夜蛾、甜菜夜蛾和棉铃虫等)具有广谱高效的杀虫活性,Vip3A 对小地老虎的毒性甚至是某些 Cry1A 类蛋白的 260 多倍<sup>[6,7]</sup>。此外,通过比较 *vip3A* 基因敲除前后 Bt 菌株 HD-1 对甜菜夜蛾的毒力,Donovan 等<sup>[8]</sup>认为 Vip3A 蛋白是 Bt 在发挥杀虫作用时产生“孢子效应”的主要成分之一。Vip3A 蛋白引起昆虫的病症与 ICPs 的一样,但前者导致昆虫死亡的时间一般较长<sup>[6,9]</sup>。因为 Vip3A 和 ICPs 是两

类完全不同的蛋白,杀虫作用机理也不同,所以 Vip3A 蛋白的研究对于我国 Bt 的进一步开发利用具有重要意义<sup>[10]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂、质粒及菌种

限制酶均购自 TaKaRa 公司;DNA marker 和 pGEM-T Easy 载体系统购自 Promega 公司;Taq 酶购自上海博彩生物科技公司;高保真 PCR 试剂盒购自 Roche 公司;pQE30 高效表达及纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司;总蛋白定量试剂盒(CD Protein Assay Kit)购自 Bio-Rad 公司。大肠杆菌 TG1 为本实验保存。野生型 Bt 菌株均为本实验室分离,并相应地进行了血清型、基因型鉴定与生物测定<sup>[11-13]</sup>。Bt 标准菌株均来自法国巴斯德研究所<sup>[14]</sup>。

### 1.2 聚合酶链式反应

按已发表的 *vip3A*(a)基因序列<sup>[6]</sup>(GenBank 登

收稿日期 2003-01-20,修回日期 2003-04-21。

基金项目 国家 973 计划 No. G20000162209 \ 863 计划 No. 2001AA214011 和广东省自然科学基金项目。

\* 通讯作者。 Tel: 86-20-84113860; Fax: 86-20-84037472; E-mail: ls12@zsu.edu.cn

本文涉及的 *vip3A*-S101 和 *vip3A*-611 基因核苷酸序列已提交 GenBank, Accession No.: AY074707 和 AY074708。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

录号为 L48811)设计一对引物用于 PCR 检测。正向引物: 5'-ATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGCAC-3'; 反向引物 5'-TCACCATAAAATACTTCCGATAA-3'。PCR 按常规条件进行: 94℃, 4 min; 94℃, 1 min, 42℃, 1 min, 72℃, 1 min, 30 个循环, 72℃, 10 min。

同样地, 根据已发表的 *vip3A(a)* 基因序列设计一对引物用于扩增全长 *vip3A* 基因开放阅读框, 分别在引物的 5' 引入 *Bam*H I 和 *Sal* I 内切酶位点。正向引物 5'-GGATCCATGAACAAGAATAATACTAAA

*Bam*H I

TTAAGCAC-3';

反向引物 5'-GTCGACGATCCCGATCTTACTTAATAG

*Sal* I

AGACAT-3'。

PCR 反应条件: 94℃, 2 min; 94℃, 15 s, 50℃, 30 s, 72℃, 2 min, 10 个循环; 94℃, 15 s, 50℃, 30 s, 72℃, 2 min, 20 个循环, 每个循环中的延伸反应依次增加 5 s, 最后 72℃ 延伸 7 min。

### 1.3 表达载体 pOTP 的构建及 DNA 序列测定

质粒抽提、酶切反应、电泳鉴定、DNA 片段回收、连接反应和大肠杆菌的转化等步骤均按分子克隆实验手册<sup>[5]</sup>。DNA 序列委托上海基康公司测定。

### 1.4 目的蛋白 Vip3A 的诱导表达

挑取转化平皿上的单菌落接种于 10 mL 含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 过夜培养。以 1:20 转接到 100 mL 含有以上浓度抗生素的 LB 液体培养基, 培养至  $OD_{600nm}$  为 0.5 ~ 0.7 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导培养 5 h, 各取 1 mL 菌体进行 SDS-PAGE 电泳分析。

