

DOI: 10.3969/j.issn.2095-3704.2012.04.001

PTD-Cry3Aa 原核融合表达产物对 甘薯小象甲的活性研究

邱道寿, 刘晓津*

(广东省农业科学院 作物研究所/广东省农作物遗传改良重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 为探讨 TAT PTD 对苏云金杆菌鞘翅目特效基因 *Cry3Aa* 是否具有协同作用, 本试验在实现了融合基因 TAT PTD-Cry3Aa 大肠杆菌原核表达的基础上, 以甘薯小象甲为生测对象测定了原核表达产物 PTD-Cry3Aa 与 *Cry3Aa* 的毒力。结果表明, 用大肠杆菌表达的 *Cry3A* 和 PTD-Cry3Aa 包涵体初提物均对甘薯小象甲成虫和幼虫有杀虫活性, 且表现出一定毒力增效作用, 对成虫的增效倍数为 2.01 倍, 对幼虫的增效作用更加明显, 达到 3.19 倍。这一研究结果对于甘薯小象甲的生物防治研究以及转基因抗虫甘薯的研究具有重要的指导作用。

关键词: *Cry3Aa*; 蛋白转导结构域(PTD); 甘薯小象甲

中图分类号: S435.315⁺.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-3704 (2012) 04-0347-05

A Study on the Activity of the Prokaryotic Expression Products of PTD-Cry3Aa Fusion Gene to Sweet Potato Weevil, *Cylas formicarius*

QIU Dao-shou, LIU Xiao-jin*

(Key Laboratory of Crops Genetics and Improvement of Guangdong Province, Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to study the synergism of the TAT PTD (the protein transduction domain in HIV-1 transactivator of transcription protein) to the *Cry3Aa* from *Bacillus thuringiensis*, the fusion gene PTD-Cry3Aa and gene *Cry3Aa* were expressed in *E. coli* cells. The toxicity of prokaryotic expression products from PTD-Cry3Aa and *Cry3Aa* was tested in sweet potato weevil, *Cylas formicarius*. The bioassay results showed that the primary extracts of PTD-Cry3Aa and *Cry3Aa* inclusion bodies exhibited activities against the adults and larvae of sweet potato weevil. The results also indicated there was a synergism of PTD to *Cry3Aa* both on the adults and the larvae. The synergistic rates were 2.01 folds for the adults while 3.19 folds for the larvae. The study results would play an important role in biological control and transgenic sweet potato against sweet potato weevil.

Key words: *Cry3Aa*; TAT protein transduction domain; *Cylas formicarius*

甘薯小象甲(*Cylas formicarius*)是我国南方薯区的一种重要害虫, 除以成虫咬食藤、叶、幼芽、薯块外, 还易引起甘薯病害^[1-2]。同时幼虫蛀食粗蔓和薯块形成隧道, 诱导产生萜类和酚类物质而导致味苦, 即使少量为害也不能食用或饲用^[3-4]。常年给我国南方薯区造成较大损失, 一般损失为 5%~20%,

严重时高达 30%以上^[5], 大多数疫区薯块为害率高达 60%~100%^[6]。长期以来, 尽管各种防治措施都有应用, 但实际效果一直不是十分理想。

Cry3Aa 是一个对鞘翅目害虫特效的苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)杀虫蛋白基因, 最早由 Herrnstadt 等^[7]于 1987 年从苏云金芽胞杆菌圣地亚

收稿日期: 2012-10-20

基金项目: 广东省自然科学基金项目(06025389)

作者简介: 邱道寿, 男, 江西遂川人, 博士, 副研究员, 主要从事作物病虫害生物防治与生物技术研究, E-mail: dsqiu@163.com;

