

核型多角体病毒 *p74* 基因在苏云金芽胞杆菌中的表达

叶湘漓^{1,2}, 夏立秋¹

(¹湖南师范大学生命科学学院微生物分子生物学湖南省重点实验室, 长沙 410081; ²湖南师范大学医学院, 长沙 410013)

摘要: 【目的】利用核型多角体病毒 (NPV) 的 *p74* 基因与苏云金芽胞杆菌 (Bt) 的 *cryIAc* 基因构建融合基因 *cryIAc-p74*, 构建具有广谱杀虫作用的工程菌。【方法】从 Bt 4.0718 菌株中克隆 *cryIAc* 基因及其终止子 *cryIAct*, 从苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (AcMNPV) 中克隆 *p74* 基因, 以 pMD-T 作为大肠杆菌亚克隆载体, 分别构建含有目的基因片段的 T 载体 pT1Ac、pTp74、pT1Act 以及中间载体 pT1Act、pTp74Act, 获得携带有目的融合基因 *cryIAc-p74* 的表达载体 pH1Acp74; 该表达载体电转化至 Bt 无晶体突变株 XBU001, 得到目的重组菌株 XBU-H1Acp74。【结果】XBU-H1Acp74 可表达 130 kD 的 Cry1Ac 蛋白和 50 kD 的 P74 蛋白, 生测显示 P74 蛋白可以协同 Cry1Ac 的杀虫效果。【结论】本研究成功构建了 *cryIAc* 基因与 *p74* 基因融合的 Bt 工程菌, 为进一步研究和构建新型生物杀虫剂的工程菌株, 研制出高效、广谱、安全的杀虫剂提供了新的技术途径。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 核型多角体病毒; *cryIAc* 基因; *p74* 基因; 融合基因

Study on the Expression of *p74* Gene of Nuclear Polyhedrosis Virus in *Bacillus thuringiensis*

YE Xiang-li^{1,2}, XIA Li-qiu¹

(¹ Key Laboratory of Microbial Biology of Hunan Province, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081; ² College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013)

Abstract: 【Objective】 This study was conducted to build a recombinant strain with highly insecticidal activity and a wide host range by using the *cryIAc* gene and *p74* gene. 【Method】 Firstly, the *p74* gene was amplified from the genome of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, the *cryIAc* gene and the terminator gene of *cryIAc*, named *cryIAct*, were amplified from the plasmid of Bt 4.0718 strain. Three T vectors, named pTp74, pT1Ac and pT1Act which held the aimed gene *p74*, *cryIAc* and *cryIAct*, respectively, and two middle vectors, named pTp74Act and pT1Acp74 which held the aimed fusion gene *p74-cryIAct* and *cryIAc-p74*, respectively, were built by using pMD18-T. Then pT1Acp74 and the shuttle plasmid were digested and linked, and an expressing-vector pH1Acp74 was built. Finally, pH1Acp74 was transformed into the acrySTALLIFEROUS strain XBU001 and the aimed recombinant strain XBU-H1Acp74 were obtained. 【Result】 The expression of Bt transformant XBU-H1Acp74 was analyzed by SDS-PAGE, which showed XBU-H1Acp74 could produce 130 kD Cry1Ac protein and 50 kD P74 protein. The insecticidal activity of transformant against *Helicoverpa armigera* Hubner was evaluated compared with the contrast strains HTX-42 (only *cryIAc* gene was transformed into XBU001) after autolysis. The LC₅₀ of HTX-42 was higher than the XBU-H1Acp74's, which implied that P74 could increase the efficacy and range of Bt Cry toxins in insect control. 【Conclusion】 This work constructed the fusion gene of *cryIAc* and *p74* successfully, which made a good ground for constructing the fusion genes of Bt *cry* gene and other foreign genes.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus; *cryIAc* gene; *p74* gene; fusing gene

收稿日期: 2008-04-28; 接受日期: 2008-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870064, 30670052)、国家“863”项目 (2006AA02Z187)、国家博士点基金项目 (20060542006)、湖南省自然科学基金项目 (06JJ50062, 06JJ2009)

作者简介: 叶湘漓 (1970—), 男, 湖南长沙人, 研究方向为微生物分子生物学。Tel: 13574868469; E-mail: ye_xiangli@yahoo.com.cn. 通信作者夏立秋 (1955—), 男, 湖南安乡人, 教授, 研究方向为微生物分子生物学。Tel: 0731-8872298; E-mail: xialiq@hunnu.edu.cn

0 引言

【研究意义】苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫剂是目前世界上用途最广、产量最大的微生物杀虫剂, 其杀虫活性源于芽胞形成时期产生的杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs), 其中应用于农业生产的主要是 δ -内毒素; 毒素通过与敏感昆虫中肠上皮细胞刷状缘膜泡 (brush border membrane vesicle, BBMV) 的特异性受体结合, 在胞膜上形成孔道, 造成细胞裂解、肠黏膜损伤, 最终昆虫幼虫因厌食而死亡^[1-7]; Bt 杀虫剂能有效地控制农作物和植物的病害、虫害, 又能显著降低对人、畜以及害虫天敌的毒害作用, 且开发周期较短 (约为化学杀虫剂的 1/3), 开发费用较低廉 (约为化学杀虫剂的 1/40), 故其经济、社会和生态效益越来越受到世界各国的重视; 不过, Bt 杀虫剂亦存在一系列的缺陷, 如杀虫谱相对较窄、杀虫效果和速杀效果明显低于化学杀虫剂、杀虫残效期短、能够诱导昆虫产生抗性; 因此, 利用遗传工程技术, 提高 Bt 的杀虫效率、拓宽其杀虫谱成为 Bt 研究的重要方向。【前人研究进展】Bt 的杀虫活性主要决定于杀虫晶体蛋白的毒力、种类和表达量, 通过不同杀虫蛋白之间的协同增效作用、杀虫晶体蛋白的改造、辅助蛋白的利用、外源毒力基因的导入等^[8], 使毒素蛋白的表达量增加、蛋白毒力增强, 继而提高杀虫活性是 Bt 杀虫剂研究的重要途径之一; 绝大部分的野生 Bt 菌株只对某一类昆虫有活性, 而在田间作物上往往是多种害虫同时为害, 将不同宿主范围的 ICPs 基因进行体外重组, 构建具有广谱杀虫活性的工程菌, 成为 Bt 杀虫剂研究的另一条重要途径; 此外, 还有将 Bt 的 ICPs 基因转入不同的微生物 (如荧光假单胞菌、豌豆根瘤菌以及球形芽孢杆菌等) 或导入农作物以产生抗虫植物等的报道。核型多角体病毒 (nuclear polyhedrosis virus, NPV) 是一类以节肢动物为宿主的昆虫杆状病毒, 其侵染的宿主涉及到不同目的数百种昆虫, 尤其是鳞翅目昆虫 (烟草夜蛾、棉铃虫等), 但对人、畜及环境安全, 故往往作为病毒杀虫剂应用于虫害的生物防治; 近年来, 利用基因工程改良 NPV 等病毒杀虫剂逐渐成为国内外应用研究的热点, 如在病毒基因组中插入 Bt δ -内毒素、蝎毒素、北非蝎神经毒素、麦秆蒲螨神经毒素、蜘蛛毒素等毒素基因以及利尿激素、保幼激素酯酶、羽化激素、蜕皮激素等激素基因, 以构建重组病毒杀虫剂^[9-10]。不过目前的研究很少有将病毒基因转入 Bt、

