

# 转化 *cryIC* 基因对苏云金芽胞杆菌杀虫活性的影响

乐超银<sup>1,2</sup> 鲁松清<sup>1</sup> 刘子铎<sup>1</sup> 喻子牛<sup>1\*</sup>

(华中农业大学微生物农药国家工程研究中心, 微生物农业部重点实验室 武汉 430070)<sup>1</sup>

(三峡大学化学和生命科学学院 宜昌 443003)<sup>2</sup>

**摘要:** 将含基因 *cryIC* 的质粒, 通过电脉冲法转入含基因 *CryIC* 的质粒, 通过电脉冲法转入含基因 *CryIAb*、*CryIAc* 和 *cry2* 的对小菜蛾具有高毒力的苏云金芽胞杆菌野生菌株 YBT-803-1 中, 得到转化子 BMBY-003。PCR 和 SDS-PAGE 分析显示, *CryIC* 可在其中正常复制、表达, 但使受体菌部分内源质粒发生丢失。生物测定结果表明, 转化子 BMBY-003 既对甜菜夜蛾有毒力,  $LC_{50}$  值为  $1.178\mu\text{L/mL}$ , 高于出发菌株 YBT-803-1 ( $LC_{50} 1.879\mu\text{L/mL}$ ), 也对小菜蛾有毒力,  $LC_{50}$  值为  $1.968\mu\text{L/mL}$ , 低于 YBT-803-1 ( $LC_{50} 1.143\mu\text{L/mL}$ )。表明 *cryIC* 转入后, 提高了野生菌株 YBT-803-1 对甜菜夜蛾的毒力, 却降低了对小菜蛾的毒力。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌, 杀虫晶体蛋白基因 *cryIC*, 野生受体菌, 甜菜夜蛾, 小菜蛾

中图分类号: S476.11 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2002) 03-0017-04

## EFFECTS OF ICP GENE *cryIC* ON INSECTICIDAL CHARACTERIZATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* WILD-TYPE STRAIN

YUE Chao-Yin<sup>1,2</sup> LU Song-Qing<sup>2</sup> LIU Zi-Duo<sup>2</sup> WU Lan<sup>2</sup> YU Zi-Niu<sup>2</sup>

(National Engineering Research Center of Microbe Pesticides, Wuhan 430070)<sup>1</sup>

(College of Chemistry and Life Science, Three Gorges University, Yichang 443003)<sup>2</sup>

**Abstract:** The *cryIC* gene which is highly toxic to *Spodoptera exigua* was transformed by electroporation into *Bacillus thuringiensis* wild-type strain YBT-803-1. The transformant BMBY-003 was obtained. The plasmid profile of transformant showed that three plasmids were lost. SDS-PAGE analysis demonstrated that *cryIC* could express in BMBY-003. But the production of *cryIAc* was reduced. The result of bioassay showed BMBY-003 was not only toxic to *Spodoptera exigua* larva ( $LC_{50} 1.178\mu\text{L/mL}$ ) which was higher than that of YBT-803-1 ( $LC_{50} 1.879\mu\text{L/mL}$ ), but also toxic to *Plutella xylostella* ( $LC_{50} 1.968\mu\text{L/mL}$ ), lower than that of YBT-803-1 ( $LC_{50} 1.143\mu\text{L/mL}$ ).

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, Gene *cryIC*, Wild-type recipient, *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*

苏云金芽胞杆菌 (Bt) 是对昆虫有毒性的一类革兰氏阳性杆状细菌, 在形成芽胞的过程中也形成伴胞晶体, 分别对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等 8 个目、线形动物门的部分寄生线虫以及扁形动物门的吸虫类具有杀虫活性<sup>[1]</sup>。然而, 对于某一种天然菌株而言, 其杀虫谱往往局限于某一目中的几个种, 如研究较为深入的 *cryI* 类基因, 它编码 130kD 的杀虫晶体蛋白, 主要对鳞翅目有毒, 其中 *cryIC* 基因编码 134kD 的晶体蛋白对双翅目和鳞翅目均有毒力, 也是迄今发现在苏云金芽胞杆菌中, 对鳞翅目夜蛾科中贪夜蛾属昆虫最有活性的蛋白<sup>[2]</sup>。有研究表明, 将 *cryIAb* 和 *cryIC* 的毒性片段相连形成复合杀虫晶体蛋白, 它具有两种天然毒素的杀虫活性, 并且这两种毒素的表达水平是相同的<sup>[3]</sup>。为进一步提高杀虫毒力, 扩大杀虫谱, 本文将 *cryIC* 基因通过电脉冲法转化到一株对小菜蛾高毒力的天然菌株中, 并测其杀虫活性的变化, 为进一步构建高毒力、