### 1.5 表达产物的可溶性分析

取 1 mL 按以上方法诱导 5 h 的菌液, 12 000 r/min 离心 2 min, 收集菌体, 加入 1 mL 裂解缓冲液 (50 mmol/L  $NaH_2PO_4$ , 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole, pH 8.0), 加入溶菌酶至 1 mg/mL 并在冰上放置 30 min, 然后进行超声波破碎, 10 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清 (含有可溶性蛋白的粗提液 A) 并保存沉淀 (含不可溶性蛋白的粗提液 B), 进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.6 Western 印迹分析

挑取 Bt 单菌落接种于 LB 培养基, 30℃ 过夜培养。以 1:100 转接到 PY 液体培养基<sup>[8]</sup>中培养 8 h, 各取 1 mL 菌体进行 SDS-PAGE 电泳分析, 然后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 用已制备的 Vip3A 蛋白

的多克隆抗体<sup>[16]</sup>作为一抗, 以辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的羊抗兔 IgG 作为二抗, 用化学发光法进行显色。

### 1.7 蛋白定量

用 Imagemaster VDI Software V3.0 (Pharmacia 公司) 软件分析目的蛋白占总蛋白的百分比, 而菌体总蛋白按照 CD Protein Assay Kit 提供的 Lowry 法进行定量。

### 1.8 生物测定

试虫斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 为本室饲养。按照已有文献<sup>[17]</sup>对初孵幼虫进行生物测定, 利用本实验室研制的昆虫毒力测定分析软件<sup>[18]</sup>进行  $LC_{50}$  分析。

## 2 结果

### 2.1 *vip3A* 基因菌株的 PCR 检测

对本实验室保存的 114 株 Bt 野生型菌株和 41 株 Bt 标准菌株进行 PCR 鉴定, 发现有 39 株可以获得 1.2 kb 大小的 PCR 产物 (图 1), 约有 25% 含有 *vip3A* 基因, 这与已报道的<sup>[6, 19]</sup>基本一致。

### 2.2 Vip3A 蛋白的 Western 印迹分析

对以上 PCR 鉴定为阳性的菌株和晶体缺陷型菌株 *Cry*<sup>-</sup>B 进行 Western 印迹分析, 结果表明, 39 株含有 *vip3A* 基因的 Bt 菌株中绝大多数都能产生 89 kD 大小的蛋白, 其中有 4 株即 HD-12、S12-2、J-1 和 M 没有阳性信号, 此外, *Cry*<sup>-</sup>B 也没有阳性信号 (图 2), 这说明这 5 个菌株没有 Vip3A 蛋白的表达。

### 2.3 *vip3A* 基因的克隆及序列比较

选取对夜蛾科害虫具有较高和较低毒力的 Bt 野生菌株 S101 和 611<sup>[11]</sup>分别制备其总 DNA 为模板进行 PCR, 各获得一条大约 2.3 kb 条带, 其中 S184 作为阳性对照。回收 PCR 产物, 克隆到 T 载体上, 并将正确的克隆子进行测序。本文报道的 *vip3A*-S101 和 *vip3A*-611 基因核苷酸序列已提交 GenBank, 登录号分别为 AY074707 和 AY074708。将以上 2 个基因与在 GenBank 上登录的其它 6 个完整的 *vip3A* 基因即 *vip3A(a)*、*vip3A(b)*、*vip3A*-S184、*vip3A*-S、*vip83* 和 *vip3V* (登录号分别是 L48811、L48812、Y17158、AY074706、AY044227 和 AF373030) 以及已报道但未登录 GenBank 的 2 个基因即 *vip14* 和 *vip15* 进行核苷酸和氨基酸序列比较 (表 1), 它们的同源性均达到 99% 以上。结果表明了 *vip3A* 基因是相当保守的, 其中第 206、284、291、406、464 和 742 位氨基酸是变动频率最高的。

