

苏芸金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白 cry 基因研究的现状

曾 林 任改新

(南开大学微生物学系 天津 300071)

1 Bt 种系 cry 基因的多样性

苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 简称 Bt) 是一种能在芽孢形成期间产生多种蛋白晶体的革兰氏阳性菌。它最早在日本发现于家蚕的猝倒病^[1], 1915年 Berliner 再次发现并定名, 并于 1938 年在法国首次成为商品^[2]。它的毒素对包括大量农林及卫生害虫在内的无脊椎动物的 4 个门和节肢动物门中 9 个目的生物有毒杀活性^[3]。截止 1994 年, 已发现它的 45 个血清型、58 个亚种^[4], 1996 年达到 55 个血清型^[5] (法国巴斯德所 *Bacillus* 保藏中心资料)。出于众所周知的应用方面的价值, 人们更关心的是 Bt 的杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins 简称 ICPs) 及编码这些毒蛋白的 cry 基因。1981 年 Schnepf 和 Whiteley 克隆了第一个 cry 基因^[6], 到 1989 年人们共发现了 42 个基因, 按照它们的氨基酸顺序相似性及杀虫活性归为 13 个小组^[7], 到 1992 年为 29 个小组^[8]。根据最新的信息^[9], 已发现 cry 基因 121 个。随着新 cry 基因的不断发现, 在氨基酸顺序相似性和杀虫谱之间出现了越来越多的不符合。1995 年 SIP (无脊椎病理学会) Bt cry 基因命名委员会单独地依据 Cry 蛋白的氨基酸顺序关联性将 96 个 cry 基因分成了 17 个大组。这是 cry 基因分类学上的一次变革, 目的是为了适应不断增多的 cry 基因种类的需要。

本文是继 1996 年综述^[10]的进一步论述。

2 有关 cry 基因工程的最新进展

Bt cry 基因工程研究是该领域的一个热点^[10]。下面对国内外该领域的最新研究方法及现状作一个粗略的介绍。

鸟枪法, 即通过对随机 DNA 片断的克隆和筛选, 获得目的基因克隆的方法。1995 年 B. T. Koo 等以 PCR 产物作探针进行了新基因 cry1k 的克隆^[11]。

基因定位, 转化 / 结合, 这是构建 Bt 工程菌株的经典方法。大多数 cry 基因位于 Bt 丰富的质粒谱上, 准确定位、消除多余 / 不相容的质粒、转化 / 结合, 这是最接近于 Bt 自然界中 cry 基因转移的模式。商业上不乏成

功的例子, 目前已有多种产品问世, 包括 Crymax[®]、MVP[®]、MVPII[®] 和 Foil[®] 等。

更为精确有力的基因工程手段: (1) *In vivo* 基因重组: 许多 Bt cry 基因都位于大的可转移质粒上, 有的与转座子或插入序列 (IS) 组合在一起。1992 年 Lereclus^[12] 等将 cry3A 基因克隆入一个插入序列片断 (IS232) 并插入到一个热敏质粒上。该质粒转化目的菌株, 并在限制温度下筛选已插入天然质粒的克隆 (通过插入序列间的同源重组), 再经过一次重组 (IS232 内部), 载体被切除, 导入的基因得到稳定保存。在自然状态下, Bt 内部的基因之间或它们与新转移进基因之间由于存在同源性也常发生重组, 这就是 Bt cry 基因复杂多样性的来源之一。(2) cry 基因整合入染色体: 虽然天然的 cry 基因大多定位于质粒上, 但由质粒导入的 cry 基因往往不能在 Bt 中稳定保存, 其主要原因是同源重组及质粒的不稳定性。1995 年 Kalman 等人^[13] 建立了一套两步整合克隆基因入 Bt 染色体的方法。目的基因是 cry1C, 目的宿主是 HD-1。为减小 cry1C 基因与同源基因间的重组, 先用一个含有 Bt 磷脂酶 C 基因的整合载体将 cry1C 导入只含有 cry1Ac 基因的 HD-73 中, 磷脂酶 C 基因片断间的同源重组使 cry1C 整合入 HD-73 的染色体; 第二步采用普遍转导法 (phage CP-51) 将 cry1C 从 HD-73 转入 HD-1, 在后者中再整合, 最终获得 cry1C 高表达。宿主的生长特性、原有 cry 基因的表达并没受到影响, 而具有了 Cry1C 对于甜菜夜蛾 (*Spodoptera. exigua*) 的特异高效毒力, 且表达十分稳定。在 1996 年的西班牙国际会上 Poncet 等报道, 利用类似的方法将 *Bt. subsp. israelensis* (Bti) 含 cryIVD 基因的操纵子整合入球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*, 简称 Bs), 整合子积累了更多的蛋白晶体, 并获得了 Bti 的对 *Aedes aegypti* 幼虫的毒杀活性。他们还构建了新的整合质粒, 用于将不同组合的 Bti 基因