病毒基因与 *cry* 基因融合共表达的。【本研究切入点】自然环境中, NPV 以包涵体形式存在, 当包涵体被昆虫吞食而进入肠道后, 通过与宿主的中肠细胞融合使核衣壳进入宿主中肠上皮细胞而触发病毒的初级感染; P74 蛋白是迄今发现并得到证实的、能与敏感宿主的 BBMV 相互作用、决定病毒初级感染以及病毒宿主范围的结构蛋白^[11-21]。利用 P74 蛋白的膜融合功能, 改善 Bt 杀虫晶体蛋白的膜融合机制, 就可能在毒力没有发生改变的前提下扩大 Bt 杀虫晶体蛋白的杀虫范围, 从而可以构建出一种具有广谱杀虫作用的新型 Bt 工程菌株。【拟解决的关键问题】构建 *cryIAC-p74* 融合基因片段, 为 Bt 的晶体毒蛋白基因与其它外源基因构建融合基因^[22-25], 以获得具有更高杀虫毒力、更广杀虫谱的工程菌株的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株、菌株和质粒 苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) 由武汉大学生命科学院提供; 苏云金芽孢杆菌 Bt 4.0718 菌株 (CCTCC No.M200016) 为湖南师范大学生命科学学院微生物分子生物学湖南省重点实验室选育; *E.coli* DH5 α 用作亚克隆宿主菌, 该菌株不含限制性内切酶和甲基化酶, 对氨苄青霉素和四环素敏感; 菌株 XBU001 (即 Bt 无晶体突变株) 和菌株 HTX-42 (即 *cryIAC* 单价转 XBU001) 为湖南师范大学生命科学学院微生物分子生物学湖南省重点实验室保藏, 是 Bt 表达宿主菌; pUC19 作为大肠杆菌亚克隆载体; pH7304 是穿梭载体, 作为融合基因表达载体; 其它菌株与质粒均为研究中构建所得 (表 1)。

1.1.2 试剂与工具酶 TaKaRa Pyrobest Taq、Ex Taq、限制性内切酶以及质粒载体 pMD18-T 等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; T₄ DNA 连接酶购自 MBI 公司; 质粒小样快速提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物的设计及合成 PCR 引物由北京奥科生物工程技术有限公司合成 (表 2)。

1.2 方法

1.2.1 *p74* 基因的克隆 将 AcMNPV 的包涵体原液用灭菌双蒸水稀释成病毒悬液, 滴加到人工饲料中 (终

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characterization	来源 Resource
菌株 Strains		
DH5 α	大肠杆菌 DH5 α 菌株 <i>E.coli</i> DH5 α strain	实验室保藏 Lab store
Bt 4.0718	Bt 4.0718 野生菌株 (CCTCC No.200016) Bt strain wild type (CCTCC No.200016)	实验室保藏 Lab store
XBU001	Bt 无晶体突变株 Bt acrySTALLIFEROUS strain	实验室保藏 Lab store
HTX-42	HTX-42 菌株 Bt HTX-42 strain	实验室保藏 Lab store
T1Ac	携带 pT1Ac 的 DH5 α 菌株 DH5 α strain containing pT1Ac	本研究构建 This work
TP74	携带 pTP74 的 DH5 α 菌株 DH5 α strain containing pTP74	本研究构建 This work
T1Act	携带 pT1Act 的 DH5 α 菌株 DH5 α strain containing pT1Act	本研究构建 This work
TP74Act	携带 pTP74Act 的 DH5 α 菌株 DH5 α strain containing pTP74Act	本研究构建 This work
T1Acp74	携带 pT1Acp74 的 DH5 α 菌株 DH5 α strain containing pT1Acp74	本研究构建 This work
H1Acp74	携带 pH1Acp74 的 DH5 α 菌株 DH5 α strain containing pH1Acp74	本研究构建 This work
XBU-H1Acp74	携带 pH1Acp74 的重组 XBU001 工程菌株 Transformant XBU001 stain containing pH1Acp74	本研究构建 This work
质粒 Plasmid		
pMD18-T	具有氨苄青霉素 (Amp) 抗性的克隆载体 Amp ^r , Cloning vector	TaKaRa 公司 TaKaRa Co.
pHT304	具有氨苄青霉素 (Amp) 抗性和红霉素 (Erm) 抗性的穿梭载体 Amp ^r and Erm ^r , shuttle vector of <i>E.coli</i> and Bt	实验室保藏 Lab store
pT1Ac	含有 <i>cryIAc</i> 基因上游启动序列及 ORF (3.9 kb) 的 T 载体 pMD18-T carried 3.9 kb fragment of <i>cryIAc</i> promoter and ORF	本研究构建 This work
pTP74	含有 <i>p74</i> 基因 ORF (1.9 kb) 的 T 载体 pMD18-T carried 1.9 kb fragment of <i>p74</i> ORF	本研究构建 This work
pT1Act	含有 <i>cryIAc</i> 基因终止子 <i>cryIAct</i> (0.3 kb) 的 T 载体 pMD18-T carried 0.3 kb fragment of <i>cryIAc</i> terminator, named <i>cryIAct</i>	本研究构建 This work
pTP74Act	含有 <i>p74</i> 基因 ORF 及 <i>cryIAct</i> (2.2 kb) 的 T 载体 pMD18-T carried 2.2 kb fragment containing <i>p74</i> ORF and <i>cryIAct</i>	本研究构建 This work
pT1Acp74	含有 <i>cryIAc</i> 基因启动子、 <i>p74</i> 基因 ORF 及 <i>cryIAct</i> (6.2 kb) 的 T 载体 pMD18-T carried 6.2 kb fragment containing <i>cryIAc</i> promoter and ORF, <i>p74</i> ORF and <i>cryIAct</i>	本研究构建 This work
pH1Acp74	含有 <i>cryIAc</i> 基因启动子、 <i>p74</i> 基因 ORF 及 <i>cryIAct</i> (6.2 kb) 的穿梭载体 pHT304 carried 6.2 kb fragment containing <i>cryIAc</i> promoter and ORF, <i>p74</i> ORF and <i>cryIAct</i>	本研究构建 This work

