

孙钰航,刘艳杰,李海涛,等. 辽宁千山地区含 *cry8* 类基因的苏云金芽孢杆菌的分离、克隆与表达[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):28-32.

# 辽宁千山地区含 *cry8* 类基因的苏云金芽孢杆菌的分离、克隆与表达

孙钰航,刘艳杰,李海涛,高继国

(东北农业大学生命科学学院,黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:**QWH132、QZL1-2、QWH7-2、QZL144-1、QZL144-2、QWH101 是笔者所在实验室从辽宁千山地区自行分离的含有 *cry8* 类基因的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*),具有鞘翅目杀虫活性。本研究在 6 株菌株中成功发现并克隆了 6 个靶标生物为鞘翅目的 *cry8* 类基因,其中被鉴定为 *cry8C* 类、*cry8D* 类、*cry8F* 类(大小为 3 525 bp)、*cry8K* 类的基因各有 1 个,被鉴定为 *cry8E* 类的基因有 2 个,其大小分别为 3 534、3 495 bp。后 4 个基因已在 GenBank 注册,登记号依次为 KC778983、KC778983、KC778984、KC778985。将 6 个基因插入 pEB 表达载体,经过 PCR 检测与 SDS-PAGE 分析证实它们能在大肠杆菌中进行异源表达,这 6 个基因的表达约有 126~128 ku 的蛋白,这些菌株中的 Cry8 蛋白为进一步发掘我国天然的苏云金芽孢杆菌资源与构建新的杀鞘翅目昆虫的高效工程菌提供了重要的试验材料与新思路。

**关键词:**苏云金芽孢杆菌;大肠杆菌;质粒;*cry8* 基因;克隆;表达;生物信息学分析

**中图分类号:**Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)10-0028-04

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*) 是目前应用最多也是应用最广泛的生物杀虫剂。它是天然的昆虫病原菌,对无脊椎动物中的 4 个门(包括节肢动物门中的 16 个目的 3 000 种以上)的害虫有活性<sup>[1]</sup>,而对非目标生物安全,从而广泛用于防治鳞翅目(Lepidoptera)、双翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)等农林害虫<sup>[2]</sup>。苏云金芽孢杆菌能够产生多种杀虫活性物质,其中主要有 Cry 蛋白、Vip 蛋白、Sip 蛋白,其中对 Cry 蛋白与 Vip 蛋白的研究较深入<sup>[3]</sup>。随着研究与应用的深入,*Bt* 杀虫基因在杀虫工程菌和转基因抗虫植物广泛应用的过程中已发现多种昆虫在实验室条件下对 *Bt* 毒素产生抗性,在田间也发现了具有抗性的个体<sup>[4]</sup>,因此,筛选、克隆新的高毒力、杀虫谱广且不易产生抗性 with 交互抗性的基因是解决问题的重要途径之一<sup>[5]</sup>。*Cry8* 类蛋白质在 *Bt* 中分布比较广泛,它们对金龟子科、象甲科、叶甲科等多种鞘翅目害虫具有杀灭作用<sup>[6]</sup>。但目前成功防治鞘翅目害虫的 *Bt* 菌株和产品数量还相对较少,鞘翅目害虫是粮食作物、经济作物、园艺和森林的重要害虫,因此分离新的对鞘翅目害虫具有较高杀灭效果的 *Bt* 菌株并研究其杀虫蛋白基因,对于开发高效安全的生物杀虫剂和生产转基因作物有重要的理论和实践意义<sup>[7]</sup>。近些年发现的 *Bt* 杀虫活性物质另外一种 Sip 蛋白也具有鞘翅目害虫活性,Sip 蛋白的发现为 *Bt* 杀虫活性蛋白提供了一条新思路<sup>[8]</sup>。笔者所在实验室自行分离出 QWH132、QZL1-2、QWH7-2、QZL144-1、QZL144-2、

QWH101 菌株,经鉴定这些菌株中含有 *cry8* 类具有鞘翅目杀虫活性的基因。本研究以这些菌株为模板,分离克隆菌株中的 *cry8C*、*cry8D*、*cry8E*、*cry8F*、*cry8K* 基因,并对其中所含的 *cry8* 类基因进行克隆与表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 本试验所用菌株分离自辽宁千山采集的土样,采用醋酸-抗生筛选法进行分离<sup>[9]</sup>。其余菌株质粒见表 1。