* 通信作者: 刘晓津, 研究员, 主要从事作物品种选育研究, E-mail: lxj6306@yahoo.com.cn。

哥亚种中获得克隆, 目前全球已获得 12 个 *Cry3Aa* 克隆, 它们的氨基酸同源性都在 97% 以上。其编码区一般为 1 932 或 1 956 bp, 编码的蛋白质由 644 或 652 个氨基酸残基组成, 分子量为 65 ku^[7]、73 ku^[8]、85.78 ku^[9]。含 *Cry3Aa* 基因 Bt 菌株的制剂已被广泛应用于防治马铃薯甲虫及其它作物、仓储和森林鞘翅目害虫^[10-12], *Cry3Aa* 基因还被应用于多种转基因作物, 以对抗马铃薯甲虫^[13-15]、甘薯小象甲^[16]、白杨叶甲^[17]和米象^[18]等多种鞘翅目害虫。原核表达的 *Cry3Aa* 产物也被证明对安第斯马铃薯象甲 (*Premnotrypes vorax*)^[19]、椰心叶甲^[20]较强的杀虫活性。这些研究表明 *Cry3Aa* 是对抗鞘翅目害虫生防制剂或转基因作物的一个很有效的候选基因, 应用前景广阔。

TAT(transactivator of transcription)为人类免疫缺陷病毒(HIV-1)的重要调节基因, 其编码的 TAT 蛋白是 HIV-1 重要的反式激活因子。在 TAT 功能区有一段被称为蛋白转导结构域(protein transduction domain, PTD)的区段, 其核心序列由 11 个氨基酸组成, 目前的诸多研究发现它具有细胞传导和亚细胞定位功能, 能够有效地引导肽段或蛋白质通过细胞膜, 从细胞外向细胞内直接跨膜转运, 能够通过血脑屏障, 而且具有转导速度快, 效率高和广谱性等特点, 是一个极好的蛋白质、多肽和基因的转运载体。利用 PTD-蛋白质系统来提高目的蛋白穿透生物膜的方法既简单可行, 又不影响生物大分子的活性, 因此对蛋白功能研究、协同作用研究是一个极好的手段。通过大肠杆菌原核表达的 *PTD-CryIAc* 融合蛋白对小菜蛾杀虫毒力研究表明, PTD 对 *CryIAc* 具有 2~9 倍的增效作用, 被认为是提高 Bt 杀虫毒力和治理小菜蛾对 Bt 产生抗性的有效途径^[21-23]。通过烟草表达的 *PTD-CryIAc* 融合蛋白同样也表现出 2~3 倍的毒力增效作用^[24]。

为了探讨 TAT PTD 对 *Cry3Aa* 是否具有毒力增效作用, 我们合成了 *PTD-Cry3Aa* 融合基因, 设计了 *PTD-Cry3Aa* 融合基因的大肠杆菌原核表达, 并测定了它对甘薯小象甲的毒力活性, 现将结果整理如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体 pUC57 Vector 购自南京金斯瑞生物科技有限公司。大肠杆菌 pET22b(+)载体、菌株 *Escherichia coli* DH5α、*E.coli* BL21(DE3)菌株由本实验室保存。

1.1.2 工具酶和试剂盒 *Pfu* 酶、*Taq* 酶、dNTP、10×PCR buffer、限制性内切酶、质粒提取、小量胶回收试剂盒和 DNA Marker 等分别购自大连 TaKaRa、北京鼎国(Dingguo)、上海申能博彩(SNBC)、Gen-view 等公司。

1.2 方法

1.2.1 *His-tag-PTD-linker-Cry3Aa* 基因的合成 通过目前国际上已命名的 12 个 *Cry3Aa*(*Cry3Aa1*, *Cry3A2*, *Cry3A3*,, *Cry3Aa12*)基因序列的比对分析, 发现其中的 *Cry3Aa2*、*Cry3Aa3*、*Cry3Aa5*、*Cry3Aa6* 和 *Cry3Aa12* 5 个基因的氨基酸序列均为 644aa, 而且 100%同源。因此, 笔者选取其对应的蛋白质序列(GenBank 登录号为 *AAA22541.1*)作为基因合成的模板。将此序列、TAT PTD 核心序列(YGRKKRRQRRR)进行大肠杆菌偏好密码子优化, 将优化后的两 CDS 序列用 linker(GGATCC)相连, 再在 PTD 的 5'端引入 His-tag (CACCATCATCATC ATCAT)序列, 以及在整个序列的 5'端和 3'端分别引入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点, 以此设计序列(2004 bp, 图 1)交南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