表 2 寡核苷酸引物序列

Table 2 Nucleotide sequences of oligonucleotide primers

引物 Primer	序列 Sequence
<i>cryIAc</i> -F	5'ACGCGCATTCTGTCAGGTAAATGGTTC 3'
<i>cryIAc</i> -R	5'GCGCAGATCTAGATTCCTCCATAAGGAGTAA 3'
<i>p74</i> -F	5'CCTAAGATCTATGGCGGTTTTAACAG 3'
<i>p74</i> -R	5'GCTGAACCATGGTAAAAATAACAAATC 3'
<i>p74</i> -F3	5'CCTAAGATCTATGGCGGTTTTAACAGCCG 3'
<i>cryIAct</i> -F	5'ACGCGGATCCCAAAAACACCCTATTAGT 3'
<i>cryIAct</i> -R	5'ACGCCCATGGTCTCATGCAAACTCA 3'

浓度为 10^6 PIBs/g), 饲喂 3~4 龄棉铃虫幼虫; 感染病毒的死虫经 PBS 浸泡、匀浆后, 300 r/min 离心 3 min

去掉细胞碎片, 10 000 r/min 离心 3 min 沉淀多角体, 然后经 45%~65%蔗糖梯度离心, 取出多角体带, 洗糖 3 次; 取纯化的多角体病毒悬液 (10^9 PIB/ml) 600 μ l, 加入 NaOH ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 15 μ l 碱解多角体, 室温放置 15 min; 待悬液透亮后, 加入 100 μ l SDS (10%) 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h; 加入等体积的酚/氯仿抽提 4 次; 12 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清, 弃沉淀; 加入 1/10 体积的乙酸钠和等体积的异丙醇, -20 $^{\circ}$ C 下放置 DNA; 12 000 r/min 离心 10 min, 保留沉淀, 去除上清; 加入 800 μ l 70%乙醇清洗沉淀两次, 室温晾干; 加入 100 μ l TE, 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min 以上溶解 DNA 沉淀, -20 $^{\circ}$ C 保存。

以 AcMNPV 的基因组为模板, PCR 扩增 *p74* 基

因 (GenBank 登录号: L22858)。

1.2.2 *cryIac* 基因和 *cryIac* 基因终止子 *cryIact* 的克隆 将 Bt4.0718 菌株先于 LB 斜面 30℃ 活化 8 h, 后接种于 30 ml LB 培养基中, 30℃ 200 r/min 摇床培养; 当 OD 值为 0.7 时, 离心收集菌体; 用试剂盒提取质粒, -20℃ 保存。

以提取的质粒为模板分别 PCR 扩增含有上游启动序列的 *cryIac* 基因和含有终止序列的终止子 *cryIact*。

1.2.3 融合基因片段的 TA 克隆 TA 克隆反应体系为: pMD18-T Vector 0.5 μl, Insert DNA 4.5 μl, Ligation Mix 5 μl; 16℃ 反应过夜; 连接产物加入至 100 μl DH5α 感受态细胞中, 冰上放置 30 min; 不超过 42℃ 水浴静置 90~150 s; 快速冰浴 5 min; 加 800 μl LB 培养基轻摇; 37℃ 水浴 1 h; 6 000 r/min 离心 3.5 min 收集菌体; 吸出上清, 加 100 μl LB 培养基重悬细胞; 涂板; 37℃ 培养 16~18 h。随机挑选转化子, 快速裂解检测; 根据快速裂解的结果, 筛选适当转化子进行菌落 PCR 检测, 获得分别携带 *p74* 基因、*cryIac* 基因和 *cryIact* 基因的 TA 克隆 pT1Ac、pTp74 和 pT1Act, 对应的菌株依次为 T1Ac、Tp74 和 T1Act。

1.2.4 中间载体 pTp74Act 和 pT1Acp74 的构建 用 *Sma* I 和 *Nco* I 双酶切 pTp74 和 pT1Act, 回收酶切片段并进行连接, 连接产物转入 DH5α 感受态细胞, 培养过夜; 利用快速裂解筛选适当转化子进行菌落 PCR 检测; 阳性菌株再分别置于 LB 培养基中 37℃ 培养过夜, 提质粒; 以所提质粒为模板 PCR 扩增 *p74-cryIact* 融合基因片段, 获得携带有中间载体 pTp74Act 的菌株 Tp74Act; 再用 *Sal* I 和 *Bgl* II 双酶切 pT1Ac 和中间载体 pTp74Act, 获得携带有中间载体 pT1Acp74 的菌株 T1Acp74, 提质粒, 以所提质粒为模板 PCR 扩增 *cryIac-p74* 融合基因片段。