1.1.2 酶及生化试剂  $2 \times Taq$  mix、 $2 \times Primer$  Star mix 均购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自美国 Axygen 公司;其他均为市售国产或进口分析纯或电泳级纯化学试剂。

1.1.3 主要仪器 主要仪器包括 Labnet PCR 仪[Multigene Gradient (TC9600-G-230V)]、蛋白电泳仪(BIO-RAD MiNi-PROTEAN Tetra system)、离心机 Beckman (AllegraTM64R Centrifuge)、北京赛智创业科技有限公司生产的 ChampGel 6000 全自动凝胶成像系统 Gel Documentation And Image Analysis System 等。

1.1.4 培养基与抗生素 液体 LB:蛋白胨 10.0 g,酵母粉 5.0 g,NaCl 10.0 g,加水定容到 1 000 mL,调 pH 值为 7.0;固体 LB:在液体培养基中加入 1.3% 琼脂。1/2 固体 LB:蛋白胨 5.0 g,酵母粉 2.5 g,NaCl 5.0 g,加水定容至 1 000 mL,加入 1.3% 琼脂,调 pH 值至 7.0;将氨苄青霉素、卡那霉素配制成为 100 mg/mL 的水溶液,经 0.22  $\mu$ m 过滤器过滤除菌,-20  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.2 方法

1.2.1 从土壤中分离 *Bt* 菌 *Bt* 菌株分离纯化的方法参照文献[10]。

收稿日期:2014-01-07

基金项目:国家“863”计划(编号:2011AA10A203、2010RCB54)。

作者简介:孙钰航(1984—),男,黑龙江牡丹人,硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:weiweiabcd222@163.com。

通信作者:高继国,教授,博士生导师,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:gaojiguo1961@hotmail.com。

表 1 菌株与质粒

菌株	质粒	特点描述	来源
大肠杆菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	Rosetta	$F^-$ <i>ompT hsdSB</i> ( <i>RB</i> - <i>mB</i> - ) <i>gal dcm</i> $\lambda$ ( <i>DE3</i> [ <i>lacI lacUV5</i> - <i>T7 gene</i> <i>1 ind1 sam7 nin5</i> ]) <i>pLysSRARE</i> ( <i>Cam</i> <sup>R</sup> )	笔者所在实验室
	JM109	<i>rpsL</i> ( <i>strr</i> )、 <i>thr</i> 、 <i>leu</i> 、 <i>thi</i> - 1、 <i>lacY</i> 、 <i>galK</i> 、 <i>galT</i> 、 <i>ara</i> 、 <i>tonA</i> 、 <i>tsx</i> 、 <i>dam</i> 、 <i>dcm</i> 、 <i>supE44</i> 、 $\Delta$ ( <i>lac</i> - <i>proAB</i> )、[ <i>F'</i> 、 <i>traD36</i> 、 <i>proAB</i> 、 <i>lacIqZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ]	笔者所在实验室
苏云金芽孢杆菌	QWH132		笔者所在实验室
	QZL1 - 2		笔者所在实验室
	QWH 7 - 2		笔者所在实验室
	QZL144 - 1		笔者所在实验室
	QZL144 - 2		笔者所在实验室
	QWH101		笔者所在实验室
	Plasmids		
	pMD19 - T Vector	Amp <sup>r</sup>	TaKaRa 公司
	pEB	<i>lac</i> 操纵子、 <i>T7</i> 启动子、多克隆位点、HisoTag、HSVoTag、 <i>lacZ</i> 起始密码子、大肠杆菌启动子、Amp <sup>r</sup>	笔者所在实验室
	pEB8C - like	pEB 载体和 <i>cry8C</i> - like 基因重组质粒、Amp <sup>r</sup>	笔者所在实验室
	pEB8D - like	pEB 载体和 <i>cry8D</i> - like 基因重组质粒、Amp <sup>r</sup>	笔者所在实验室
	pEB8E - like	pEB 载体和 <i>cry8E</i> - like 基因重组质粒、Amp <sup>r</sup>	笔者所在实验室
	pEB8F - like	pEB 载体和 <i>cry8F</i> - like 基因重组质粒、Amp <sup>r</sup>	笔者所在实验室
	pEB8K - like	pEB 载体和 <i>cry8K</i> - like 基因重组质粒、Amp <sup>r</sup>	笔者所在实验室

