

# 苏云金芽胞杆菌 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 片段 置换对其杀虫活性的影响

张悠然, 史琛琛, 李帅, 尹彦力, 李海涛\*

(东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150000)

**摘要:** 为了寻找苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 与杀虫活性相关的关键氨基酸片段, 在基因水平上进行分子操作对其蛋白氨基酸片段分别进行置换, 成功获得了 8 个置换体蛋白: 11N-39C、39N-11C、11N-11M-39C、39N-39M-11C、11N-39M-39C、39N-11M-11C、11N-39M-11C 和 39N-11M-39C。然后将置换体基因和 *vip3Aa11*、*vip3Aa39* 基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 菌株中诱导表达, 得约 88 ku 的蛋白片段。对小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 和棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 分别进行室内生物活性测定。生测结果显示, 相较于 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白, 置换体蛋白对小菜蛾、甜菜夜蛾以及棉铃虫的杀虫活性出现不同程度的降低, 相较而言棉铃虫变化不明显。经胰蛋白酶消化结果显示, Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白以及置换体 11N-39C、39N-11C、11N-39M-11C、39N-11M-39C 蛋白均被消化成 62 ku 的抗性核心多肽。上述结果为今后的 VIPs 类蛋白研究提供了依据, 置换体蛋白的构建为进一步研究 Vip3 类蛋白杀虫机理提供了参考。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌; Vip3Aa11; Vip3Aa39; 片段置换; 杀虫活性

**中图分类号:** Q 71   **文献标志码:** A

自从发现第一个 Vip 毒素以来, 大量的苏云金芽胞杆菌已经被筛选出新的 *vip* 基因<sup>[1,2]</sup>, 并且这种基因毒素的杀虫活性也已经被测试<sup>[3]</sup>。与 Vip1 和 Vip2 不同, Vip3 的作用机制研究已相对深入, 与 Cry 毒素作用方式类似, Vip3A 毒素需要通过中肠胰蛋白酶酶解活化产生活性, 酶解产生的活性蛋白片段通过与中肠细胞相应受体结合使细胞代谢受损, 导致昆虫死亡。

**收稿日期:** 2018-08-01   **录用日期:** 2019-01-12

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2017YFD0201200)

**\*通信作者:** lihaitao@neau.edu.cn

近年来许多研究表明 Vip3A 蛋白上某些氨基酸区域与其杀虫活性及特异性有关。刘荣梅等<sup>[4]</sup>构建了氨基端(N-端)缺失蛋白 Vip-C9-N,证明了 N-端 39 个氨基酸对甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的活性提高是必需的。Estruch<sup>[5]</sup>也曾发现当蛋白酶作用于 Vip3A 时, Vip3A 的羧基端(C-端)不被切除,将其最小活性的 590 个氨基酸进行单独表达,所形成的蛋白对蛋白酶十分敏感而且没有杀虫活性,表明 Vip3A 的 C-端在蛋白杀虫作用过程中也发挥着重要作用。徐宁<sup>[6]</sup>在 Vip3A 蛋白 C-端添加 8 个组氨酸或缺失 3 个氨基酸,发现蛋白的杀虫活性将会丧失;而用亮氨酸和精氨酸分别取代 C-端的异亮氨酸和赖氨酸,可使 Vip3A 蛋白对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)和甜菜夜蛾的杀虫活性提高。崔国兴<sup>[7]</sup>发现 Vip3Aa11 蛋白的 C-端氨基酸的改变会影响杀虫活性的改变。Chen 等<sup>[8]</sup>成功构建了新型杀虫蛋白 Vip3AcAa,对鳞翅目害虫具有广谱的杀虫活性。Liu 等<sup>[9]</sup>发现 Vip3Aa11 蛋白的 N-端氨基酸的改变也会影响杀虫活性。同时,有研究表明 Vip3A 蛋白少量氨基酸位点的变化就会引起毒力和杀虫谱的变化,N-端和 C-端氨基酸均会影响其活性而且二硫键这些特殊区域和位点也与其功能密切相关<sup>[10]</sup>。

基于不同苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)菌株来源的 Vip3Aa 蛋白的杀虫谱和杀虫活性不同<sup>[9]</sup>。Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 只有 39 个氨基酸的差异,但是对小菜蛾(*Plutella xylostella*)、甜菜夜蛾、棉铃虫等鳞翅目害虫表现出不同的杀虫活性。本研究通过引物设计、基因片段置换、表达载体的构建、基因的表达、生物活性的测定以及胰蛋白酶消化对 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 杀虫活性关键氨基酸片段进行了探讨,以期为 Vip 蛋白在农业杀虫中的应用奠定理论和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

苏云金芽胞杆菌菌株 vip3Aa11, vip3Aa39 以及大肠杆菌表达菌株 BL21、JM109 与载体 pEB 均由本实验室保存。

### 1.2 引物

参考 GenBank 公布的已知 vip3Aa11(登录号:AAR36859)和 vip3Aa39(登录号:HMI17631)基因序列,在 DNAMAN 6.0 软件上进行比对并利用 Primer 6.0 软件设计两对全长引物 11F/ 11R

和 39F/39R, 同时设计构建片段置换体的引物 1000-1027F/ 1000-1027R、609-631F/ 609-631R、1573-1600F/1573-1600R, 分别在两对全长引物两端加上相应的 *BamH* I 和 *Sal* I 酶切位点, 如表 1。所有引物均由吉林省库美科技有限公司合成。

