

新 *vip3Aa* 基因的克隆、表达及其序列分析*

蔡 峻** 滑东辉 肖 亮 严 冰 陈月华

(南开大学生命科学学院微生物系 天津市微生物功能基因组重点实验室 天津 300071)

摘要 克隆了 Bt9816C 的 *vip3A* 基因,并将测序结果提交到 GenBank(序列号:AY945939)。该基因是一个新的 *vip3Aa* 基因,Bt 杀虫晶体蛋白命名委员会将其命名为 *vip3Aa18*。在大肠杆菌 BL21 中表达了该基因,生物测定结果表明纯化的 Vip3Aa18 蛋白对棉铃虫和甜菜夜蛾具有很高的杀虫活性。序列分析结果显示 Vip3Aa18 C 端 536 至 667 位氨基酸残基间是一个糖类结合域,推测可能参与 Vip3Aa18 与敏感昆虫中肠受体结合,N 端 272 至 292 位氨基酸残基间存在一个跨膜螺旋,可能与 Vip3Aa18 形成穿孔有关。此外,Vip3Aa18 还可能具有一个二硫键。这些特殊区域和位点可能与其功能密切相关。

关键词 Vip3Aa18 序列分析 糖类结合域 跨膜螺旋

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0672-04

Cloning, Expressing and Sequence Analysis of a Novel *vip3Aa* Gene*

CAI Jun** HUA Dong-Hui XIAO Liang YAN Bing CHEN Yue-Hua

(Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, Department of Microbiology,
College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract The *vip3A* gene of Bt9816C was cloned and the sequencing result was submitted to GenBank (accession no. AY945939). The gene was identified as a novel *vip3Aa* gene, which was assigned name *vip3Aa18* by the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin nomenclature committee. Subsequently, *vip3Aa18* was expressed in *Escherichia coli* BL21 and bioassay demonstrated that the purified recombinant Vip3Aa18 had high toxicity against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua*. The results of sequence analysis revealed that a carbohydrate binding domain exists on the C-termini 536 to 667 residues of Vip3Aa18, which maybe participate in binding to midgut receptors in susceptible insects. Moreover, a transmembrane helices located on N-termini 272 to 292 residues was proposed responding for pore formation. Furthermore, a putative disulfide bond was found in the Vip3Aa18 sequence. The specific structures and sites of Vip3Aa18 sequence imply potential function.

Key words Vip3Aa18, Sequence analysis, Carbohydrate binding domain, Transmembrane helices

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)是目前世界上应用最广泛、最成功的微生物杀虫剂,其主要杀虫成分是在芽孢形成期产生的杀虫晶体蛋白。1996年,Estruch等人首次发现某些 Bt 菌株在芽孢形成前的营养期生长阶段,可分泌产生一种营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins,简称 Vips)^[1]。现有研究表明 Vip3A 蛋白具有广谱杀虫活性,尤其对小地老虎 *Agrotis ipsilon*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 等对 Cry 蛋白不敏感的害虫有特效^[2,3]。此外,Vip3A 蛋白与任何已知的杀虫晶体蛋

白没有同源性,其杀虫机理也不同于已知的杀虫晶体蛋白,它也因此被誉为第二代杀虫蛋白。我们的前期研究工作已经证明了 Vip3A 蛋白是 Bt9816C 培养上清中的主要杀虫活性成分^[4]。本研究中,我们克隆并表达了 Bt9816C 的 *vip3A* 基因,并对其序列进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及主要试剂

Bt9816C、HD-1 和大肠杆菌 DH5 α 、BL21 均为本

* 国家自然科学基金(No. 30600015)

天津市自然科学基金(No. 06YFJMJC11200)

** 通讯作者 Tel: 022-23505964, E-mail: caijun@nankai.edu.cn

收稿日期 2006-10-30,修回日期 2007-01-08

室保藏菌种。DNA 聚合酶、限制酶、pMD 18-T vector 和 DNA marker 均购自 TaKaRa 公司; plasmid pQE-28a (+) 高效表达及纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司。