1.2.2 *Bt* 总 DNA 的提取 将菌株在固体 LB 培养基上培养 12 h 左右,再放入到 1.5 mL EP 管中,加入 TE、2% 十二烷基硫酸钠(SDS)各 200  $\mu$ L,充分混匀;加入 200  $\mu$ L Tris 饱和酚与 200  $\mu$ L 三氯甲烷,混匀,12 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入 1.5 倍上清体积的异丙醇,50  $\mu$ L 的 5 mol/L NaCl 溶液,轻微振荡混匀;12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,并加入 200  $\mu$ L 无水乙醇,沉淀 DNA;离心,弃上清,干燥沉淀,用适量的 ddH<sub>2</sub>O 溶解。

1.2.3 *cry* 基因的扩增和克隆 参照 GenBank 中公布的 *cry8* 类基因序列设计引物(表 2),以提取的 *Bt* 基因组为模板,利用高保真 DNA 聚合酶和 DNA 聚合酶分别进行 PCR 扩增,方法参考文献[11]。

表 2 各的引物序列情况

引物名称	序列(5'→3')
<i>cry8</i> - like F1	ATGAATTCAAATAATCAAAATGAAT
<i>cry8</i> - like R1	AATGGAGTTACGAACCTGAAT
<i>cry8</i> - like F2	CCAAATGAAAAACGGTTGTTATGGGATGC
<i>cry8</i> - like R2	TGAGTCGTTTTGCCTCTTTCACTGC
<i>cry8</i> - like R3	TTACTCTACGTCAACAATCAATT

1.2.4 基因测序 基因测序由博仕生物医学服务中心完成,DNA 序列分析采用 DNAMAN、NCBI - BLAST 软件进行。

1.2.5 基因在大肠杆菌中的表达 用 KOD 酶对 *cry8* 类基因进行克隆,胶回收产物连接 pEB 表达载体,转化到大肠杆菌 JM109 中<sup>[12]</sup>进行 PCR 鉴定,筛选出阳性转化子转化到大肠杆菌 Rosetta 中进行 IPTG 诱导表达,具体方法参考文献[13]。收集诱导物,离心,弃上清,用 10 mmol/L Tris - HCl(pH 值为 8.0)缓冲液悬浮细胞并进行超声波破碎,取样,进行 SDS - PAGE 分析<sup>[14]</sup>。大肠杆菌质粒 DNA 提取、酶切、连接、转化及 *Bt* 质粒提取参考文献[15 - 16]中的方法,杀虫晶体蛋白样品制备和 SDS - PAGE 电泳检测方法参考文献[17]。

2 结果与分析

2.1 菌株分离

将分离得到的菌株接种于 LB 固体培养基上,30  $^{\circ}$ C 培养 48 h,涂片、烘干、固定、镜检,通过光学显微镜与电镜观察(图 1)可知,菌体均为长杆状,芽胞为长圆棒状,晶体为球形。

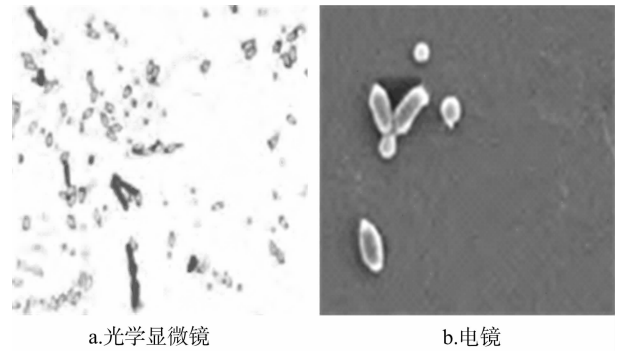


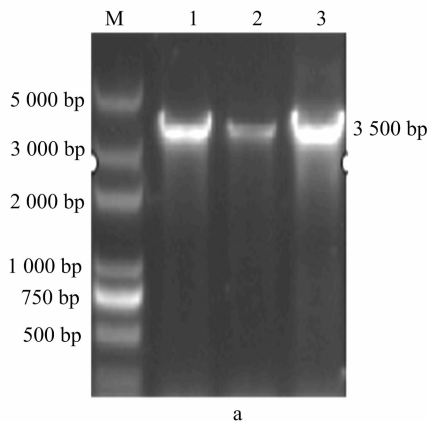
图 1 光学显微镜和电镜下的菌株晶体形态

2.2 *cry8* 类基因全长的克隆

采用 TaKaRa 公司生产的聚合酶与其设计的通用引物对菌株 DNA 模板进行 PCR 扩增,回收 PCR 产物,通过测序确定其基因类型分别为 1 个 *cry8C* 基因片段、1 个 *cry8D* 基因片段、2 个 *cry8E* 基因片段、1 个 *cry8F* 基因片段、1 个 *cry8K* 基因片段,参照 GenBank 中公布的 *cry8C*、*cry8D*、*cry8E*、*cry8F*、*cry8K* 基因序列设计全长引物,利用 TaKaRa 公司生产的聚合酶进行 PCR 扩增,得到 3 548、3 435、3 534、3 495、3 525、3 522 bp 的 6 个片段。扩增产物进行胶回收后和 pMD19 - T 载体连接,获得了重组质粒,这些质粒被命名为 pMD8C - like、pMD8D - like、pMD8E - like1、pMD8E - like2、pMD8F - like、pMD8K - like。转入大肠杆菌 JM109 中,通过蓝白斑筛选阳性克隆子,并对其测序。

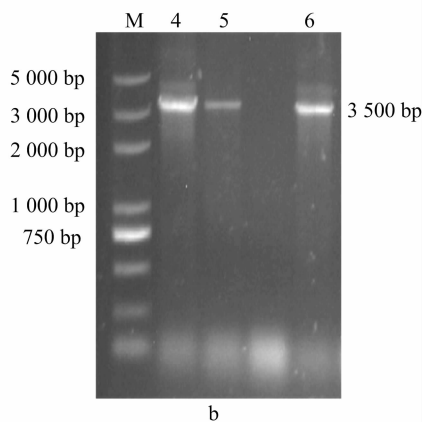
### 2.3 菌株中 *cry8C*、*cry8D*、*cry8E*、*cry8F*、*cry8K* 基因的序列分析

对 pMD8C-like、pMD8D-like、pMD8E-like1、pMD8E-



a

like2、pMD8F-like、pMD8K-like 进行序列测定,得到 6 个核苷酸序列,其编码区长度分别为 3 548、3 435、3 534、3 495、3 525、3 522 bp,琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。



b

M—DNA marker; 1—引物对 QWH7-2 扩增产物、2—引物对 QZL144-1 扩增产物; 3—引物对 QZL144-2 扩增产物; 4—引物对 QWH101 扩增产物; 5—引物对 QWH132 扩增产物; 6—引物对 QZL1-2 扩增产物

图2 6 株菌株的琼脂糖凝胶电泳结果

pMD8C-like DNA 序列碱基分布为 A:988、C:733、G:599、T:1 228,应用 NCBI Blast 比对同源性发现其与 *Cry8Ca1* 相似度最高,最大同源性为 100%。pMD8D-like DNA 序列碱基分布为 A:1 179、C:576、G:706、T:974,应用 NCBI Blast 比对同源性发现其与 *Cry8Da1* 相似度最高,最大同源性为 100%。pMD8E-like1 DNA 序列碱基分布为 A:1 229、C:584、G:766、T:955,应用 NCBI Blast 比对同源性发现其与 *Cry8Ea1* 相似度最高,最大同源性为 98%,该基因已在 GenBank 中注册,登记号为 KC778984。pMD8E-like2 DNA 序列碱基分布为 A:1 215、C:576、G:761、T:943,应用 NCBI Blast 比对同源性发现其与 *Cry8Ea1* 相似度最高,最大同源性为 99%,该基因已在 GenBank 中注册,登记号为 KC778985。pMD8F-like DNA 序列碱基分布为 A:1 253、C:572、G:728、T:972,应用 NCBI Blast 比对同源性发现其与 *Cry8Fa1* 相似度最高,最大同源性为 99%,该基因已在 GenBank 中注册,登记号为 KC778983。pMD8K-like DNA 序列碱基分布为 A:1 244、C:581、G:732、T:965,应用 NCBI Blast 比对同源性发现其与 *Cry8Ka2* 相似度最高,最大同源性为 99%,该基因已在 GenBank 中注册,登记号为 KC778982。

### 2.4 菌株氨基酸的序列分析

对 pMD8C-like、pMD8D-like、pMD8E-like1、pMD8E-like2、pMD8F-like、pMD8K-like 进行氨基酸序列分析,其中 *Cry8Ca1* 与 pMD8C-like 蛋白序列无差别,全长共 1 160 个氨基酸,分子量为 126.3 ku; *Cry8Da1* 与 pMD8D-like 蛋白序列无差别,全长共 1 144 个氨基酸,分子量为 125.8 ku; *Cry8Ea1* DNA 与 pMD8E-like1 蛋白序列对比发现,起始端中多出一段 MYDLQAAANSLVI 氨基酸残基序列,全长共 1 177 个氨基酸,分子量为 128.0 ku; *Cry8Ea1* DNA 与 pMD8E-like2 蛋白序列对比后发现,第 341 位 F 被 C 替换,第 492 位 F 被 L 替换,第 818 位 K 被 N 替换,第 872 位 D 被 G 替换,第 946 位 Q 被 R 替换,全长共 1 164 个氨基酸,分子量为 126.5 ku; *Cry8Fa1* DNA 与 pMD8F-like 蛋白序列对比发现,第 1 042 位

L 被 K 替换,第 1 126 位 S 被 T 替换,全长共 1 174 个氨基酸,分子量为 127.6 ku。 *Cry8Ka2* DNA 与 pMD8F-like 蛋白序列对比后发现,第 9 位 E 被 G 替换,第 891 位 V 被 I 替换,第 1 144 位 P 被 Q 替换,全长共 1 173 个氨基酸,分子量为 127.6 ku (图 3)。

### 2.5 *Cry8C*、*Cry8D*、*Cry8E*、*Cry8F*、*Cry8K* 蛋白在大肠杆菌中的表达

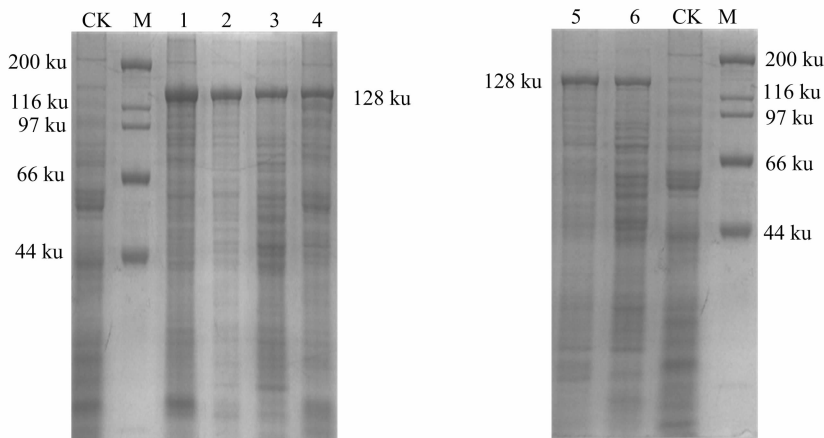
将全长 PCR 片段回收后,与表达载体 pEB 连接,转入大肠杆菌 Rosetta 中进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果表明基因能在 *Bt* 中表达,其表达蛋白为 126~128 ku。

### 3 结论与讨论

*Bt* 杀虫晶体蛋白广泛应用于鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、同翅目、直翅目、食毛目以及线虫、螨类和原生动物等多种重要的农林害虫的防治<sup>[18]</sup>。但是,目前能够用于转基因植物的 *Bt* 基因种类单一,我国具有自主知识产权的新型基因较少,用于转基因抗虫作物开发的基因十分有限<sup>[19]</sup>。地下害虫是国内外公认的难防治的土栖性害虫,已成为制约我国农业、林业、畜牧业的重要因素之一,*Bt* 菌由于具有毒力高、专一性强、对非靶标生物无害等特点,成为防治地下害虫的重要途径。

*Cry8* 类蛋白质在 *Bt* 中分布较广泛,它们对金龟子科、象甲科、叶甲科等多种鞘翅目害虫具有抑杀作用<sup>[14]</sup>。对蛴螬有杀虫活性的 *Bt* 基因主要有 *cry3*、*cry8*、*cry23*、*cry18*、*cry37*、*cry43* 等基因<sup>[14]</sup>。其中,研究最多的是 *cry8* 类基因,*cry8* 类基因由 1 160~1 210 个氨基酸组成,分子量在 128~137 ku 之间。笔者所在实验室筛选到了 7 株 *cry8* 类基因,但这 7 株菌株中除了含有已经鉴定的基因外,还可能含有一些其他的 *cry8* 类杀虫基因,需要新的方法去发掘。

本研究对笔者所在实验室采集并保存的包括辽宁千山地区分离得到的 120 株 *Bt* 菌株进行 *Bt cry* 基因的鉴定,共检出 7 株包含 *cry8* 类基因菌株,其中 *cry8C* 类 2 株、*cry8E* 类 3 株、



M—protein marker: 1—pEB-QWH7-2 大肠杆菌表达; 2—pEB-QZL144-1 大肠杆菌表达; 3—pEB-QZL144-2 大肠杆菌表达; 4—QWH101 大肠杆菌表达; 5—pEB-QWH132 大肠杆菌表达; 6—pEB-QZL1-2 大肠杆菌表达; CK—对照组

图3 QWH132、QZL2-1、QWH7-2、QZL144-1、QZL144-2、QWH101的表达蛋白情况

*cry8F* 类 1 株、*cry8K* 类 1 株,其中 2 株菌基因型完全相同,由于分离时间差异可排除同菌株污染。*cry8* 类基因检出率为 9.2%,本试验中所用的土样采取于东北地区不同地域,该地域纬度偏高、年均温度较低,可能导致出菌率较低。

辽宁千山地区植被丰富、昆虫种群丰富且土壤含腐殖质丰富,能从这些土壤中分离出多个含有 *cry8* 类基因的菌株,证明该菌株在自然环境中存在较为普遍,充分证明我国地域辽阔、生境类型多样、生物多样性丰富,是生物物种的天然基因库<sup>[20]</sup>。

本研究从菌株 QZL144-2 所得到的 *cry8Ea* 基因与已知基因 5 个位点存在差异,与已知菌株对比,其上氨基酸序列第 341 位 F 被 C 替换,第 492 位 F 被 L 替换,第 818 位 K 被 N 替换,第 872 位 D 被 G 替换,第 946 位 Q 被 R 替换;从菌株 QWH101 中得到的 *cry8Ka* 基因与已知基因 3 个位点存在差异,其上氨基酸序列第 9 位 E 被 G 替换,第 891 位 V 被 I 替换,第 1144 位 P 被 Q 替换,有研究表明 Cry 毒力蛋白中只要有几个氨基酸位点发生变化,就会引起毒力和杀虫谱的显著变化<sup>[16]</sup>,所以对其后续的活性研究依旧具有重要意义。

将菌株 QZL144-1 序列得到的 *cry8Ea* 基因与已知的 *cry8Ea* 对比发现,其起始氨基酸序列中多出一段 MVDLQAANSLVI 氨基酸残基,这个发现与已知的模式基因 *cry7A*、*cry7B* 的起始序列差别很像,可能会有比较大的活性差异<sup>[16]</sup>。本研究从 1 株菌株中成功克隆了含有 2 个 8 类基因 *cry8Ca*、*cry8Ea* 的菌株,虽然其同源率为 100%,但研究价值较高,证明 *cry8* 基因在对蛱蝶有活性的 *Bt* 菌株中经常是共存的<sup>[15]</sup>。本试验分离出来的 *cry8* 类菌株均完成了大肠杆菌 Rosetta (DE3) 的异源表达,表达蛋白均为 128 ku 左右。由于试验条件所限,进行鞘翅目生物活性测定的结果并不理想,蛋白的试验组杀虫活性与对照组差异不显著,可能是由于实验室环境下鞘翅目幼虫生存环境产生较大差异,从而导致幼虫死亡。

本试验分离出多个 *cry8* 类基因,其中不同种类的 *cry8* 类基因是否有协同作用有待后续研究,尤其是对同一菌株含有 2 个以上 Cry8 类蛋白是否会有增效作用需要着重研究。由于

试验菌株来自天然的 *Bt* 菌株,其中天然存在的 *cry8* 基因并且成功地进行异源表达可以为构建高效杀地下害虫活性重组微生物提供重要的基因来源,丰富了抗虫基因库且对于其后续的杀虫活性与交互抗性研究提供了很好的试验素材与理论价值。