1.2.5 表达载体 pH1Acp74 的构建及电转化 中间载体 pT1Acp74 和穿梭载体 pHT304 分别用 *Sal* I 和 *Xma* I 双酶切, 获得携带有融合基因 *cryIac-p74* 的表达载体 pH1Acp74, 送上海生工有限公司测序。

取表达载体 pH1Acp74 100 ng 电转化至无晶体突变株 XBU001, 转化条件为 2.0 kV、25 μF、200 Ω, 电击后加入 1 ml BHI 培养基, 30℃ 振荡培养 2 h, 6 000 r/min 离心收集菌体, 涂布于含红霉素的 BHI 平板上, 30℃ 倒置培养 12~16 h。挑取转化子, 筛选并获得含有融合基因的重组菌株 XBU-H1Acp74。

1.2.6 融合基因的 SDS-PAGE 检测 将重组菌株 XBU-

H1Acp74 接种于 Bt 发酵培养基中, 28℃、200 r/min 培养 72 h, 液体双相法分离伴孢晶体, 提纯的晶体进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.7 多克隆抗体的制备和检测

1.2.7.1 兔抗血清的制备 将纯化过的 P74 蛋白与适当体积的 PBS 溶液混合, 加入等体积佐剂, 混匀后按照一定时间间隔先后免疫家兔 4 次, 在第 4 次免疫后 3~5 d 内采血; 然后将获得的抗血清转移至已灭菌的 Ep 管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, -80℃ 分装保存。

1.2.7.2 兔抗血清的点杂交检测 取适量硝酸纤维素膜, 剪成 3 条, 分别滴加 1 μl 纯化后的 P74 蛋白, 浓度依次为 1:1、1:10 和 1:100; 再按顺序先分别加入 1:100、1:200、1:400 的特异性抗血清, 室温下结合 2 h, TBST 洗膜 5 次, 每次 15 min; 然后加入酶标第二抗体, 室温下结合 1.5 h, TBST 洗涤 5 次, 每次 15 min; 加入底物显色 DAB 溶液, 避光观察, 若出现印记即终止反应, 膜用蒸馏水冲洗后置于双层滤纸中干燥保存。

1.2.8 融合蛋白的 Western blot 检测 将待检测的融合蛋白进行 SDS-PAGE, 电泳后的凝胶放入转移缓冲液中平衡 30 min, 转膜; 双蒸水漂洗 1~2 min, 将膜转入塑料袋, 加入第一抗体, 室温孵育 1~2 h; 用镊子将膜取出, 加 TBST 漂洗 3 次, 每次 15 min; 再加入酶标第二抗体, 室温孵育 1 h, 洗膜; 加底物显色液; 终止反应, 膜用蒸馏水冲洗, 干燥保存。

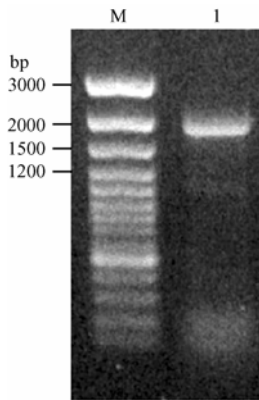
1.2.9 重组菌株的杀虫毒力生测 生测样品分别为 XBU-H1Acp74 菌株 (即 *p74* 与 *cryIac* 双价转 XBU001 工程菌) 发酵纯化的重组晶体和 HTX-42 菌株 (即 *cryIac* 单价转 XBU001, 实验室保存) 发酵纯化的 *CryIac* 晶体, 按标准生测方法配置饲料, 将样品稀释成不同的浓度, 与一定的饲料混合均匀, 采用 24 孔培养板对菌体超声波悬液进行生物活性测定。试验用虫采用棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*), 每个浓度接初孵幼虫 48 条, 每个处理重复 3 次, 幼虫在 28℃、60% 湿度的光照培养箱中培养, 生测条件为相对湿度 80%, 温度 (27±1)℃, 光: 黑周期为 16:8, 48 h 和 72 h 统计致死率。采用 DPS5.0 生物统计学软件分析工程菌的 LC₅₀ 值。

2 结果与分析

2.1 *p74* 基因、*cryIac* 基因和 *cryIact* 的克隆

2.1.1 *p74* 片段的 TA 克隆和 pTp74 的构建 根据克

隆需要, 设计引物 *p74* 上游和 *p74* 下游分别带有 *Bgl* II 和 *Nco* I 酶切位点, PCR 扩增结果见图 1, *P74* 基因的理论值为 1 937 bp, 电泳结果与理论值符合。克隆后的 *p74* 基因片段加 A 尾, 进行 TA 克隆。筛选适当转化子, 提质粒, 以所提质粒为模板扩增 *p74* 基因, 结果为阳性的菌株即为携带 *p74* 基因的 T 载体 pTp74。



M: 分子量标准; 1: *p74* 基因的 PCR 扩增片段 (1 937 bp)
M: Molecular weight marker; 1: *p74* PCR amplification product (1 937 bp)

图 1 以 AcNPV 基因组为模板 PCR 扩增 *p74*

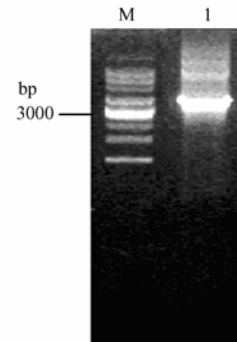
Fig. 1 PCR amplification of *p74* gene as template of the genome from AcNPV