表 1 PCR 鉴定引物及序列  
Tab. 1 PCR primers used for amplification

引物名称	序列(5'→3')
11F	<u>CGCGGATCCGATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGCA</u>
11R	<u>ACGCGTCGACCTACTTAATAGAGACATCGTAAAAAT</u>
39F	<u>CGCGGATCCGATGAATATGAATAATACTAAATTAACG</u>
39R	<u>CCGCTCGAGCTTAATTGAGACATCGTAAACTTTACAA</u>
1000-1027F	ATTATGCAAAAAGTTAAAGCAAGTGATGA
1000-1027R	TCATCACTTCCTTTA <sup>*</sup> CTTTGCATAA
609-631F	GATATTCTTGATGAGTTAACTGA
609-631R	TCAGTTAACTCATCAAGAATATC
1573-1600F	CTAAATGATCGTCCCGCCAAGTGGTTT
1573-1600R	AAACCACTGGCGGGACGATCAATTTAG

### 1.3 供试昆虫

小菜蛾、甜菜夜蛾、棉铃虫初孵幼虫以及人工饲料均购于河南省济源白云实业有限公司。

### 1.4 酶与生化试剂

KOD 高保真酶购于 TOYOBO 公司; 氨苄青霉素 (Ampicillin) 购自纳川生物技术公司; 2× *Taq* mix、2× solution I 连接试剂盒、pET-21b 载体、限制性内切酶 (*BamH* I、*Sal* I) 购于 TaKaRa 公司; DNA 回收试剂盒、大肠杆菌质粒提取试剂盒购于 Axygen 公司; 洗洁精购于广州立白企业集团有限公司其他试剂均为市售国产或者进口分析纯或电泳级纯化学试剂。

### 1.5 基因片段置换

采用重叠延伸 PCR 技术(SOEPCR)进行基因片段置换。首先将 *vip3Aa11* 基因和 *vip3Aa39* 基因进行两段基因片段置换, 根据置换片段位置在两基因的保守区设计一对正、反向引物

1000-1027F/ 1000-1027R。这样将 *vip3Aa11*、*vip3Aa39* 基因的 1~342 位氨基酸和 333~789 位氨基酸这两个基因片段于 *vip3Aa11* 基因和 *vip3Aa39* 基因中分别进行了互换。然后在 *vip3Aa11* 和 *vip3Aa39* 基因序列中确定三段基因片段进行置换（图 1），可在两基因的保守区设计两对正反向引物 609-631F/609-631R 和 1573-1600F/1573-1600R。这样将 *vip3Aa11*、*vip3Aa39* 基因的 1~210 位氨基酸、203~533 位氨基酸以及 524~789 位氨基酸对应的这 3 个基因片段分别进行置换，其中 1~210 位氨基酸（N-端）中有 10 个氨基酸的差异，203~524 位氨基酸中有 5 个氨基酸的差异，524~789 位氨基酸（C-端）中有 24 个氨基酸的差异。

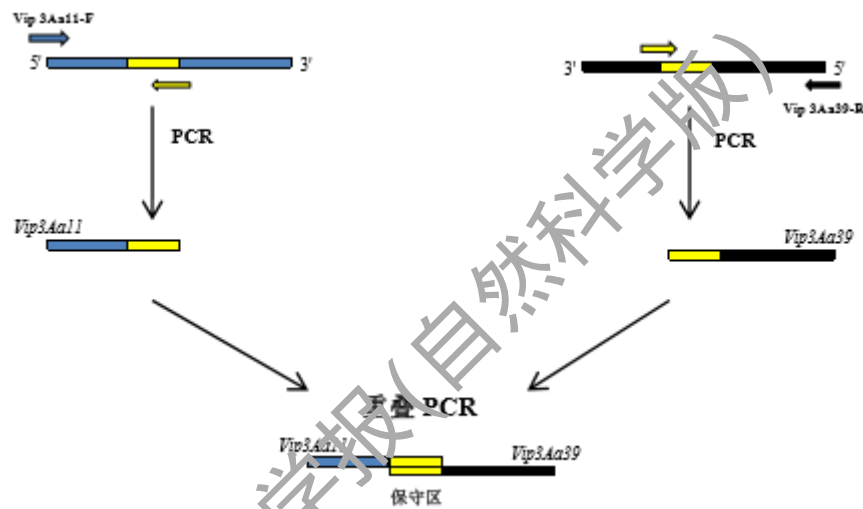


图 1 重叠 PCR 示意图

Fig.1 Overlapping PCR schematic

## 1.6 基因扩增及诱导表达

PCR 扩增体系如下：94 °C 预变性 2 min；94 °C 变性 15 s， $T_m$  退火 2 min 30 s，68 °C 延伸 2 min 30 s，30 个循环；最后 68 °C 终延伸 5 min。将上述 PCR 产物用 0.7%（质量分数）琼脂糖进行电泳检测。大肠杆菌质粒 DNA 提取、酶切、连接、转化。

## 1.7 蛋白在大肠杆菌中诱导表达

将大肠杆菌接种于 5 mL 的含有氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中，37 °C，220 r/min 条件下培养 12 h。将上述菌液按 1% 的比例转接到 100 mL LB 液体培养基中，其中 LB 液体培养基按 1:1000 的比例加入氨苄青霉素抗性，37 °C，220 r/min 条件下培养 2 h，至  $OD_{600}$  约为 0.5 左右。在每 100 mL 菌液中加入 100  $\mu$ L 1mol/L IPTG，16°C，1600 r/min 条件下低温诱导

