

文章编号: 0529-6579 (1999) 04-0052-06

利用转座子 Tn917 构建杀虫 *Bt* 工程菌^{*}

余健秀, 庞 义, 李建华, 余榕捷, 汤慕瑾

(中山大学昆虫学研究所/生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要: 利用链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 的转座子 Tn917 衍生载体 pTVITs 将苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 的 2 个杀虫晶体蛋白 (ICPs) 基因整合进 *Bt* 染色体上, 转座频率达 5.9×10^{-5} . 将对双翅目昆虫有毒效的 ICPs 基因 *cry11A* 和广谱溶细胞且对蚊子等有毒效的 *cyt1A* 基因分别克隆到 pTVITs 上, 用高压电激法转入对鳞翅目昆虫有毒效的库斯塔克亚种 (*Bt. subsp. kurstaki*) HD-1 菌株, 分别筛选到在染色体基因组上整合进这 2 个基因的突变株 HT26 和 HT45, 整合基因均能在这 2 株工程菌中获得表达并形成正常的伴孢晶体. 生物测定结果显示, 表达的 *Cry11A* 和 *Cyt1A* 晶体蛋白有很高的杀虫活性, 对库蚊三龄幼虫的 LC_{50} 分别为 83 ng/mL 和 64 ng/mL, 同时 *Cyt1A* 晶体蛋白对培养的昆虫细胞有较强的溶解作用. 其结果为创造新型基因工程苏云金杆菌杀虫剂提供了新的重要途径.

关键词: 苏云金杆菌; 杀虫晶体蛋白; 转座子 Tn917

中图分类号: Q 93 **文献标识码:** A

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 是一种昆虫病原菌, 它对昆虫的毒性主要靠菌体产生的各种杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs), 这些 ICPs 具有杀虫的专一性, 研究已证明大多数 ICPs 的编码基因位于菌体内的大质粒上. 本研究试图把来源于莫里逊亚种 (*Bt. subsp. morisoni*) 的 *cry11A* (表达 67 000 蛋白、对双翅目蚊子有高毒力) 和 *cyt1A* (表达 27 000 蛋白对蚊子具高毒效及有广谱溶细胞性) 2 个基因, 克隆到链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 的转座子 Tn917 载体 pTVITs 上, 然后转入库斯塔克亚种 (*Bt. subsp. kurstaki*) HD-1 菌株中, 使这 2 个基因整合到染色体上并在 *Bt* 体系中表达和形成晶体. 从理论上来说, 这样可使工程菌遗传稳定, 避免质粒的不稳定性, 又可提高基因的表达水平.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 质粒 pWF26 和 pWF45 分别含 *cry11A* 和 *cyt1A* 基因, 且都含 20 000 蛋白基因, 由美国 Wu 博士惠赠. 枯草杆菌 BS121 含 pTVITs, pTVITs 为含 Em^r 及温度敏感复

^{*} 基金项目: 国家 863 计划 (101-03-01-01) 资助项目; 广东省自然科学基金重点资助项目

收稿日期: 1998-07-13 作者简介: 余健秀, 男, 1968 年生, 讲师 通讯联系人: 庞义.

制子的转座子 Tn917 的衍生载体。HD-1、Bti 菌株为本室保存菌种。

1.1.2 昆虫及昆虫细胞 致乏库蚊 (*Culex pipens fatigans*) 幼虫和银纹夜蛾 (*Argyrogramma agnata*) 幼虫均为本室人工饲料饲养的健康种群。草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, Sf) 细胞为本室保存 IPLB-2 细胞系。

1.2 方 法

1.2.1 苏云金杆菌和枯草杆菌质粒 DNA 的提取 采用改良碱法，在 100 μL 溶液 I 中加入 2 μL 浓度为 50 mg/mL 的溶菌酶，于 37 ℃保温 1 h 后迅速置于冰浴。其余步骤与碱法相同。