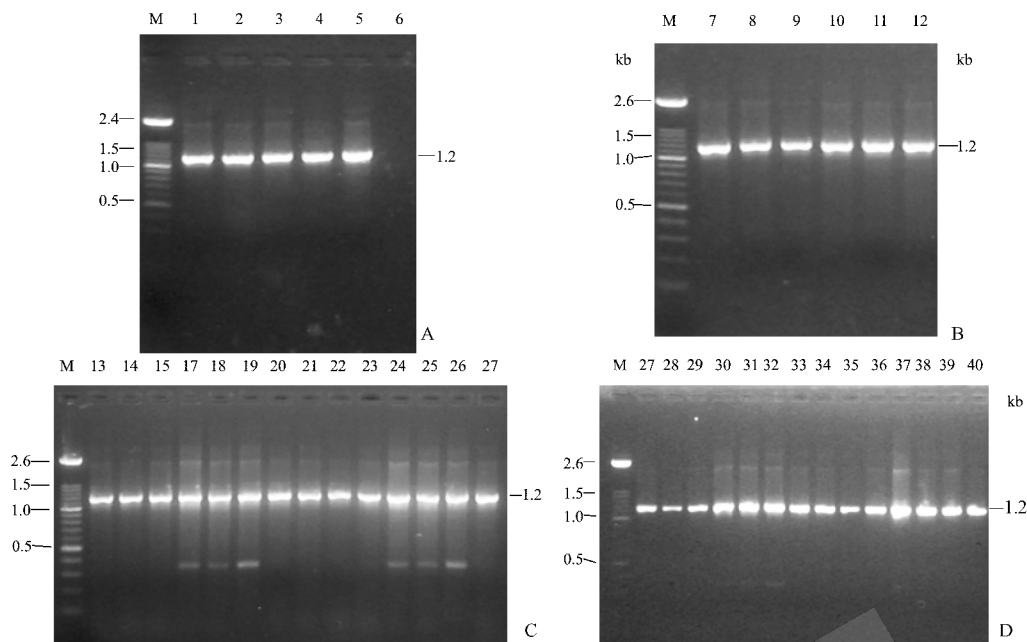


图 1 PCR 产物的电泳分析结果

Fig.1 Analysis of PCR products

1. HD-109 2. HD-11 3. HD-12 ; 4. HD-1 ; 5. HD-537 ; 6. Cry<sup>-</sup>B ; 7. S184 ; 8. S101 ; 9. S12-2 ; 10. 611 ; 11. S12-1 ; 12. A2-F ; 13. IV ; 14. A1st ; 15. 8C ; 16. 609 ; 17. 38-3 ; 18. -10 ; 19. G-2 ; 20. J-1 ; 21. G ; 22. C ; 23. F ; 24. -3 ; 25. Q ; 26. -8 ; 27. -1 ; 28. M ; 29. -5 ; 30. -99 ; 31. HD-201 ; 32. (10) ; 33. 10tA1 ; 34. 2 ; 35. -9 ; 36. -6 ; 37. -7 ; 38. 4 ; 39. 3rd(1) ; 40. E