2.1.2 *cryIac* 基因的 TA 克隆和 pT1Ac 的构建 通过登录 GenBank 查找 *cryIac* 基因的序列, 比较多种 *cryIac* 基因序列的 5' 端上游启动序列和 3' 端 TAG 序列的同源性设计引物, 扩增目的片段; 含有上游启动序列的 *cryIac* 的正向引物和反向引物分别带有 *Sal* I 和 *Bgl* II 的酶切位点。 *cryIac* 基因的大小为 3.9 kb, 电泳结果与理论值符合 (图 2)。克隆后的 *cryIac* 基因片段加 A 尾, 进行 TA 克隆。筛选适当转化子, 提质粒, 以所提质粒为模板扩增 *cryIac* 基因, 结果为阳性的菌株即为携带 *cryIac* 基因的 T 载体 pT1Ac。

2.1.3 *cryIact* 的 TA 克隆和 pT1Act 的构建 根据克隆需要, 设计引物 *cryIact* 上游和下游分别带有 *Nco* I 和 *Xma* I 酶切位点, PCR 扩增结果见图 3, *cryIact* 基因的理论值为 0.3 kb, 电泳结果与理论值符合。克隆后的 *cryIact* 基因片段加 A 尾, 进行 TA 克隆。筛选适当转化子提质粒; 以所提质粒为模板扩增 *cryIact*, 结果仍为阳性的菌株即为携带 *cryIact* 的 T 载体 pT1Act。

2.2 中间载体 pTp74Act 和 pT1Acp74 的构建

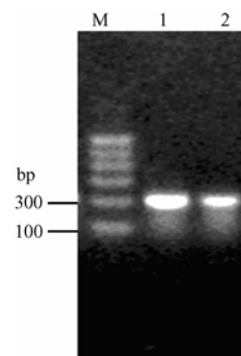
中间载体 pTp74Act 携带 *p74-cryIact* 融合基因片



M: 分子量标准; 1: *cryIac* 扩增片段 (3.9 kb)
M: Molecular weight marker; 1: PCR fragment of *cryIac* gene (3.9 kb)

图 2 以 Bt4.0718 菌株中提取的质粒为模板 PCR 扩增含有上游启动序列的 *cryIac* 基因

Fig. 2 PCR amplification of *cryIac* gene with the upstream promoter region as template of the plasmid from Bt4.0718



M: 分子量标准; 1、2: *cryIact* (0.3 kb)
M: Molecular weight marker; 1, 2: *cryIact* gene (0.3 kb)

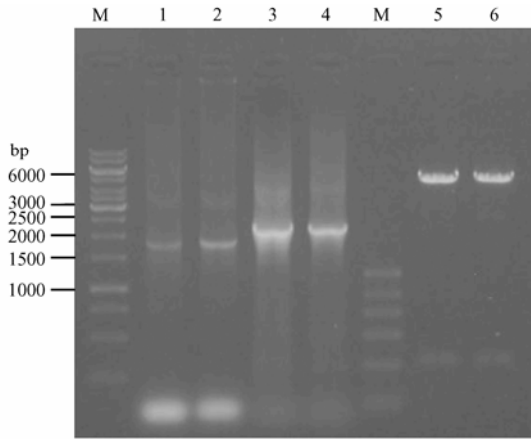
图 3 以 Bt4.0718 菌株中提取的质粒为模板 PCR 扩增 *cryIac* 终止子 *cryIact*

Fig. 3 PCR amplification of the terminator of *cryIac* gene, named *cryIact*, as template of the plasmid from Bt4.0718

段, 大小约为 2.2 kb; 中间载体 pT1Acp74 携带 *p74-cryIac* 融合基因, 大小约为 6.1 kb, 电泳结果与理论值符合, 融合基因的构建完成 (图 4)。

2.3 表达载体 pH1Acp74 的构建、测序与电转化

中间载体 pT1Acp74 经 *Sal* I 和 *Xma* I 双酶切, 回收融合基因片段, 将其克隆进穿梭载体 pHT304 中, 经蓝白斑筛选, 获得表达载体 pH1Acp74; 对 pH1Acp74 测序, 并进行 Blast 分析, 结果表明克隆的 *cryIac* 的



M: 分子量标准; 1、2: 以 pTp74Act、pT1Acp74 质粒为模板 PCR 扩增 *p74* 基因; 3、4: 以 pTp74Act、pT1Acp74 质粒为模板 PCR 扩增 *p74-cryIAct* 融合基因; 5、6: 以 pTp74Act、pT1Acp74 质粒为模板 PCR 扩增 *cryIAc-p74* 融合基因
 M: Molecular weight marker; 1, 2: PCR amplification of *p74* gene as template of pTp74Act、pT1Acp74; 3, 4: PCR amplification of *p74-cryIAct* fusing gene as template of pTp74Act、pT1Acp74; 5, 6: PCR amplification of *cryIAc-p74* fusing gene as template of pTp74Act、pT1Acp74

图 4 中间载体 pTp74Act、pT1Acp74 的 PCR 检测

Fig. 4 Examination of the middle-vectors pTp74Act and pT1Acp74 by PCR

ORF 序列与 GenBank 中注册号 M73248 的序列 100% 同源, *p74* 基因 (GenBank 登录号: L22858) 记入序列和设计的也相同, 并且在克隆过程中没有出现移码和突变现象。

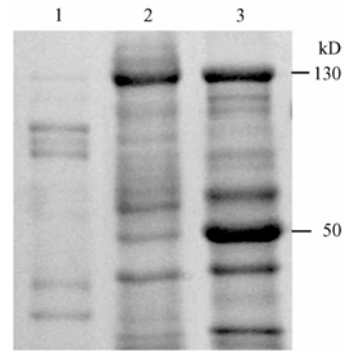
pH1Acp74 电转化至无晶体突变株 XBU001 中, 获得重组菌株 XBU-H1Acp74。通过红霉素抗性平板筛选, 对克隆子进行菌落 PCR 鉴定, 能扩增出融合基因片段, 证明融合基因表达载体已转入无晶体突变株 XBU001 中。