\* 通讯作者: E-mail: YZ41@public.wh.hb.cn

收稿日期: 2001-02-21; 修回日期: 2001-05-11

广谱工程菌打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

供体质粒: pBMBLC, 含 *cryIC* 基因, 携带 Ap 抗性 (在 *E. coli* 中) 和 Em 抗性 (在 *Bt* 中), 由华中农业大学农业部农业微生物重点实验室鲁松清博士提供。

受体菌: 苏云金芽胞杆菌野生菌株 YBT-803-1, 由华中农业大学农业部农业微生物重点实验室, 苏云金芽胞杆菌分子生物学研究室提供。

标准菌株: 苏云金芽胞杆菌 HD-2, 由华中农业大学农业部农业微生物重点实验室, 苏云金芽胞杆菌分子生物学研究室提供。

### 1.2 培养基

LB 和 LA 培养基, 筛选转化子时使用红霉素的终浓度为 25 $\mu$ g/mL。

### 1.3 电转化

参照 Schurter 的方法<sup>[4]</sup>, 转化条件: 电压 6.25kV/cm, 电阻 200 $\Omega$ , 电容 25 $\mu$ F, 电击 1 次。电脉冲仪为 Bio-Rad 公司产品, 型号为 165-2075。

### 1.4 质粒抽提

参照文献 [5] 进行。

### 1.5 PCR 鉴定

*CryIAb* 特异引物序列: 5'-TCGATTGATTTGTTCGGCAGAAGTA  
3'-GAATTGCTTTCATAGGCTCCGTC

*CryIAc* 特异引物序列: 5'-TCACTTCCCATCGACATCTIACC  
3'-ATCACTGAGTCGGCTTCGCATGTTGACTTTCTC

*Cry2* 特异引物序列: 5'-ATAGGCCCGTGCTCCACCAGG  
3'-CAGATACCCCTTGCTCGTGTA

*CryIC* 特异引物序列: 5'-CCTTATAGCAGCTCGTAAC  
3'-GGTGTTCAGATCTTTGAAC

扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 1min, 53 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 25~30 个循环。

### 1.6 SDS-PAGE 分析

参照文献 [5] 方法。

### 1.7 生物测定

参照文献 [6, 7] 方法, 用甜菜夜蛾 (*Spodotera exigua*) 初孵幼虫和小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 三龄幼虫进行生物测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因 *cryIC* 电转化野生受体菌株 YBT-803-1

从大肠杆菌中抽提纯化含 *cryIC* 基因的质粒 pBMBLC, 电转化野生型受体菌 YBT-803-1, 然后用红霉素抗性平板筛选, 获得转化子 BMBY-003, 对转化子进行质粒抽提, 电泳分析, 结果见图 1。

从图 1 中可看出, 转化子 BMBY-003 与受体菌 YBT-803-1 相比较, 少了 47kb、9.5kb 和 4.3kb 的带, 而多了一条 8.1kb 供体质粒带, 表明质粒 pBMBLC 已被转入受体中, 并且能正常复制, 但质粒带较弱, 可能是拷贝数较低。而质粒本身的不稳定性以及质粒间的不相容性, 可能是导致部分质粒丢失的原因。

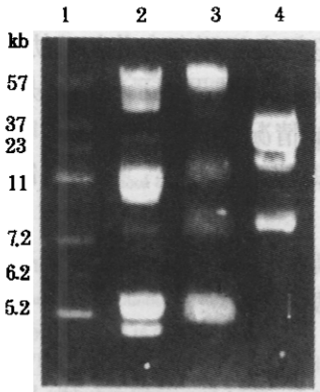


图1 苏云金芽胞杆菌受体菌株 YBT-803-1 和转化子 BMBY-003 的质粒带谱

1 HD-2, 2 YBT-803-1,  
3 BMBY-003, 4 pBMBLC

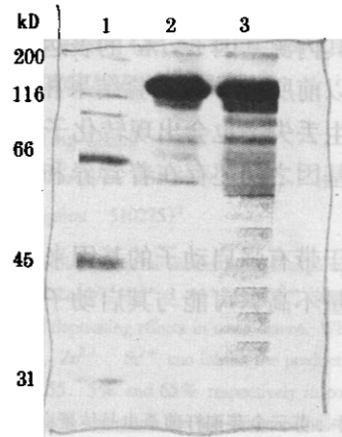


图2 受体菌 YBT-803-1 与转化子 BMBY-003 杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