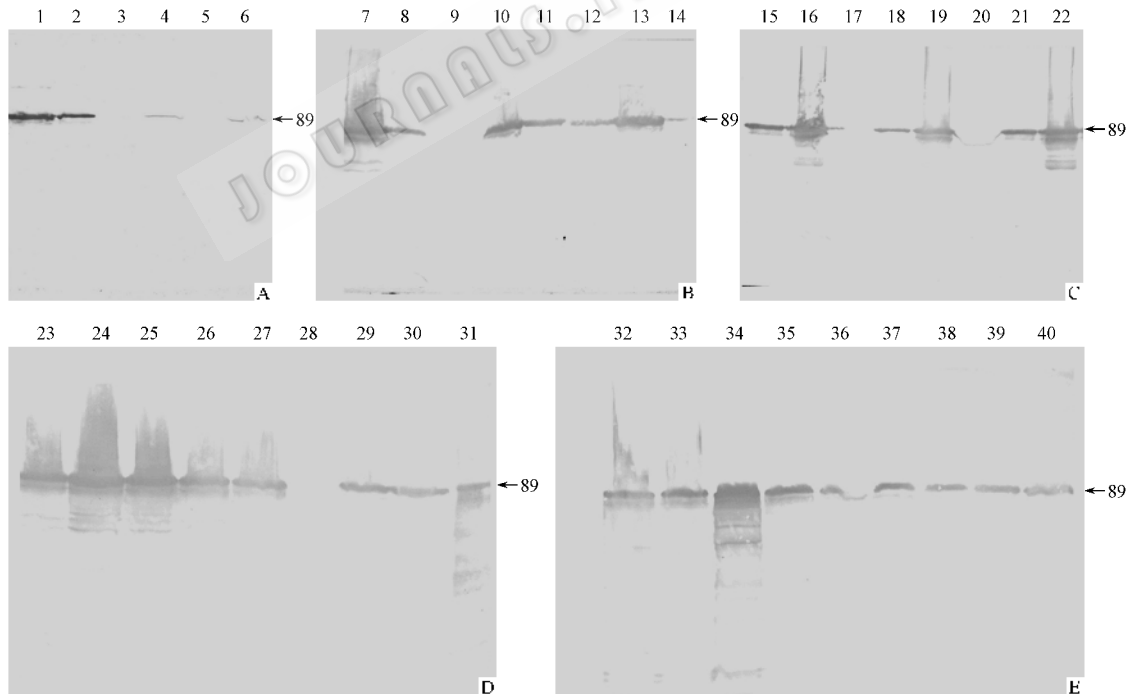


图 2 Bt 菌株 Vip3A 蛋白的 Western 印迹分析

Fig.2 Western blot of Vip3A proteins in *Bacillus thuringiensis*

1. HD-109 2. HD-11 3. HD-12 ; 4. HD-1 ; 5. Cry<sup>-</sup>B ; 6. HD-537 ; 7. S184 ; 8. S101 ; 9. S12-2 ; 10. 611 ; 11. S12-1 ; 12. A2-F ; 13. IV ; 14. A1st ; 15. 8C ; 16. 609 ; 17. 38-3 ; 18. -10 ; 19. G-2 ; 20. J-1 ; 21. G ; 22. C ; 23. F ; 24. -3 ; 25. Q ; 26. -8 ; 27. -1 ; 28. M ; 29. -5 ; 30. -99 ; 31. HD-201 ; 32. (10) ; 33. 10tA1 ; 34. 2 ; 35. -9 ; 36. -6 ; 37. -7 ; 38. 4 ; 39. 3rd(1) ; 40. E

表 1 苏云金芽孢杆菌 Vip3A 蛋白的氨基酸序列比较

Table 1 Amino acid differences among Vip3A proteins in Bt strains

Vip3A( a )	Vip3A( b )	Vip3A-S	Vip3A-S184	Vip3A-S101	Vip3A-611	Vip83	Vip14	Vip15	Vip3V
Leu <sup>206</sup>	Arg	a—	—	—	—	—	—	—	—
Gln <sup>284</sup>	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	—	—	Lys
Thr <sup>291</sup>	Pro	—	—	—	—	—	—	—	—
Glu <sup>406</sup>	Gly	—	—	—	—	—	—	—	—
Tyr <sup>464</sup>	—	—	His	—	—	—	—	—	—
Glu <sup>742</sup>	—	Gly	—	—	—	—	—	—	—

a.—indicates identity with Vip3A( a )

2.4 重组质粒 pOTP 的构建及表达

重组质粒 pOTP 构建的流程如图 3 所示,将克隆有 *vip3A* 基因的重组质粒 pTvip3A 和表达载体 pQE30 分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切,回收 2.4 kb 大小目的片段和 3.4 kb 载体片段,进行连接后转化到大肠杆菌 TG1,将正确的重组质粒 pOTP 转化大肠杆菌 M15 进行表达,转化子经 1 mmol/L IPTG 诱导后,在 1~8 h 间目的蛋白的表达量随时间而增加,到第 8 h 时,目的蛋白 Vip3A-S101 和 Vip3A-611 各约占总蛋白的 33%和 31%(图 4),这些说明了 *vip3A*-S101 和 *vip3A*-611 基因在 pQE30 表达载体系统中得到高水平表达。

2.5 目的蛋白的可溶性

将含有可溶性蛋白的粗提取物 A 与含有不可溶性蛋白的粗提取物 B 进行 SDS-PAGE,结果如图 5 所示。Vip3A-S101 和 Vip3A-611 的可溶性蛋白分别占目的蛋白总量约为 48%和 35%,而目的蛋白主要以包涵体形式存在<sup>[16]</sup>。