1.2.2 苏云金杆菌感受态细胞的制备 参照文献 [1] 进行。

1.2.3 苏云金杆菌电激转化 参照文献 [2] 进行。

1.2.4 Tn917 衍生转座子整合进 Bt 染色体阳性菌落的筛选 参照文献 [3] 并略作修改。

1.2.5 转座子衍生质粒的转座频率及共合体 (cointegrate) 拆分的计算 转座频率的计算依据文献 [3] 的方法，由于 pTV ITs 在非 Tn917 区域有 cat 基因，拆分的百分比可通过丢失 Cm 抗性、存活的菌落数来计算。

2 结果与讨论

2.1 重组转座子的构建、转座频率及共合体拆分

由于 Tn917 非必须区可用于插入外源基因的位点极少^[4]，所以本研究试图从必须区 tnpA 基因的序列中插入外源基因以达到转移基因的目的。在 tnpA 序列区中，以 Hind III 酶切去掉 1.3 千碱基对的 DNA 片段，再插入 8 千碱基对左右的外源 DNA 片段，pTYP45 的构建如图 1 (a)，pTYP26 的构建如图 1 (b)。这 2 个重组转座子衍生载体实际上是不能再形成 TnpA 蛋白，也意味着转座作用不能够发生。但本实验中 pTYP26 和 pTYP45 转座作用仍有发生，其转座频率在同一个低水平为 4.8×10^{-7} 左右，但共合体拆分率却仍维持 80% 以上 (如表 1)。

表 1 重组转座子的特性
Tab 1 Characterization of several recombinant transposons

重组转座子	工程菌株	MLS 抗性 ¹⁾	转座频率	共合体拆分率/ %
pTV ITs	HT	1~10	1.1×10^{-4}	98% (98/100)
pTYP26	HT26 (M)	1~2	4.8×10^{-7}	83% (5/6)
pTYP45	HT45 (M)	1~2	4.7×10^{-7}	80% (4/5)
pTYP26+ pTV ITs (1:1)	HT26	1~8	5.6×10^{-5}	96% (96/100)
pTYP45+ pTV ITs (1:1)	HT45	1~7.5	5.9×10^{-5}	97% (97/100)

1) MLS 为 macrolides, lincosamides 和 streptogramin 的简写;
本实验在不同浓度的 Em 及恒定浓度 25 μg/mL 的 Im, 32 ℃下测定

这与文 [5] 的结果一致，可能因为 pE194 衍生质粒具有不依赖于转座酶而整合到染色体的功能或存在 RecA 重组体系发生异源重组所致。为了提高转座频率，依据 TnpA、TnpR 等能发生反式作用的原理，以 pTV ITs+pTYP26 (1:1)、pTV ITs+pTYP45 (1:1) 混合 DNA 电激转化受体菌，结果大大提高了转座频率，几乎达到与转座子载体 pTV ITs 相近的转座频率 5.9×10^{-5} 以上，且共合体拆分率都接近 100%。这可能是因为：虽然重组转座子