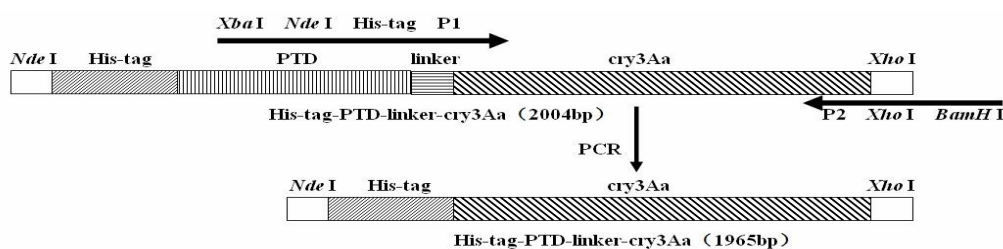


图 1 PCR 扩增示意

1.2.2 *His-tag-Cry3Aa* 基因的 PCR 扩增 以合成的 *His-tag-PTD-linker-Cry3Aa* 基因为模板, 通过设计

两条引物: P1 GCTCTAGACGCATATG CACCAT
CATCATCATCATTTGGGCTTGTGGCATCGCT

(单划线为分别 *Xba* I 和 *Nde* I 酶切位点, 双划线为 His-tag), P2 GTGGATCCCGCTCGAGTTATTAGT T
CACCGGAATAAATTCA ATT(单划线分别为 *Bam* H I 和 *Xho* I 酶切位点), 利用 PCR 扩增获得 His-tag-Cry3Aa 基因(图 1)。PCR 反应体系为 *Pfu* (SNBC)1 μ L, 10 \times PCR buffer (SNBC)1 μ L, P1 和 P2 各 2 μ L, dNTP (Gen-view)2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L, SNBC)2 μ L, 模板 DNA 0.5 μ L, 加去离子水 9.5 μ L 至总体积为 20 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 进行 24 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保持。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶回收方法回收目的片段。

1.2.3 克隆载体的构建 上述 PCR 反应的回收产物与 pUC57 vector 连接, 构建重组质粒 *pUC57-His-tag-Cry3Aa*, 连接的反应体系和反应条件根据公司说明书。然后将连接产物转化 *E. coli DH5 α* 感受态细胞。将转化菌取 100 μ L 涂于含 100 mg/L 氨苄西林、IPTG(20 mg/mL)和 X-Gal(20 mg/mL)的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 孵育 16 h, 分别挑 10 个白色单菌落扩大培养。采用质粒小提试剂盒提取质粒, 经 *Xba* I 和 *Bam* H I 双酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 筛选阳性克隆。

1.2.4 测序及序列分析 将鉴定正确的连接有目的片段的质粒交上海英骏(Invitrogen)公司进行测序, 并在<http://www.ebi.ac.uk/> 网站用 ClustalW2 软件对测序结果进行比对分析。

1.2.5 载体构建与原核表达 分别将含有 *Cry3Aa* 和 *PTD-Cry3Aa* 基因的 pUC57 重组质粒和表达载体 pET22b(+)质粒经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后, 分别回收 *Cry3Aa* 和 *PTD-Cry3Aa* 基因片段以及表达载体大片段, 将两者 22 $^{\circ}$ C 连接后转化 DH5 α 感受态细胞。经 PCR 初步鉴定正确后, 分别提取重组质粒 *pET-Cry3Aa* 和 *pET-PTD-Cry3Aa*。经测序鉴定正确后, 将重组质粒 *pET-Cry3Aa* 和 *pET-PTD-Cry3Aa* 分别转入感受态细胞 BL21(DE3)中。挑取阳性克隆于 LB(Amp⁺)液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜。按 1%的接种量将菌液转接至 50 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至菌液 OD 值达到 0.5~1.0 时, 在 100 mL 菌液中加入 IPTG (终浓度为 0.1 mol/mL), 37 $^{\circ}$ C 震荡

