

苏云金芽胞杆菌高效表达载体的构建

李朝睿^{1,2} 杜立新^{2,3} 彭琦² 梁影屏² 高继国¹ 张杰² 宋福平^{2*}

(1. 东北农业大学 生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

(2. 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

(3. 河北农林科学院植物保护研究所 河北 保定 071000)

摘要:【目的】通过比较 *cry1A*、*cry3A*、*cry4A* 和 *cry8E* 四个基因的启动子转录活性, 筛选出一个强启动子, 利用强启动子构建一个苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)高效表达载体。【方法】利用启动子融合 *lacZ* 技术检测了 4 种启动子的转录活性。通过扫描电子显微镜观察晶体、SDS-PAGE、蛋白定量和生物活性测定等方法对新建高效表达载体进行功能验证。【结果】构建了 *Pcry1A*、*Pcry3A*、*Pcry4A* 和 *Pcry8E* 4 个启动子融合报告基因 *lacZ* 的表达载体, 经 β -半乳糖苷酶活性分析得知, 启动子活性从高到低依次为 *Pcry8E*>*Pcry1A*>*Pcry4A*>*Pcry3A*。选取 *cry8E* 启动子, 以 pHT315 作为基础载体构建苏云金芽胞杆菌高效表达载体 pHT315-8E21b, 将 *cry1Ac* 基因连接到 pHT315-8E21b 和广泛应用的 *cry3A* 启动子指导的 pSXY-422b 上, 分别转入无晶体突变株 HD-73⁻, 获得菌株 HD-8E1Ac 和 HD-422-1Ac。扫描电子显微镜观察显示, HD-8E1Ac 菌株可以形成菱形晶体, 说明正确表达了 *cry1Ac* 基因。SDS-PAGE 分析结合蛋白定量实验表明 pHT315-8E21b 表达效率高于 pSXY-422b。对小菜蛾(*Plutella xylostella*)的生物活性测定表明 HD-8E1Ac 菌株对小菜蛾有生物活性, 且菌株活性高于 HD-422-1Ac。【结论】利用强启动子 *Pcry8E* 构建了一个能在 Bt 中高效表达的穿梭载体 pHT315-8E21b, 该载体可正确表达 *cry1Ac* 基因, 其表达效率高于被广泛应用的 pSXY422b。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, *cry8E* 启动子, *cry3A* 启动子, 表达载体

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2009CB118902); 国家自然科学基金项目(No. 31070083)

*通讯作者: Tel: 86-10-62896634; 信箱: fpsong@ippcaas.cn

收稿日期: 2012-03-30; 接受日期: 2012-05-18

Construction of high-level expression vector for *Bacillus thuringiensis*

LI Chao-Rui^{1,2} DU Li-Xin^{2,3} PENG Qi² LIANG Ying-Ping²

GAO Ji-Guo¹ ZHANG Jie² SONG Fu-Ping^{2*}

(1. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

(2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

(3. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: [Objective] To construct a vector for high-level expression of *cry* genes in *Bacillus thuringiensis*, a strong promoter was screened by comparing the transcriptional activities among *cry1A*, *cry3A*, *cry4A* and *cry8E* promoters. **[Methods]** The transcriptional activities of the four promoters were detected by fusing with *lacZ* gene. Scanning electron microscopy was used to detect the abilities of crystal protein formation. SDS-PAGE, protein quantitation and bioassay were performed for the functional verification of the high-level expression vector. **[Results]** The four promoters *Pcry1A*, *Pcry3A*, *Pcry4A* and *Pcry8E* were fused with *lacZ* report gene. Beta-galactosidase assay showed that the activities of the four promoters were, in decreasing order, *Pcry8E*>*Pcry1A*>*Pcry4A*>*Pcry3A*. The *cry8E* promoter was selected to construct the high-level expression vector pHT315-8E21b based on plasmid pHT315. *cry1Ac* gene was inserted into both pHT315-8E21b and the widely used plasmid pSXY-422b which was initiated by *cry3A* gene promoter, respectively. The two expression plasmids were introduced into the acrySTALLIFEROUS mutants HD-73⁻, and HD-8E1Ac and HD-422-1Ac strains were obtained. HD-8E1Ac and HD-422-1Ac strains Cry1Ac protein was observed by scanning electron microscopy, the results indicated that HD-8E1Ac strain produce diamond crystals compared with HD-73⁻. SDS-PAGE and protein quantitation analysis showed that the expression of *cry1Ac* gene is significantly increased in HD-8E1Ac compared with that in HD-422-1Ac. Bioassay results showed that HD-8E1Ac possesses much higher toxic against *Plutella xylostella* compared with HD-422-1Ac. **[Conclusion]** The high-level expression vector pHT315-8E21b initiated by *cry8E* gene promoter has the ability to express Cry1Ac correctly. It has higher efficiency of expressing insecticidal crystal protein compared with the widely used plasmid pSXY-422b.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *cry8E* promoter, *cry3A* promoter, Expression vector