2.4 融合基因的 SDS-PAGE 检测

重组菌株 XBU-H1Acp74 分别表达了 130 kD 的 Cry1Ac 蛋白和 50 kD 的 P74 蛋白; 而在对照菌株中, HTX-42 没有 P74 蛋白的 50 kD 带, XBU001 则两个目标蛋白带都没有。重组菌株虽然没有表达出理论上的 180 kD 左右的融合蛋白, 但其总蛋白表达量明显增强; 推测融合蛋白可能在菌株内发生了降解或者在制备 SDS-PAGE 样品时发生了降解, 从而形成 130 kD 的 Cry1Ac 蛋白、50 kD 的 P74 蛋白以及若干降解的融合蛋白小分子片段 (图 5)。

2.5 融合蛋白的 Western blot 检测

用纯化的 P74 蛋白作为抗原检测制备的兔抗血清的效价, 1、2、3 号硝酸纤维素膜上 P74 蛋白的浓度



1: XBU001 菌株发酵液; 2: HTX-42 菌株发酵液; 3: XBU-H1Acp74 菌株发酵液
 1: *Bt acrySTALLIFEROUS* strain XBU001; 2: HTX-42; 3: Transformant XBU-H1Acp74

图 5 转化子 XBU-H1Acp74 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of transformants XBU-H1Acp74

依次为 1 : 1、1 : 10、1 : 100, 分别与不同稀释度 (1 : 100、1 : 200、1 : 400) 的兔抗血清结合, 结果显示, 当兔抗血清的稀释度为 1 : 400 时, 仍能与 P74 蛋白发生明显结合, 表明制备的兔抗血清效价比较高, 可以用于融合蛋白的 Western blot 检测 (图 6)。

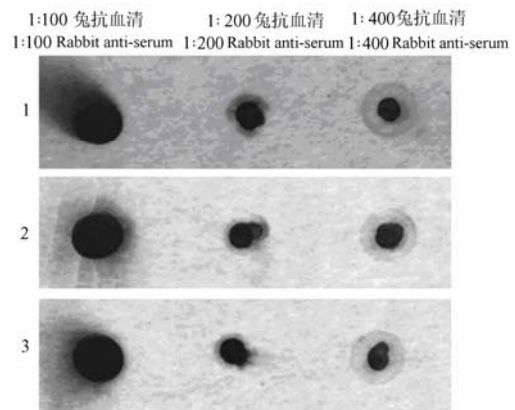


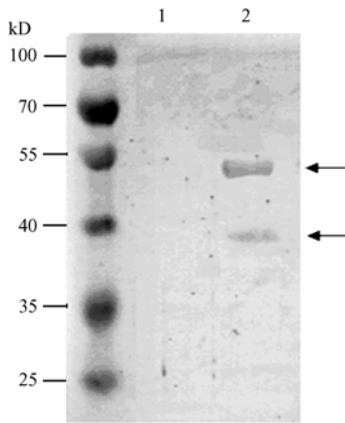
图 6 P74 蛋白抗血清的点杂交检测

Fig. 6 Dot-blot analysis of P74 antibody

重组菌株 XBU-H1Acp74 的 48 h 发酵液中的表达产物处理用兔抗-P74 血清进行 Western blot 检测, 结果显示重组菌株表达的产物有两条较明显的杂交带, 分子量约 50 kD 和 40 kD, 表明融合蛋白已经在重组菌株中表达, 但已经发生降解 (图 7)。

2.6 重组菌株 XBU-H1Acp74 的生物活性测定

无晶体突变株 XBU001 没有晶体产生, 对初孵棉



M: 分子量标准; 1: HTX-42 菌株的表达蛋白; 2: 重组菌株 XBU-H1Acp74 的表达蛋白

M: Marker; 1: Proteins of HTX-42 strain; 2: Proteins of XBU-H1Acp74

图 7 Western blot 检测重组菌株表达蛋白

Fig. 7 Western blot analysis of recombinant proteins

铃虫基本上无毒杀作用。HTX-42 对初孵棉铃虫在 48 h 的生测 LC_{50} 是 $116.4880 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 72 h 的生测 LC_{50} 是 $90.7526 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; XBU-H1Acp74 对初孵棉铃虫在 48 h 的生物 LC_{50} 是 $47.6240 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 72 h 的生物 LC_{50} 是 $29.0782 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。XBU-H1Acp74 比 HTX-42 对棉铃虫的生测毒力要在 48 h 高 2.4 倍, 在 72 h 要高 3.1 倍; 表明随着时间的延长, P74 对 Cry1Ac 杀虫效果的协同作用也越显著 (表 3)。

表 3 工程菌 XBU-H1Acp74 对初孵棉铃虫的毒力

Table 3 Bioassay of XBU-H1Acp74 against first instar *Spodoptera exigua* Hubner larvae

生测样品	48 h 的生测 LC_{50}	72 h 的生测 LC_{50}
Sample	48 h of LC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	72 h of LC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
HTX-42	116.4880	90.7526
XBU-H1Acp74	47.6241	29.0782

3 讨论

3.1 生物杀虫剂杀虫效率的决定因素

生物杀虫剂的杀虫效率取决于两个方面的因素:

(1) 生物杀虫剂本身毒力的强弱, 即在作用浓度相同的前提下, 能否最大量的杀死害虫。一般说来, 毒力越强, 杀虫的性能就越高, 毒力越弱, 其杀虫的性能也就越低; 而毒力的强弱与毒素有关, 目前研制的重组 Bt 杀虫剂就是希望通过 DNA 重组技术, 借助插入

