

苏云金芽孢杆菌 *Cry2Ab* 基因克隆与植物表达载体的构建

王 毛, 吴亚飞, 邓 拓, 王 敦*

(西北农林科技大学 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:以苏云金芽孢杆菌 Bt 菌液为模版, 用 PCR 扩增的方法克隆出两端带酶切位点 *Xho* I 的 *Cry2Ab* 片段, 与高效植物表达载体 pSR784d 连接, 并进行 PCR 和酶切鉴定。结果表明, 克隆片段含有 *Cry2Ab* 基因、且连接方向正确, 所构建植物表达载体 *Cry2Ab*-pSR784d 序列与相关元件正确。研究构建单独 *Cry2Ab* 植物表达载体, 为转基因植物表达和通过转基因植物验证其功能奠定了基础。

关键词:基因克隆; 苏云金芽孢杆菌; *Cry2Ab*; 植物表达载体; 载体构建

中图分类号:S763.13 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)05-0178-04

Gene Cloning of *Cry2Ab* from *Bacillus thuringiensis* and Construction of Plant Expression Vector

WANG Mao, WU Ya-fei, DENT Tuo, WANG Dun*

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: PCR was performed to amplify *Cry2Ab* gene from *Bacillus thuringiensis*. Then *Cry2Ab* gene was ligated to plant expression vector pSR784d with double restriction enzyme sites *Xho* I. The results showed that the *Cry2Ab* gene was cloned properly and the expression vector *Cry2Ab*-pSR784d was constructed successfully. This study constructed a plant expression vector for *Cry2Ab* transgenic plant and laid foundation for further related studies.

Key words: gene clone; *Bacillus thuringiensis*; *Cry2Ab*; plant expression vector; vector construction

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是能产生芽孢革兰氏阳性细菌, 具有昆虫病原微生物属性。苏云金芽孢杆菌在形成芽孢的过程中, 产生具有杀虫活性的水溶性晶体蛋白^[1-2], 主要分为 Cry 毒素蛋白和 Cyt 毒素 2 种, 也被称为 δ -内毒素。其中, Cry 毒素蛋白对鳞翅目、鞘翅目、膜翅目和双翅目昆虫有特异性毒性, 对人、畜及其他大部分昆虫天敌无毒害作用^[3-4]。在昆虫中肠碱性条件下, 伴胞晶体被消化酶水解为 60~70 kD 的蛋白, 活化的毒素蛋白结合在微绒毛上的特异结合蛋白, 然后在肠壁细胞上造成穿孔, 使细胞溶解、渗透压失衡, 直至昆虫死亡^[5-6]。Cry 毒素蛋白由至少 50 个子群组成, 种类超过 200 种^[7], 其三级结构含有 3 个结构域, 不同蛋

白之间结构高度相似, 故推测不同种的 Cry 毒素有相似的作用机理^[8-10]。

目前, 基因遗传转化已应用于多种经济林木上, 如转 Bt 基因欧洲黑杨等^[11-13]。此外, Bt 杀虫蛋白还应用于 Bt 杀虫剂的工业化生产, 构建 Cry 基因工程菌株、提高杀虫蛋白毒力等^[14-16]。虽然 Bt 转基因植物应用的越来越广泛, 但是国内外转基因研究多将其与 *Cry1A* 系列毒素蛋白双价转化, 鲜有针对 *Cry2Ab* 单独转化的转基因相关研究。本研究将 *Cry2Ab* 毒素蛋白基因单独转化植物表达载体 pSR784d, 为进一步转化植物和研究其单价转基因植物的抗虫性奠定了基础。

收稿日期: 2015-11-20 修回日期: 2016-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(31270691, 31170609); 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2014KTCL02-14)。

作者简介: 王 毛, 女, 在读硕士, 研究方向: 植物转基因。E-mail: maode2046@163.com

* 通信作者: 王 敦, 男, 博士, 教授, 研究方向: 昆虫生化与分子生物学、昆虫病毒分子生物学与生物防治。E-mail: wanghande@nwsuaf.edu.cn; dunwang@foxmail.com