12 h。将上述诱导的菌液分装于 50 mL BD 管中，4 °C，8000 r/min，离心 5 min，弃滤液。用 5 mL 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 悬浮菌块并吹开，富集后定容于 50 mL，4 °C，8000 r/min，离心 5 min，弃滤液。如此重复 2~3 次。将最终得到的 7 mL 菌液置于冰水混合物中，Ampl 80%，pluse on 3 s，pluse off 3 s 超声破碎菌体 7 min。将超声后的菌体置于高速冷冻离心机中，4 °C，12000 r/min，离心 10 min，收集上清液分装，进行 SDS-PAGE 电泳检测，-20 °C 保存。使用 National Institutes of Health 开发的 Image J (v1.43) 软件对 SDS-PAGE 图谱结果进行蛋白定量分析。

## 1.8 生物活性测定

小菜蛾生物活性测定，参考张金波<sup>[12]</sup>并略有改动：取 10~20 mL 样品溶液加入灭菌培养皿中，加入 0.1% 洗洁精。选取新鲜的小白菜叶片，均匀地浸入上述样品溶液中 15 s。取出，晾干，置于培养皿中，垫入润湿的滤纸（灭菌）。用毛笔轻轻接入初孵幼虫，每培养皿接 30 头虫，重复两次。放置于 25 °C 光照培养箱中培养，光周期为 12 h 光照：12 h 黑暗。定期观察以检查叶片是否腐烂或干枯，是否有水蒸气凝结。培养 72 h 后调查死、活虫数，计算校正死亡率。

甜菜夜蛾和棉铃虫生物活性测定：称取 20 g 人工饲料（主要成份：麦胚、大豆粉、玉米粉、酵母粉）放置于无菌的培养皿中，加入待测样品溶液混合均匀。将饲料平均分装于 3 个已消毒的 24 孔细胞培养板中。用毛笔轻轻将幼虫接于 24 孔板中，每孔一头；铺上微湿的无味纸巾后盖盖子，防止幼虫逃逸。放置于 25 °C 光照培养箱中培养，光周期为 12 h 光照：12 h 黑暗，相对湿度大于 30%。每天观察饲料是否霉变，是否有水蒸气凝结。培养 7 d 后分别调查死、活虫数，计算校正死亡率。

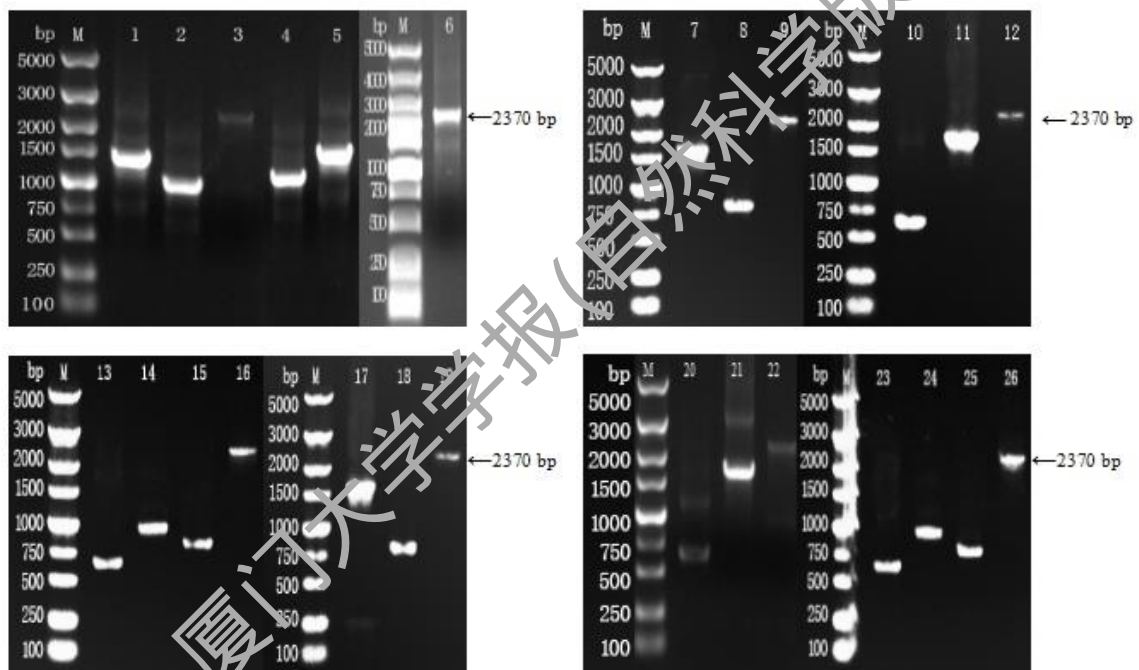
## 1.8 胰蛋白酶消化

经超声波破碎处理后的重组蛋白以及 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白样品与 0.1 mg/mL 的胰蛋白酶溶液按质量比 10:1 (蛋白质/胰蛋白酶) 的比例在 37 °C 条件下反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的克隆

将 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 菌液提取质粒 DNA 作为 PCR 的模板, 利用表 1 中设计的引物扩增片段置换所需的各目的片段, DNA 凝胶电泳检测结果如图 2 所示, 片段置换获得的置换体均可检测到 2370 bp 的目的条带, 根据图 1 划分的 3 个片段置换位置 (N-端、C-端或中间端) 分别命名为 11N-39C、39N-11C、11N-11M-39C、39N-39M-11C、11N-39M-39C、39N-11M-11C、11N-39M-11C、39N-11M-39C, 氨基酸置换示意图 3。