整合入Bs。(3)结构域交换(Domain Swapping):大部分ICPs包括一个无毒的C端和一个以毒性多肽形式释放的N端核心。Cry蛋白的一级结构中有广泛存在的5个高保守区,它们都位于原毒素毒性核心部分(N端),而Cry蛋白三级结构也存在一致性。这暗示了一种毒杀作用的类似机理的存在。为此人们提出并初步证实了一些假设^[30,31],现在可以说, δ -内毒素由三个结构域(Domain I, Domain II, Domain III)组成,其中Domain II负责与昆虫中肠上皮细胞刷状缘膜(Brush Border Membrane, BBM)上的受体结合,Domain I则在随后的穿膜及离子通道形成中起作用,而Domain III可能调节通道的活动。一个完整通道的形成有时可能包括不止一个毒素分子的作用,也可能仅仅是毒素分子诱导受体构型改变而形成离子通道。一些重要的阳离子(Na^+ , K^+ 等)经该通道而渗漏,导致昆虫中肠穿孔、pH和渗透压失调,最终麻痹死亡。1994年Knight等在烟草天蛾(*Manduca sexta*)中克隆了毒蛋白CryIAc的受体^[2],它是一个120ku的糖蛋白(氨基酶N, APN)。1996年Adang等人的工作^[14]显示CryIAc也与*M. sexta*中肠BBM上的特殊脂类受体结合,其特异性由脂类上的糖基决定。

尽管具体杀虫分子机制尚待进一步研究,但人们可以假设,不同毒素结构域可能适应于不同的特异昆虫,这启发人们将不同的结构域编码区进行替换,可能得到对特异昆虫具有高毒力的新蛋白。1996年Dirk等^[15]将CryIE的Domain III用CryIC的相同成分进行替换,得到了对*S. exigua*的高毒的CryIE',而CryIE本来是对*S. exigua*没有毒力的。他们还得到由CryIAb的I、II结构域和CryIC的结构域III构成的杂合蛋白,它对*S. exigua*的毒性比前者(CryIE + CryIC)更高。具体操作是将两个亲本基因置入一个质粒并在*E. coli*中增殖,同源重组导致多个具有不同交叉点的杂交基因的产生,再经筛选得到目的基因。早在1990年Guy^[16]报道将Bt的两个不同基因(cryIAb和cryIC)的5'活性端融合表达,产生的杂交蛋白同时具有与两个亲本蛋白近似水平的杀虫活性。这样的融合基因转入别的生物,抗虫品质将大大提高。正是对ICPs杀虫机理的研究和大量cry基因的发现使ICPs蛋白质工程成为可能,这显示了Bt基础研究的重要意义。(4) cry基因在Spo⁻Bt中的表达^[17]: cry基因大致分为两类,一类基因(如cry3A)的表达不依赖于芽孢的形成,另一大类基因由于其RNA合成酶的 σ 因子由产孢机制

调控而只能在芽孢形成期表达。如cry1A亚类依赖芽孢的形成,仅在母细胞部分表达,它有两个重叠的启动子(BtI, BtII),BtI在对数期后2到6h,由 σ^{25} 识别;BtII在对数期后5h开始活动,由 σ^{26} 识别。不依赖于芽孢形成的cry3A基因,它的启动子与*B. subtilis*营养期的 σ 因子(σ^A)识别的序列相似,可能它是在细胞由对数期转入稳定期的时候被激活,并且有实验显示在产孢期有一种关闭cry3A表达的机制存在^[18]。1996年西班牙国际会上,Poncet等指出,Bti的四个cry基因(cryIVA, cryIVB, cryIVD, cytA)在稳定期有微弱的表达,这种表达不依赖于芽孢的形成并在细胞进入产孢期时关闭,起作用的 σ 因子与*B. subtilis*的 σ^H 同源;进入产孢中期后这四个基因由新的 σ^{25} 因子控制^[28]。这种类型介于前两大类基因之间。

