

苏云金芽孢杆菌 Cry8Ca2 蛋白的纯化与活性的研究

吴洪福^{1,4}, 张彦彩², 郭淑元^{2*}, 张杰¹, 王容燕³, 高继国⁴

- (1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094;
2. 北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081; 3. 河北省农林科学院植物保护研究所, 保定 071000;
4. 东北农业大学生命科学院, 哈尔滨 150030)

摘要 *cry8Ca2* 基因是本实验室自行分离克隆的一种新型苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)杀虫晶体蛋白基因,其表达 130 kDa 蛋白对铜绿异丽金龟(*Anomala corpulenta*)和黄褐异丽金龟(*A. exoleta*)幼虫具有较高的活性。本研究对 Cry8Ca2 蛋白原毒素及胰凝乳蛋白酶消化片断的纯化条件及活性进行研究,最适的消化条件为质量比 1:20,37 ℃,消化 1 h。通过阴离子交换层析得到纯的活性毒素蛋白。用原毒素与纯化的毒素对铜绿丽金龟幼虫进行生测,Cry8Ca2 原毒素蛋白的 LC_{50} 为 0.47 $\mu\text{g/g}$ 土,纯化的毒素的 LC_{50} 为 0.08 $\mu\text{g/g}$ 土,毒素的杀虫活性可以达到原毒素的 6 倍。

关键词 苏云金芽孢杆菌; Cry8Ca2 原毒素; Cry8Ca2 毒素; 纯化; 活性

中图分类号 S 482.39

A study on purification and activity of Cry8Ca2 protein from *Bacillus thuringiensis*

Wu Hongfu^{1,4}, Zhang Yancai², Guo Shuyuan², Zhang Jie¹, Wang Rongyan³, Gao Jiguo⁴

- (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;
2. Life Science and Technology College, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;
3. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forest Sciences, Baoding 071000, China;
4. Life Science College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Cry8Ca2 protein encoded by the gene *cry8Ca2* of *Bacillus thuringiensis* is a kind of insecticidal crystal protein with molecular mass of 130kDa. It is larvicidal to both *Anomala corpulenta* and *A. exoleta*. The solubilized Cry8Ca2 protoxin of 130kDa was activated by chymotrypsin at the enzyme / protoxin ratio of 1:20 (w/w). It was further purified by anion exchange chromatography on Resource Q column. The activities of the protoxin and the toxin were evaluated by bioassays. The lethal concentration fifty percent (LC_{50}) of the protoxin was 0.47 μg per gram soil, while that of the toxin was 0.08 μg per gram soil. The activity of the toxins was six folds as that of the protoxin. These results indicate that Cry8Ca2 toxin may be beneficial for biocontrol of both *A. corpulenta* and *A. exoleta*.

Key words *Bacillus thuringiensis*; Cry8Ca2 protoxin; Cry8Ca2 toxin; purification; activity

金龟子属于鞘翅目金龟总科(Scarabaeoidea),其幼虫俗称蛴螬是一类重要的世界性地下害虫,分布广泛,为害多种植物。近 20 年来全国各地的大量调查表明,蛴螬在地下害虫中危害居首位,占地下害虫总虫量的 80% 以上;每年全国蛴螬发生面积约

600 万 hm^2 ,产量损失 20%。1976、1977 年,全国每年蛴螬发生面积曾高达 2 千万 hm^2 ,产量损失 40%,有些地块甚至绝产^[1-2]。据调查,北京及周边地区的绿化草坪、草坪生产基地、高尔夫球场草坪及运动场草坪主要以黄褐异丽金龟(*Anomala exoleta*)和铜

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 国家“973”项目(2003CB114201);国家“863”项目(2006AA10A212)

* 通讯作者 Tel: 010-68914907; E-mail: guosy@bit.edu.cn

绿异丽金龟(*A. corpulenta*)等为危害优势种^[3]。对这类重要害虫的防治一直依赖于化学农药,而生物防治的研究和应用也局限于病原真菌和寄生线虫等手段^[4-5]。

