



研究报告

Research Report

新载体pBUC3可在营养期表达苏云金芽孢杆菌Cry1Ac31晶体蛋白

刘辰^{1,2}, 张文飞^{1,2}, 周燕¹, 李有志²

1 海南省热带农业资源研究所, 三亚, 572025, 中国;

2 广西大学生命科学与技术学院, 南宁, 530005, 中国

✉ 通讯作者: dyzl@gxu.edu.cn ✉ 作者

基因组学与生物技术, 2012年, 第1卷, 第7篇 doi:10.5376/gb.cn.2012.01.0007

收稿日期: 2012年06月26日

接受日期: 2012年08月07日

发表日期: 2012年08月09日

本文首次以英文发表在 *Bt Research* (2011年第2卷第2期第9-13页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

刘辰等, 2012, 新载体 pBUC3 可在营养期表达苏云金芽孢杆菌 Cry1Ac31 晶体蛋白, 基因组学与生物技术(online) Vol.1 No.7 pp.40-44 (doi: 10.5376/gb.cn.2012.01.0007)

引用格式(英文):

Liu et al., 2012, New Vector pBUC3 can Express *Bt Cry1Ac31* during the Vegetative Phase in *Bacillus thuringiensis*, *Jiyinzuxue Yu Shengwu Jishu* (online) Vol.1 No.7 pp.40-44 (doi: 10.5376/gb.cn.2012.01.0007)

摘要 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*) 的特征是能够在产生芽孢的同时伴随产生伴孢晶体蛋白(parasporal crystal proteins)。为了实现 *Bt cry* 基因的表达不依赖于芽孢形成, 本研究试图设计能在苏云金芽孢杆菌的营养期表达的杀虫晶体蛋白表达载体。首先, 我们以 *cry3Aa* 启动子基因为模板设计了一对特异引物, 从苏云金芽孢杆菌拟步虫甲亚种(*Bt* subsp. *tenebrions*)中扩增出与设计目的片段大小一致的启动子 DNA 片段并测序验证; 然后, 我们将该 DNA 片段平末端连接到穿梭载体 pBU4 上, 构建了一个不依赖芽孢形成并能在营养期表达的新载体 pBUC3。为了验证构建的载体在营养期能否表达 *Bt cry* 基因, 我们将 *cry1Ac31* 基因连接到载体上, 随后通过电击转化, 将含有 *cry1Ac31* 基因的表达载体转入 *Bt* 无晶体突变株 IPS。最后, 利用 PCR、镜检和 SDS-PAGE 进行验证, 结果表明 *cry1Ac31* 基因在菌体生长营养期即得到了表达。我们的研究表明, *cry3Aa* 启动子活性不依赖于芽孢形成, 可能是实现 *cry* 基因在苏云金芽孢杆菌的营养期表达的有用的表达原件。

关键词 苏云金芽孢杆菌; *cry3Aa* 启动子; 营养期表达载体; *cry1Ac31* 表达

New Vector pBUC3 can Express *Bt Cry1Ac31* during the Vegetative Phase in *Bacillus thuringiensis*

Liu Chen^{1,2}, Zhang Wenfei^{1,2}, Zhou Yan¹, Li Youzhi²

1 Hainan Institute of Tropical Agricultural Resources, Sanya, 572025, P.R. China;

2 College of Life and Technology Science, Guangxi University, Nanning, 530004, P.R. China

✉ Corresponding author, dyzl@gxu.edu.cn ✉ Authors

Abstract The feature of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is the ability to generate parasporal crystal protein during the spore-forming process. In order to realize the expression of the *Bt cry* genes independent on spore formation, we attempted to design new vector that could express *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein in the vegetable growth phase in this research. First, we designed a pair of specific primers based on *cry3Aa* promoter gene sequence to amplify *cry3Aa* promoter from *Bt* subsp. *Tenebrions*; then the DNA fragment with blunt-end was ligated to the cross-species vector pBU4 to build new pBUC3 vector which would be non-dependent sporulation vector expressing in the vegetative growth phase of *Bacillus thuringiensis*. In order to validate the vector whether express *Bt cry* gene in the vegetative phase, The *Bt cry1Ac31* gene was ligated to the pBUC3 vector to be transformed into *Bt* non crystal mutant IPS strain by electronic transformation approach. Through the examinations by the PCR, microscopic observation and SDS-PAGE, the results showed that *Bt cry1Ac31* was expressed in cell growth vegetable phase. Our study suggested that the feature of *cry3Aa* promoter being non-dependent on spore formation might be useful expression element that could achieve the *cry* gene of *Bacillus thuringiensis* expressing in vegetative phase.