#### 参考文献:

- [1] 关 雄. 苏云金芽孢杆菌研究回顾与展望[J]. 中国农业科技导报, 2006, 8(6): 5-11.
- [2] 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.
- [3] Tabashnik B E, Dennehy T J, Sims M A, et al. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3790-3794.
- [4] Liu Y B, Tabashnik B E. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis* [C]//Proceedings of the Royal Society of London Series B, 264, 1997: 605-610.
- [5] 李海涛, 姚 江, 郭 巍, 等. 苏云金芽孢杆菌 *cry2Aa* 基因的克隆、表达与活性[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(6): 787-791.
- [6] 束长龙, 王容燕, 张 杰, 等. 杀蛱蝶的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) *cry8* 基因的 PCR-RFLP 分析[M]//成卓敏. 农业生物灾害预防与控制研究. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005: 919.
- [7] Ohba M, Iwahana H, Asano S, et al. A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles[J]. Lett Appl Microbiol, 1992, 14: 54-57.
- [8] Donovan W P, Engleman J T, Donovan J C, et al. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(4): 713-719.
- [9] 谭芙蓉. 四川生态区苏云金芽孢杆菌资源的筛选鉴定及其新型杀虫基因的克隆表达研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
- [10] 吴丽云, 何金清, 周 勇, 等. 污水、污泥中苏云金杆菌的分离及其基因型鉴定[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2010, 39(1): 19-24.

岳耀敬, 刘建斌, 郭婷婷, 等. 抑制素  $\alpha$  亚基三级结构与其他 TGF- $\beta$  配体的比较[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 32-36.

# 抑制素 $\alpha$ 亚基三级结构与其他 TGF- $\beta$ 配体的比较

岳耀敬, 刘建斌, 郭婷婷, 郭 究, 郭 健, 孙晓萍, 杨博辉

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050)

**摘要:**抑制素 A 和抑制素 B 是由不同抑制素/激活素  $\beta$  亚基( $\beta A$ ,  $\beta B$ )和结构相似的  $\alpha$  亚基组成的同源二聚体, 即抑制素 A ( $\alpha\beta A$ )、抑制素 B ( $\alpha\beta B$ )。利用生物信息学技术对抑制素  $\alpha$  亚基 (INH $\alpha$ ) 进行三级结构建模, 并利用 ClustalW 和 SPDV 软件比较 INH $\alpha$  与其他转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超结构家族成员在结构和序列方面的异同。结果表明, 激活素 (ACT)、骨形成蛋白 7 (BMP7)、BMP9 与 type II 受体结合面的核心氨基酸在 INH  $\alpha$  中不仅在多处发生了突变, 而且在空间上也发生了很大位移, 因此如果 INH  $\alpha$  同时与 type II 受体在与激活素、BMP7、BMP9 的相同位置结合, 那么 INH  $\alpha$  会比激活素与激活素受体 ActR II、ActR II B 的亲合力低。ACT A 中几个参与活化素受体样激酶 4 (ALK4) 相互作用的氨基酸在 INH  $\alpha$  中发生了突变, ACT A  $\alpha$  螺旋中极性氨基酸在 INH  $\alpha$  中被非极性氨基酸所替代, 且  $\alpha$  螺旋在空间上发生了很大位移, INH  $\alpha$  不与 ALK4 结合。可见, 抑制素信号传导机制为: 抑制素与 Betaglycan 高亲和力结合并与 ActR II、ActR II B、BMPR II 形成复合物, 但不与 ALK4 结合, 因此将它们与激活素和 BMP 隔离。

**关键词:**抑制素  $\alpha$  亚基; 3D 结构模拟; TGF- $\beta$ ; 结构特征

**中图分类号:** Q75 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0032-05

抑制素 (inhbin, INH)、激活素 (activin, ACT)、骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMP)、转化生长因子- $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )、TGF- $\beta 2$ 、TGF- $\beta 3$  同属 TGF- $\beta$  超家族的生长和分化因子, 这个多肽激素家族控制着许多发育和生物学进程, 并且对正常的生长过程和不同组织的功能极其重要<sup>[1]</sup>。激活素是由抑制素/激活素的  $\beta$  亚基[激活素 A ( $\beta A\beta A$ )、激活素 AB ( $\beta A\beta B$ )、激活素 B ( $\beta B\beta B$ )]构成的二聚体蛋白, 而抑制素是抑制素/激活素  $\beta$  亚基与结构相似的  $\alpha$  亚基的同源二聚体[抑制素 A ( $\alpha\beta A$ )、抑制素 B ( $\alpha\beta B$ )]<sup>[2]</sup>。抑制素和激活素合成大量前体蛋白, 并通过细胞内对疏基连接的二聚体进行切割, 释放出成熟的具有完整生物活性的羧基端蛋白。激活素和抑制素在控制生殖功能上的重要性已经被许多研究和临床观察所证实<sup>[1]</sup>。目前已经了解到, 抑制素、激活素和卵泡抑制素通过对脑垂体和