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种重要的昆虫病原细菌,呈革兰氏阳性(G^+),杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs)是其主要的杀虫成分,也是细菌毒素中结构与功能研究较为深入的一种^[6-7]。对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、同翅目昆虫及动植物寄生线虫等有特异性毒杀作用,而对人和家畜无害,不污染环境,在农林卫生害虫防治中得到广泛的应用^[8]。

cry8Ca2 基因是 2004 年由中国农业科学院植物保护研究所宋福平等克隆的(专利申请号为 200410009807),该基因已经在 GenBank 中登记(accession number 为 AY518201),并为 Bt 国际命名委员会命名。*cry8Ca2* 基因编码由 1 160 个氨基酸组成的蛋白,分子质量为 130 kDa,对铜绿异丽金龟和黄褐异丽金龟幼虫具有特异性的杀虫活性。本研究对 Cry8Ca2 蛋白的纯化进行了研究,建立了 Cry8Ca2 毒素的方法,并进行了生物学活性测定。纯化的活性毒素其杀虫活性高于原毒素,本研究将为蛱蝶的生物防治起到重要的指导作用。

1 试验材料及来源

1.1 菌株来源

苏云金芽孢杆菌 Cry8Ca2 原始菌株(HBF-1)由河北省农林科学院植物保护研究所提供。

1.2 培养基及试剂

牛肉膏蛋白胨培养基:5.0 g 蛋白胨,3.0 g 牛肉膏,加水定容 1 000.0 mL,pH 7.0。

2 方法

2.1 *cry8Ca2* 基因在原始菌株中的表达

cry8Ca2 基因的原始菌株(HBF-1)活化过夜,按 1%接菌量转接,30 °C、230 r/min 培养 76 h,菌体裂解至晶体释放 50%以上时进行蛋白提取。

2.2 Cry8Ca2 蛋白提取方法

牛肉膏蛋白胨培养菌体至裂解;3 000 r/min 离心 8 min 收集菌体;1 mol/L NaCl 悬浮菌体后 3 000 r/min 离心 8 min,去上清;灭菌蒸馏水洗沉淀;50 mmol/L Na_2CO_3 、50 mmol/L EDTA 体积比为

5%的巯基乙醇 pH 10 悬浮沉淀冰上 100 r/min,4 h 以上;10 000 r/min 离心 10 min,取上清;上清加入 1/10 体积的 4 mol/L NaAC 调 pH 至 4.7,混匀,冰上沉淀 2 h 以上;10 000 r/min 离心 10 min,取沉淀;用灭菌蒸馏水洗蛋白至没有巯基乙醇为止;沉淀用适量的 50 mmol/L Na_2CO_3 溶解 pH10.2,冰上溶解 1 h;4 °C,12 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀^[9]。

2.3 SDS-PAGE 检测

聚丙烯酰胺凝胶配置及电泳方法参见分子克隆实验指南^[10]。

2.4 Cry 蛋白纯化

先用胰凝乳蛋白酶消化,酶与 Cry8Ca2 原毒素的质量比为 1:10 到 1:200,然后 Resource Q 进行阴离子交换层析。平衡缓冲液为 50 mmol/L Na_2CO_3 ,pH10.2,1 mol/L NaCl 线性梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,洗脱下来的蛋白用截留量 10 kDa 的超滤管脱盐。蛋白定量是通过 SDS-PAGE 电泳中加入标准 BSA 定量;真空冷冻干燥备用。

2.5 生物活性测定

供试昆虫铜绿异丽金龟的幼虫由河北省农林科学院植保所实验室饲养的标准试虫。测定方法:将纯化的 Cry8Ca2 蛋白干粉溶解浓度为 2 mg/mL,系列稀释,加入到含有粗细均匀的新鲜土豆条的灭菌细土中,搅拌混匀。以 7 日龄铜绿异丽金龟幼虫作为试虫,每个处理接虫 20 头,重复 3 次,50 mmol/L Na_2CO_3 处理作空白对照,感染饲养 7、14 d 检查死虫数量。采用 POLO 软件分析结果。