Keywords *Bacillus thuringiensis*; Parasporal crystal protein; *cry3Aa* promoter; *cry1Ac31*; Vegetative expression vector



众所周知, 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*)的特征是能够在产生芽孢的同时伴随产生伴孢晶体蛋白(parasporal crystal proteins), 也称为杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, 简称 ICPs)。绝大部分杀虫晶体蛋白(ICPs)的表达依赖于芽孢形成, 即只有在芽孢形成期才会产生杀虫晶体蛋白(ICPs) (Liu et al., 2010; Liu et al., 2011)。但 *Cry3Aa* 是一个例外, *Cry3Aa* 蛋白的表达发生在营养期并在芽孢形成期结束(Schnepf et al., 1998)。研究表明, *cry3Aa* 基因的启动子序列不同于其它 *ICP* 基因的启动子, *cry3Aa* 基因的转录依赖于细胞营养期特有的 ζ A 因子。而其它 *ICP* 基因的表达必须得到芽孢形成期 ζ E 因子和 ζ K 因子的激活才能进行(Schnepf et al., 1998)。那么, 是否可以利用 *cry3Aa* 基因的启动子来驱动其它的 *cry* 基因表达杀虫晶体蛋白, 从而实现在苏云金芽孢杆菌的营养期表达伴孢晶体蛋白呢?

本研究试图设计一个能在苏云金芽孢杆菌的营养期表达的杀虫晶体蛋白表达载体。为此, 选用了苏云金芽孢杆菌拟步虫甲亚种(*Bt* subsp. *Tenebrions*, *Btt*)的 DNA 作为模板, 根据已知 *cry3Aa* 基因启动子设计了一对引物(C3-5 和 C3-3), 利用 PCR 方法扩增出了目的片段为 575 bp 的 DNA 片段, 并将该片段克隆到 pBU4 载体上建成一个 pBUC3 载体。随后, 我们将 *cry1Ac31* 基因连接到 pBUC3 载体中, 最后, 将含有 *cry1Ac31* 基因的表达载体通过电脉冲转化法转入 *Bt* 无晶体突变株 IPS, 通过 PCR、镜检和 SDS-PAGE 进行验证, 为进一步开展多基因的表达提供新的途径。

1 结果与分析

1.1 *cry3Aa* 启动子基因的获得

我们设计一对引物 C3-5/C3-3, 利用 *Pfu* DNA 聚合酶, 以 *Btt* 的 DNA 模板进行 PCR 扩增获得 575 bp 目的片段(图 1)。测序测定分析表明该片段的-35 区域(GATTAAGA)存在于 402 bp 到 409 bp 之间, -10 区(TATAAATT)存在于 425 bp 到 433 bp 之间。转录起始位点在 438 bp 处, STAB-SD 序列(GAAAGGAGG)在 443 bp 到 451 bp 之间。核糖体结合位点(RBS) (GAAAGGAGG)在 550 bp 到 560 bp 之间。获得的启动子片段包含了完整的启动子结构域(图 2)。

1.2 *Bt* 营养期表达载体 pBUC3 的构建

我们将获得的 575 bp 的启动子序列连接到 pBU4 载体上建成一个 pBUC3 载体。阳性克隆子经过 PCR 鉴定含有 575 bp 的启动子片段(图 3)。进一步用 *Fok* I 酶切阳性克隆发现 1 号克隆子酶切图谱与 Vector NTI