在Spo⁻Bt中用不在产孢期活动的cry3A基因的启动子表达原本在产孢期表达的基因cry1C,1996年Sanchis等人获得了不产芽孢只产Cry1C晶体的菌株^[17]。它的芽孢囊不破裂,可延长毒素的作用时效^[27],另外这种cry3A-cry1C基因由于其表达调控系统不同于一般产孢期基因,当它置入一般Bt中时,可避免与天然cry基因的冲突。(5) cry基因转入别的生物:从1996年开始,美国市场上出现大量的转cry基因的农作物品牌^[20](如NEWLeaf[®] Potatoes, Bollgard[®] Cotton (Monsanto 1996); Bt Corn (Ciba Seeds / Mycogen),并有明显的增产作用。但是转基因植物的Cry蛋白种类有限及长时间对害虫形成的选择压力都易于诱导抗性产生,这可能导致大量Bt杀虫剂的失效及化学杀虫剂使用的增加。1995年,Martens等人^[19]将cry基因转入Baculovirus(杆状病毒,也作为一种生物杀虫剂),试图提高该病毒的杀虫性能,这为开发新的杀虫剂提供了新的思路。

cry基因工程的终极目标是建造一个具有多种希望活性且高毒的单一 δ -内毒素基因,且能针对抗性的产生对该基因进行特异性的改造或调控^[21]。

VIPs (Vegetative insecticidal proteins)代表一组新发现的杀虫蛋白,它们是Bt营养期表达的分泌型外毒素^[22,23],对谷物的几种主要害虫具有很强的毒杀力,并且它的表达不与cry基因冲突。1996年Kostichka等首次报道了在稳定期早期表达的Bt cryV型基因^[23],有证据显示它编码的是一种分泌型蛋白,该蛋白存在一个作为信号肽的N端区域,在分泌过程中被切除而形成成熟的60ku蛋白。除此以外其他的cryV基因通常在Bt中处于静默状态(缺少启动子)。1996年泰国国际会

议上 Kostichka 等就 VIPs 的鉴定、类别、纯化以及编码区的克隆等作了报告^[22]。据报道, Ciba-Geigy 公司已将 VIPs 列入 1997 年的发展对象。