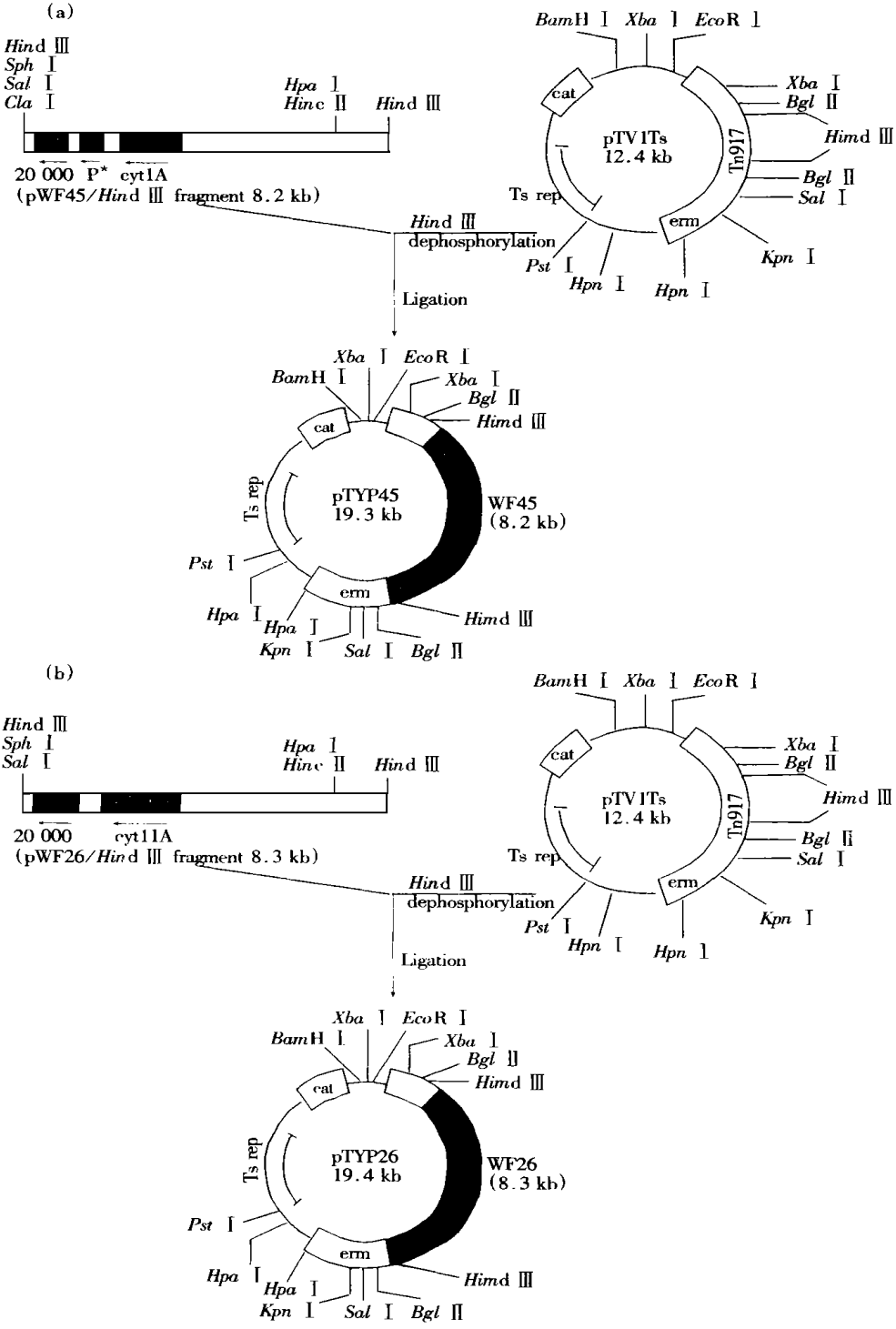


图 1 衍生转座子的构建

Fig 1 Construction of the derived transposon

(a) pTYP45; (b) pTYP26

pTYP26 或 pTYP45 在 *tnpA* 基因区插入外源基因导致丧失 TnpA 转座酶, 但利用了另一转座子 pTVITs 的 *tnpA* 基因的完整性, 使得它们能发生正常转座. 筛选到的工程菌对红霉素的压力试验表明: 经转座子 pTVITs 转座得到的菌株 HT 耐受能力最强, 在 10 $\mu\text{g/mL}$ Em 及 25 $\mu\text{g/mL}$ Lm 都能生长. HT26 和 HT45 耐受红霉素浓度也达 8 $\mu\text{g/mL}$ 左右, 但 HT26 和 HT45 耐受红霉素能力较差, 超过 2 $\mu\text{g/mL}$ 以后, 菌落不能生长.

2.2 晶体蛋白 SDS-PAGE 分析和电镜观察

分别从培养成熟的 HD-1、HD-1-*Cry*⁻ (未加任何转座子载体经同步高温 42 $^{\circ}\text{C}$ 处理的 HD-1 菌株, 因丢失了大质粒不形成伴孢晶体)、HT26 和 HT45 菌株中粗提取蛋白进行 SDS-PAGE 分析. 结果表明, HT26 菌株表达了 *cry11A* 基因产物 67 000 蛋白 (如图 2a), HT45 表达了 *cry1A* 基因产物 27 000 蛋白 (图 2b). 分别对 HD-1、HT26 和 HT45 3 个菌株产生的晶体蛋白颗粒进行纯化, 在透射电子显微镜下观察, HT45 菌株只有 1 种双金字塔形晶体 (图 3c), 与野生型菌株 HD-1 的 3 种晶体不规则四边形、方形、六角双梯形晶体 (图 3a) 不一样; 而 HT26 菌株只有卵圆形晶体 (图 3b), 也与 HD-1 不同. 一般来讲, 蛋白质本身可以自聚, 但这种

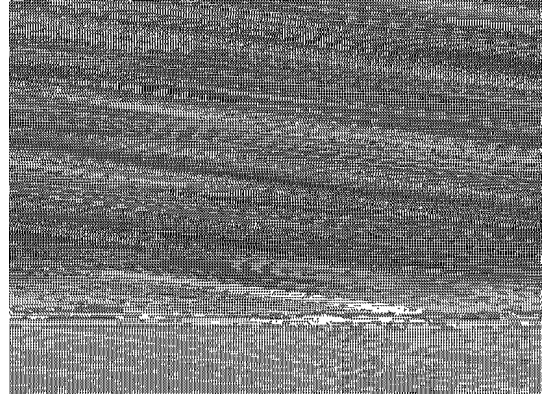


图 2 晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig 2 SDS PAGE detection of the crystal proteins

M 标准蛋白, 1 HT26, 2 HD-1-*Cry*⁻, 3 HD-1

聚集在细胞内大部分情形是借助于一种叫做“分子伴侣 (chaperone)”起作用的. 20 000 蛋白就是一种分子伴侣, 它可促使 *cry1A* 晶体和 *cry11A* 晶体的形成^{6,7}. 本研究中, 利用的是 pWF45 酶切大片段, 含有完整的 *cry1A* 基因、20 000 蛋白基因及 *cry1A* (*c*) 启动子序列, 因而在 HD-1 受体菌中有 Cyt1A 蛋白的伴孢晶体大量形成, 电镜观察表明伴孢晶体呈