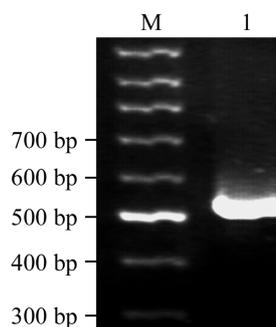


图 1 PCR 扩增获得的启动子片段

注: M: 100 bp DNA Ladder; 1: 以 C3-5/C3-3 为引物 PCR 扩增 *Btt* 后生成的产物

Figure 1 The promoter fragment amplified by PCR

Note: M: 100 bp DNA Ladder; 1: The PCR product from *Btt* amplified by C3-5/C3-3 primer



图 2 扩增的启动子序列及其结构域分析

Figure 2 Sequence analysis of the amplified promoter and its domain structure

软件分析结果一致, 出现了一条 526 bp 的特征条带(图 4)。最终测序结果验证了 1 号克隆子是符合本研究设计目标的 *Bt* 营养期表达载体, 将该克隆子命名为 pBUC3。

1.3 *cry1Ac31* 基因在 *Bt* IPS 中的表达

我们将 *cry1Ac31* 基因连接到 pBUC3 载体上, 构建成 pBUC3-1Ac31, 通过电脉冲转化法转化 *Bt* 无晶体突变株 IPS 中。通过 PCR 扩增筛选阳性克隆子, 结果显示挑取的 3 个克隆子均出现了目的条带(图 5)。利用光学显微镜对 *Bt* IPSC3-1 进行观察, 可以直观看出 IPSC3-1 已经能产生了大量菱形杀虫晶体, 而同时期的 *Bt* S3299-1 以及 IPS 均无菱形晶

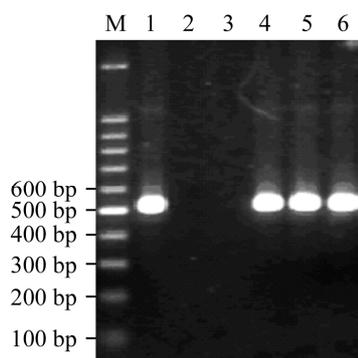


图 3 PCR 筛选阳性克隆子

注: M: DNA Ladder Marker D505A; 1~6: 1~6 号克隆子用引物 C3-5/C3-3 进行 PCR 反应后生成的产物

Figure 3 Positive clones screened by PCR

Note: M: DNA Ladder Marker D505A; 1~6: The results of recombinants (No.1~6) detected by PCR with C3-5/C3-3 primers

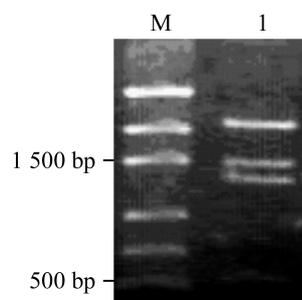


图 4 *Fok* I 酶切分析 1 号克隆子

注: M: DNA Marker D515A; 1: 1 号克隆子的 *Fok* I 酶切图谱
 Figure 4 Restriction enzymetic analysis of recombinant plasmid (No.1) digested by *Fok* I

Note: M: DNA Ladder Marker D515A; 1: The result of recombinant plasmid (No.1) digested by *Fok* I

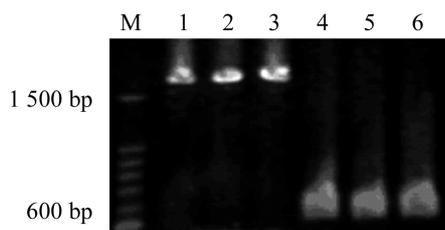


图 5 PCR 筛选阳性克隆子

注: M: DNA Ladder Marker D505A; 1~3: 克隆子 1~3 用 K2-5/K2-3 引物进行 PCR 反应后生成的产物; 4~6: 克隆子 1~3 用 C3-5/C3-3 引物进行 PCR 反应后生成的产物

Figure 5 PCR for screening positive clones

Note: 1~3: The result of recombinant 1~3 detected by PCR with K2-5/K2-3 primers; 4~6: The result of recombinant 1~3 detected by PCR with C3-5/C3-3 primers

体产生(图 6)。随后的 SDS-PAGE 蛋白电泳可以看出(图 7), IPSC3-1 在 12 h 就能够产生 130 kD 蛋白带, 而 IPS 和 *Bt* S3299-1 均无蛋白带产生。由此可以证明, *cry1Ac31* 基因在 IPS 中得到了较好的表达。

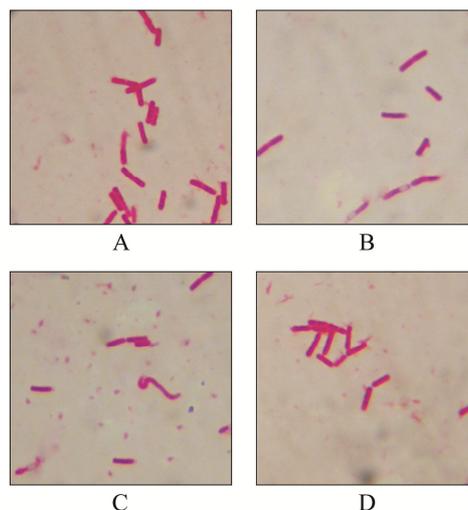


图 6 菌株生长 18 h 时的光学镜检观察

注: A: IPS; B: IPS-pBU4; C: IPSC3-1; D: S3299-1

Figure 6 Light micrographs of the tested strains observed after 18 hours culture

Note: A: IPS; B: IPS-pBU4; C: IPSC3-1; D: S3299-1

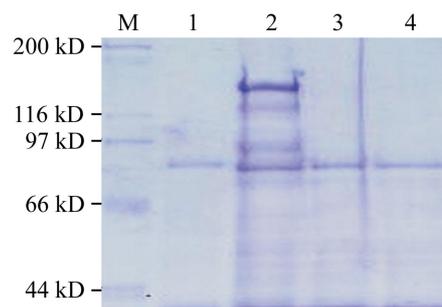


图 7 *Cry1Ac31* 晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

注: M: TaKaRa Protein Molecular Weight Marker (Broad) D530S; 1: S3299-1 培养 18 小时后的蛋白产物; 2: IPSC3-1 培养 18 小时后的蛋白产物; 3: IPS-pBU4 培养 18 小时后的蛋白产物; 4: IPS 培养 18 小时后的蛋白产物

Figure 7 *Cry1Ac31* protein generated after 18 hours culture identified by SDS-PAGE

Note: M: TaKaRa Protein Molecular Weight Marker (Broad); 1: S3299-1; 2: IPSC3-1; 3: IPS-pBU4; 4: IPS

2 讨论

由于 pBU4 载体拥有 *EcoR* I、*Sac* I、*Kpn* I、*Xma* I、*BamH* I、*Xba* I、*Sal* I、*Pst* I、*Sph* I 和 *Hind*III 10 个多克隆酶切位点, 对 Amp 和 Tc 有抗性, 能够在大肠杆菌和芽孢杆菌中穿梭复制, 因此, 本研究构建的 pBUC3 是一个拥于 pBU4 特点, 能够在大肠杆菌和芽孢杆菌中均能大量的复制表达, 这个特点是该载体能够电转化芽孢杆菌并大量表达蛋白的先决条件。由于 pBUC3 拥有了能够在芽孢杆菌中表达的强启动子, 并且其表达不依赖于芽孢期的到来就能大量表达, 因此, 在实际的应用中, 菌体培养的时间比依赖于芽孢形成而表达的载体



大为缩短。

不同的 *ICP* 基因在同一菌株中的表达, 由于都集中在芽孢期, 相互之间具有竞争性(Sanchis et al., 1989)。因此我们可以假设, 将两种杀虫蛋白基因一个在营养期表达, 另外一个在芽孢期表达, 这样其表达效果可能会比同时在芽孢期表达为好。进一步推想, 同一种 *ICP* 基因如果既能在营养期表达又能在芽孢期表达, 那么表达量也可能比只在营养期或芽孢期表达的表达式要高很多。

3 材料与方法

3.1 菌株与质粒

本研究所用的菌株与质粒列于表 1。其中 *Bt* 菌株 S3299-1 为携带 *cry1Ac31* 基因的野生菌株, 由海南省热带农业资源研究所分离; *Bt* 菌株 IPS 为无晶体 *Bt* 突变株有英国 University of Sussex 的 Neil Crickmore 博士赠送。

3.2 培养基、抗生素与试剂

LB 液体培养基及固体培养基用于培养 *Bt* 和 *E. coli*; SOC 培养基用于电转化后的感受态细胞的复苏。*Bt* 培养温度为 30°C, *E. coli* 培养温度为 37°C。氨苄青霉素和四环素使用浓度分别 100 ug/mL 和 50 ug/mL。PCR 反应试剂购自大连宝生物工程有限公司, PCR 引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。*Pfu* DNA 聚合酶及 *T₄*DNA 聚合酶购自上海生物工程有限公司。限制性内切酶及 *T₄*DNA 连接酶从 MBI 公司购买。*Taq* DNA 聚合酶由海南省热带农业资源研究所提供。

3.3 *cry3Aa* 启动子 PCR 扩增及其产物回收

根据 *cry3Aa* 启动子设计一对引物 C3-5/C3-3, 序列为: C3-5: 5'-AGCTTAATTAAGATAATATC TTTGAA-3'; C3-3: 5'-GGATTCATTTTCTTCCTC

CCTTTCTT-3'。

以 *Bt* 菌株 *Btt* 总 DNA 作为模板, 利用本研究设计的引物 C3-5/C3-3 和 *Pfu* DNA 聚合酶进行扩增 *cry3Aa* 启动子, 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收及纯化。PCR 反应条件参照 Song 等(1998)的方法进行。

携带 pBUC3 的 *E.coli* 阳性克隆子的筛选也是使用引物 C3-5/C3-3, 以克隆子质粒 DNA 作为模板, 使用 *Taq* DNA 聚合酶扩增。携带 pBUC3-1Ac31 的 IPS 阳性克隆子筛选以克隆子总 DNA 作为模板, 分别采用引物 C3-5/C3-3 和 K2-5/K2-3, 使用 *Taq* DNA 聚合酶扩增。

3.4 *Bt* 营养期表达载体 pBUC3 的构建

用限制性内切酶 *EcoR* I 在 37°C 水浴中完全消化质粒 pBU4, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收、纯化后, 利用 *T₄*DNA 聚合酶补平粘性末端。接着用等体积异丙醇置 -20°C 沉淀 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min 回收沉淀物, 加入 10 μL TE 溶解。随后, 利用 *T₄*DNA 连接酶将通过 PCR 获得的 *cry3Aa* 启动子片段和补平末端后的载体 pBU4 连接, 转化大肠杆菌 JM110, 在含有氨苄青霉素(100 ug/mL)和四环素(50 ug/mL)的 LB 培养基平板进行重组子筛选, 用 PCR (引物 C3-5/C3-3)和酶切克隆子质粒的方法鉴定阳性克隆, 通过序列测定进一步确定启动子序列是否正确插入 pBU4 质粒中。获得的表达载体命名为 pBUC3。

3.5 *cry1Ac31* 基因在 IPS 中的表达

用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 在 37°C 水浴中完全消化重组质粒 pCRY1Ac31 和载体 pBUC3, 消化产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 胶回收和纯化后, 利用 *T₄*连接酶将 *cry1Ac* 基因全长序列和表达载

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this research

名称 Name	特征 Characteristics	来源或文献 Sources or reference
<i>E. coli</i> JM110	Dcm, proAB, leu, dam, galK, thr, supE44	HITAR
<i>B. thuringiensis</i> S3299-1	Wild strain, Cry1Ac31, bidiamond crystal	HITAR and Zhang et al., 2009
<i>Bt</i> subsp. <i>tenebrions</i>		
<i>B. thuringiensis</i> IPS	<i>Bt</i> mutant strain, non-crystal	Dr Neil Crickmore
<i>Bt</i> IPSC3-1	Transformed <i>Bt</i> IPS strain with Cry1Ac31 bidiamond crystal	In this research
<i>Bt</i> IPS-pBU4	Transformed <i>Bt</i> IPS strain with pBU4 plasmid, non-crystal	In this research
pBU4	Vector with multifunctional cloning site (5.7 kb), Amp ^r , Tc ^r	HITAR
pBUC3	Vector derived from pBU4 adding Cry1Aa3 promotor (6.3 kb)	In this research
pBUC3-1Ac31	pBUC3 containing <i>cry1Ac31</i> coding sequence	In this research
pQE1Ac31	pQE30xa carrying with <i>cry1Ac31</i> gene from <i>Bt</i> S3299-1	HITAR and Zhao et al., 2009



体 pBUC3 连接, 电转化表达宿主苏云金芽孢杆菌无晶体突变株 IPS 中。在含有氨基青霉素(100 ug/mL)和四环素(50 ug/mL)的 LB 培养基平板进行重组子筛选, 用 PCR 扩增鉴定阳性克隆。验证后的阳性克隆子接种到 LB 固体培养基培养 12 h 后, 显微镜观察其伴胞晶体产生情况, 最后用 7.5%胶进行 SDS-PAGE 电泳分析验证表达情况。

鉴定 *cryIac* 基因的通用引物为 K2-5/K2-3 序列: K2-5: 5'-AGGACCAGGATTTACAGGAGG-3'; K2-3: 5'-GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC-3'。 *Bt* 菌株电转化感受态制备及电转化参考分子克隆实验指南(Sambrook et al., 1989); 显微镜观察方法参照谢柳等(2009)的方法, SDS-PAGE 电泳分析方法参照(Liu et al., 2010)。

作者贡献

刘辰是本研究的实验设计和实验研究执行人; 张文飞和周燕参与数据分析, 论文写作与修改; 李有志指导实验设计, 试验结果分析和论文修改和写作。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究受本研究受中国 *Bt* 收集与鉴定项目的资助。本研究的部分工作是在李有志教授的实验室完成的, 感谢该实验室在过程中的技术支持和有益的建议。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。本文中提到了我们实验中涉及的有关试剂供应商和测序服务商, 这并非我们为这些试剂供应商和测序服务商的产品和服务提供推荐或背书。

参考文献

- Liu S.K., Liu Z.M., Li Y.Z., and Fang X.J., 2010, Expression and localization of Cry1Ac22 crystal protein from *Bacillus thuringiensis* W015-1 in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *Bt Research* (online), 1(2): 10-15 (DOI: 10.5376/bt.2010.01.0002) <http://dx.doi.org/10.5376/bt.2010.01.0002>
- Liu Z.M., Liu S.K., Li Y.Z., and Fang X.J., 2010, Heterologous

expression and purification of Cry1Ac22 toxin from *Bacillus thuringiensis* W015-1, *Bioscience Methods* (online), 1(2): 9-14 (DOI: 10.5376/bm.2010.01.0002) <http://dx.doi.org/10.5376/bm.2010.01.0002>

- Liu Z.M., Zhou Y., Li Y.Z., Liu S.K., and Fang X.J., 2011, Construction of plant expression constructs harboring full-length *Bt CryIac22* toxin gene and truncated functional domains of *Bt CryIac22* toxin and arabidopsis transformation, *Bioscience Methods*, 2(2): 15-20 (doi: 10.5376/bm.2011.02.0003) <http://dx.doi.org/10.5376/bm.2011.02.0003>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989, *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, pp. 22-50
- Sanchis V., Agaisse H., Chauvaux J., Lereclus D., 1996, Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression system of cryIII A and a site specific recombination vector (*J Biotechnol*), 48(1-2): 81-96
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H., 1998, *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins, *Microbiol and Molecular Biology Review*, 62: 3 775-806
- Song F.P., Zhang J., Huang D.F., Xie T.J., Yang Z.W., Dai L.Y., and Li G.X., 1998, Establishment of PCR-RFLP identification system of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis*, *Scientia Agricultura Sinica*, 31(3): 1-4
- Xie L., Zhang W.F., Quan J.X., Liu Z.M., Ye D.W., Li Y.Z., and Fang X.J., 2009, *Bacillus thuringiensis* collection and isolates identification from Dawangling natural reserves in Guangxi province, *Jiyinzuxue Yu Yingyongshengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 28(1): 62-68 (谢柳, 张文飞, 全嘉新, 刘卓明, 叶大维, 李有志, 方宣钧, 2009, 广西大王岭和大明山自然保护区苏云金芽孢杆菌收集与鉴定, *基因组学与应用生物学*, 28(1): 62-68)