M. Marker; 1. 11F-1027R; 2. 1000F-39R; 3. 11F-39R; 4. 39F-1027R; 5. 1000F-11R; 6. 39F-11R; 7. 11F-1600R; 8. 1573F-39R; 9. 11F-11M-39; 10. 11F-631R; 11. 609F-39R; 12. 11F-39M-39R; 13. 11F-631R; 14. 39,609F-1600R; 15. 1573F-11R; 16. 11F-39M-11R; 17. 39F-1600R; 18. 1573F-11R; 19. 39F-39M-11R; 20. 39F-631R; 21. 609F-11R; 22. 39F-11M-11R; 23. 39F-631R; 24. 11,609F-1600R; 25. 1573F-39R; 26. 39F-11M-39R。

图 2 目的基因 PCR 鉴定图谱

Fig. 2 Identification results of target genes by PCR

### 2.2 表达载体的构建

#### 2.2.1 含 vip3Aa11 和 vip3Aa39 基因片段表达载体的构建

将获得的置换体基因片段胶回收产物和 pET-21b 载体分别用进行双酶切, 琼脂糖凝胶电

泳检测结果显示置换体和 pET-21b 载体分别被切为 2.37 kb 和 5.44 kb。将各置换体和载体进行过夜连接并转化 *E. coli* JM109 感受态细胞，通过抗性筛选获得阳性重组子。以获得的阳性克隆菌液为模板进行菌落 PCR 验证，琼脂糖凝胶电泳检测结果显示均获得大小为 2370 bp 的目的基因，全长测序，测序结果显示与置换体序列一致。然后提取各置换体与 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 的质粒 DNA 进一步转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞表达。

### 2.2.2 序列分析鉴定

将置换体连接载体并转化 *E. coli* JM109 感受态细胞，送库美科技有限公司进行全长测序，用 DNAMAN 软件将测序结果分别与 *vip3Aa11* 和 *vip3Aa39* 基因序列进行比对，结果一致。基于 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 的 39 个差异氨基酸的片段置换，11N-39C 置换体具有的 Vip3Aa11 的 N-端 11 个差异氨基酸，Vip3Aa39 的 C-端 28 个差异氨基酸；39N-11C 置换体具有的 Vip3Aa39 的 N-端 11 个差异氨基酸，Vip3Aa11 的 C-端 28 个差异氨基酸；11N-39M-39C 置换体具有的 Vip3Aa11 的 N-端 10 个差异氨基酸，Vip3Aa39 的 C-端 29 个差异氨基酸；39N-11M-11C 置换体具有的 Vip3Aa39 的 N-端 10 个差异氨基酸，Vip3Aa11 的 C-端 29 个差异氨基酸；11N-11M-39C 置换体具有的 Vip3Aa11 的 N-端 15 个差异氨基酸，Vip3Aa39 的 C-端 24 个差异氨基酸；39N-11M-11C 置换体具有的 Vip3Aa39 的 N-端 15 个差异氨基酸，Vip3Aa11 的 C-端 24 个差异氨基酸；11N-39M-11C 置换体具有的 Vip3Aa11 的 N-端 10 个差异氨基酸，Vip3Aa11 的 C-端 24 个差异氨基酸，以及 Vip3Aa39 的其它 5 个差异氨基酸；39N-11M-39C 置换体具有的 Vip3Aa39 的 N-端 10 个差异氨基酸，Vip3Aa39 的 C-端 24 个差异氨基酸，以及 Vip3Aa11 的其他 5 个差异氨基酸（图 3）。



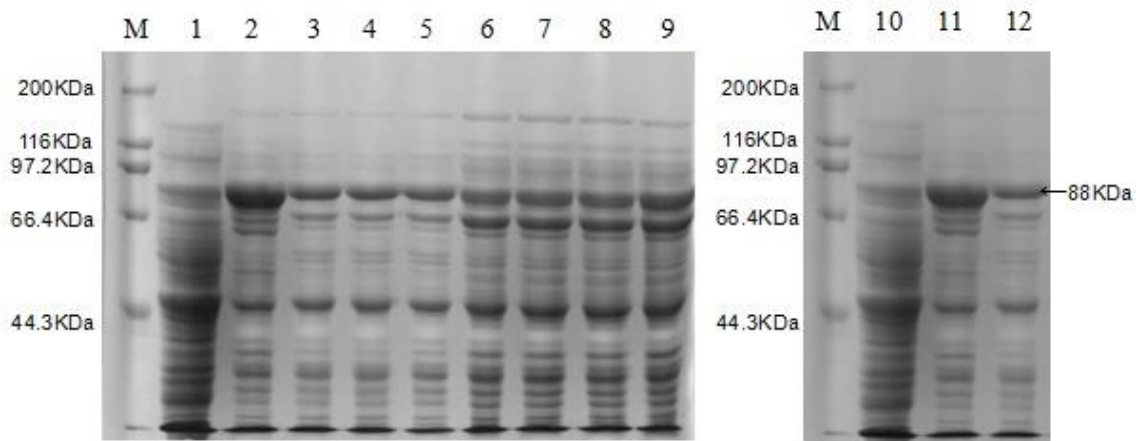
图3 置换体命名示意图

Fig. 3 Schematic diagram of substitution body names

## 2.2 目的基因与置换体基因的表达与分析

将置换体基因以及 *vip3Aa11* 和 *vip3Aa39* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达，SDS-PAGE 检测可溶性蛋白，并以空质粒 pET-21b 转入 BL21(DE3)感受态细胞作为对照。结果显示（图 4）：置换体均可在大肠杆菌中正常表达分子量约为 88 ku 的可溶蛋白，且突变体蛋白的可溶性以及大小与 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 无明显差异。