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株和载体 大肠杆菌 TG1、苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)Bt-2011-12 株均为本实验室保存;植物表达载体 pSR784d 由中国种子生命科学技术研究中心转基因育种部分分子生物实验室马崇烈老师提供,其 T-DNA 区结构如图 1 所;农杆菌菌株 LBA4404 由西北农林科技大学林学院李厚华老师提供;pGEM®-T Easy Vector 购自 Promega 公司。

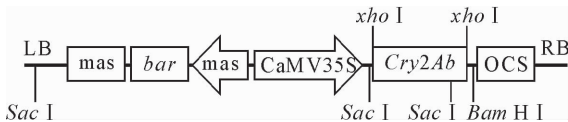


图 1 植物表达载体 pSR784d 质粒 T-DNA 区结构

Fig. 1 The T-DNA structure on plant expression vector pSR784d

1.1.2 酶和主要试剂 PCR 相关试剂、限制性内切酶和 Rnase 均购自 TaKaRa 生物工程有限公司;T4 DNA ligase 购自 Promega 公司;琼脂糖胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;其他常规试剂均为国产分析纯。引物合成和测序由 Invitrogen 公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 引物的设计及合成 根据 NCBI:EU623976 中 *Cry2Ab* 基因全长序列设计寡核苷酸引物 1 对,并在上、下游引物的 5' 端都加入 *Xho*I(CTC GAG) 酶切位点,引物如下:

Cry2Ab-F: 5'-CCTCGAGATGAATAGTGT-ATTGAATAGC-3'(*Xho*I)

Cry2Ab-R: 5'-CTCGAGTCTAGATTAATA-AAGTGGTGAAATA-3'(*Xho*I)

引物由 Invitrogen™ 合成,用无菌双蒸水溶解至终浓度为 10 μmol · L⁻¹,置于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 目的基因 *Cry2Ab* 的扩增克隆 以实验室保存的苏云金芽孢杆菌 Bt-2011-12 菌液为模板,用上述引物扩增 *Cry2Ab* 基因。PrimeSTAR HS DNA Polymerase 的 PCR 反应体系为 5 × PrimeSTAR Buffer (Mg2+ Plus) 10 μL,dNTP Mixture (各 2.5 mmol · L⁻¹) 4 μL,模板 DNA 1 μL,上下游引物 (20 μmol · L⁻¹) 各 1 μL,PrimeSTAR HS DNA Polymerase(2.5 U/μL) 0.5 μL,灭菌双蒸水补足到 50 μL。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 10 s,64.5℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 2 min,进行 34 个循环,再 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经割胶回收、平末端加 A 反应后,与 pGEM®-T Easy Vector 连接,转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,

蓝白斑筛选阳性菌落提取质粒 *Cry2Ab*-pGEM®-TE,经 *Xho*I 单酶切,酶切大小正确的菌液送 Invitrogen 公司测序。

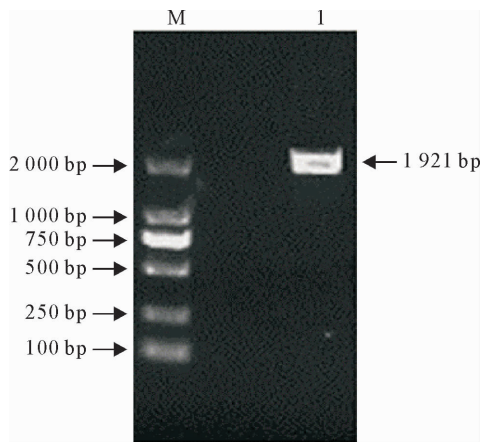
1.2.3 植物表达载体 *Cry2Ab*-pSR784d 构建 将重组载体 *Cry2Ab*-pGEM®-TE 和植物表达载体 pSR784d 同时经 *Xho*I 单酶切,分别回收目的基因片段和表达载体片段,用 T4 连接酶进行连接反应。连接产物转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,挑取卡那霉素平板上生长出的单菌落作为模板进行 PCR 鉴定。

对 PCR 阳性菌落提取质粒 *Cry2Ab*-pSR784d,分别用 *Xho*I,*Sac*I 和 *Bam*H I 单酶切鉴定。重组质粒酶切鉴定正确即表明 *Cry2Ab*-pSR784d 植物表达载体构建成功。重组质粒 *Cry2Ab*-pSR784d 转化农杆菌 LBA4404,即可用于植物转基因工程。