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是一种广泛存在于土壤中的细菌,其可以在生长稳定期形成芽胞,并在母细胞中产生晶体,晶体主要组成成分是杀虫晶体蛋白(亦称为 δ -内毒素)由 *cry* 和 *cyt* 基因编码,具有特异的杀虫活性^[1]。多种 Bt 产品被应用于农业害虫和卫生害虫蚊子的防治^[2]。根据 *cry* 基因表达调控的特点可以将其分为两类,芽胞依赖型 *cry* 基因如 *cry1A*、*cry2A*、*cry4A*、*cry4B* 和 *cry11A* 等;和不依赖芽胞形成的 *cry* 基因如 *cry3A*^[3-7]。而不同机制的启动子需要不同的转录因子,如 *cry1Ac* 启动子为重叠的双启动子 Bt I 和 Bt II,二者分别由 σ^E 和 σ^K 调控^[8]; *cry4A* 为非重叠双启动子 p1 和 p2,在过渡期受到 σ^H 的调控有较弱表达^[9-10]; *cry8E* 基因与其上游 *orf1* 基因以操纵子形式进行转录,操纵子中的两个启动子受到 σ^H 和 σ^E 调控^[11]; *cry3A* 从营养期即开始表达,受到 σ^A 的调控^[7],而 *sigK* 基因功能的丧失有利于 *cry3A* 启动子在产胞后期的转录^[12]。*cry* 基因启动子转录机制的不同决定了其相应的转录特点,研究人员根据这些特点构建出表达载体用于实验和生产。目前已报道的 Bt 表达载体主要有 pBMB1A、pEMB0557、pSXY-422b 和 pSTK-3A。pBMB1A 是以低拷贝载体 pHT304^[13]为基础, *cry1Ac* 启动子指导的穿梭表达载体,可用于快速克隆表达不同类别的 Cry 蛋白^[14]; pEMB0557 可以容纳至少 70 kb 的 DNA 片段,可用于克隆或表达较大的基因或基因簇^[15]; pSXY-422b 和 pSTK-3A 均是以高拷贝载体 pHT315^[13]为基础, *cry3A* 启动子指导的穿梭表达载体,只有抗性不同^[16-17], Wang 等将携带 *cry3Aa7* 基因的 pSTK-3A 转化到对鳞翅目害虫高毒力的野生菌株 G03 中,得到对鞘翅目和鳞翅目害虫都有很高毒力的工程菌 G033A^[17]。Yan 等将

携带 *cry3Aa7* 基因的 pSTK-3A 转化到对蛱蝶高毒力的野生菌株 HBF-1 中,得到工程菌株 3A-HBF,其不仅对蛱蝶表现出较高毒力,而且还获得对叶甲科害虫的杀虫活性^[18]。苏云金芽胞杆菌杀虫晶体的形成是蛋白积累的结果,而利用一个强启动子表达相应基因,可提高蛋白的产量,从而提高单位重量发酵液的活性^[19-20]。本文通过比对 *cry1A*、*cry3A*、*cry4A* 和 *cry8E* 4 种不同机制的 *cry* 基因启动子的活性,寻找强启动子,并利用强启动子构建一个可在 Bt 中高效表达的载体,从而实现杀虫蛋白的高效表达,为今后研制更为高效广谱的苏云金芽胞杆菌工程菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 本实验所用菌株与质粒见表 1。大肠杆菌(*Escherichia coli*)用 LB 培养基进行培养; Bt 用 SSM 培养基(芽胞生成培养基)进行培养^[21]。

1.1.2 主要试剂: *Taq* DNA 聚合酶购自博迈德生物技术公司; PrimerSTAR HS DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 DNA Blunting Kit 均购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 纯化试剂盒购自 AXYGEN 公司; Pierce[®] 660 nm Protein Assay 试剂盒购自 Thermo Scientific 公司; 营养肉汤购自于北京奥博星生物技术有限责任公司; G250 购自 Bio-Rad 公司。

1.1.3 引物合成及序列测定: 根据 GenBank 中 HD-73^[22]、Bt22^[23]、4Q2-72^[24]、Bt185^[25] 菌株已知序列设计引物,引物名称及序列见表 2。引物合成由上海生工生物工程公司完成,测序工作由华大基因完成。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	特性 Characterization	来源 Resource
Strains		
<i>E. coli</i> JM110	<i>rpsL (Str^r) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15]</i>	Novagen
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15]</i>	Stratagene
HD-73	Bt strain carrying <i>cryIAc</i> gene	[22]
Bt22	Bt strain carrying <i>cry3A</i> gene	[23]
4Q2-72	Bt strain carrying <i>cry4A</i> , <i>cry4B</i> , <i>cry11A</i> , <i>cytA</i> gene	[24]
Bt185	Bt strain carrying <i>cry8E</i> and <i>cry8F</i> gene	[25]
HD-73 ⁻	AcrySTALLIFEROUS mutant of Bt HD-73 strain	[26]
HDLPcry1Ac	HD-73 ⁻ strain containing plasmid pHTlacPcry1Ac	This study
HDLPcry3A	HD-73 ⁻ strain containing plasmid pHTlacPcry3A	This study
HDLPcry8E	HD-73 ⁻ strain containing plasmid pHTlacPcry8E	This study
HDpHTlac	HD-73 ⁻ strain containing plasmid pHTlac	This study
HD-8E1Ac	HD-73 ⁻ strain containing plasmid pHT315-8E-1Ac	This study
HD-422-1Ac	HD-73 ⁻ strain containing plasmid pHT315-422-1Ac	This study
Plasmids		
pHT304-18Z	Amp ^r , Erm ^r , <i>E. coli</i> -Bt shuttle vector	[27]
pHT315	Amp ^r , Erm ^r , <i>E. coli</i> -Bt shuttle vector	[13]
pHTlac	Promoterless <i>lacZ</i> vector, Ery ^r , Amp ^r	This study
pHTlacPcry1Ac	pHTlac carrying <i>cryIAc</i> promoter	This study
pHTlacPcry3A	pHTlac carrying <i>cry3A</i> promoter	This study
pHTlacPcry4A	pHTlac carrying <i>cry4A</i> promoter	This study
pHTlacLPcry8E	pHTlac carrying <i>cry8E</i> promoter	This study
pET-21b	Containing ampicillin resistance gene	Novagen
pHT315-8E21b	pHT315 carrying <i>cry8E</i> promoter and multiple clone sites (MCS) from pET-21b	This study
pSXY-422b	pHT315 carrying <i>cry3A</i> promoter and multiple clone sites (MCS) from pET-21b	[16]
pHT315-8E-1Ac	pHT315-8E21b containing <i>cryIAc</i> gene	This study
pSXY-422b-1Ac	pSXY-422b containing <i>cryIAc</i> gene	This study