3 结果与分析

3.1 Cry8Ca2 蛋白原毒素的分离和胰凝乳蛋白酶消化研究

试验中提取的苏云金芽孢杆菌 Cry8Ca2 原毒素分子量约为 130 kDa(图 1)。

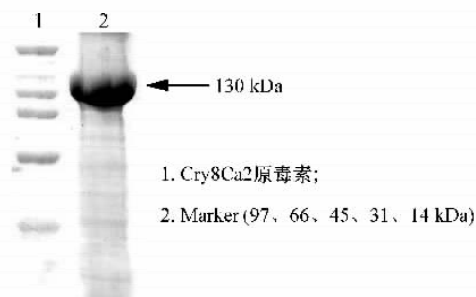


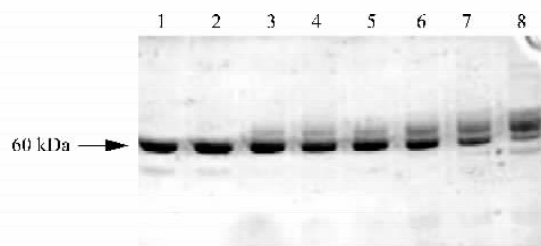
图 1 Cry8Ca2 原毒素 SDS-PAGE 电泳

Cry8Ca2 原毒素的消化结果表明,在 1 h,37 ℃ 条件下原毒素可以降解到 60 kDa 左右的毒素(图 2)。试验中进行了胰凝乳蛋白酶浓度的摸索,在酶与 Cry8Ca2 原毒素的质量比为 1:10 和 1:20 时,可获得消化完全的 60 kDa 的活性毒素(图 2 样品 1、2);当酶浓度低时(1:50~1:200)消化不完全,消化产物为一系列大小不等的蛋白片段(图 2 样品 3~8)。

3.2 Cry8Ca2 毒素的纯化

采用阴离子交换预装柱 Resource Q 对该蛋白进行离子交换层析,通过 NaCl 线性梯度进行洗脱,结果见图 3。在 NaCl 浓度为 0.38 mol/L 时,目标蛋白被洗脱下来,洗脱蛋白的紫外吸收最高值达到 3 804 mAU。通过 AKTA explorer 软件分析 Cry8Ca2

毒素过阴离子交换的得率为 92.41%。进一步通过 SDS-PAGE 电泳检测洗脱峰,结果表明目标蛋白 Cry8Ca2 毒素已经和杂蛋白完全分开,纯度很高(图 4)。



酶与Cry8C原毒素的质量比分别为: 1. 1:10; 2. 1:20; 3. 1:50; 4. 1:60; 5. 1:70; 6. 1:80; 7. 1:100; 8. 1:200