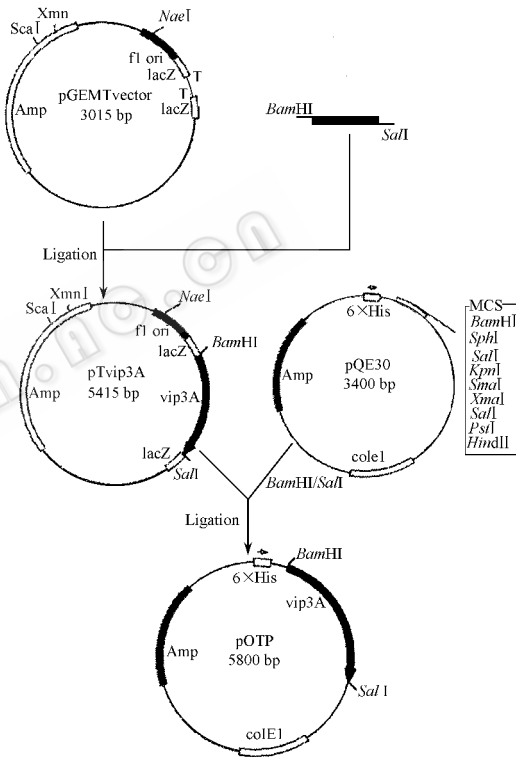


图 3 重组质粒 pOTP 的构建流程图

Fig.3 Construction of recombinant plasmids pOTP

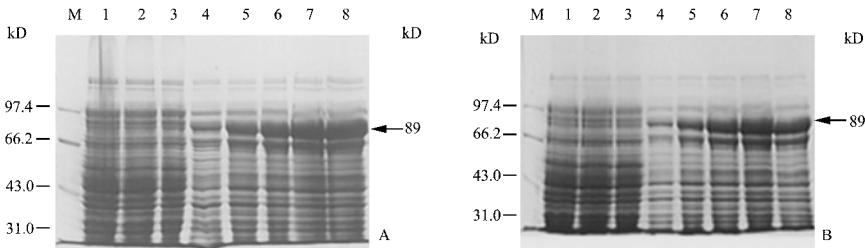


图 4 Vip3A-S101( A )和 Vip3A-611( B )在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of Vip3A-S101( A ) and Vip3A-611( B ) expressed in *E. coli*

M. Marker ; 1. M15 [ pQE30 ] without IPTG induction ; 2. M15 [ pQE30 ] with IPTG induction ; 3. M15 [ pOTP ] without IPTG induction ; 4. M15 [ pOTP ] for 1 h cultivation with IPTG induction ; 5. M15 [ pOTP ] for 2 h cultivation with IPTG induction ; 6. M15 [ pOTP ] for 4 h cultivation with IPTG induction ; 7. M15 [ pOTP ] for 6 h cultivation with IPTG induction ; 8. M15 [ pOTP ] for 8 h cultivation with IPTG induction

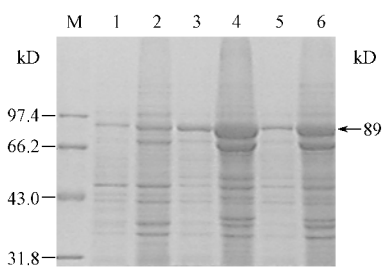


图5 目的蛋白可溶性实验

Fig.5 Determination of target protein solubility

M. Standard protein marker ; 1. Crude extract A of Vip3A-S184 ; 2. Crude extract B of Vip3A-S184 ; 3. Crude extract A of Vip3A-S101 ; 4. Crude extract B of Vip3A-S101 ; 5. Crude extract A of Vip3A-611 ; 6. Crude extract B of Vip3A-611

2.6 生物测定

以 Vip3A-S184 蛋白为阳性对照 ,空白对照组以空载菌培养液替代 ;收集大肠杆菌 M15[ pQE30 ]和 M15[ pOTP ]菌体各 10mL ,将菌体进行超声波破碎后对初孵斜纹夜蛾幼虫进行生物测定 ,结果如表 2 所示。Vip3A-S184、Vip3A-S101 和 Vip3A-611 对斜纹夜蛾幼虫的毒力没有显著性差异 ,LC50 值达到 1.0 μg/mL 左右 ,这与已报道的结果<sup>[6]</sup>基本一致。此外 ,它们对斜纹夜蛾幼虫的生长均有明显的抑制作用。