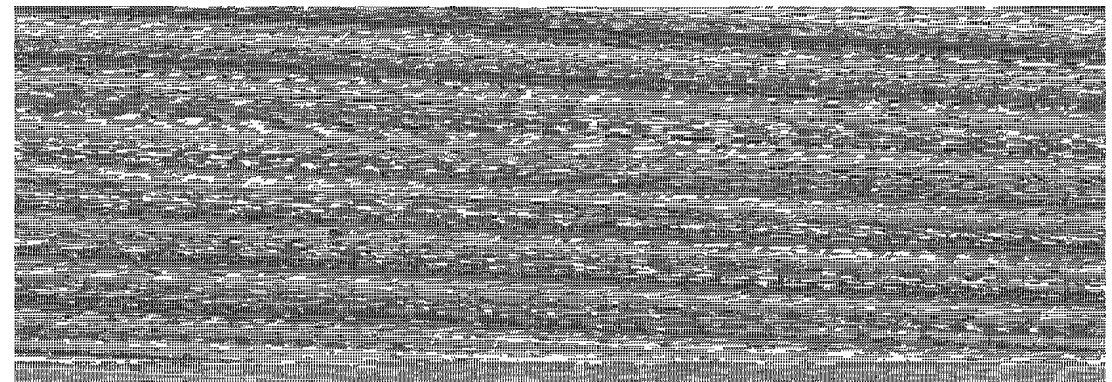


图 3 各菌株伴孢晶体形态

Fig 3 Morphology of parasporal crystals

(a) HD-1; (b) HT26; (c) HT45

Sp 孢子, Q 方形晶体, Hb 六角双梯形晶体, Ti 不规则四边形晶体, Nb 营养体,

Ci 不规则或卵圆形晶体, Pb 双金字塔形晶体

双金字塔状（图 3c）。pWF26 酶切大片段含有 *cry*11A 操纵子完整区域，与野生型无差异，由于 20 000 蛋白的表达，也增强了 Cry11A 的大量合成，得到了一种不规则或卵圆形的晶体（图 3b）。

2.3 工程菌伴孢晶体的杀虫活性

2.3.1 工程菌 HT45 产生的 Cyt1A 蛋白的溶细胞作用 将 HT45 和 HD-1 的晶体碱解液加入到生长旺盛的 *Sf* 细胞培养基中，30 min 后已观察到加 HT45 晶体蛋白 Cyt1A 的细胞开始变形、膨胀。1 h 后细胞开始破裂，随着时间的延长或浓度的增加，破裂细胞急剧增加。但加入 HD-1 晶体蛋白作对照的细胞，12 h 后仍未发现有明显的细胞死亡。在显微镜下观察计数破裂细胞，裂解百分比与时间、剂量关系。加入 Cyt1A 蛋白后，在 3.5~9 h 之间，是细胞裂解变化的主要时期，几乎以直线上升，12 h 后，细胞裂解率达 90% 以上。

2.3.2 工程菌 HT45 和 HT26 的伴孢晶体对双翅目和鳞翅目 幼虫活性 对提纯晶体蛋白稀释系列蛋白浓度进行生物测定。对处理的双翅目库蚊三龄幼虫和银纹夜蛾三龄幼虫进行 48 h 观察并记录，通过计算对数浓度与死亡率机率值之间的关系，求得 LC₅₀（表 2）。

表 2 工程菌 *Bt* 晶体提纯物对库蚊三龄幼虫和银纹夜蛾三龄幼虫的生物测定

Tah 2 Toxicity of purified crystals produced by engineered *Bt* to
third-instar *C. pipiens fatigans* and third-instar *A. agnata*

菌株	库蚊		银纹夜蛾	
	LC ₅₀ / (μg·mL ⁻¹) ¹⁾	斜率	LC ₅₀ / (μg·mL ⁻¹) ¹⁾	斜率
HD-1	242(133~357)	1.43	1.42(0.69~2.03)	2.45
Bti	9.3(4.5~14.9)	1.32	197(149~255)	0.94
HT45	64(46~109)	1.38	199(159~260)	0.94
HT26	83(59~167)	1.23	194(167~253)	0.95
HT45:HT26(1:1)	17(11~23)	1.43	186(154~258)	0.97

1) 括号里的数值为 95% 置信区间值

工程菌 HT45 和 HT26 分别产生的 Cyt1A 和 Cry11A 晶体蛋白对库蚊幼虫有极高的杀虫活性，其 LC₅₀ 分别为 64 和 83 ng/mL，且 Cyt1A 和 Cry11A 有协同增效作用，共同作用时可提高毒力 4 倍以上。但这 2 株工程菌与原出发菌 HD-1 相比，却几乎完全丧失了对银纹夜蛾幼虫的毒性，HD-1 对银纹夜蛾的 LC₅₀ 为 1.42 μg/mL，而工程菌 HT26 和 HT45 的毒力降低了 140 倍，即它们的 LC₅₀ 都在 186 μg/mL 以上。这是由于在筛选工程菌过程中，多次进行 42℃ 高温处理所致。高温处理可大大促进转座作用的发生及富集染色体上多点插入突变菌，但同时也极易使存在于菌体中的质粒丢失。我们发现工程菌 HT26 和 HT45 基本上丢失了原出发菌株 HD-1 的 23 千碱基对以上大质粒（资料略去）。苏云金杆菌大多数伴孢晶体的结构基因及调节基因位于较大的质粒上，其大小为 33×10⁶~150×10⁶，目前尚未在小于 30×10⁶ 的质粒上发现有毒素基因。工程菌丢失了编码 130 000 蛋白的杀鳞翅目的 *cry*1A 类基因的大质粒，从而造成对鳞翅目幼虫几乎无毒性。

参考文献:

[1] SCHURTER W, GEOSER M, MATHE T. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* via electroporation; transformation of crystalliferous strains with a cloned delta-endotoxin gene [J] . Mol Gen Genet. 1989, 218: 177~181.

- [2] CHENG C, DAIS M, FRUTOS R et al. Properties protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 expressed in *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* by using the shuttle vector pHT3101 [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 507~512
- [3] YOUNGMAN P J, PERKINS J B, LOSICK R. Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917 [J]. Proc Natl Acad Sci (USA), 1983, 80: 2305~2309.
- [4] 余健秀, 庞义, 邓日强, 等. 转座子 Tn917 的 DNA 序列计算机分析 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1997, 36 (6): 11~15.
- [5] PERKINS J B, YOUNGMAN P J. A physical and functional analysis of Tn917, a *Streptococcus transposon* in the Tn3 family that functions in *Bacillus* [J]. Plasmids, 1984, 12: 119~138.
- [6] WU D, FEDERICI B A. A 20-kDa protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis* [J]. J Bacteriol, 1993, 175: 5276~5280.
- [7] WU D, FEDERICI B A. Improved production of the insecticidal CryVID protein in *Bacillus thuringiensis* using *cytI* A (c) promoters to express the gene for an associated 20-kDa protein [J]. Appl Microbiol Biotech, 1995, 41: 697~702.

Construction of Insecticidal Engineered *Bacillus thuringiensis* Using the Transposon Tn917

YU Jian-xiu^{*}, PANG Yi, LI Jian-hua, YU Rong-jie, TANG Mu-jin

Abstract: *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is an entomopathogenic bacterium whose toxicity mainly relies on the presence of insecticidal crystal proteins (ICPs) which exhibit a highly specific insecticidal activity. Most of the genes coding for these toxic proteins are plasmid-borne. A limitation has in previous work been shown in construction of the recombinant *Bt* for expanding the toxic spectrum and enhancing their toxicity by plasmid transference or coexpression of ICPs due to instability and incompatibility of the plasmids. In the present work, two cloned ICP-genes were firstly successfully integrated into chromosomes of *Bt* respectively employing the transposon vector, pTV1Ts (containing Tn917 from *Streptococcus faecalis*) by a transposition frequency of 5.9×10^{-5} . Two recombinant transposon-derived vectors have been constructed by cloning *cyt11A* gene and *cyt1A* gene, which were originally cloned from the plasmids of *Bt*. subsp. *morrisoni* PG 14 strain, on the pTV1Ts respectively. Cry11A protein is toxic to dipterous larvae and cyt1A protein is either highly cytolytic to various cells or toxic to dipterous larvae. The recombinant transposon-derived vectors were transferred into *Bt*. subsp. *kurstaki* HD-1 strain against lepidopterous larvae by electroporation. Two mutant strains HT26 and HT45 integrated with the two genes into the genomic DNA were achieved respectively. The integrated ICP-genes were expressed and normal parasporal crystals could be observed under electron microscope. The toxicities of Cry11A and Cyt1A crystal proteins were determined by bioassays using third instars of mosquito *Culex pipiens fatigans*. The LC₅₀ for the Cry11A protein was 83 ng/mL, whereas the Cyt1A protein was 64 ng/mL. Meanwhile, solubilized cyt1A protein was cytolytic to *Spodoptera frugiperda* cell established.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; insecticidal crystal proteins; transposon Tn917

^{*} Institute of Entomology and State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China