表 2 引物序列
Table 2 Primers and sequences

引物名称 Primer name	序列 Sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction site
LacZ5'	A <u>ACTGCAG</u> GCTTGAATTGATACACTAATGCTTTTAT	<i>Pst</i> I
LacZ3'	CCC <u>AAGCTT</u> TATTTTGGACACCAGACCAACTG	<i>Hind</i> III
LP1Ac5'	GG <u>GGTACC</u> ATTCAAGGTGAATTGCAGGTAAATG	<i>Kpn</i> I
LP1Ac3'	GCT <u>TCTAGA</u> AGTTACCTCCATCTCTTTTATTAAGAT	<i>Xba</i> I
LP3A5'	GG <u>GGTACC</u> GGGAGCTTAATTAAAGATAATATCTTTG	<i>Kpn</i> I
LP3A3'	GC <u>TCTAGA</u> ATTTTCTTCCTCCCTTTCTTATCAT	<i>Xba</i> I
LP4A5'	GG <u>GGTACC</u> AAAGGTCAACTCAAATTAAGGGCAC	<i>Kpn</i> I
LP4A3'	GCT <u>TCTAGA</u> ATTTGTTCCCTCCCACTCAATTTAGAT	<i>Xba</i> I
LPorf15'	GG <u>GGTACC</u> AATGCACCTCCAATTGTTAATTATGT	<i>Kpn</i> I
LP8E3'	GCT <u>TCTAGA</u> CTATTTTCTCCTATACATACACAAGAT	<i>Xba</i> I
8E-up	TCC <u>CCCGGG</u> AATGCACCTCCAATTGTTAATTATGTGTC	<i>Sma</i> I
8E-down	ACCAGTCATGCTAGCCATCTATTTTCTCCTCCTATACA	
21b-up	TGTATAGGAGGAAAATAGATGGCTAGCATGACTGGT	
21b-down	TCC <u>CCCGGG</u> CAAAAAACCCCTCAAGACCC	<i>Sma</i> I
1Ac-up	CGC <u>GGATCC</u> GATGGATAACAATCCGAACATCAATG	<i>Bam</i> H I
1Ac-down	ACGCGT <u>CGAC</u> CTATTCCTCCATAAGGAGTAATTCC	<i>Sal</i> I

1.1.4 供试昆虫: 利用小菜蛾(*Plutella xylostella*)进行杀虫蛋白的生物活性测定。小菜蛾由本实验室人工饲养。

1.2 细菌的培养条件

苏云金芽胞杆菌在 30 °C 培养, 摇床转速为 220 r/min; 红霉素使用浓度为 5 mg/L。大肠杆菌 *E. coli* JM110、SCS110 在 37 °C 培养, 摇床转速为 220 r/min, 氨苄霉素使用浓度为 100 mg/L。

1.3 DNA 操作、转化、PCR

大肠杆菌质粒的提取、转化和 DNA 片段纯化参照文献[28]。Bt 总 DNA 的提取与电击转化参照文献[29]。粘性末端补平以及目的片段的连接参考 TaKaRa DNA Blunting Kit 说明书。

1.4 β-半乳糖苷酶活性分析

将活化后的菌株分别接入加有红霉素的 SSM 培养基中, 30 °C、220 r/min 振荡培养, 从

T_0 (菌体对数生长期将要结束即将进入稳定期的时间点)取样至 T_{12} (T_0 后 12 h), 每小时取样一次, 每次取样 2 mL, 12 000×g 离心弃上清, 沉淀迅速置于-20 °C 保存。β-半乳糖苷酶活性测定方法参照文献[30], 每组数据进行 3 次独立重复试验, 取平均值。

1.5 菌株形态观察

分别用光学显微镜和电子扫描显微镜观察 Bt 菌株产生蛋白晶体的形态。光学显微镜制样方法: 将晶胞混合液均匀涂于载玻片上, 固定后用石炭酸复红染色 3 min, 清水冲洗, 100×油镜镜检。扫描电镜制样方法: 晶胞混合液滴于盖玻片上, 涂抹均匀, 干燥, 离子溅射喷金(2 nm), Hitachi S-4800 扫描电镜进行观察和拍照。