其他毒素, 包括溶细胞毒素 (Cytolytic crystal protein 简称 Cyt), 溶血素和肠毒素等。

Cyt 蛋白 (27~28kDa) 能直接插入昆虫中肠细胞微绒毛膜上的不饱和脂肪酸, 而后溶解细胞, 它除具有抗双翅目昆虫活性外, 还显示出对不同的无脊椎动物及脊椎动物的溶细胞活性, 它与 Cry 蛋白家族在结构上无任何相关性。1995 年 Poncet^[25] 报道, Bt 中 CryIVA、CryIVB、CryIVD 三种毒肽及其混合物的毒性都不及野生型内溶体的毒力高, 这暗示了其他活性成分 (CytA) 的作用。1996 年 Federici 报告了 Cyt 蛋白在延缓或克服对 Cry 蛋白的抗性中的明显作用^[24]。由于在 Bt 的大量使用中害虫已经表现出明显的抗性, 人们正着力寻求克服的有效办法, Cyt 显示了它诱人的应用前景。最近我们研究发现, 溶血素基因 (hblA)、肠毒素基因 (bceT) 在 Bt 中有较广的分布和表达, 它们的存在是否利于 Bt 提高杀虫活力、减缓抗性, 是否对 Bt 使用的安全性构成威胁尚待进一步研究。此外 1996 年 Tantimavanich 等报道^[26] 将几丁质酶基因克隆入 Bta (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai*) 并获得了表达; 菲律宾的 Bt Rice 在表达 cry 基因的同时, 也进行了 cry 基因与几丁质酶基因的组合^[33]。这提示我们, Bt 的杀虫活性是一种由多种毒素协同作用的综合效应, 这为 Bt 的基因工程的发展拓展了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Ishiwata, S., Dainihon Sanshi Kaiho (Rep. Sericult. Assoc. Jpn.) 1905, 160: 1~8.
- [2] Feng T-Y, K-F Chak, R. A. Smith *et al.* *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Environmental Benefits. Taipei: Hua Shiang Yuan Publishing Co., 1995, Vol I.
- [3] 喻子牛, 孙 明, 戴经元等. 中国生物防治, 1996, 12(2): 85~89.
- [4] Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*, International Entomopathogenic Bacillus Center. Institut Pasteur, France. 1994, Catalogue No.1.
- [5] Catalogue of Strains No. 1. International Entomopathogenic Bacillus Centre, W. H. O Collaborating Centre, Institut Pasteur. Paris, FRANCE, 1996.
- [6] Schnepf H. E. and H. R. Whiteley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78: 2893~2897.
- [7] Hofte H. and H. R. Whiteley. Microbiol Rev, 1989, 53: 242~255.
- [8] Feitelson J. S., Payne J. and L. Kim. Bio / Technology, 1992, 10: 271~275.
- [9] Internet <http://www.sussex.ac.uk/Users/bafn6/bt>.
- [10] 李 扬, 任改新. 微生物学通报, 1996, 23(1): 37~43.
- [11] Koo B. T., S. H. Park, S. K. Choi, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 1995, 134: 159~164.
- [12] Lereclus D., M. Vallade, J. Chaufaux, *et al.* Bio / Technology, 1992, 10: 418~421.
- [13] Kalman S., K. L. Kiehnc, N. Cooper, *et al.* Appl. and Environ. Microbiol, 1995, p3063~3068.
- [14] Adang M. J., S. Garczynski, K. Luo, *et al.* in "Program and Abstracts of SIP 29th A. M. & IIIrd IC on Bt". Sept~6, 1996, Cordoba, Espana, p.1.
- [15] Dirk Bosch and R. de Maagd. The II nd Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bt and Its Impact to the Environment, Nov, 4~8, 1996, Chang Mai, Thailand, p. 15~16.
- [16] Guy Honee, W. Vriezen, and B. Visser. Appl. Environ. Microbiol, 1990, p. 823~825.
- [17] Sanchis V., H. Agaisse, J. Chaufaux, *et al.* in "Program and Abstracts of SIP 29th A. M. & IIIrd IC on Bt". Sept~6, 1996, Cordoba, Espana, p.72.
- [18] Agaisse Herve and Didier Lereclus. J. of Bacteriol, Nov, 1995, p. 6027~6032.
- [19] Martens J. W., M. Knoester, F. Weijts, *et al.* J. of Invertebrate Pathol, 1995, 66: 249~257.
- [20] Stone Terry B. The II nd Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bt and Its Impact to the Environment. Nov, 4~8, 1996, Chang Mai, Thailand, p. 98~99.
- [21] Currier T. C. *ibid.*, p. 4~6.
- [22] Kostichka K., G. W. Warren, J. Estruch, *et al.* *ibid.*, p. 7.
- [23] Kostichka K., G. W. Warren, M. Mullins, *et al.* J. of Bacteriol, 1996, p. 2141~2144.

(上接第 51 页)

- [24] Brian A. Federici. The IInd Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bt and Its Impact to the Environment, Nov, 4~8, 1996, Chang Mai, Thailand, p. 20~21.
- [25] Poncet Sandrine, Armelle Delecluse, Andre Klier, *et al.* J. of Invertebrate Pathol, 1995, 66: 131~135.
- [26] Tantimavanich S. The IInd Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bt and Its Impact to the Environment, Nov, 4~8, 1996, Chang Mai, Thailand, p. 19.
- [27] Poncet S., C. Bernard, J. Cayley, *et al.* In "Program and Abstracts of SIP 29th A. M. & IIIrd IC on Bt". Sept~6, 1996, Cordoba, Espana. p. 64.
- [28] Poncet S., C. Bernard, E. Dervyn, *et al.* *ibid*, 1996, p. 64.
- [29] 刘崇乐, 傅贻玲, 任改新等. 苏芸金杆菌研究的五十年. 北京: 科学出版社, 1962, 5~9.
- [30] Knowles B. H., and D. J. Ellar. *Biochem. Biophys. Acta*, 1987, 924: 509~518.
- [31] Sacchi V. F., P. Parenti, G. M. Hanozet, *et al.* *FEBS Lett*, 1986, 204: 213~218.
- [32] SIP Newsletter, May 1995. 27(2), p. 21.
- [33] S. K. Datta, M. F. Alam, K. Datta, *et al.* The IInd Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bt and Its Impact to the Environment, Nov, 4~8, 1996, Chang Mai, Thailand, p82.