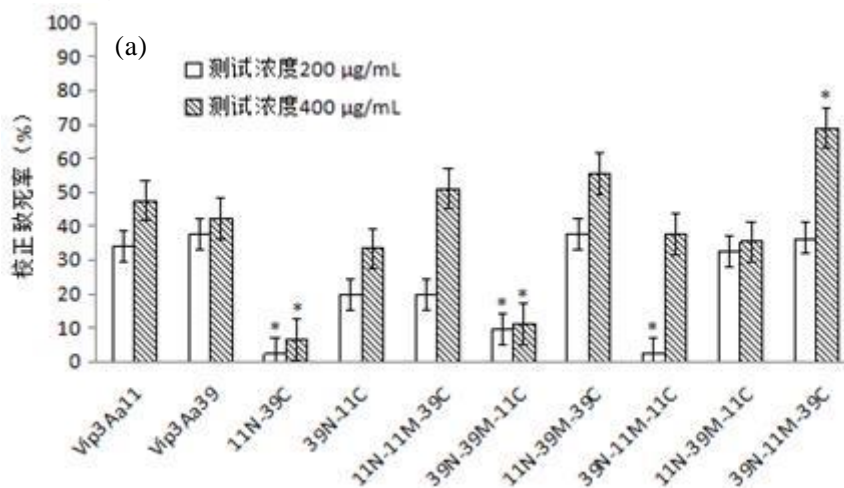
M. Protein marker; 1. pET21b 空载体; 2. Vip3Aa39; 3. 11N-11M-39C; 4. 39N-39M-11C; 5. 39N-11M-11C; 6. 11N-39C; 7. 39N-11C; 8. 11N-39M-11C; 9. 39N-11M-39C; 10. pET21b 空载体; 11. Vip3Aa11; 12. 11N-39M-39C。

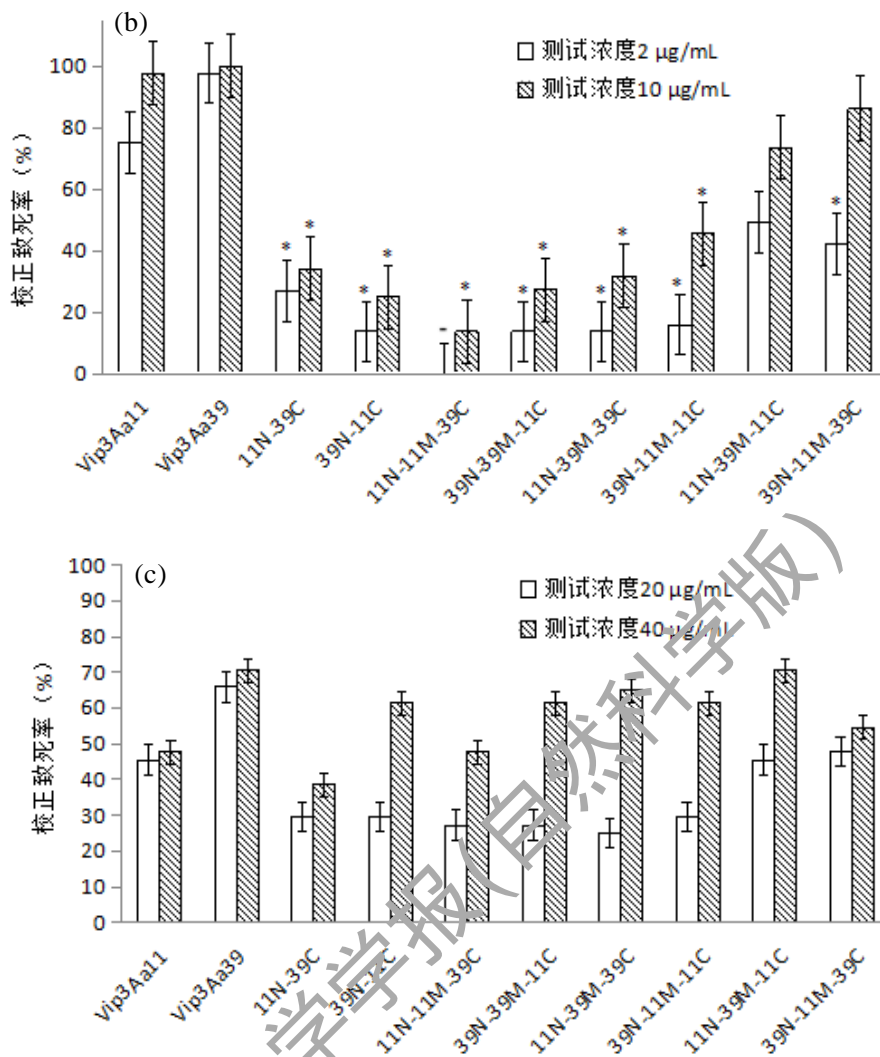
图 4 *vip3Aa11*、*vip3Aa39* 和置换体基因在 BL21 中表达

Fig. 4 Expression of *vip3Aa11*, *vip3Aa39* and displacement genes in the BL21

### 2.3 室内杀虫活性测定

8 种置换体可溶性蛋白及 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白分别对小菜蛾、甜菜夜蛾和棉铃虫进行室内生物活性测定，以 pET-21b 空载体转入 *E.coli* BL21(DE3) 感受态细胞作为阴性对照。浓度设置以 0.1 mg/mL 的牛血清蛋白 (BSA) 作为标准量，利用 Image J 软件对 SDS-PAGE 电泳图谱进行浓度定量。小菜蛾初孵幼虫以新鲜的白菜叶片浸染待测可溶蛋白的方法进行生物活性测定，甜菜夜蛾和棉铃虫初孵幼虫采用饲料混合可溶蛋白的方式进行生物活性测定，每 20 g 饲料充分混合 2 mL 可溶蛋白。小菜蛾每组 30 头虫，甜菜夜蛾和棉铃虫每组均 24 头，每个处理重复 3 次。生物活性测定结果见图 5。





注：“\*”表示数值与 Vip3Aa11、Vip3Aa39 原蛋白之间有显著差异， $P \leq 0.05$ ；“-”表示无杀虫活性。

图 5 小菜蛾 (a)、甜菜夜蛾 (b) 和棉铃虫 (c) 的生物活性测定

Fig. 5 Bioactivity assays of *Plutella xylostella*(a), *Spodoptera exigua*(b) and *Helicoverpa armigera*(c)

对小菜蛾的生物活性测定，200 和 400  $\mu\text{g/mL}$  蛋白浓度下，Vip3Aa11 与 Vip3Aa39 蛋白对小菜蛾的毒杀效果均不明显。相比之下，置换体蛋白对小菜蛾的杀虫活性有明显降低现象，在 200  $\mu\text{g/mL}$  的浓度下，置换体蛋白的杀虫活性降低或不变；在 400  $\mu\text{g/mL}$  的浓度下，11N-11M-39C、11N-39M-39C、39N-11M-39C 蛋白杀虫活性分别升高了 1.13 倍、1.23 倍、1.53 倍，39N-11M-39C 蛋白杀虫活性变化显著，其他置换体蛋白杀虫活性均出现不同程度的降低。

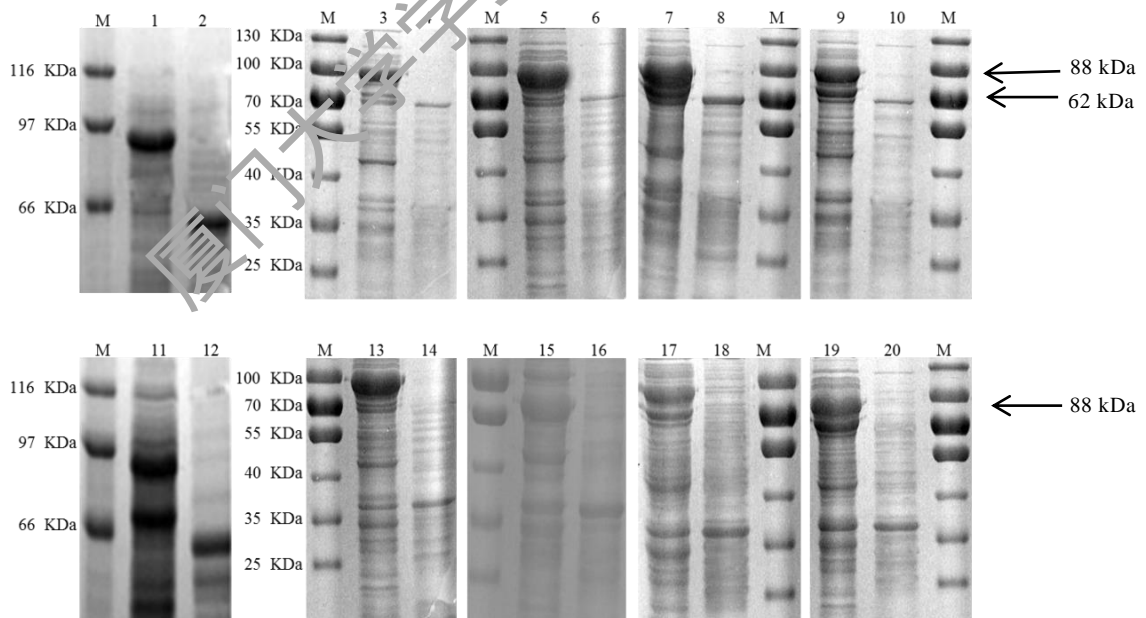
对甜菜夜蛾进行生物活性测定，2 和 10  $\mu\text{g/mL}$  蛋白浓度下，Vip3Aa11 与 Vip3Aa39 蛋白对甜菜夜蛾具有高的杀虫活性，在 2  $\mu\text{g/mL}$  浓度，39N-11C、39N-39M-11C、11N-39M-39C、

39N-11M-11C、11N-11M-39C 置换体的毒力均明显降低了 6 倍左右。在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度, 39N-11C、39N-39M-11C 置换体的毒力降低了 3 倍左右, 11N-11M-39C 置换体的毒力降低了 7.18 倍, 其余置换体杀虫活性变化不明显。