1 蛋白质标准, 2 YBT-803-1 晶体蛋白,  
3 BMBY-003 晶体蛋白

## 2.2 转化子基因型的鉴定

PCR 分析结果显示, 转化子 BMBY-003 含基因 *cryIAb* (238bp)、*cryIAc* (487bp) 和 *cryIC* (333bp), 但不含基因 *cry2* (1070bp), 说明基因 *cryIC* 转入受体菌后导致带有基因 *cryIAb* 和 *cry2* 的质粒丢失。

## 2.3 基因 *cryIC* 在 YBT-803-1 中的表达及转化子的杀虫活性

对转化子 BMBY-003 表达产物进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示 (图 2), BMBY-003 与受体菌一样, 也可大量表达 133kD 的蛋白。生测结果表明 (表 1) BMBY-003 对甜菜夜蛾具有一定毒力, 其  $LC_{50}$  值为  $1.178\mu\text{L/mL}$ , 高于受体菌 YBT-803-1 (其  $LC_{50}$  值为  $1.879\mu\text{L/mL}$ ), 对小菜蛾也有毒力,  $LC_{50}$  值为  $1.968\mu\text{L/mL}$ , 低于 YBT-803-1 (其  $LC_{50}$  值为  $1.143\mu\text{L/mL}$ )。

表 1 受体菌 YBT-803-1 和转化子 BMBY-003 的毒力

昆虫	菌株	毒力回归方程	相关系数	$LC_{50}$ ( $\mu\text{m/mL}$ )
小菜蛾	YBT-803-1	$Y = 0.771 + 1.355x$	0.97	1.143
	BMBY-003	$Y = -4.989 + 3.765x$	0.98	1.968
甜菜夜蛾	YBT-803-1	$Y = -2.795 + 2.516x$	0.96	1.879
	BMBY-003	$Y = 3.431 + 0.512x$	0.99	1.178

## 3 讨论

从本研究结果看, 通过电转化的方法将含 *cryIC* 基因的质粒导入含 *cryIAb*、*cryIAc* 和 *cry2* 的野生型菌株后, 可使转化子表现出对甜菜夜蛾的毒力比出发菌株有所提高, 但效果并不十分理想, 而对小菜蛾的毒力亦有所下降。可见, 外源基因进入野生型受体后, 其表达活性是由多方面因素决定的, 如基因间的相互作用, 基因本身的启动子强弱等。

质粒间的不相容性, 使得外源质粒进入受体后, 导致内源质粒所携带基因丢失,

这在以前类似试验中也常有发生<sup>[8]</sup>。转化子 BMBY-003 丢失了含基因 *cry1Ab* 和 *cry2* 的质粒后, 其内源基因 *cry1Ac* 的表达减弱, 可能反映出它们之间原存在着相互协同的关系, 这也与以前所报导的实验结果相类似<sup>[9]</sup>, 当然, 也有实验结果显示, 即使是内源质粒没有发生丢失, 也会出现转化子内源基因表达减弱的情况<sup>[10]</sup>。这也可能说明外源基因与内源基因之间还存在着营养和能量的竞争关系, 即使可以共存, 也相互制约彼此的表达。

对于带有强启动子的基因来说其表达量往往较高<sup>[11]</sup>, *cry1C* 基因之所以在受体菌中的表达量不高, 可能与其启动子较弱或质粒的拷贝数较低有关。

### 参 考 文 献

- [1] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白及其基因的研究及利用. 见: 李章棣等主编. 生命科学和土壤学中几个领域的研究进展. 北京: 农业出版社, 1993, 170~179.
- [2] Whiteley H R, Schnepf H E. Ann Rev Microbiol, 1986, 40: 549~576.
- [3] Sanchis V, Agraisse H, Chaufaux F, et al. J Biotechnol, 1996, 48: 81~96.
- [4] Schurter W, Geiser M, Malhe D. Mol Gen Genet, 1989, 218: 171~181.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] 曾晓慧, 胡 萃, 喻子牛, 等. 中国生物防治, 1998, 14 (4): 172~175.
- [7] 沈鞠群, 王锦举, 喻子牛, 等. 生物防治通报 (增刊), 1990, 12~16.
- [8] Sue K, Kristine L. Appl Environ Microbiol. 1995, 61 (8): 3063~3068.
- [9] Schnepf H E, Crickmore N, Rie J V, et al. Microbiol Mol Biol Rev. 1998, 62: 775~806.
- [10] 鲁松清, 刘子铎, 喻子牛. 生物工程学报, 2000, 16 (4): 56~59.
- [11] 乐超银, 刘子铎, 喻子牛, 等. 微生物学报, 2000, 40 (2): 139~143.