

cry4Aa、*cry4Ba* 和 *cry11Aa* 基因在苏云金杆菌 无晶体型菌株中的表达*

孙 钊^{1,2} 袁志明^{1,2**} 李田勇¹ 蔡全信¹ 张用梅¹

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)¹ (中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)²

摘要: 利用穿梭载体 pBU4, 将苏云金杆菌以色列亚种 (Bti) 的 *cry4Aa*、*cry4Ba* 和 *cry11Aa* 基因分别转入 Bti 无晶型突变株 4Q7 中, 获得了转化菌株 Bt-B601、Bt-B611 和 Bt-B640。SDS-PAGE 结果显示: Cry4Aa、Cry4Ba 和 Cry11Aa 蛋白均分别获得了表达。透射电镜下观察, 转化菌株能产生球形或菱形伴胞晶体。转化菌株对敏感和抗性致倦库蚊及白纹伊蚊幼虫的生物测定结果显示: Cry4Aa、Cry4Ba 和 Cry11Aa 蛋白对库蚊和伊蚊的毒力较低, 二元毒素抗性库蚊幼虫对 Bti 杀蚊毒素蛋白无明显的交叉抗性。

关键词: 苏云金杆菌以色列亚种, 球形芽孢杆菌, 毒素基因表达, 交叉抗性

中图分类号: Q939.124 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 05-0061-04

EXPRESSION OF *cry4Aa*, *cry4Ba* AND *cry11Aa* IN CRYSTAL-MINUS *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENSIS*

SUN Fan^[1,2] YUAN Zhi-Ming^[1,2] LI Tian-Yong¹ CAI Quan-Xin¹ ZHANG Yong-Mei¹

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

(State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275)²

Abstract: Recombinant plasmids pBU601, pBU611 and pBU640 were constructed by the cloning of *cry4Aa*, *cry4Ba* and *cry11Aa* gene independently on a shuttle vector pBU4, and then transferred into crystal-minus *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) 4Q7. The resulting Bti recombinant strains, named Bt-B601, Bt-B611 and Bt-B640 respectively, expressed the Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa proteins in high level and produced spherical or rhombus crystalline inclusions during their sporulation. It was proved that the individual Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa toxin had only low toxicity against susceptible and resistant *Culex quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* larvae and that the *B. sphaericus*-resistance *C. quinquefasciatus* colony had no cross-resistance to the individual toxin from Bti.

Key Words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, *Bacillus sphaericus*, Toxin gene expression, Cross-resistance

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*, 简称 Bs) 和苏云金芽孢杆菌以色列亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 Bti) 是目前应用最广泛, 也是最成功的两种杀蚊微生物。Bti 的伴胞晶体主要是由 *cry4Aa*、*cry4Ba*、*cry11Aa* 和 *cry1Aa* 基因所编码的 128、134、72 和 28kD 蛋白多肽组成, Bs 的伴胞晶体是由二元毒素蛋白基因编码的 42-和 51kD

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770170)

Project Granted by Chinese National Nature Science Fund (No. 39770170)

** 通讯作者

收稿日期: 2000-04-01, 修回日期: 2000-12-24

蛋白多肽构成的^[1]。实验室筛选和野外应用证明，在连续的高选择压力下蚊虫对Bs会产生很高的抗性，而对Bti却不产生抗性或产生的抗性水平很低，同时还证明对Bs产生抗性的致倦库蚊对Bti野生株不产生交叉抗性^[2-3]。但二元毒素抗性蚊虫是否对单一Bti杀蚊毒素蛋白产生交叉抗性还未见报道。本研究在Bti无晶体突变株4Q-7中分别表达了cry4Aa、cry4Ba和cry11Aa基因，考察了各重组菌株毒素蛋白的合成和伴胞晶体的形成，同时用敏感和对二元毒素高抗性的致倦库蚊（*Culex quinquefasciatus*）幼虫对重组菌株的全发酵液进行了生物测定，研究了不同毒素蛋白对目标蚊幼虫的毒力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株：*E. coli* DH5a (recA-, F-, endA1, gyr96, thi⁻ hsdR17, sup44 relA1)、Bti 1897野生株(H14)、Bti 4Q-7(无晶体突变株)均由本研究室保藏；Bt-CW-3(含二元毒素基因的Bti 4Q7转化菌株)由本室袁志明构建^[4]。

1.1.2 质粒：pBU4(穿梭载体, Amp^r Tet^r in *E. coli*, Tet^r in *Bacillus*)，pHT601(Erm^r, 含cry4Aa基因)，pHT611(Erm^r, 含cry4Ba基因)，pHT640(Erm^r, 含cry11Aa基因)由法国巴斯德研究所惠赠。

1.1.3 供试蚊虫：敏感致倦库蚊是本实验室连续饲养3年，对球形芽孢杆菌二元毒素敏感的品系；抗性致倦库蚊是本实验室用高浓度的球形芽孢杆菌C3-41粉剂连续筛选18代所获得的抗性品系，其对C3-41菌株的抗性为144,000倍。致倦库蚊蚊虫品系按常规方法饲养^[2]，3~4龄幼虫用于生物测定。3~4龄白纹伊蚊(*Aedes albopitus*)幼虫采集于野外蚊幼虫孳生地。

1.1.4 培养基：LB培养基用于Bti1897和Bti重组菌株的发酵。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建：分别从质粒pHT601、pHT611和pHT640上以限制酶切的方法获得含cry4Aa、cry4Ba和cry11Aa基因的片段，连接到穿梭载体pBU4上，得到重组质粒pBU601、pBU611和pBU640。各重组质粒的图谱见图1。质粒的提取、酶切、连接、转化参照文献[5]。

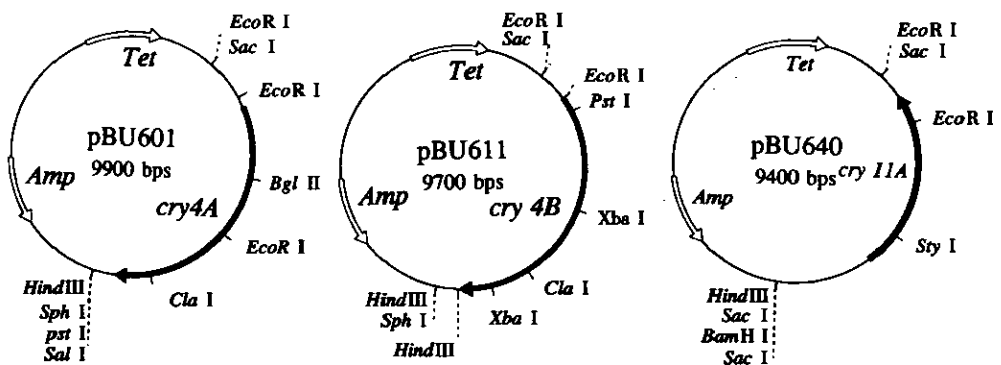


图1 重组质粒图谱

1.2.2 苏云金芽孢杆菌的电转化：按参考文献[6]方法进行。电激条件为：电压1.5~

2.5kV, 电阻为 200~800 Ω , 电容为 25 μ F。

1.2.3 Bt 转化菌株的鉴定: 提取转化菌株的质粒并转化大肠杆菌, 对所得的转化子进行限制酶切分析和鉴定。

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按文献 [5] 中阳性克隆子蛋白检测方法进行。

1.2.5 透射投影电镜观察: 将孢晶混合物悬液滴于铜网上, 干燥后喷碳, 置 HITACHI H7000FA 型透射电子显微镜下观察。

1.2.6 生物测定: 参照 WHO 提供的标准生物测定方法进行^[7]。记录 24h 死亡蚊幼虫数, 通过 Log-Probbit 分析确定不同重组和野生型 Bti 菌株的全发酵液对不同蚊幼虫的 50% 和 90% 致死浓度 (LC₅₀ 和 LC₉₀)。

2 结果

2.1 转化菌株的获得

通过电转化将含有 *cry4Aa*、*cry4Ba* 和 *cry11Aa* 基因的重组质粒 pBU601、pBU611 和 pBU640 分别转入 Bti 无晶体型 4Q-7 中, 获得转化菌株 Bt-B601、Bt-B611 和 Bt-B640。

2.2 转化菌株表达产物的分析

通过 SDS-PAGE 对 3 个转化菌株的表达产物进行了分析, 结果表明, Bt-B601、Bt-B611 和 Bt-B640 菌株分别表达了 134kD、128kD 和 72kD 蛋白 (见图 2)。

2.3 转化菌株伴胞晶体的显微结构

透射电子显微镜观察表明, 表达 *Cry4Ba* 蛋白的 Bt-B611 菌株形成的伴胞晶体为球形, 表达 *Cry4Aa* 和 *Cry11Aa* 蛋白的 Bt-B601 和 Bt-B640 菌株形成的伴胞晶体均为菱形, 但彼此形态有差异 (见图 3)。

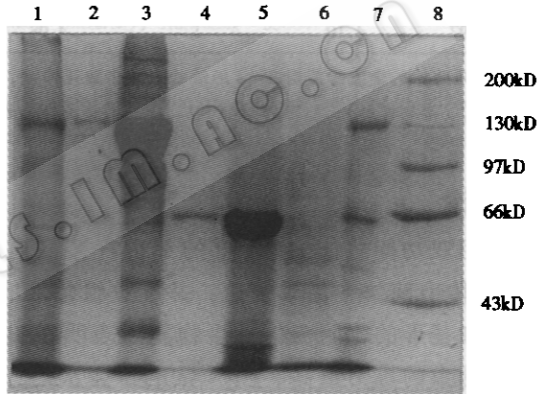


图 2 苏云金芽胞杆菌转化菌株的 SDS-PAGE 电泳图

1 Bt-B601 菌株 (*Cry4Aa*), 2, 3 Bt-B611 菌株 (*Cry4Ba*), 4, 5 Bt-B640 菌株 (*Cry11Aa*), 6 Bti 无晶体型, 7 Bti 野生株, 8 分子量蛋白标准

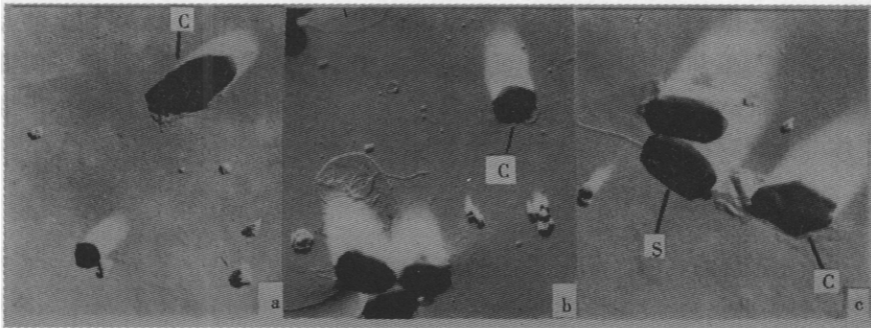


图 3 转化菌株伴胞晶体的透射电镜图谱

a Bt-B601 菌株 (含 *Cry4Aa* 蛋白), b Bt-B611 菌株 (含 *Cry4Ba* 蛋白), c Bt-B640 菌株 (含 *Cry11Aa* 蛋白, 照片内: S 芽胞, C 晶体, 放大倍数: a(8000 \times), b(6000 \times), c(8000 \times)

2.4 转化菌株的杀蚊活性

生测结果表明: Bti 野生株对敏感和抗性致倦库蚊及白纹伊蚊具有较高的毒力, 其

LC₅₀值分别为4.10、4.98和3.26 μg/mL, 而表达单一毒素蛋白 Bt-B601、Bt-B611和 Bt-B640 菌株对目标蚊虫的毒力比较低, 对敏感蚊致倦库蚊幼虫的 LC₅₀分别为636.0、10,000和156.6 μg/mL; 对抗性蚊幼虫的 LC₅₀则分别为1146、10,000和603.1 μg/mL; 对白纹伊蚊的 LC₅₀分别为5670.9、134.7和1907.0 μg/mL(见表1)。对二元毒素产生144,000倍抗性的致倦库蚊幼虫对单一的 Cry4Aa、Cry4Ba和Cry11Aa不产生明显的交叉抗性。

表1 苏云金芽孢杆菌转化菌株对几种蚊幼虫的毒力

菌株	敏感致倦库蚊		抗性致倦库蚊		白纹伊蚊	
	LC ₅₀ (μg/mL) ^a	毒力指数 Ratio ^b	LC ₅₀ (μg/mL) ^a	毒力指数 Ratio ^b	LC ₅₀ (μg/mL) ^a	毒力指数 Ratio ^b
Bt-B601	636.0	0.0064	1146.0	0.0043	5670.9	0.0006
Bt-B611	>10,000	<0.0004	>10,000	<0.00041	134.7	0.024
Bt-B640	156.6	0.026	603.1	0.0083	1907.0	0.0017
Bt-CW-3	0.463	8.9	>10,000	<0.0005	- ^c	- ^c
Bti 1897	4.10	1	4.98	1	3.26	1

注: a 不同菌株的全发酵液对3~4龄蚊幼虫的半致死浓度, 以μg全发酵液/mL处理液表示, b 毒力指数=LC₅₀(Bti)/LC₅₀(待测样品), 如毒力指数>1, 则表明待测样品毒力高于Bti, 如毒力指数<1, 则表明待测样品毒力低于Bti, c “-”无毒

3 讨论

利用双功能载体 pBU4 上的芽孢杆菌的启动子可使 Cry4Aa、Cry4Ba 和 Cry11Aa 在 Bti 无晶体型菌株中高效表达, 并在重组菌株的芽孢形成过程中形成位于芽孢胞外膜外的球形和菱形的伴胞晶体。生物测定表明在 Bti 的几个毒素蛋白组分中, Cry11Aa 对敏感库蚊幼虫的毒力最高, Cry4Aa 的毒力次之, Cry4Ba 基本上是无毒的; Cry4Ba 的对伊蚊毒力最高, Cry11Aa 的毒力次之, Cry4Aa 的毒力最低。同野生型菌株中存在的4种主要毒素蛋白对蚊虫的协同毒杀作用相比, 单一的毒素蛋白对几种目标蚊虫的毒力很低, 毒力水平只相当于野生菌株0.0004~0.026倍。本实验用于生物测定的抗性致倦库蚊对球形芽孢杆菌二元毒素具有高水平抗性(>100,000倍), 而Cry4Aa和Cry11Aa对抗性和敏感蚊虫的LC₅₀值却在同一水平, 证明二元毒素抗性致倦库蚊对Bti单一的毒素蛋白无明显的交叉抗性。这可能同Bti各毒素成分与Bs二元毒素在蛋白结构作用方式, 毒素蛋白受体等方面存在的差异相关^[2,10]。

参考文献

- [1] Charles J F, Nielsen-Leroux C, Delecluse A. *Ann Rev Entomol*, 1996, 41: 451~472.
- [2] Yuan Z M, Zhang Y M, Liu E Y, *et al*. *Bioccontrol Sci. Technol*, 2000, 10: 43~51.
- [3] Georgioui G P, Wirth M C. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 1095~1101.
- [4] 袁志明, Nielsen-LeRoux C, Pasteur N, 等. *微生物学报*, 1999, 39: 29~35.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 金冬雁等译. *分子克隆实验指南(第二版)*. 北京: 科学出版社, 1992.
- [6] Li T R, Sun F, Yuan Z M, *et al*. *Curr Microbiol*, 2000, 40: 322~326.
- [7] WHO. TDR/BCV/SPHAERICUS. 85. 3, 1985. 1~24.
- [8] Nieleen-LeRoux C, Pasquier F, Charles J F, *et al*. *J Med Entomol*, 1997, 34: 321~327.