表 2 Vip3A 蛋白对斜纹夜蛾幼虫的毒力测定<sup>a</sup>

Table 2 Toxicity of Vip3A proteins against *S. litura*

Proteins	LC <sub>50</sub> ( μg/mL )	Regression equation	95 % fiducial limits ( μg/mL )
Vip3A-S184	0.97	y = 3.7497 + 1.2669x	0.64 - 1.46
Vip3A-S101	0.76	y = 3.4453 + 1.7614x	0.57 - 1.02
Vip3A-611	1.26	y = 7.1038 - 1.9102x	0.98 - 1.63

a. Against neonate larvae of *S. litura* , 30 larvae/replicate , three replicates

3 讨 论

对野生型和标准 Bt 菌株进行 PCR 筛选和 Western 印迹检测时 ,发现多数 PCR 反应为阳性的菌株均能产生 89 kD 大小的蛋白 ,除了 Cry<sup>-</sup> B 外 ,其中有 4 株含有 vip3A 基因 ,但进行 Western blot 时没有阳性信号。因此可以推测这 4 个 Bt 菌株可能含有 vip3A“ 沉默 ”基因 ,至于具体的原因还有待进一步研究。与标准菌株 HD-1 不同的是 ,晶体缺陷型菌株 Cry<sup>-</sup> B 无论 PCR 还是 Western blot 都证明不含有 vip3A 基因 ,因此 ,vip3A 基因可能是与 ICPs 基因一样定位于质粒上 ,在质粒消除过程中也随之丢失。通过 Blast 分析 ,vip3A( a )基因 3'下游序列与 cry1D 的 5'上游序列<sup>[20]</sup>的同源性达到 87% ,因此推测在 Bt 沾泽亚种( *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* )HD133 菌

株中 vip3A 基因可能正位于 cry1D 基因的上游。

分别从 3 株对夜蛾科昆虫具有高、中、低不同毒力的 Bt 菌株 S184<sup>[16]</sup>、S101 和 611 中克隆了 vip3A 基因并进行测序。通过对来自不同国家和地区的 Bt 菌株 vip3A 基因的核苷酸和氨基酸序列比较分析表明 ,vip3A 是一个极其保守的基因。利用表达这 3 个 vip3A 基因的大肠杆菌进行生物测定 ,结果表明 ,3 个 Vip3A 蛋白对斜纹夜蛾幼虫的毒力相当 ,与已报道的 Vip3A( a )杀虫活性也基本一致。在以上所进行比较的 Vip3A 蛋白中 ,Vip3A( a )与 Vip3A( b )的氨基酸差异要比其它的大 ,但是它们的杀虫能力也基本相同<sup>[6]</sup>。所以 ,这 6 个变动频率较大的氨基酸可能位于比较灵活的空间位置 ,对 Vip3A 蛋白的杀虫活性影响不大。因此可以推测 vip3A 基因可能与 ICPs 基因不同 ,不具有多样性 ,在遗传上比较保守 ,可能是 Bt 菌种某种结构或功能所必需的基因<sup>[21]</sup>。

Vip3A 和 ICPs 对多种夜蛾科害虫具有类似的杀虫活性 ,但其杀虫范围要比 ICPs 广泛得多 ,尤其对夜蛾科害虫具有较强的杀虫作用。而许多夜蛾科害虫的防治是农林生产中比较棘手的问题之一<sup>[22]</sup> ,因此 ,vip3A 基因的研究和利用为夜蛾科害虫的防治提供新的途径。尽管 vip3A 基因高度保守 ,但是 Vip3A 可能存在多样的杀虫活性 ,新杀虫谱也有待于进一步测试。由于 vip3A 基因与 ICPs 基因没有任何同源性 ,两类蛋白的杀虫活性和作用机理也不相同 ,所以 ,vip3A 基因为构建转基因植物提供新的杀虫基因资源 ,同时也可以作为 Bt 的抗性管理策略之一。与绝大多数 ICPs 不同的是 Vip3A 蛋白是在 Bt 营养期产生的毒蛋白 ,它也为构建高效广谱的 Bt 工程菌提供新的思路。