的外源基因来增强 Bt 毒力, 从而达到增强 Bt 杀虫效果、缩短害虫致死时间、减少作物受害的目的; 这是当前重组 Bt 杀虫剂的主要研究途径。(2) 生物杀虫剂本身作用的广谱性, 即在作用浓度相同的前提下, 能否最大范围的杀死不同种类的昆虫。作用的广谱性往往与昆虫对毒素的内在敏感性有关, 包括中肠液的 pH 环境、蛋白酶活性的高低以及毒素受体的类型、数量等, 其中主要又与毒素受体的类型、数量有关。Bt 的毒蛋白至少有 134 个亚类, 它们之间一级结构的差异以及与昆虫中肠上皮细胞受体结合种类、能力的差异是影响杀虫晶体蛋白毒力和杀虫特异性的两个重要因素。在本研究中, 重组菌株 XBU-H1Acp74 与对照菌株 HTX-42 比较, 毒性基因并没有发生变化, 都是由 Cry1Ac 晶体蛋白决定的; 但二者对初孵棉铃虫的毒力却有明显差异, 原因即与 P74 蛋白的膜融合功能有关, P74 蛋白虽然没有增强重组菌株的毒力, 但却改善了 Cry1Ac 毒素与昆虫中肠相应受体的相互结合, 从而使 Cry1Ac 的毒杀效率得到增强, 因此, 通过改变毒素与其受体的结合而增强毒杀效果也是重组 Bt 杀虫剂研究的重要途径之一。

3.2 昆虫的中肠受体蛋白与“共同受体”

有关昆虫中肠受体蛋白的性质、种类、结构及功能等尚处于研究中, 不过受体蛋白与 Bt 毒素作用的发挥存在重要关联是勿容置疑的。受体蛋白与 Bt 毒素的作用效果直接相关, 虽然 Bt 毒素与受体蛋白能够结合并不一定意味着毒性的产生及毒性的高低, 但 Bt 毒素若不能够与受体蛋白进行结合则肯定不能产生毒性, 中肠受体蛋白的存在是 Bt 毒素发生作用的物质基础。而昆虫抗性的形成、变化与消失也与受体蛋白的数目、结合位点以及亲和性的改变等存在密切的联系, 这从另一个角度反映出受体蛋白的重要性。

那么, 昆虫的中肠受体蛋白在不同种类的昆虫中是否具有相似性呢? 其对不同毒素蛋白是否会表现出多样性呢? 受体蛋白在毒素蛋白的作用过程中除了结合作用之外是否还担当着其它什么作用呢? 所有这些都还有待进一步探讨。但可以肯定的是, 在相同种类的昆虫中是可以找到相同或者相似的受体蛋白的, 因此它们可以接受同一种或同一类 Bt 毒素的作用; 而在不同种类的昆虫中可能也存在部分相同或相似的受体蛋白, 本研究中谨称其为“共同受体”或受体蛋白的“共有亚基”, 它们将可以接受同一种或同一类 Bt 毒素的作用, 尽管作用的效果会有所不同。因此, 如果有一种物质, 它能够和这种“共同受体”或受体蛋白的“共

有亚基”进行结合,也就意味着它能够与各种不同类型的昆虫发生作用;而一旦拥有了这种物质,就如同拥有了一片“万能钥匙”,能够开启与各种不同类型昆虫作用的大门,这种“共同受体”的发现与研究可能是未来 Bt 研究的一个重要方向。

3.3 NPV 的 P74 蛋白与病毒宿主的种属特异性

体外结合试验中, P74 蛋白能与敏感宿主的 BBMV 发生可饱和的特异性结合,并且纯化的重组 P74 蛋白还能帮助同种 *p74* 缺陷型病毒包涵体恢复对敏感宿主幼虫的口服感染能力,表明 P74 蛋白与宿主中肠 BBMV 的特异性结合参与了病毒的初级感染,是决定杆状病毒的宿主范围的重要因素。

虽然昆虫杆状病毒本身的宿主专一性较强,杀虫谱较窄,但其宿主范围并非不能改变,如利用 AcMNPV 和 BmNPV (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, 家蚕核型多角体病毒)共转染容许性昆虫细胞,可以获得扩大了宿主域的重组杆状病毒,因此,若选取某些 Bt 原来不能感染或只能弱感染的昆虫的 NPV,利用 P74 蛋白或其它功能相似蛋白的受体结合功能,构建融合蛋白,则可能通过改变毒素的膜融合机制,在毒力没有发生改变的前提下,扩大 Bt 杀虫晶体蛋白的杀虫范围,从而可以构建出一种具有广谱杀虫作用的新型 Bt 工程菌株;倘若选择了两种甚至多种不同宿主范围的 NPV 的 P74 蛋白或其它功能相似蛋白,将其与 Bt 毒素基因构建融合基因,则该 Bt 工程菌株可能获得作用于多种昆虫的能力,其宿主范围也将进一步扩大。

4 结 论

本研究将 NPV 的 *p74* 基因与 Bt 的 *cryIAc* 基因构建融合基因,电转到无晶体突变株 XBU001,融合基因中的 Cry 蛋白与 P74 蛋白都得到了表达。由于人畜消化道与昆虫消化道环境的 pH 不同,融合晶体蛋白在人畜消化道酸性环境中不会溶解,故重组工程菌 XBU-H1Acp74 具有较好的生物安全性,对人、畜等高等动物没有危害,有利于环境保护和生态安全。

References

- [1] Chaturvedi R, Bhakuni V, Tuli R. The δ -endotoxin proteins accumulate in *Escherichia coli* as a protein-DNA complex that can be dissociated by hydrophobic interaction chromatography. *Protein Expression and Purification*, 2000, 20(1): 21-26.
- [2] Coux F, Vachon V, Rang C. Role of interdomain salt bridges in the

- pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(38): 35546-35551.
- [3] Griffiths J S, Whitacre J L, Stevens D E, Aroian R V. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science*, 2001, 293: 860-864.
- [4] Jenkins J L, Lee M K, Valaitis A P. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(19): 14423-14431.
- [5] Sedlak M, Walter T, Aronson A. Regulation by overlapping promoter of the rate of synthesis and deposition into crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Journal of Bacteriology*, 2000, 18: 734-741.
- [6] Ding X Z, Zhang H, Sun Y J, Huang H, Zhang C Y, Xia L Q. Cloning and expression analysis of the cry1Ac gene from *Bacillus thuringiensis* strain 4. 07183. *Acta Laser Biology Sinica*, 2006, 15(6): 563-571.
- [7] 丁学知, 邹先琼, 孙运军, 付祖姣, 高必达, 夏立秋. 苏云金芽孢杆菌 4. 0718 菌株晶体毒素性质的研究. *农业生物技术学报*, 2005, 13(3): 365-371.
- Ding X Z, Zou X Q, Sun Y J, Fu Z J, Gao B D, Xia L Q. Characterization of the insecticidal crystal protoxins from *Bacillus thuringiensis* stain 4. 0718. *Journal of Agriculture Biotechnology*, 2005, 13(3): 365-371. (in Chinese)
- [8] 刘 强, 丁 翠. 昆虫病毒增效蛋白的研究进展. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(3): 326-332.
- Liu Q, Ding C. Progress of the studies on synergistic factors of some insect viruses. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 1995, 5(3): 326-332. (in Chinese)
- [9] 庞 义, 姚 斌, 范云六, 赵荣敏, 王天原, 王珣章, 龙繁新, 庄美宝. 利用蝎毒基因改良杆状病毒杀虫剂. *昆虫天敌*, 1995, 17: 90-92.
- Pang Y, Yao B, Fan Y L, Zhao R M, Wang T Y, Wang X Z, Long Q X, Zhuang M B. Improvement of baculovirus as insecticide by using a scorpion toxin gene. *Natural Enemies of Insects*, 1995, 17: 90-92. (in Chinese)
- [10] 蒋 洪, 韩亚娟, 胡 柳, 张珈敏, 胡远扬. 重组病毒杀虫剂应用研究进展. *昆虫学报*, 2008, 51(3): 322-327.
- Jiang H, Han Y J, Hu L, Zhang J M, Hu Y Y. Advances in application of recombinant insect viruses as biopesticides. *Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51(3): 322-327. (in Chinese)
- [11] Liu D L, Xiao H Z, Qi Y P. Construction and function of the recombinant AcMNPV with two copies of ν -cath gene. *Chinese*

- Science Bulletin*, 2002, 47 (1) 52-57.
- [12] Chen X, Tarchini R. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 241-257.
- [13] 王利群, 沈卫德, 李 兵. 柞蚕 NPV 多角体膜蛋白类似基因的克隆和序列分析. *蚕业科学*, 2006, 32(4): 500-505.
- Wang L Q, Shen W D, Li B. Cloning and sequence analysis of the *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus polyhedral envelope protein gene. *Canye Kexue*, 2006, 32(4): 500-505. (in Chinese)
- [14] 刘 岚, 陈新文, 孙修炼. 棉铃虫单核衣壳核多角体病毒组织蛋白酶基因的序列分析和进化研究. *中国病毒学*, 2001, 16(3): 229-235.
- Liu L, Chen X W, Sun X L. Sequence analysis of the putative v-cathepsin gene of *Heliothis Armigera* single-nucleocapsid baculovirus. *Virologica Sinica*, 2001, 16(3): 229-235. (in Chinese)
- [15] Woo S D, Roh J Y, Choi J Y, Jin B R. Propagation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in nonpermissive insect cell lines. *Journal of Microbiology*, 2007, 45(2): 133-138.
- [16] Woo S D, Choi J Y, Je Y H, Jin B R. Characterization of the *Helicoverpa assulta* nucleopolyhedrovirus genome and sequence analysis of the polyhedrin gene region. *Journal of Biosciences*, 2006, 31(3): 329-338.
- [17] Deng F, Wang R R, Fang M G, Jiang Y J, Xu X S, Wang H Z, Chen X W, Arif B M, Guo L, Wang H L, Hu Z H. Proteomics analysis of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus identified two new occlusion-derived virus-associated proteins, HA44 and HA100. *Journal of Virology*, 2007, 81(17): 9377-93851.
- [18] Long G, Westenberg M, Wang H L, Vlaskovic J M, Hu Z H. Function, oligomerization and N-linked glycosylation of the *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein. *Journal of General Virology*, 2006, 87: 839-846.
- [19] Oliveira J V, Wolff J L, Garcia-Maruniak A, Ribeiro B M, de Castro M E, de Souza M L, Moscardi F, Maruniak J E, Zanotto P M. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 2006, 87: 3233-3250.
- [20] Fujita R, Matsuyama T, Yamagishi J, Sahara K, Asano S, Bando H. Expression of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus genes in mammalian cells and upregulation of the Host β -Actin gene. *Journal of Virology*, 2006, 80(5): 2390-2395.
- [21] Si Y H, Fang M G, Huang Y, Zheng F L, Li T, Hu Z H, Wang H Z. Construction and characterization of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus bacterial artificial chromosome with deletion of ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(10): 2435-2441.
- [22] 王彦华, 侯喜林, 申书兴, 陈雪平, 王 梅. 不结球白菜抗病基因同源序列的克隆及分析. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2621-2626.
- Wang Y H, Hou X L, Shen S X, Chen X P, Wang M. Isolation and characterization of resistant gene analogs from *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(12): 2621-2626. (in Chinese)
- [23] 叶湘漓, 李大力, 钟志宏, 雷立芳. 人类新基因 *netrin-G2* 的初步分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(5): 363-369.
- Ye X L, Li D L, Zhong Z H, Lei L F. Primary analysis of human novel gene *netrin-G2*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 23(5): 363-369. (in Chinese)
- [24] 袁志栋, 王志亮, 刘雨田, 吴晓东, 赵永刚, 刘海生. 水牛朊蛋白成熟片段基因的克隆与原核表达. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2590-2596.
- Yuan Z D, Wang Z L, Liu Y T, Wu X D, Zhao Y G, Liu H S. Cloning, prokaryotic expression of the buffalo mature PrP gene. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(12): 2590-2596. (in Chinese)
- [25] 高国辉, 张传溪. 棉铃虫核型多角体病毒 *sod* 基因在大肠杆菌中的表达. *中国病毒学*, 2003, 18(5): 482-485.
- Gao G H, Zhang C X. Expression of HaSNPV *sod* gene in *E. coli*. *Virologica Sinica*, 2003, 18(5): 482-485. (in Chinese)