性腺轴的作用来控制生殖功能<sup>[1]</sup>。除了激活素和抑制素, 其他 TGF- $\beta$  超家族成员包括 TGF- $\beta$ 、BMPs 的亚型、GDFs 以及 MIS 也控制着性腺轴的发育及其功能<sup>[3]</sup>。

目前 TGF- $\beta$  超家族中一些成员的受体已经确定, 发现几乎所有这些受体在细胞外、跨膜和细胞内区域均有相似结构, 即丝氨酸/苏氨酸磷酸激酶结构域。TGF- $\beta$  家族的配体通过与 2 类细胞表面受体 (type I、II) 相互作用而启动信号传导<sup>[2]</sup>。目前由 TGF- $\beta$  超家族成员 Activin A (PDB: 1nys)<sup>[4]</sup>、Activin A (PDB: 2arv)<sup>[5]</sup>、BMP2 (PDB: 1rew)<sup>[6]</sup>、BMP7 (PDB: 1lx5)<sup>[7]</sup>、BMP9/GDF2 (PDB: 1zkz)<sup>[8]</sup> 与受体相互作用的蛋白质结构已经被鉴定, 然而尚未见关于抑制素结构的报道, 并且抑制素受体尚未确定, 因此抑制素信号传导机制也尚未确定。

为了研究抑制素信号传导机制, 本研究尝试应用生物信息学方法对抑制素  $\alpha$  亚基 (inhbin $\alpha$ , INH $\alpha$ ) 进行结构建模, 并通过比较 INH $\alpha$  与 TGF- $\beta$  超家族成员 Activin A (PDB: 1nys)、Activin A (PDB: 2arv)、BMP2 (PDB: 1rew)、BMP7 (PDB: 1lx5)、BMP9/GDF2 (PDB: 1zkz) 的结构差异, 分析 INH $\alpha$  结构与功能的关系。

收稿日期: 2013-12-11

基金项目: 甘肃省青年自然科学基金 (编号: 1308RJYA037)。

作者简介: 岳耀敬 (1980—), 男, 山东聊城人, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。Tel: (0931) 2115173; E-mail: yueyaojing@caas.cn。

- [11] 刘艳杰, 李海涛, 刘荣梅, 等. *Bt* 新型基因 *sip* 的克隆、表达和生物信息学分析[J]. 生物技术通报, 2012(12): 101-105.
- [12] 宋 萍, 郭丽伟, 苏俊平, 等. 含 *cry7* 类基因的苏云金芽孢杆菌菌株的分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 40-43.
- [13] 李长友, 张 杰, 宋福平, 等. 苏云金芽孢杆菌 B-Pr-88 菌株中 *cry2Ab4* 基因的表达和杀虫活性研究[J]. 生物工程学报, 2007, 23(4): 634-638.
- [14] 林 毅, 方光伟. 红树林沉积物 *Bt* 菌株的分离与 *cry* 基因型的鉴定[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(6): 889-893.
- [15] 李荣森, 陈 涛, 邓海凡, 等. 几种苏云金杆菌晶体的超微结构[J]. 微生物学报, 1983(4): 343-346, 389.

- [16] 刘晶晶, 束长龙, 张 杰, 等. 苏云金芽孢杆菌内生质粒提取方法的改进[J]. 生物技术通报, 2008(6): 120-123.
- [17] 苏旭东. 苏云金芽孢杆菌菌株的分离和 *cry* 基因的鉴定[D]. 保定: 河北农业大学, 2005.
- [18] 王利平, 代林远, 李 鹏. 苏云金芽孢杆菌研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011(8): 52-61.
- [19] 宋 敏, 林祥明, 刘丽军. *Cry* 基因家族的专利分布研究[J]. 生物技术通报, 2010(1): 1-8.
- [20] 蔡亚君, 袁志明, 胡晓敏, 等. 苏云金芽孢杆菌几丁质酶基因的克隆及诱导表达[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(3): 599-602.