对棉铃虫进行生物活性测定, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的蛋白浓度下, 置换体 11N-39M-11C、39N-11M-39C 对棉铃虫的杀虫活性无明显变化, 而其他置换体的毒力均降低了 2 倍左右。40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的蛋白浓度下, 11N-39C 置换体蛋白毒力降低了 1.53 倍, 其他置换体蛋白杀虫活性无明显变化。

## 2.4 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 及置换体蛋白对胰蛋白酶敏感性分析

8 种置换体蛋白样品分别与 0.1 mg/mL 的胰蛋白酶溶液按质量比 10:1(蛋白质/胰蛋白酶)的比例在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温金属浴 (CHB-100 型, 德国) 中消化反应。然后将 Vip3Aa11、Vip3Aa39 蛋白和各置换体蛋白分别与消化后产物进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳检测, 结果如图 6。由图可见, Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白以及置换体 11N-39C、39N-11C、11N-39M-11C、39N-11M-39C 均被消化成 62 ku 的抗性核心多肽。



M. Protein marker; 1. Vip3Aa11 protoxin; 2. Vip3Aa11 toxin; 3. 11N-39C protoxin; 4. 11N-39C toxin; 5. 39N-11C protoxin; 6. 39N-11C toxin; 7. 11N-39M-11C protoxin; 8. 11N-39M-11C toxin; 9. 39N-11M-39C protoxin; 10. 39N-11M-39C toxin; 11. Vip3Aa39 protoxin; 12. Vip3Aa39 toxin; 13. 11N-11M-39C protoxin; 14.

11N-11M-39C toxin; 15. 39N-39M-11C protoxin; 16. 39N-39M-11C toxin; 17. 11N-39M-39C protoxin; 18. 11N-39M-39C toxin; 19. 39N-11M-11C protoxin; 20. 39N-11M-11C toxin。

图 6 胰蛋白酶消化 Vip3Aa11、Vip3Aa39 和置换体蛋白结果

Fig. 6 The trypsin digestion products of the Vip3Aa11、Vip3Aa39 and displacement proteins

### 3 讨论

苏云金芽胞杆菌营养型杀虫蛋白 (VIPs) 与其他已知的 Cry 蛋白不同源, 尽管 Vip3A 蛋白具有相似的作用模式, 但它不与 Cry 蛋白共享结合位点<sup>[13]</sup>, 而是通过独特的作用方式对鳞翅目幼虫起作用。目前所有报道的关于 Vip3 蛋白作用模式的研究均在 Vip3A 家族中进行, 甚至主要在 Vip3Aa 亚家族上进行<sup>[14]</sup>。

在本研究中, 各个置换体蛋白的杀虫活性与 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白相比, 均有不同程度的变化。11N-39C 和 39N-11C 置换体蛋白对小菜蛾和甜菜夜蛾的杀虫活性明显下降, 而对棉铃虫的活性变化不大, 这可能是因为 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白的大部分氨基酸的改变导致了其空间结构的变化, 进而破坏了原有的功能结构, 导致杀虫活性的降低。11N-11M-39C 和 39N-39M-11C 与 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白相比, 对三种害虫的活性下降, 其中, 39N-39M-11C 比 11N-11M-39C 置换体蛋白对小菜蛾的毒力下降幅度更大, 但两者对棉铃虫的毒力下降幅度相当。Chi 等<sup>[15]</sup>对 Vip3Aa11 的 C-端氨基酸点突变, 获得了甜菜夜蛾活性明显升高的 3 个突变体 S543N, I544L 和 S686R, 这 3 个突变位置分别位于 Vip3Aa11 氨基酸序列的第 543 位、544 位和 686 位。从本研究结果来看, 将包含 C-端活性氨基酸位点的片段置换并没有获得置换体蛋白活性的显著升高, 这可能说明了单个氨基酸的改变可以极大的提高蛋白的活性, 但各个氨基酸之间并没有有效的叠加效应甚至有可能改变了蛋白的基本功能单位。这说明单个氨基酸所发挥的活性是显著的, 而本研究中包含多个氨基酸位点的片段其杀虫活性并不显著, 这在研究 Vip3Aa 蛋白的结构和杀虫机理中氨基酸片段所起到的影响作用可能是关键的。

在本研究中得到的 11N-39M-39C 蛋白与 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白相比, 对甜菜夜蛾的活性显著降低, 对棉铃虫的杀虫活性也有所降低; 39N-11M-11C 蛋白与 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白相比, 对甜菜夜蛾的毒力失活, 对两种害虫的毒力有所降低。Liu 等<sup>[9]</sup>为了确

定 Vip3Aa11 蛋白质的 N-末端是否有助于杀虫活性，使用定点诱变将 Vip3Aa11 残基与 Vip3Aa39 非核心片段残基交换。获得了对棉铃虫毒力增强的 3 个突变体 S9N、S193T 和 S194L，突变位置分别位于氨基酸序列的第 9 位、193 位和 194 位；毒性减弱的一个突变体 R115H，突变位置位于氨基酸序列的第 115 位。本研究中 11N-39M-39C 蛋白与 39N-11M-11C 蛋白由 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白质 N-端前 210 个氨基酸的置换所得，置换导致对 3 种害虫的活性明显下降，这说明原蛋白 N-端氨基酸片段可能对杀虫活性有一定的影响；同时，置换体与 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白相比，活性改变程度不一致，这也可能是由于不同氨基酸之间所起到的效力是不同的，可能与氨基酸的性质有关。并且未来可以对 8 种置换变体蛋白与受体结合的能力与 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白是否与存在不同进行进一步的验证，通过对其农业害虫的中肠受体结合能力的探究，可以进一步缓解抗性的产生以及探究实际的应用价值。