1.2 引物及聚合酶链式反应

按 *vip3Aa2* 基因序列 (GenBank 登录号为 L48812) 设计一对引物用于扩增全长 *vip3Aa* 开放阅读框。5' 端引物: 5' GGG **GAA TTC** ATG AAC AAG AAT AAT ACT AAA TTA AGC AC 3', 3' 端引物: 5' ACT **CTC GAG** ATT AGA TCC CGA TCT TAC TTA ATA GAG AC 3'。PCR 反应条件 95℃ 变性 2 min 后加入 DNA 聚合酶 95℃ 变性 60 s, 40℃ 复性 120 s, 72℃ 延伸 150 s, 共 5 个循环, 95℃ 变性 5 s, 45℃ 复性 60 s, 72℃ 延伸 150 s, 共 29 个循环, 最后一轮 72℃ 延伸 10 min。

1.3 *vip3A* 的克隆、表达与重组蛋白的纯化

按试剂盒的说明, 将 PCR 产物与 pMD 18-T vector 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 在含有 IPTG 和 X-gal 的 Amp 抗性 LB 平板上挑选白色转化子。阳性克隆经 PCR 检测和 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定后, 由上海生工公司进行序列测定。回收双酶切的 DNA 片段, 与同样双酶切处理的 pQE-28a (+) 质粒相连, 并转化大肠杆菌 BL21 感受态。挑取经 PCR 检测和 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定的阳性克隆, 接种于 3 mL 的含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃ 过夜培养。以 1:50 转接于 100 mL 含上述抗生素的 LB 培养基中, 培养至 OD_{600} 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 进行诱导, 5 h 后离心收集菌体。按照 pQE28 蛋白高效表达及纯化试剂盒提供的方法进行蛋白纯化。

1.4 生物测定

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 均为本室饲养。将纯化的重组 *Vip3Aa18* 以生测缓冲液稀释至不同的浓度, 分别涂布于装有生测培养基的 24 孔板, 每孔涂布 20 μ L, 后续生测步骤按苏云金芽孢杆菌国家行业标准中的规定进行。

1.5 序列分析

用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 进行序列比对。蛋白跨膜区预测使用在线软件 TMAR (<http://bioinfo.limbo.ifm.liu.se/tmap/>), TMPred

(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), DNS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) 和 TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>)。结构域预测用 CDDv2.09 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 和 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)。信号肽预测用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>)。二硫键预测用 DISULFIND (<http://cassandra.dsi.unifi.it/cysteines/>)。

2 结果与讨论

2.1 *vip3A* 基因的克隆与测序

以 Bt9816C 的总 DNA 为模板进行 PCR, 获得一条约 2.4 kb 的条带 (图 1)。回收 PCR 产物与 T-载体相连后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态。阳性克隆经过双酶切鉴定后 (图 2), 再进行测序。测序结果表明, 克隆的 *vip3A* 基因全长 2370 bp, 编码 789 个氨基酸。该序列已提交到 GenBank (Accession No. AY945939), 并被 Bt 杀虫晶体蛋白命名委员会 (*Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin nomenclature committee) 命名为 *vip3Aa18* (见 http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html)。

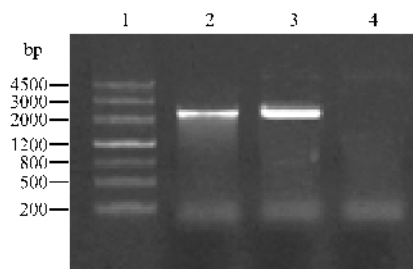


图 1 *vip3Aa* 全长基因 PCR 扩增结果

1 DNA Marker, 2 Bt 9816C, 3 Bt HD-1, 4 H₂O

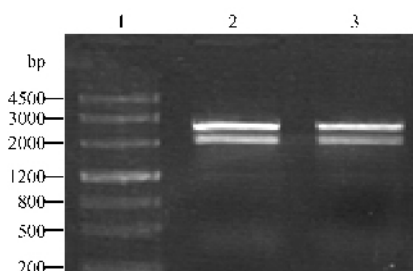


图 2 重组质粒 pTvip3A 的酶切鉴定

1 DNA Marker, 2, 3 两个转化子质粒经过 *EcoR*I 及 *Xho*I 双酶切后

2.2 蛋白表达、纯化及生物测定

将克隆有 *vip3A18* 基因的重组质粒和表达载体 pQE-28a(+) 分别用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切,回收 2.4 kb 大小目的片段和 3.4 kb 载体片段,进行连接并转化大肠杆菌 BL21。转化子 Vip-BL 经 1 mmol/L IPTG 诱导 5h 后,离心收集菌体。SDS-PAGE 显示目的蛋白得到了较高表达(图 3)。纯化蛋白的生物测定结果表明,该转化子对甜菜夜蛾和棉铃虫均有很高的毒力(表 1)。

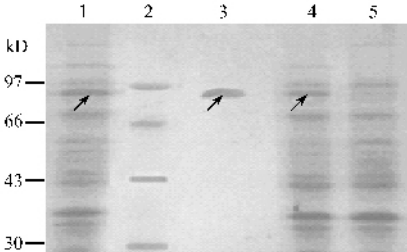


图 3 转化子 Vip-BL 和纯化的重组 Vip3Aa18 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

1 Vip-BL 超声破碎后的上清液,2 蛋白质 marker,3 纯化的 Vip3Aa18 重组蛋白,4 Vip-BL 超声波破碎后的沉淀,5 带有空载体的大肠杆菌 BL21 菌体

表 1 Vip3Aa18 的生物测定结果

试虫	LC ₅₀ (ng/cm ²)	回归方程式	R ²
棉铃虫	124.0	$Y = 1.4086X + 1.9951$	0.9772
甜菜夜蛾	6.6	$Y = 1.3877X + 3.8457$	0.9969

2.3 Vip3A18 的序列分析

至 2006 年 10 月为止,Bt 杀虫晶体蛋白命名委员会共命名了 21 种 *vip3Aa* 基因。我们应用 ClustalW 软件对其中 20 种 *vip3Aa* 基因进行了比对(由于 *vip3Aa8* 缺少终止子,不是一个完整的基因^[5],因此未进行比对),结果表明 Vip3Aa18 与其它已知的 Vip3Aa 蛋白的同源性在 97% 以上,20 种 Vip3Aa 的系统发育树见图 4。

Vip3Aa18 有 3 个半胱氨酸残基,分别位于 292、401 和 507 位,DISULFIND 预测 292 位和 401 位的半胱氨酸残基会形成二硫键,而它与 Vip3Aa18 蛋白的空间结构、稳定性以及功能的关系尚不清楚。

Estruch 等人发现虽然 Vip3Aa 是一种分泌蛋白,但它不存在 N 端加工去除信号肽的过程,这种情况在 G⁺ 细菌中较为少见,推测它是以一种新的方式分泌出胞外^[1]。我们应用在线软件 SignalP 3.0 分析发现,Vip3Aa 的 N 端含有正电荷区(Asn2 ~

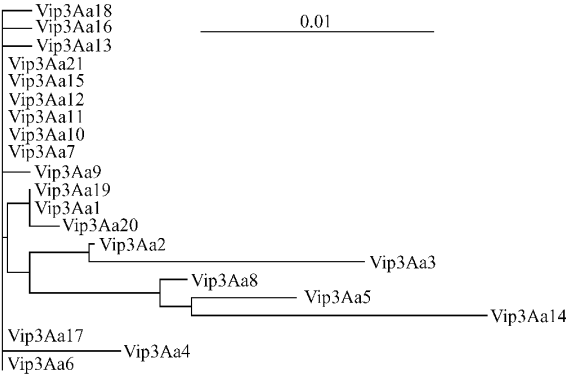


图 4 Vip3Aa 的系统发育树

Lys7)及其相连的疏水核心功能区(Leu8 ~ Ile33),这是与其它芽孢杆菌的信号肽序列相类似的,但它缺少信号肽酶作用位点,不具备典型的信号肽序列;进一步应用在线软件 SecretomeP 2.0 分析发现 Vip3A 的分泌属于非典型的分泌方式(non-classical protein secretion)。