1.6 菌株表达杀虫晶体蛋白能力分析

将各菌株接种于 SSM 培养基中 220 r/min、

30 °C 培养, 在菌体裂解时 8 000×g 离心 15 min 收集晶体芽胞混合物, 冻干 24 h。取适量干粉称重, 重悬于 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中。取适量溶解液混于 SDS-PAGE 上样 Buffer 中, 煮沸 10 min, 12 000×g 离心, 上清用 Pierce® 660 nm Protein Assay Kit 进行总蛋白的定量。方法参见 Pierce® 660 nm Protein Assay Kit 说明书。调整各样品上样量使总蛋白量一致进行上样。利用 SDS-PAGE 检测各菌株杀虫晶体蛋白的产量, 方法参照文献[31]。

1.7 Cry1Ac 蛋白生物活性的测定

将蛋白样品稀释成不同浓度, 分别混入饲料拌匀, 接入待测幼虫, 放入人工气象器中, 48 h 调查结果, 进行 3 次独立重复试验, 计算致死中浓度 (LC_{50})^[32]。

2 结果

2.1 启动子转录活性分析载体的构建

为了比较 *cry1Ac*、*cry3A*、*cry4A* 和 *cry8E* 基因启动子的转录活性, 首先构建了高拷贝转录活性分析载体 pHTlac。以质粒 pHT304-18Z 为模板, 用引物对 LacZ5'/LacZ3' 扩增获得 *lacZ* 基因片段,

经过 *Hind* III、*Pst* I 双酶切后, 插入高拷贝载体 pHT315 中相应位点, 获得质粒 pHTlac (图 1), 经 PCR 扩增、酶切及测序鉴定, 证明构建正确。之后构建了 4 种启动子与 *lacZ* 基因的融合表达载体。分别以 HD-73 菌株总 DNA 为模板用引物对 LP1Ac5'/LP1Ac3' 扩增 *cry1Ac* 基因 ATG 上游 382 bp 的启动子序列; 以 Bt22 菌株总 DNA 为模板, LP3A5'/LP3A3' 为引物扩增 *cry3A* 基因 ATG 上游 570 bp 的启动子序列; 以 4QZ-72 菌株总 DNA 为模板, LP4A5'/LP4A3' 为引物扩增 *cry4A* 基因 ATG 上游 826 bp 的启动子序列; 以 Bt185 菌株总 DNA 为模板, LPorf15'/LP8E3' 为引物扩增 *cry8E* 基因 ATG 上游 1 352 bp 的启动子序列。以上启动子片段分别经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切后, 插入 pHTlac 的相应位点, 获得质粒 pHTlacPcry1Ac、pHTlacPcry3A、pHTlacPcry4A 和 pHTlacLPcry8E。4 个重组质粒经 PCR 扩增、酶切及测序鉴定, 证明构建正确。将鉴定正确的质粒和对照载体 pHTlac 转化无晶体突变株 HD-73⁻, 分别得到菌株 HDLPcry1Ac、HDLPCry3A、HDLPCry4A、HDLPCry8E 和 HDpHTlac。

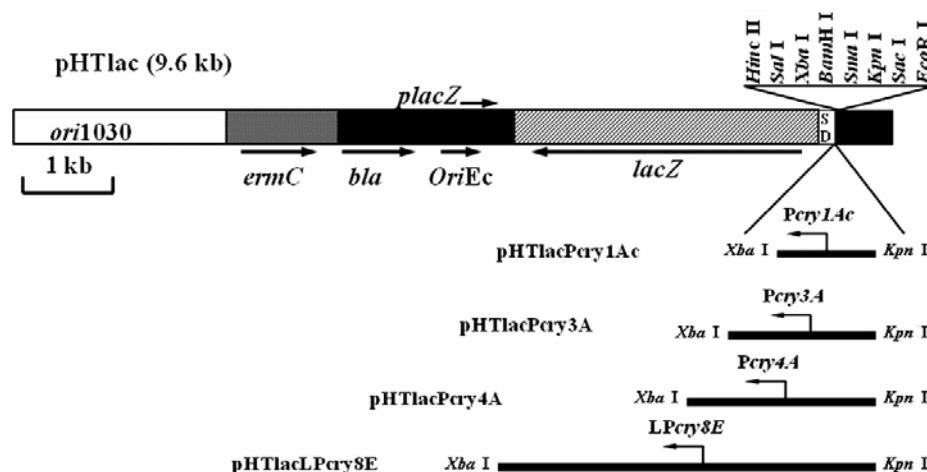


图 1 不同 *cry* 基因启动子与 *lacZ* 融合表达质粒构建示意图
Fig. 1 Construction of the different *cry* gene promoters with *lacZ* gene

2.2 启动子转录活性分析

菌株 HDLPcry1Ac、HDLPcry3A、HDLPcry4A 和 HDLPcry8E 在 SSM 培养基中进行 β -半乳糖苷酶活性分析, 方法见 1.4。分析结果表明(图 2), 在 SSM 培养基中, Pcry1A 和 Pcry4A 启动子从 T_2 开始有活性, Pcry1A 从 T_2 到 T_9 活性持续升高, Pcry4A 在 T_8 时活性达到最高; Pcry8E 和 Pcry3A 从 T_0 开始有活性, T_0 到 T_1 之间, Pcry3A 活性略高