连续培养 8 h。各样品超声波破碎后, 收集沉淀(包涵体)。

1.2.6 原核表达 PTD-Cry3Aa 与 Cry3Aa 重组蛋白对甘薯小象甲的毒性 收集诱导后的菌体, 超声波破碎, 分别初步纯化 *PTD-Cry3Aa* 与 *Cry3Aa* 包涵体蛋白。用蒸馏水配成母液后(20 mg/mL), 梯度稀释, 同时设蒸馏水为对照。

成虫的生物测定: 将 5 cm 长带心叶的甘薯嫩苗浸渍 5 min 后, 阴干后置于玻璃组培瓶中, 每瓶放置 3 棵小苗。然后将在人工气候箱中用薯块和薯苗饲养的甘薯小象甲成虫接于组培瓶中, 每瓶接 10 头, 每个浓度设 3 次重复。25 $^{\circ}$ C 人工气候箱弱光培养, 5 d 后统计死亡率。

幼虫的生物测定: 以干燥甘薯粉为主要成分配制半天然饲料, 并制成直径 2.5 cm、厚 1 cm 左右大小的冻干饲料块, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。生测时, 将饲料块浸泡于各梯度浓度的包涵体稀释液中, 令其充分泡软, 然后用镊子夹于 12 孔细胞培养板中, 每孔一块, 接甘薯小象甲初孵幼虫 5 头, 每处理接 3 板, 盖子内加吹塑纸垫盖严, 橡皮筋扎牢。置于 25 $^{\circ}$ C 人工气候箱弱光培养, 5 d 后统计死亡率。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的酶切鉴定

对公司合成构建的 *pUC57-His-tag-PTD-linker-Cry3Aa* 质粒 A 进行 *Xba* I 和 *Bam* H I 双酶切, 以及随机挑取 PCR 产物构建的 *pUC57-His-tag-Cry3Aa* 质粒 B 的阳性克隆进行 *Xba* I 和 *Bam* H I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到两条 2 700 bp 和 2 000 bp 左右的条带(图 2 所示), 与预计大小完全吻合, 证明 *His-tag-PTD-linker-Cry3Aa* 融合基因以及 *His-tag-Cry3Aa* 基因已成功插入 pUC57 载体。

2.2 重组质粒的测序鉴定

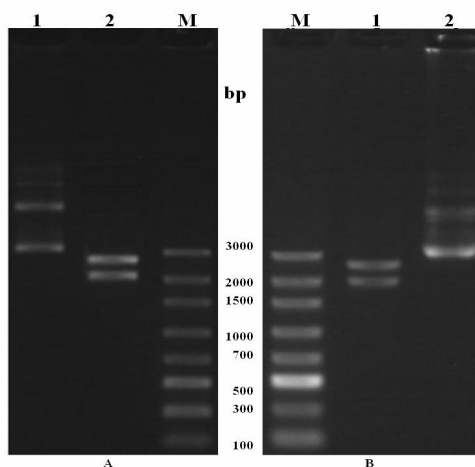
分别随机挑取 2 个质粒 A 的阳性克隆和 5 个质粒 B 的阳性克隆送上海 Invitrogen 公司进行测序, 分别在<http://www.ebi.ac.uk/> 网站用 ClustalW2 软件对 7 个测序结果进行了比对分析。质粒 A 的两个测序结果都与设计的原始序列 100%吻合。而质粒 B 的 5 个测序结果中, 有 1 个与设计序列达到 100%吻合; 其它 4 个测序结果出现 2~5 碱基不同程度的缺失或者突变错误。

2.3 重组蛋白 PTD-Cry3Aa 与 Cry3Aa 对甘薯小象

甲的毒力比较

由表 1 可以看出, *Cry3Aa* 对甘薯小象甲成虫和幼虫的致死中浓度分别是 4.53, 1.34 mg/mL, 也就是说 *Cry3Aa* 对幼虫的毒力是成虫的 3.38 倍; 而融合蛋白 *PTD-Cry3Aa* 对成虫和幼虫的致死中浓度分别是 2.25, 0.42 mg/mL, 也就是说融合蛋白 *PTD-Cry3Aa* 对幼虫的毒力是成虫的 5.36 倍; 包涵体 *Cry3Aa* 和 *PTD-Cry3Aa* 对成虫的致死中浓度分别是 5.53, 2.25 mg/mL, 也就说对同一虫龄对象,

PTD-Cry3Aa 的毒力要比 *Cry3Aa* 强, 亦即由于 PTD 与 *Cry3Aa* 融合表达, PTD 对 *Cry3Aa* 产生明显的增效作用, 增效倍数为 2.01 倍; 同理, 对于幼虫阶段, 包涵体 *Cry3Aa* 和 *PTD-Cry3Aa* 对幼虫的致死中浓度分别是 1.34, 0.42 mg/mL, *PTD-Cry3Aa* 的毒力要比 *Cry3Aa* 更强, 由于 PTD 与 *Cry3Aa* 二者的融合表达, PTD 对 *Cry3Aa* 产生更加明显的增效作用, 增效倍数为 3.19 倍。



M. DNA 标准 DL3 000; 1. 质粒 pUC57; 2. *Xba* I 与 *Bam*HI 双酶切后的质粒 pUC57

图 2 重组质粒的鉴定

表 1 重组蛋白 *PTD-Cry3Aa* 与 *Cry3Aa* 对甘薯小象甲的毒力

虫龄	蛋白	毒力回归方程	相关系数	LC ₅₀ (mg·mL ⁻¹)	增效倍数
成虫	<i>Cry3Aa</i>	$y=4.19+1.23x$	0.99	4.53	2.01
	<i>PTD-Cry3Aa</i>	$y=4.45+1.57x$	0.96	2.25	
幼虫	<i>Cry3Aa</i>	$y=4.79+1.62x$	0.96	1.34	3.19
	<i>PTD-Cry3Aa</i>	$y=6.15+3.10x$	0.92	0.42	

3 讨论

本研究在设计 PTD 与鞘翅目特效杀虫基因 *Cry3Aa* 组成融合片段时, 在 PTD 与 *Cry3Aa* 之间设计了一个 6 个碱基的 linker(GGATCC), 最后利用大肠杆菌获得了 *PTD-linker-Cry3Aa* 融合片段成功表达, 融合蛋白对甘薯小象甲表现出较强毒力, 而且比单独表达的 *Cry3Aa* 蛋白有 2~3 倍的毒力提高, 说明我们这种设计是成功的。试验结果也表明 PTD 对 *Cry3Aa* 基因具有毒力增效作用。

关于 PTD 对苏云金芽孢杆菌 ICP 基因协同作用研究, 目前已有不少报道。曹丽波^[22]研究表明, *PTD-Cry1Ac* 的原核表达产物对小菜蛾有一定的毒

力增效作用, 尤其是对田间种群比较明显, 增效倍数到达 4.76 倍。刘玮^[23]研究表明原核表达的 6 种 *tat-Cry1Ac* 蛋白对小菜蛾的杀虫活性均有一定程度的提高, 增效倍数达到 2.1~5.54 倍。杨峰山^[21]研究结果表明目前原核表达 *PTD-Cry1Ac* 融合蛋白毒力增效作用最高, 其对小菜蛾敏感种群的增效倍数为 4.84 倍, 对小菜蛾抗性种群的增效倍数为 9.69 倍, 显示出 PTD 对治理害虫, 对 Bt 抗药性的独特作用。宋政良^[24]首次报道了 *TAT-Cry1Ac* 在烟草、拟南芥等真核植物表达产物的增效作用, 其增效倍数介于 2~3, 可为转基因抗虫植物的设计提供新的途径和策略。

参考文献:

- [1] 于海滨, 郑琴, 陈书龙. 甘薯小象甲的生物学特征与综合防治措施[J]. 河北农业科学, 2010, 8: 32-35.
- [2] 邱文忠, 蔡少强. 甘薯小象甲的发生为害及综合防治[J]. 现代农业科技, 2008, 20: 130-131.
- [3] Chalfant R B, Jansson R K, Seal D R, et al. Ecology and management of sweet potato insects[J]. Annual Review of Entomology, 1990, 35: 157- 80.
- [4] Padmaja G, Rajamma P. Biochemical changes due to the weevil (*Cylas formicarius* Fab.) feeding on sweet potato[J]. Journal of Food Science and Technology, 1982, 19: 162-163.
- [5] 张世祎, Talekar N S, 李正跃, 等. 甘薯小象甲成虫对甘薯植株不同部位的选择行为[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(S1): 127-129.
- [6] Loebenstein G, Thottappilly G. The Sweetpotato[M]. Germany: Springer Science + Business Media B. V., 2009: 161-188.
- [7] Herrnstadt C, Gilroy T E, Sobieski D A, et al. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp[J]. San Diego Gene, 1987, 57(1): 37-46.
- [8] Donovan W P, Gonzalez Jr J M, Gilbert M P, et al. Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene[J]. Mol Gen Genet, 1988, 214(3): 365-372.
- [9] Chen J, Dai L Y, Wang X P, et al. The *cry3Aa* gene of *Bacillus thuringiensis* Bt886 encodes a toxin against long-horned beetles[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67(3): 351-361.
- [10] Bauer L S. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*[J]. Fla. Entomol, 1995, 78: 414-443.
- [11] Bauer L S, Pankratz H S. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. san diego on midgut cells of the cottonwood leaf beetle[J]. Invertebr Pathol, 1995, 60: 15-25.
- [12] Brian A. Federici and Leah S. *Cyt1Aa* protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to *Cry3Aa*[J]. Applied and environmental microbiology, 1998, 64(11): 4368-4371.
- [13] Perlak F J., Stone T B, Muskopf M Y, et al. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles[J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 313-321.
- [14] Watanabe T H, Kuribara T, Mishima, et al. New qualitative detection methods of genetically modified potatoes[J]. Biol. Pharm. Bull, 2004, 27(9): 1333-1339.
- [15] Jelenkovic G, Billings S, Chen Q, et al. Transformation of eggplant with synthetic *cryIIIa* gene produces a high level of resistance to the Colorado potato beetle[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1998, 123(1): 19-25.
- [16] Moran R, Garcia R, Lopez A, et al. Transgenic sweet potato plants carrying the delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis[J]. Plant science, 1998, 139: 175-184.
- [17] Genissel A, Leple J C, Millet N, et al. High tolerance against *Chrysomela tremulae* of transgenic poplar plants expressing a synthetic *cry3Aa* gene from *Bacillus thuringiensis* ssp tenebrionis[J]. Molecular breeding, 2003, 11(2): 103-110.
- [18] Johnson T M, Rishi A S, Nayak P, et al. Cloning of a *cryIIIa* endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var tenebrionis and its transient expression in indica rice[J]. Journal of Biosciences, 1996, 21(5): 673-685.
- [19] Gomez S, Hernandez J, Zimmermann B H. et al. Recombinant *Cry3Aa* has insecticidal activity against the Andean potato weevil, *Premnotrypes vorax*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 279(2): 653-656.
- [20] 苏震, 邓柳红, 易小平, 等. 原核表达 *Cry3Aa* 蛋白对椰心叶甲的杀虫活性[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 04: 691-694.
- [21] 杨峰山. 抗 Bt 小菜蛾的选育、受体基因克隆及 PTD 对 *Cry1Ac* 的增效作用[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [22] 曹丽波. PTD-*Cry1Ac* 载体的构建表达及杀虫活性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [23] 刘玮. PTD 对 Bt 杀虫蛋白 *Cry1Ac* 的增效和克抗分子机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [24] 宋政良. *TAT-Cry1Ac* 融合蛋白在烟草、拟南芥中阳性植株的筛选及对小菜蛾治理研究[D]. 黑龙江: 黑龙江大学, 2010.