此外，胰蛋白酶敏感性研究表明，Vip3Aa 经不同的鳞翅目昆虫中肠液处理后产生的 62 至 66 kDa 的抗性核心片段是活性中心<sup>[6]</sup>。11N-39C、39N-11C、11N-39M-11C、39N-11M-39C 这 4 种置换体经消化后均获得了 62 kDa 的活性核心片段，而其余置换体对胰蛋白酶较为敏感，并未产生 62 至 66 kDa 的活性核心片段。推测可能是胰蛋白酶氨基酸位点的改变使得蛋白空间结构发生变化进而导致其活性的改变。

本研究着重于对 Vip3Aa11 和 Vip3Aa39 蛋白的改造，得到的置换体生物活性测定结果不尽相同，为今后的 VIP<sub>3</sub> 类研究提供了依据。Vip3Aa 蛋白是一类杀虫谱较广的营养期杀虫蛋白，其应用越来越广泛，但目前 Vip3 蛋白的杀虫机理尚不明确，置换体蛋白的构建为进一步研究 Vip3 类蛋白杀虫机理提供了参考。在此基础上进一步研究 Vip3 蛋白对害虫毒力的高低，对 Vip3A 类氨基酸片段置换，在提高工程菌的杀虫毒力及扩大杀虫谱方面具有重要的应用价值。

---

## 参考文献:

- [1] PALMA L, ESCUDERO I D, MAEZTU M. Screening of vip genes from a Spanish *Bacillus thuringiensis* collection and characterization of two Vip3 proteins highly toxic to five lepidopteran crop pests[J]. *Biological Control*, 2013, 66(3):141-149.
- [2] SATTAR S, MAITI M K. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21(9):937-946.
- [3] BERGAMASCO V B, MENDES D R, FERNANDES O A, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry11a and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 112(2):152-158.
- [4] 刘荣梅,张杰,高继国,等. 苏云金芽胞杆菌营养期杀虫蛋白基因 *vip3A* 的研究[J]. *高技术通报*, 2004, 14(9):39-42.
- [5] ESTRUCH J J, WARREN G W, MULLINS M A, et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(11):5389.
- [6] 徐宁. 苏云金芽胞杆菌营养期杀虫蛋白(Vip3)突变体的杀虫活性及其对胰蛋白酶的敏感性[D]. 杭州: 浙江大学, 2007:47-53.
- [7] 雒国兴,刘荣梅,张金波,等. 苏云金芽胞杆菌 Vip3Aa11 蛋白 C 端点突变对其杀虫活性的影响[J]. *中国生物防治学报*, 2018,34(1):79-85.
- [8] CHEN W B, LU G Q, CHENG H M, et al. Transgenic cotton coexpressing Vip3A and Cry1Ac has a broad insecticidal spectrum against lepidopteran pests[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 26(15):769-771.
- [9] LIU M, LIU R, LUO G, et al. Effects of Site-Mutations Within the 22 kDa No-Core Fragment of the Vip3Aa11 Insecticidal Toxin of *Bacillus thuringiensis*[J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(5):655-659.
- [10] 何晓明,束长龙,何晓垒,等. 苏云金芽胞杆菌新型 *vip3Aa* 基因的克隆表达与活性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(5):932-937.
- [11] 刘晶晶,束长龙,张杰,等. 苏云金芽胞杆菌内生质粒提取方法的改进[J]. *生物技术通报*, 2008, (6):120-123.
- [12] 张金波,李海涛,刘荣梅,等. Bt 菌株 DQ89 的 *sip* 基因的克隆、表达及杀虫活性分析[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(4):598-602.
- [13] BERGAMASCO V B, MENDES D R, FERNANDES O A, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry11a10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 112(2):152-158.
- [14] 何晓明,束长龙,刘晓垒,等. 苏云金芽胞杆菌新型 *vip3Aa* 基因的克隆、表达与活性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2011(5):932-937.
- [15] CHI B, LUO G, ZHANG J, et al. Effect of C-terminus site-directed mutations on the toxicity and sensitivity

---

of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa11 protein against three lepidopteran pests[J]. *Biocontrol Science & Technology*, 2017, 7(1):1-10.

## Effect of fragment replacement of *Bacillus thuringiensis*

### Vip3Aa11 and Vip3Aa39 on insecticidal activity

ZHANG Youran, SHI Chenchen, LI Shuai, YIN Yanli, LI Haitao\*

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150000, China)

**Abstract:** In order to search for the key amino acid fragments of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa11 and Vip3Aa39, the protein amino acid fragments of Vip3Aa11 and Vip3Aa39 were replaced by overlapping PCR technique, respectively, and eight replacement proteins were successfully obtained. Then the displacement gene and *vip3Aa11*, *vip3Aa39* gene were induced to express in *E. coli* BL21 (DE3) strain, about 88 ku protein fragments. The bioactivity of *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera* were measured in laboratory. The bioassay results showed that compared with Vip3Aa11 and Vip3Aa39 proteins, the insecticidal activities of replacement proteins on *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua* were decreased in varying degrees. The results of trypsin digestion showed that Vip3Aa11 and Vip3Aa39 proteins, as well as the replacement 11N-39C, 39N-11C, 11N-39M-11C, 39N-11M-39C were digested into 62 ku resistant core polypeptides.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; Vip3Aa11 Vip3Aa39; fragment replacement; insecticidal activity