于 Pcry8E, T_1 后 Pcry8E 活性开始高于 Pcry3A, 进入芽胞期后, Pcry8E、Pcry1A 与 Pcry4A 活性均有较大幅度的提高, 而 Pcry3A 变化较为平缓。空载体 pHTlac 的转录活性很低。以上结果说明启动子转录活性由高到低依次为 Pcry8E>Pcry1A>Pcry4A>Pcry3A。其中, 纵坐标轴断点前刻度单位为 5 000 Miller units, 断点后刻度单位为 20 000 Miller units。

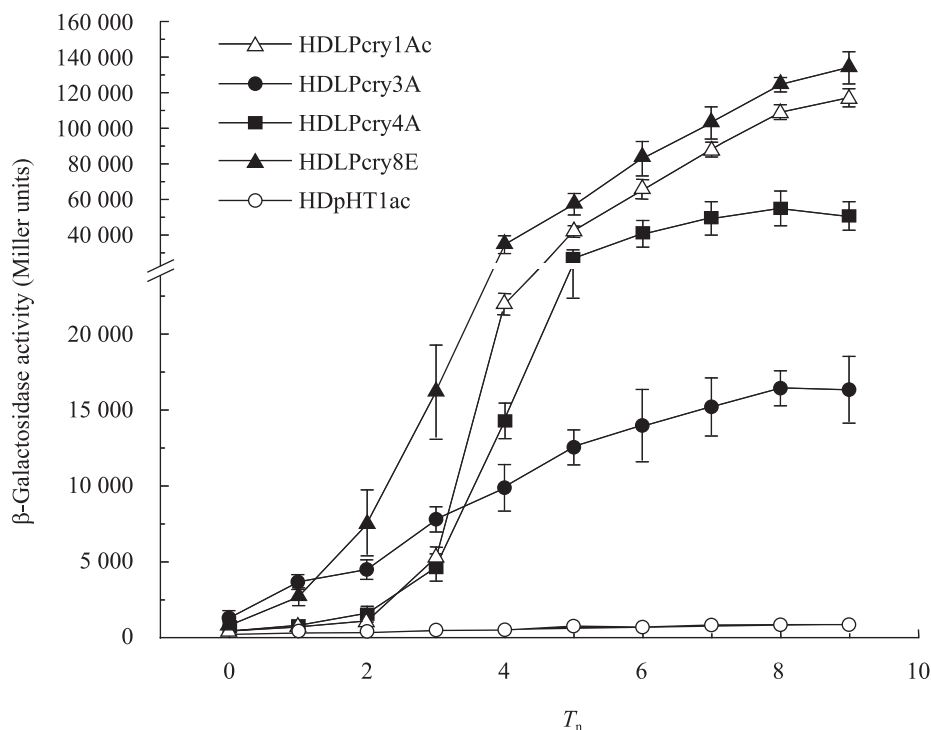


图 2 不同 cry 基因启动子转录活性比较

Fig. 2 β -Galactosidase assay of different cry gene promoters

2.3 cry8E 启动子指导的穿梭表达载体的构建

通过启动子转录活性分析, 发现芽胞期时 cry8E 基因的启动子活性最强, 因此选取该启动子构建穿梭表达载体。以 Bt185 菌株基因组 DNA 为模板, 用引物对 8E-up/8E-down 扩增 cry8E 基因的启动子序列, 大小为 1 352 bp; 以大肠杆菌表达载体 pET-21b 质粒为模板, 用引物对 21b-up/21b-down 扩增得到无启动子的 pET-21b

表达区片段, 大小为 213 bp, 其中包括多克隆位点; 回收上述 PCR 产物, 以此为模板, 用引物 8E-up 和 21b-down 进行重叠 PCR, 获得 cry8E 基因启动子和 pET-21b 表达区的重叠片段 8E-21b, 大小为 1 565 bp。8E-21b 经 Sma I 酶切, 插入穿梭载体 pHT315 经 EcoR I /Hind III 双酶切并补平后的位点, 得到重组质粒, 命名为 pHT315-8E21b。该质粒含有 cry8E 基因启动子、多克隆位点及 T7

终止子, 物理图谱如图 3 所示。

2.4 HD-8E1Ac 菌株晶体形态观察

以 HD-73 菌株基因组 DNA 为模板, 引物 1Ac-up 和 1Ac-down 配对扩增大小为 3 537 bp 的 *cryI*Ac 基因, 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后, 导入 pHT315-8E21b 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点之间, 得到重组质粒 pHT315-8E-1Ac, 在 SCS110 中去甲

基化后, 转化 HD-73⁻无晶体突变株, 所得菌株命名为 HD-8E1Ac。以出发菌株 HD-73⁻为对照, 利用 SSM 培养基培养 HD-8E1Ac, 至细胞大部分裂解, 经扫描电子显微镜观察发现(图 4), HD-8E1Ac 菌株可以形成菱形晶体, 而 HD-73⁻菌株中未观察到菱形晶体的存在, 说明 pHT315-8E21b 载体可以正确表达 *cryI*Ac 基因。