图2 Cry8Ca2 原毒素胰凝乳蛋白酶消化情况

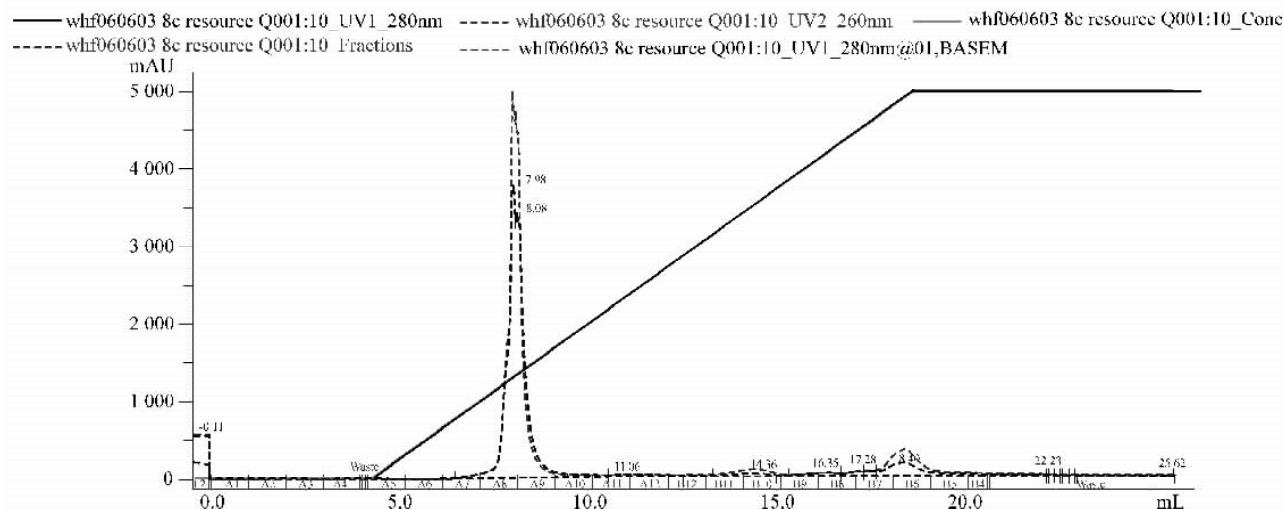


图3 Cry8Ca2 原毒素胰凝乳蛋白酶阴离子交换层析图

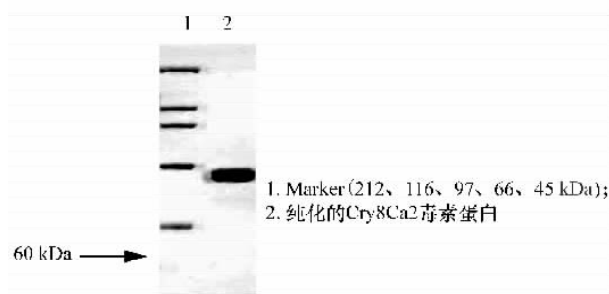


图4 SDS-PAGE 电泳检测结果

3.3 杀虫活性测定结果

分别用 Cry8Ca2 原毒素和纯化的活性毒素进行杀虫试验,结果见表 1。数据分析结果表明,Cry8Ca2 原毒素和毒素对铜绿异丽金龟幼虫都有很好的杀虫活性,饲毒 14 d,Cry8Ca2 原毒素的 LC_{50} 为 $0.47 \mu\text{g}/\text{g}$ 土,胰凝乳蛋白酶消化后纯化的毒素的

LC_{50} 为 $0.08 \mu\text{g}/\text{g}$ 土,根据试验数据表明纯化后的 Cry8C 毒素的杀虫活性可以达到 Cry8Ca2 原毒素的近 6 倍。

表 1 Cry 蛋白对铜绿异丽金龟幼虫杀虫活性测定结果 (14 d)¹⁾

处理	LC_{50} (95%置信限)/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
Cry8Ca2 原毒素	0.47(0.13~0.86)
Cry8Ca2 胰凝乳蛋白酶消化	0.08(0.07~0.38)

1) LC_{50} 单位为 1 g 土中原毒素含量。

4 讨论

为了评价毒素蛋白的杀虫活性,更真实、准确地反映其毒力大小,进行了 Cry8Ca2 毒素蛋白的纯化,通过试验摸索掌握了纯化条件,并进行了生物活性测定。由于不同 Cry 蛋白的等电点比较接近,本方

法也可以在微调后应用于其他 Cry 蛋白的纯化研究。

Cry 毒素晶体结构表明其活性区都是由 3 个结构域组成^[11-16], 这 3 个结构域或者参与受体结合^[13], 或者与插入昆虫中肠膜形成孔洞有关^[17]。有试验证据表明, δ 内毒素的杀虫选择性和毒素与昆虫中肠受体高度亲和密切相关^[13]。同时, Cry 蛋白的毒力大小与受体的亲和能力有关, 亲和力越高, 则毒蛋白与昆虫的 BBMV (brush-border membrane vesicles) 的结合越多, Cry 蛋白的毒力越强^[19]。作者用全长的 Cry8Ca2 的原毒素和胰凝乳蛋白酶激活的 60 kDa 纯化的毒素对铜绿异丽金龟幼虫进行了生物学活性测定, 两者均表现出较好的活性, 但是, 相比之下, Cry8Ca2 60kDa 毒素的活性是原毒素的 6 倍, 这可能是由于在结构上, 由于纯化的 60 kDa 的活性毒素与昆虫中肠上受体相识别的部位暴露, 从而更容易与受体亲和所导致; 另外的原因是活化的毒素可能更容易发生变构从而插入膜形成孔洞, 导致昆虫中肠膜渗透压失衡, 细胞破裂死亡。本试验结果提示在进行转基因应用时, 可选取 Cry 毒素中小的高活性的片段的基因进行转移, 这不但可以减小操作的难度、减低成本, 还可能获得更好的杀虫效果。

本研究建立了 Cry8Ca2 活性毒素蛋白的纯化方法, 通过该方法可大量获得该毒素的纯品, 为进一步研究该蛋白的结构与功能, 揭示毒素的杀虫机理奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 魏鸿钧. 中国地下害虫[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 1-41.
- [2] 王永祥, 杨彦杰, 柯汉英. 冀中平原区蛱蝶种类及综合防治技术[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 1998, 22(2): 268-270.
- [3] 罗 晨, 张芝利. 草坪地下害虫蛱蝶种类及为害调查[C]//中国昆虫学会第 6 届全国青年学术讨论会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 2005: 572-576.
- [4] 裴 晖, 吴振强, 梁世中. 金龟子绿僵菌及其杀虫机理[J]. 农药, 2004, 43(8): 342-345.
- [5] 徐洁莲, 韩日晔. 应用苹果蠹蛾线虫防治荔枝枝龟背天牛幼虫的研究[J]. 植物保护学报, 1995, 22(1): 12-16.
- [6] HOFTE H, WHITELEY H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* [J]. Microbiol Rev, 1989, 53(2): 242-255.
- [7] LESIEUR C, VECSEY-SEMJEN B, ABRAMI L, et al. Membrane insertion: the strategies of toxins [J]. Mol Membrane Biol, 1997, 14: 45-64.
- [8] SCHNEPF E, CRICKMORE N, VAN RIE J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62: 775-806.
- [9] LUO K, BANK D, ADANG M J. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda* [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 457-464.
- [10] 金冬雁. 分子克隆试验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 880-887.
- [11] GROCHULSKI P, MASSON L, BORISOVA S, et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation [J]. J Mol Biol, 1995, 353: 447-464.
- [12] MORSE R J, YAMAMOTO T, STROUD R M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope [J]. Structure, 2001, 9: 409-417.
- [13] LI J D, CARROLL J, ELLAR D J. Crystal structure of insecticidal δ endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution [J]. Nature, 1991, 353: 815-821.
- [14] GALITSKY N, CODY V, WOJTCZAK A, et al. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis* [J]. Biol Crystallogr, 2001, 57: 1101-1109.
- [15] BOONSERM P, DAVIS P, ELLAR D J, et al. Structure of the mosquito-larvicidal Cry4Ba toxin and its biological implications [J]. J Mol Biol, 2005, 384: 363-382.
- [16] BOONSERM P, MO M, ANG SUTHANASOMBAT C, et al. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution [J]. J Bacteriol, 2006, 188: 3391-3401.
- [17] MAAGD D, KWA M S, VAN DER KLER H, et al. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 1559-1563.
- [18] PUNTHEERANURAK T, UAWITHYA P, POTVIN L, et al. Ion channels formed in planar lipid bilayers by the dipteran-specific Cry4B *Bacillus thuringiensis* toxin and its alpHa1-alpHa5 fragment [J]. Mol Membr Biol, 2004, 21: 67-74.
- [19] LEE M K, RAJAMOCHAN F, JENKINS J L, et al. Role of two arginine residues in domain II, loop 2 of Cry1Ab and Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N [J]. Molecular Microbiology, 2000, 38(2): 289-298.