我们应用 CDD 和 SMART 分析发现 Vip3Aa18 的 536 ~ 667 位氨基酸残基间是一个糖类结合域(Carbohydrate binding domain,CBM_4_9)。Burton 等人曾报道 Cry1Ac 的结构域 III 中的类凝集素折叠(Lectin-like Fold)与纤维单胞菌(*Cellulomonas fimi*)的内切 β -1,4-葡聚糖酶上的纤维素结合域(cellulose binding domain,也是一种糖类结合域)十分相似,他们将推测的糖类结合位点进行突变,证实了 Cry1Ac 的类凝集素折叠是与其受体氨肽酶上糖链结合的关键区^[6]。2005 年,Aroian 研究组在国际权威杂志 Science 上报导了 Bt 毒素一类新的受体——鞘糖脂,并明确指出了糖类分子在 Bt 毒素与受体结合过程中起重要作用,他们认为糖类分子可能是 Bt 毒素的一种普遍受体^[7]。据此我们推测 Vip3Aa 蛋白的糖类结构域可能与其结合特异受体密切相关。Selvapandiyar 等人 C 端缺失实验结果也与我们的这种推测相符,缺失 C 端 154 个氨基酸对稻螟的毒力有所降低是因为该结构域还有部分功能,删除 C 端 220 个氨基酸对稻螟不表现毒性是因为该结构域已被完全破坏^[3]。

此外,我们应用 Tmap、TMpred、DNS 以及 Toppred 等多种软件分析均发现,Vip3Aa 的 272 ~ 297 位氨基酸残基可能会形成一个跨膜区,推测该区域可能与 Vip3Aa 固有的穿孔特性有关^[8]。

Vip3Aa 被誉为“第二代”杀虫蛋白,但由于其蛋

白结构尚不清楚,给 Vip3Aa 结构和功能的研究带来一定的困难,因此对 Vip3Aa 的了解还远不及以 Cry1 为代表的杀虫晶体蛋白,这也制约了 Vip3Aa 的理论研究及其推广应用。我们通过生物信息学的方法对 Vip3Aa 的结构和功能进行预测,希望发现与其毒力相关的关键结构域和位点,为揭示 Vip3Aa 的结构和功能,阐明其杀虫机理,延缓 Bt 的抗性提供科学依据。有关糖类结合域、跨膜区和二硫键突变后对 Vip3Aa 功能的影响将在后续文章中报道。

参考文献

[1] Estruch J J, Warren G W, Mullins M A, *et al.* Proceedings of the

National Academy of Science, 1996, **93**(11): 5389 ~ 5394.

[2] Yu C, Mullins M A, Gregory W, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63**: 532 ~ 536.

[3] Selvapandiyar A, Arora N, Rajagopal R, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**: 5855 ~ 5858.

[4] 蔡峻,关彬,陈月华,等.微生物学通报 2004 **31**(4): 1 ~ 4.

[5] Rang C, Gil P, Neisner Nathalie, Jeroen Van Rie. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**: 6276 ~ 6281.

[6] Burton S L, Ellar D J, Li J, *et al.* Journal of Molecular Biology. 1999, **287**: 1011 ~ 1022.

[7] Griffiths J S, Haslam S M, Yang T, *et al.* Science, 2005, **307**: 922 ~ 925.

[8] Lee M K, Walters F S, Hart H, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**: 4648 ~ 4657.