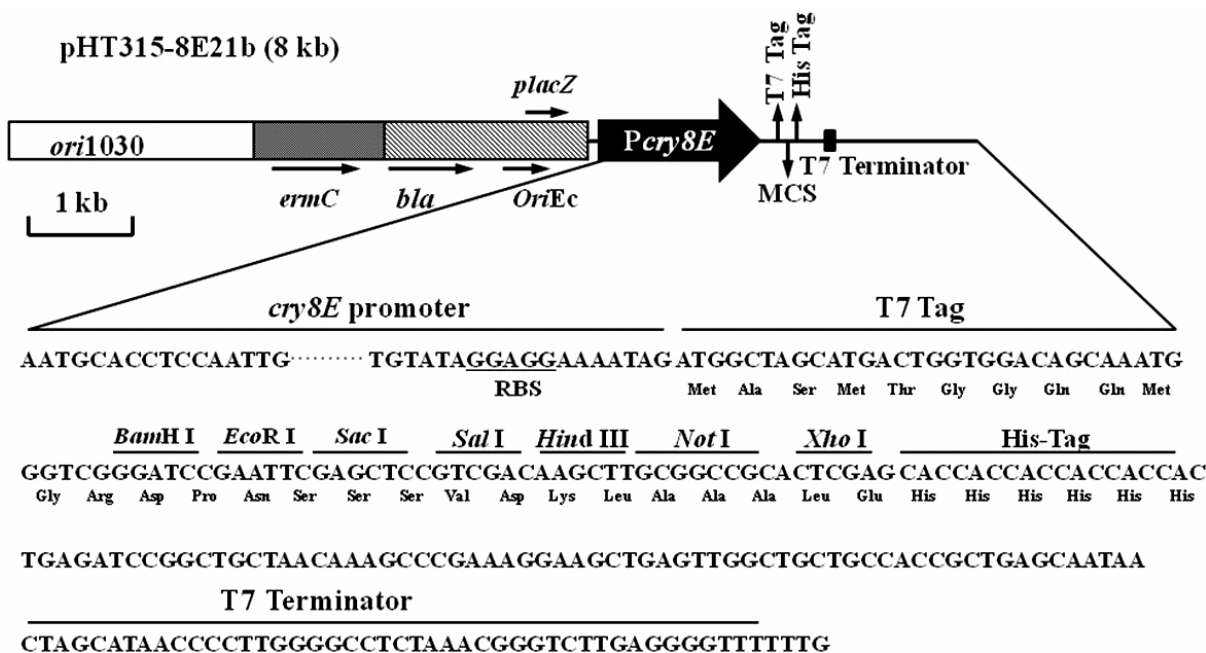


图 3 pHT315-8E21b 的表达区序列及分析

Fig. 3 Expression region of pHT315-8E21b

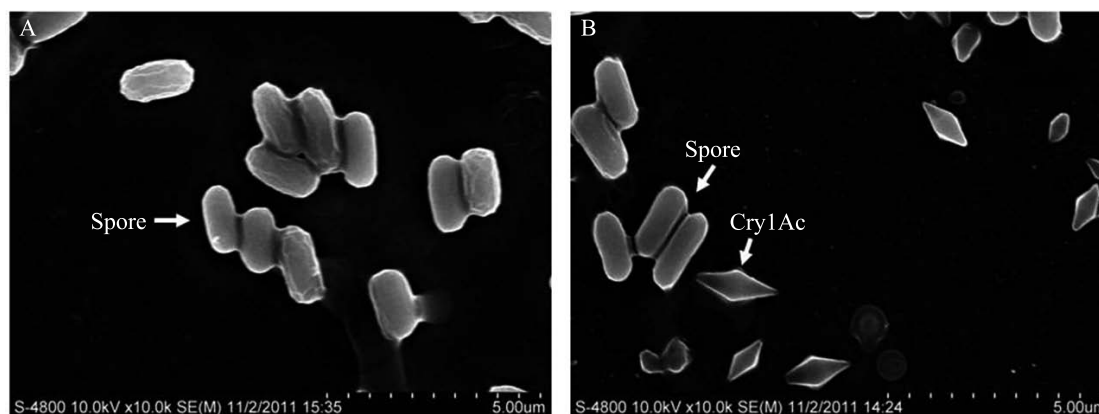


图 4 菌株 HD-73⁻和 HD-8E1Ac 的扫描电镜观察结果

Fig. 4 Scanning electron microscopy observation of strain HD-73⁻ and HD-8E1Ac

Note: A: HD-73⁻; B: HD-8E1Ac; The HD-8E1Ac strain produce diamond crystals compared with HD-73⁻.

2.5 pHT315-8E21b 载体表达效率的评估

同 2.4 方法, 将 *cry1Ac* 基因导入广泛应用的含有 *cry3A* 基因启动子的表达载体 pSXY-422b 中, 得到重组质粒 pSXY-422b-1Ac, 去甲基化后, 转化 HD-73⁻ 无晶体突变株, 得到的菌株命名为 HD-422-1Ac。通过对比 pHT315-8E21b 和 pSXY-422b 两载体表达的 Cry1Ac 蛋白产量, 对新载体进行表达效率的评估。以无晶体突变株 HD-73⁻ 为对照, 利用 SSM 培养基培养 HD-422-1Ac 和 HD-8E1Ac 至细胞完全裂解, HD-422-1Ac 菌株需 24 h 完全裂解, 而 HD-8E1Ac 需要 30 h。通过 SDS-PAGE 分析对比两菌株表达 Cry1Ac 的产量, 上样前, 采用 Pierce[®] 660 nm Protein Assay Kit 分别对三者上样混合液中的总蛋白进行定量。调整上样量使总蛋白含量一致进行点样, 由图 5 可知菌株 HD-422-1Ac 和 HD-8E1Ac 均可产生约 130 kD 的 Cry1Ac 蛋白, 而总蛋白含量一致的情况下, 通过 Quantity One 软件定量得知, HD-8E1Ac 菌株所表达的 Cry1Ac 蛋白约为 HD-422-1Ac 的 4 倍, 说明 pHT315-