REFERENCES( 参考文献 )

[ 1 ] Hofte H , Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* . *Microbiol Rev* ,1989 **53** :242 - 255  
[ 2 ] YU Z N( 喻子牛 ). *Bacillus thuringiensis* . Beijing :Science Publication Press ,1990 .pp.306 - 307  
[ 3 ] Crickmore N , Zeigler D R , Feitelson J *et al.* . Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* , 1999 , **62** : 775 - 806  
[ 4 ] Doss V A , Kumar K A , Jayakumar R *et al.* . Cloning and expression of the insecticidal protein ( vip3V ) gene of *Bacillus thruingiensis* in *Escherichia coli* . *Protein Expr Purif* 2002 , **26** : 82 - 88  
[ 5 ] Schnepf E ,Crickmore N , Van R J *et al.* . *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* ,1998 **62** :775 - 806  
[ 6 ] Estruch J J ,Warren G W ,Mullins M A *et al.* . Vip3A , a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 , **93** :5380 - 5394

- [ 7 ] Selvapandian A , Arora N , Rajagopal R *et al.* Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* . *Appl Environ Microbiol* ,2001 **67** :5855 – 5858
- [ 8 ] Donovan W P , Donovan J C , Engleman J T. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua* . *J Invertebr Pathol* 2001 **78** :45 – 51
- [ 9 ] Yu C G , Mullis M A , Warren G W *et al.* The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl Environ Microbiol* ,1997 **63** :532 – 536
- [ 10 ] CHEN J W( 陈建武 ) , YU J X( 余健秀 ) , HU X H( 胡晓晖 ) *et al.* Research on vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* . *Chinese Biotechnology*( 中国生物工程杂志 ) , 2002 , **22** ( 3 ) 33 – 36
- [ 11 ] JIANG D H( 蒋冬花 ) , DENG R Q( 邓日强 ) , PANG Y( 庞义 ) *et al.* Bt strains highly toxic to Noctuidae larvae with notes on the characteristic of their crystalline protein. *Chinese Journal of Biological Control* ( 中国生物防治 ) , 1997 , **13** ( 2 ) : 82 – 85
- [ 12 ] JIANG D H( 蒋冬花 ) , DENG R Q( 邓日强 ) , PANG Y( 庞义 ) *et al.* The new *Bacillus thuringiensis* isolates highly toxic to *Prodenia litura* larvae and their characterization. *Microbiology* ( 微生物学通报 ) , 1995 **24** ( 5 ) : 262 – 265
- [ 13 ] ZHONG X H( 钟肖芬 ) , YUAN M J( 袁美娟 ) , ZHANG H( 张萍 ) *et al.* Identification and location of the toxin genes in 56 *Bacillus thuringiensis* isolates. *Microbiology*( 微生物学报 ) , 2001 , **41** ( 3 ) : 293 – 297
- [ 14 ] YU J X , TAN L , LIU Y S *et al.* Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* based on PCR amplified fragment polymorphisms of flagellin genes. *Curr Microbiol* , 2002 , **45** : 139 – 143
- [ 15 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed , New York , Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [ 16 ] CHEN J W( 陈建武 ) , TANG L X( 唐丽霞 ) , TANG M J( 汤慕瑾 ) *et al.* Cloning and expression product of *vip3A* gene from *Bacillus thuringiensis* and analysis of insecticidal activity , *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) 2002 , **18** ( 6 ) : 687 – 692
- [ 17 ] Yu J X , Pang Y , Tang M J *et al.* Highly toxic and broad-spectrum insecticidal *Bacillus thuringiensis* engineered by using the transposon Tn917 and protoplast fusion. *Curr Microbiol* 2001 **43** : 112 – 119
- [ 18 ] CHEN Q J( 陈其津 ) , LI G H( 李广宏 ) , LIN Y F( 林扬帆 ) . Rapid statistics and analysis of insecticidal bioassay data by computer. *Supplement to the Journal of Sun Yatsen University* ( 中山大学学报论丛 ) 2000 **21** ( 3 ) : 39 – 43
- [ 19 ] Rice W C. Specific primers for the deletion of *vip3A* insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. *Lett in Appl Microbiol* , 1999 , **28** : 378 – 382
- [ 20 ] Chang L L , Grant R , Aronson A. Regulation of the packaging of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins into inclusions. *Appl Environ Microbiol* 2001 , **67** : 5032 – 5036
- [ 21 ] CAI Q L( 蔡启良 ) , LIU Z D( 刘子铎 ) , SUN M( 孙明 ) *et al.* The analysis of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein gene cloning and expression. *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) 2002 , **18** ( 5 ) : 578 – 582
- [ 22 ] YU S Q( 于思勤 ) . A preliminary study on fauna of Noctuidae( Lepidoptera : Ditrysia ) insects in China. *Etmototaxonomia*( 昆虫分类学报 ) , 1998 , **20** ( 1 ) : 44 – 50

## Screening of *Bacillus thuringiensis* Strains Containing *vip3A* Genes and Analysis of Gene Conservation

CHEN Jian-Wu TANG Li-Xia SONG Shao-Yun YUAN Mei-Jin PANG Yi\*

( State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China )

**Abstract** Vip3A , a novel insecticidal protein , is secreted by *Bacillus thuringiensis* ( Bt ) during vegetative growth. Vip3A protein possesses insecticidal activity against a wild spectrum of lepidopteran insect larvae. Since the first cloning of *vip3A* gene from Bt , many other *vip3A* genes have been isolated. To investigate *vip3A* genes contribution to Bt and reflect the revolution relationships , the strains containing *vip3A* genes were screened and gene similarity was analyzed.

114 wild-type *Bacillus thuringiensis* ( Bt ) strains isolated from different regions and 41 standard Bt strains from the Institute of Pasteur were screened for the *vip3A* genes using PCR amplification. 39 strains including *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ( *Btk* ) HD-1 were found to contain the *vip3A* genes. Because acrySTALLERous strain Cry<sup>-</sup> B derived from *Btk* HD-1 was proved not to contain *vip3A* gene , it suppose that the *vip3A* gene may be located at the plasmids. Vip3A proteins expressed in these strains were detected with polyclonal antibody by Western blot and 4 strains among them were shown not to express the Vip3A proteins. The *vip3A* genes amplified from wild-type *Bacillus thuringiensis* strains S101 and 611 with different levels of activity against lepidopteran insect larvae were cloned into pGEM-T Easy vector. Alignment of these 2 putative Vip3A proteins with 6 others ( Vip3A ( a ) , Vip3A ( b ) , Vip3A-S , Vip3A-S184 , Vip83 and Vip3V ) in the GenBank data base and 2 reported Vip3A proteins ( Vip14 and Vip15 ) showed that *vip3A* genes are highly conservative. The plasmids pOTP-S101 and pOTP-611 were constructed by in-

Received : 01-20-2003

This work was supported by grants from National 973 Project ( No. G20000162209 ) , National 863 Project ( No. 2001AA214011 ) and Natural Science Foundation of Guangdong Province.

\* Corresponding author. Tel 86-20-84113860 ; Fax 86-20-84037472 ; E-mail jls12@zsu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

serting 2 *vip3A* genes ( *vip3A*-S101 and *vip3A*-611 ) into the expression vector pQE30 respectively and were transformed into *E. coli* M15. *E. coli* M15 cells harboring the pOTP plasmids were induced with 1 mmol/L IPTG to express 89 kDa protein. Experiments showed that the level of soluble proteins of Vip3A-S101 in *E. coli* M15 [ pOTP-S101 ] and Vip3A-611 in *E. coli* M15 [ pOTP-611 ] were about 48% and 35% respectively. Bioassay showed that each of these Vip3A proteins had similar toxicity against neonate *Spodoptera litura* larvae, indicating that some amino acids change had little effect on the insecticidal activity of proteins. Although *vip3A* genes are conservative, the unknown insecticidal spectrum is still to be brought out. *Vip3A* genes can be used for the construction of the Bt engineered strains and transgenic plants. In addition, *vip3A* genes are excellent candidates for delay of the pest resistance due to the difference of the action model from that of Bt  $\delta$ -endotoxins.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*, *vip3A* gene, gene conservation, insecticidal activity