2 结果与分析

2.1 *Cry2Ab* 的扩增克隆

以 Bt-2011-12 菌液为模板,利用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 和 1.2.1 设计的引物,扩增出长度约为 1900 bp 的单一片段,与 *Cry2Ab* 基因 (1921 bp) 片段的大小一致(图 2)。扩增产物经割胶回收、平末端加 A 反应后,与 pGEM®-T Easy Vector 连接,转化大肠杆菌 TG1,阳性菌落提取质粒 *Cry2Ab*-pGEM®-TE,经 *Xho*I 单酶切鉴定,分别得到 3 015 bp 的 T 载体片段和 1 900 bp 左右的 *Cry2Ab* 基因片段(图 3),说明目的基因 *Cry2Ab* 已经连接到克隆载体上。测序结果与 GeneBank 中已知序列比对,结果显示所克隆片段为 *Cry2Ab* 基因。



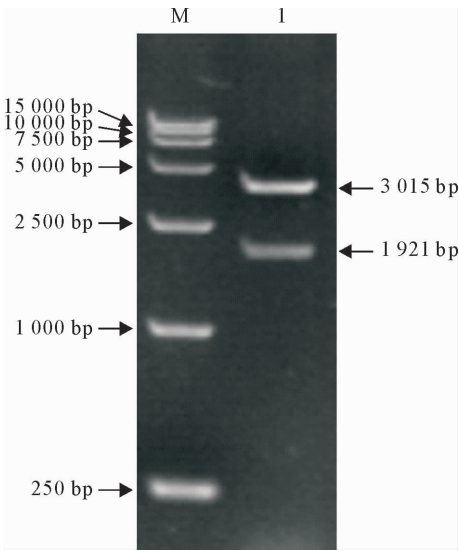
注:M;DL 2 000;1:PCR 产物。

图 2 *Cry2Ab* 基因 PCR 产物

Fig. 2 PCR amplification of *Cry2Ab* gene

2.2 表达载体 *Cry2Ab*-pSR784d 的构建

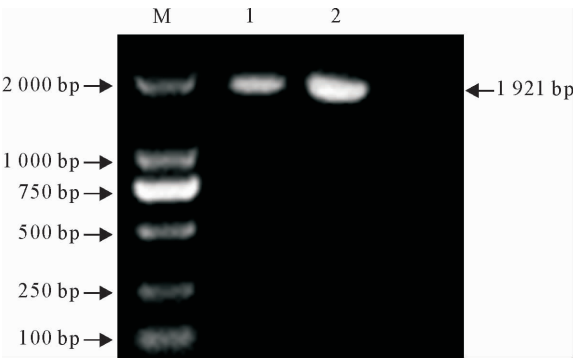
表达载体 pSR784d 经 *Xho*I 单酶切回收的载体片段和 2.2.1 中回收的 *Cry2Ab* 基因片段经 T4 DNA 连接酶 4℃ 连接 12 h,转化大肠杆菌 TG1 感



注:M;DL15 000;1:*Xho* I 单酶切重组载体 *Cry2Ab*-pGEM®-TE。

图 3 重组载体 *Cry2Ab*-pGEM®-TE 酶切鉴定

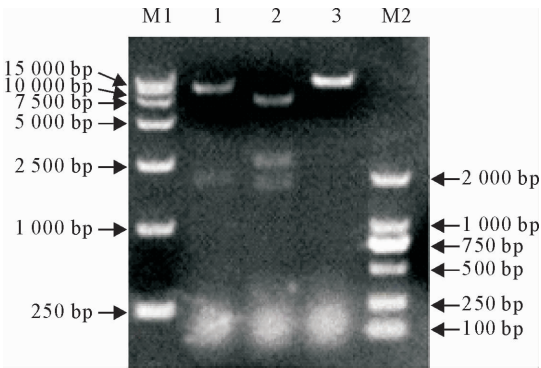
Fig. 3 Restriction analysis of recombined vector *Cry2Ab*-pGEM®-TE



注:M;DL 2 000;3:PCR 扩增出的目的条带。

图 4 重组植物表达载体 *Cry2Ab*-pSR784d PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of the recombined plant expression vector *Cry2Ab*-pSR784d



注:M1; DL15 000; M2; DL2 000; 1: *Xho* I 单酶切重组载体 *Cry2Ab*-pSR784d; 2: *Sac* I 单酶切重组载体 *Cry2Ab*-pSR784d; 3: *Bam*H I 单酶切重组载体 *Cry2Ab*-pSR784d。

图 5 重组植物表达载体 *Cry2Ab*-pSR784d 酶切鉴定

Fig. 5 Restriction analysis of recombined plant expression vector *Cry2Ab*-pSR784d

受态细胞,涂布在含有卡那霉素的 LB 固体平板培养基上,37℃倒置培养过夜。挑取平板上生长出的单菌落作为模板进行 PCR,结果显示 1、2 泳道扩增出目的条带(图 4),即 1、2 泳道的菌液可能链接成功。碱裂解法提取 2 泳道菌液的质粒 *Cry2Ab*-pSR784d,经 *Xho* I 单酶切,得到 10 000 bp 左右的载体片段和 1 900 bp 左右的 *Cry2Ab* 基因片段;质粒分别经 *Sac* I 和 *Bam*H I 单酶切后证明连接方向正确,即该基因已经正确插入到植物表达载体 pSR784d 中(图 5)。

3 结论与讨论

该研究将苏云金芽孢杆菌(Bt)毒素蛋白基因 *Cry2Ab* 成功插入载体 pSR784d 的多克隆位点中,构建了植物表达载体 *Cry2Ab*-pSR784d。该载体包含筛选标记基因 *bar* 基因(草胺膦抗性)和氨基糖苷 3'-腺苷酰基转移酶基因(*aadA*,卡那霉素抗性),广泛用于转基因植物的研究,可提供多种转基因再生植株的筛选方法,如卡那霉素抗性筛选或者除草剂百士达筛选。构建的载体中不含 *GUS* 报告基因,进一步增加了转基因的安全性。该载体应用于转基因研究中,可能为新型植物抗虫方式提供可能,也为通过植物转基因等技术研究 *Cry2Ab* 基因的功能奠定了基础。

参考文献:

[1] CHATTOPADHYAY A, BHATNAGAR N B, BHATNAGAR R. Bacterial insecticidal toxins[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2004, 30(1): 33-54.

[2] BRAVO A, LIKITVIVATANAVONG S, GILL S S, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41: 423-431.

[3] 刘芳,曹阳,孙长坡,等. 苏云金芽孢杆菌对印度谷螟幼虫的致死作用[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(9): 79-82.

LIU F, CAO Y, SUN C P, et al. Lethality of *Bacillus thuringiensis* to larvae of plodia interpunctella[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2011, 26(9): 79-82. (in Chinese)

[4] 谢雅晶,冯纪年,张存政,等. 苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白 *cry2Ad2* 原核表达及其不同长度片段产物的杀虫活性[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(6): 1242-1248.

XIE Y J, FENG J N, ZHANG C Z, et al. Prokaryotic expression and toxicity analysis of truncated insecticidal protein *Cry2Ad2* from *Bacillus thuringiensis* [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2011, 27(6): 1242-1248. (in Chinese)

[5] BRAVO A, GILL S S, SOBERÓN M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control[J]. Toxicon, 2007, 49(4): 423-435.

[6] IHARA H, HIMENO M. Study of the irreversible binding of

Bacillus thuringiensis Cry1Aa to brush border membrane vesicles from *Bombyx mori* midgut[J]. Journal of Invertebrate Pathology,2008,98(2): 177-183.

[7] CRICKMORE N,ZEIGLER D R,FEITELSON J,*et al.* Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews,1998,62(3): 807-813.

[8] GALITSKY N,CODY V,WOJTCZAK A,*et al.* Structure of the insecticidal bacterial-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography,2001,57(8): 1101-1109.

[9] BOONSERM P,DAVIS P,ELLAR D J,*et al.* Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications[J]. Journal of Molecular Biology,2005,348(2): 363-382.

[10] BOONSERM P,MO M,ANGSUTHANASOMBAT C,*et al.* Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution[J]. Journal of Bacteriology,2006,188(9): 3391-3401.

[11] 刘占德. 基因转化技术在经济林木遗传改良上的应用[J]. 西北林学院学报,1999,14(4):115-120.

LIU Z D. Application of gene transformation technology to the genetic improvement of economic trees[J]. Journal of Northwest Forestry University,1999,14(4): 115-120. (in Chinese)

[12] 陈彩霞,司瑞新,沈昕,等. 转 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白(PeN-haD1)基因派间杂种 110 杨的获得[J]. 西北林学院学报,2009,24(1):61-65.

CHEN C X,SI R X,SHEN X,*et al.* Genetic transformation of PeN haD1 gene to the hybrid poplar 110 [J]. Journal of Northwest Forestry University,2009,24(1): 61-65. (in Chinese)

[13] 苏彦苹,刘兴菊,周怀军,等. *rolC* 基因对转 Ri 质粒三倍体毛白杨的遗传转化[J]. 西北林学院学报,2007,22(5):57-61.

SU Y P,LIU X J,ZHOU H J,*et al.* Genetic transformation of Ri plasmid transgenic plant of the triploid of populus tomentosa with *rolC* gene[J]. Journal of Northwest Forestry University,2007,22(5): 57-61. (in Chinese)

[14] 李雪,马玉超,李煦,等. 苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(1):5920-5924.

LI X,MA Y C,LI X,*et al.* Research progress in parasporal crystal from *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2012,40(1):5920-5924. (in Chinese)

[15] 李今煜,潘智雄,黄天培. 苏云金芽孢杆菌外孢囊蛋白基因敲除载体的构建[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2012,41(2):159-162.

LI J Y,PAN Z X,HUANG T P. Construction of the exosporium protein gene knockout vector in *Bacillus thuringiensis* [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Nat. Sci. Edi.,2012,41(2):159-162. (in Chinese)

[16] 李霞,薛泉宏,樊军锋,等. 一年生转 Bt 基因欧洲黑杨对土壤微生物的影响[J]. 西北林学院学报,2011,26(4):123-127.

LI X,XUE Q H,FAN J F,*et al.* Effects of one-year-old Bt transgenic *Populus nigra* on soil microorganism[J]. Journal of Northwest Forestry University,2011,26(4):123-127. (in Chinese)

(上接第 89 页)

[15] 郭跃,丁国栋,吴斌,等. 毛乌素沙地沙木蓼茎干液流规律研究[J]. 水土保持通报,2010,30(5):22-26.

GUO Y,DING G D,WU B,*et al.* Stem sap flow dynamics of *Atraphaxis Bracteata* in MuUs sandy area[J]. Bulletin of Soil and Water Conservation,2010,30(5):22-26. (in Chinese)

[16] 李昌龙,王继和,孙坤,等. 民勤连古城自然保护区群落结构和物种多样性特征分析[J]. 西北植物学报,2006,26(11):2338-2344.

LI C L,WANG J H,SUN K,*et al.* Community structure and species diversity in Liangucheng nature reserve of Minqin county[J]. Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.,2006,26(11): 2338-2344. (in Chinese)

[17] 司建华,冯起,常宗强,等. 阿拉善雅布赖风沙区荒漠植物群落结构和物种多样性研究[J]. 西北植物学报,2011,31(3): 0602-0608.

SI J H,FENG Q,CHANG Z Q,*et al.* Community structure and species diversity of desert plants in the wind sand area of Yabulai[J]. Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.,2011,31(3): 0602-0608. (in Chinese)

[18] 蒲高忠,唐赛春,潘玉梅,等. 不同生境中飞机草的群落结构及其生物多样性[J]. 草业科学,2012,29(3):447-452.

PU G Z,TANG S C,PAN Y M,*et al.* *Eupatorium odoratum* community structure and its effects on species richness of native vegetation community under different habitats in Karst area of Guangxi[J]. Pratacultural Science,2012,29(3): 447-452. (in Chinese)

[19] 董云龙,张德罡,陈建纲,等. 东祁连山高寒草地不同生境条件下植物群落结构特征及多样性比较——以甘肃省天祝抓喜秀龙乡为例[J]. 草地学报,2014,22(3):481-487.

DONG Y L,ZHANG D G,CHEN J G,*et al.* Comparison of community structure and biodiversity of alpine meadow in different habitats in eastern Qilian Mountains—a case study in Zhuaxixiulong township of Tianzhu tibetan autonomous county,Gansu Province[J]. Acta Agrestia Sinica,2014,22(3): 481-487. (in Chinese)