8E21b 载体对 Cry 蛋白的表达效率明显高于 pSXY-422b。

2.6 菌株 HD-8E1Ac 和 HD-422-1Ac 的杀虫活性比较

对菌株 HD-422-1Ac 和 HD-8E1Ac 进行生物活性测定, 以无晶体突变株 HD-73⁻ 为阴性对照, HD-73 野生型为阳性对照。结果表明(表 3), 无晶体突变株 HD-73⁻ 无活性, HD-8E-1Ac 菌株产生的 Cry1Ac 蛋白对小菜蛾有活性, LC_{50} 为 0.055 61 mg/g, 与 HD-73 野生型活性相似, 约为 HD-422-1Ac 菌株 LC_{50} 的 1/5, 证明菌株 HD-8E1Ac 的生物活性比菌株 HD-422-1Ac 的活性高, 所以从生物活性的角度说明 pHT315-8E21b 载体对 Cry 蛋白的表达效率高于 pSXY-422b。

表 3 菌株 HD-422-1Ac 和 HD-8E1Ac 对小菜蛾的毒力测定

Table 3 Toxicity of strain HD-422-1Ac and HD-8E1Ac against *Plutella xylostella*

样品 Sample	致死中浓度 LC_{50} (mg/g)	95%置信区间 95% confidence
HD-73 ⁻	NA	NA
HD-73	0.041 49	0.028 36–0.057 57
HD-422-1Ac	0.311 80	0.150 67–0.468 46
HD-8E1Ac	0.055 61	0.045 66–0.067 01

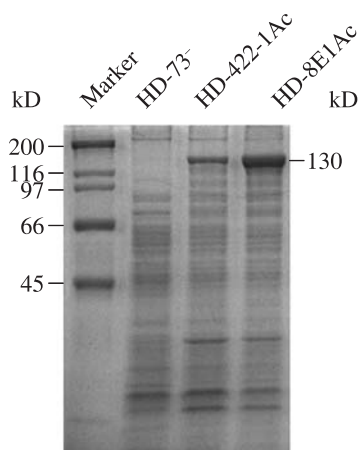


图 5 HD-422-1Ac、HD-8E-1Ac 菌株 Cry1Ac 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of Cry1Ac protein initiated by HD-422-1Ac and HD-8E-1Ac

Note: Marker: Bio-Rad SDS-PAGE molecular weight standards high range marker; HD-8E1Ac and HD-422-1Ac strains both produced 130 kD Cry1Ac protein compared with HD-73⁻ strain.

3 讨论

苏云金芽胞杆菌(Bt)在过去几十年内一直被广泛用于农林业的害虫防治, 同时对可在哺乳动物间传播疾病的幼蚊和蚋科黑蝇也有防治作用^[33–35]。苏云金芽胞杆菌在芽胞形成的过程中可以产生具有杀虫活性的晶体蛋白, 是苏云金芽胞杆菌杀虫活性的主要成分^[17], 所以增加杀虫晶体蛋白的产量是提高 Bt 制剂活性的途径之一。*cry* 基因启动子转录水平上有其特定的调控机制, 且 mRNA 的稳定性较高, 所以在芽胞形成末期, 杀虫晶体蛋白产量可达整个细胞干重的 25%^[19]。*cry*

基因一般存在于Bt的大质粒上,其表达量也会受质粒拷贝数的影响,Arantes 和 Lereclus 的研究发现,当 *cry3Aa* 基因连接于有 15 个拷贝的 pHT315 载体上时,其表达量明显高于仅 4 个拷贝的 pHT304^[13]。

本文通过对比 *Pcry1A*、*Pcry3A*、*Pcry4A* 和 *Pcry8E* 4 种具有不同转录调控机制的启动子的活性,筛选出了一个强启动子——*cry8E* 启动子。*cry8E* 基因的上游有一个开放读码框 *orf1*, *orf1* 基因和 *cry8E* 基因是一个转录单元; *Porf1* 启动子受 σ^E 调控,是一个芽胞期表达的强启动子; *Pcry8E* 受 σ^H 调控,是一个营养期表达的弱启动子^[11]。本文将 *cry8E* 启动子和 pET-21b 表达载体的表达区进行重叠,连入了苏云金芽胞杆菌大肠杆菌穿梭载体 pHT315 中,构建了苏云金芽胞杆菌高效表达载体 pHT315-8E21b。被广泛使用的 pSXY-422b 是以同样方式构建的受 *cry3A* 启动子指导的表达载体, *cry3A* 基因启动子在营养期即开始表达,启动子上有一个 STAB-SD 序列,可以提高核糖体和转录产物的结合稳定性,从而提高表达量^[36],但最终经蛋白定量分析得知, pHT315-8E21b 的表达效率比 *cry3A* 启动子指导的 pSXY-422b 高,说明本研究构建的 *cry8E* 基因启动子指导的表达载体可以应用于 *cry* 基因的异源表达,以获得大量表达产物用于深入的活性和机理分析,同时该强启动子也可以用于苏云金芽胞杆菌生防制剂的构建,为微生物农药的研发提供了有潜力的表达元件。

参 考 文 献

- [1] Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(3): 283–300.
- [2] Bravo A, Likitvatanavong S, Gill SS, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(7): 423–431.
- [3] Ibrahim MA, Griko N, Junker M, et al. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective[J]. Bioengineered Bugs, 2010, 1(1): 31–50.
- [4] Bravo A, Agaisse H, Salamitou S, et al. Analysis of *cryIAa* expression in *sigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*[J]. Molecular and General Genetics, 1996, 250(6): 734–741.
- [5] Widner WR, Whiteley HR. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(2): 965–974.
- [6] Poncef S, Dervyn E, Klier A, et al. SpooA represses transcription of the *cry* toxin genes in *Bacillus thuringiensis*[J]. Microbiology, 1997, 143(8): 2743–2751.
- [7] Agaisse H, Lereclus D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIA* toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spooA* mutant[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(16): 4734–4741.
- [8] Sedlak M, Walter T, Aronson A, et al. Regulation by overlapping promoters of the rate of synthesis and deposition into crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(3): 734–741.
- [9] Yoshisue H, Sakai H, Sen K, et al. Identification of a second transcriptional start site for the insecticidal protein gene *cry IV A* of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*[J]. Gene, 1997, 185(2): 251–255.
- [10] Yoshisue H, Fukada T, Yoshida K, et al. Transcriptional regulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* mosquito larvicidal crystal protein gene *cry IV A*[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(9): 2750–2753.
- [11] Du L, Qiu L, Peng Q, et al. Identification of the promoter in the intergenic region between *orf1* and

- cry8Ea1* controlled by sigma H factor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(12): 4164–4168.
- [12] 杜立新, 魏娟, 韩丽丽, 等. 苏云金芽胞杆菌 *sigK* 基因插入失活突变体的特点及其对 *cry3A* 基因启动子活性的影响[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1177–1184.
- [13] Arantes O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*[J]. Gene, 1991, 108(1): 115–119.
- [14] 郑文, 叶伟星, 彭东海, 等. 基于 *cry1Ac* 表达调控元件的苏云金芽胞杆菌表达载体构建[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(2): 400–405.
- [15] Liu XY, Peng DH, Luo Y, et al. Construction of an *Escherichia coli* to *Bacillus thuringiensis* shuttle vector for large DNA fragments[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(4): 765–772.
- [16] 宋福平. 苏云金芽胞杆菌特异性 *cry* 基因的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2001.
- [17] Wang GJ, Zhang J, Song FP, et al. Engineered *Bacillus thuringiensis* G033A with broad insecticidal activity against lepidopteran and coleopteran pests[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5): 924–930.
- [18] Yan GX, Song FP, Shu CL, et al. An engineered *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against Scarabaeidae (*Anomala corpulenta*) and Chrysomelidae (*Leptinotarsa decemlineata* and *Colaphellus bowringi*)[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(5): 697–703.
- [19] Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(21): 6027–6032.
- [20] Park HW, Ge B, Bauer LS, et al. Optimization of Cry3A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3932–3938.
- [21] Schaeffer P, Millet J, Aubert JP, et al. Catabolic repression of bacterial sporulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1965, 54(3): 704–711.
- [22] Adang MJ, Staver MJ, Rocheleau TA, et al. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*[J]. Gene, 1985, 36(3): 289–300.
- [23] 张杰, 宋福平, 李长友, 等. 对鞘翅目害虫高毒力 Bt 基因 *cry3Aa7* 的分离克隆及表达研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(6): 650–653.
- [24] Berry C, O'Neil S, Ben-Dov E, et al. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5082–5095.
- [25] Shu CL, Yu H, Wang RY, et al. Characterization of two novel *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* strain BT185[J]. Current Microbiology, 2009, 58(4): 389–392.
- [26] González J Jr, Dulmage HT, Carlton BC. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*[J]. Plasmid, 1981, 5(3): 351–365.
- [27] Agaisse H, Lereclus D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*[J]. Molecular Microbiology, 1994, 13(1): 97–107.
- [28] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第2版. 北京: 科学出版社, 1996: 16–69.
- [29] Lereclus D, Arantes O, Chauvaux J, et al. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1989, 60(2): 211–217.
- [30] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972: 352–355.

- [31] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 等译. 北京: 科学出版社, 1999: 334-338.
- [32] 陈中义, 李长友, 刘加宝, 等. 苏云金芽胞杆菌沉默基因 *cry2Ab3* 在大肠杆菌中表达及杀虫活性研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(5): 561-566.
- [33] de Maagd RA, Bosch D, Stiekema W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(1): 9-13.
- [34] Roberts L. Mosquitoes and disease[J]. Science, 2002, 298(5591): 82-83.
- [35] Boonserm P, Angsuthanasombat C, Lescar J. Crystallization and preliminary crystallographic study of the functional form of the *Bacillus thuringiensis* mosquito-larvicidal Cry4Aa mutant toxin[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2004, 60(7): 1315-1318.
- [36] Agaisse H, Lereclus D. STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability[J]. Molecular Microbiology, 1996, 20(3): 633-643.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 并在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn