



中国农业科学院植物保护研究所

Institute of Plant Protection(IPP), Chinese Academy of Agricultural Sciences(CAAS)

苏云金芽胞杆菌杀虫蛋白Cry1Ea序列分析和改造

Sequence analysis and modification of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ea

汇报人：孙晓妮

小组成员：张清璐、孙晓妮、吕晨、邱晟群

汇报日期：2022.5.14

目录

一、背景介绍

二、研究内容

1、Cry1Ea蛋白序列信息分析

2、设计Cry1Ea结构域III突变位点

3、构建Cry1Ea蛋白突变体模型

三、总结与展望

一、背景介绍

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, **Bt**)

- 革兰氏阳性菌，可以产芽孢，并伴随芽孢产生各种形态的晶体
- 对目标昆虫具有高毒性和高特异性，对环境具有安全性
- 目前，国际上对草地贪夜蛾防治应用最广泛的Bt基因之一为*cry1*
- Cry1Ea蛋白对草地贪夜蛾具有高活力

二、研究内容

➤ 课题相关物种信息：苏云金芽胞杆菌（Bt）

Bacillus thuringiensis

➤ 课题相关蛋白信息：

蛋白名：Pesticidal crystal protein Cry1Ea

序列条目名：CR1EA_BACTX

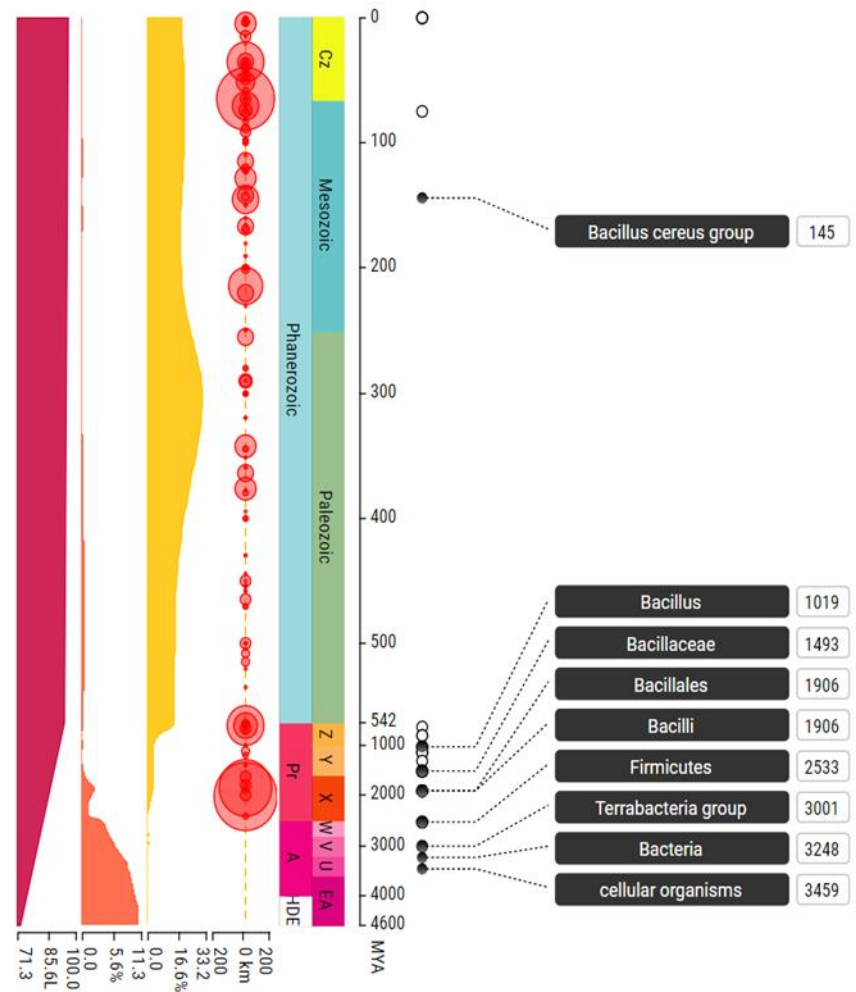
登录号：Q57458

基因名：*cry1Ea*

二、研究内容

分类学地位：

- › Bacteria 细菌
- › Firmicutes 厚壁菌门
- › Bacilli 芽胞杆菌纲
- › Bacillales 芽胞杆菌目
- › Bacillaceae 芽胞杆菌科
- › Bacillus 芽胞杆菌属
- › Bacillus cereus group
蜡状芽胞杆菌菌群



二、研究内容

➤ GO注释信息:

分子功能: 信号受体结合

毒素活性, 蛋白的毒性部分位于N端。

生物过程: 通过宿主细胞共生体进行细胞分裂、

芽胞分化导致孢子球的形成

➤ Cry1Ea杀虫晶体蛋白是在孢子形成过程中产生的, 既作为内含物又作为孢子外壳的一部分积累。属于Delta内毒素家族, 其中第1105-1120位为碱性和酸性残基。

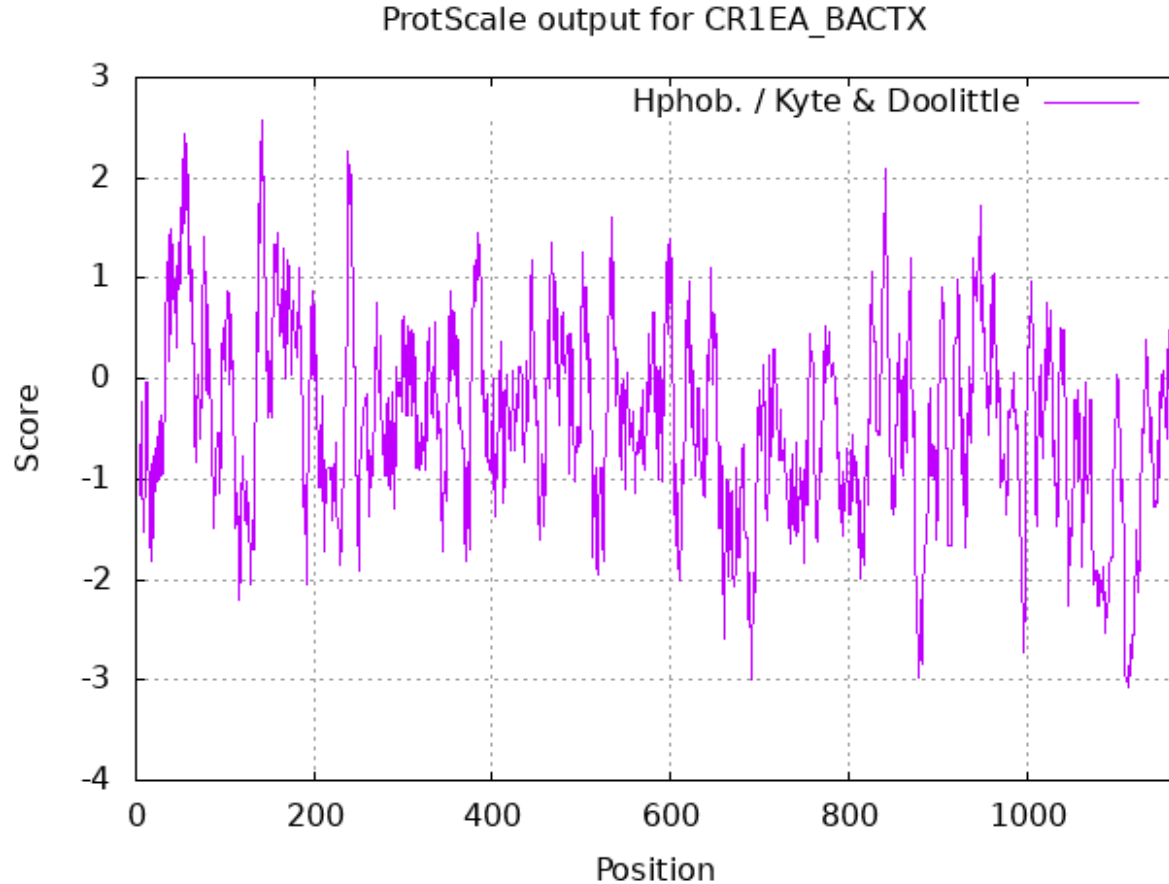
二、研究内容

Cry1Ea蛋白理化性质分析

氨基酸数	1171
分子量	133253.13
等电点	4.99
酸性氨基酸	165
碱性氨基酸	114
不稳定性系数	36.67
脂肪指数	85.90
总平均亲水性	-0.420

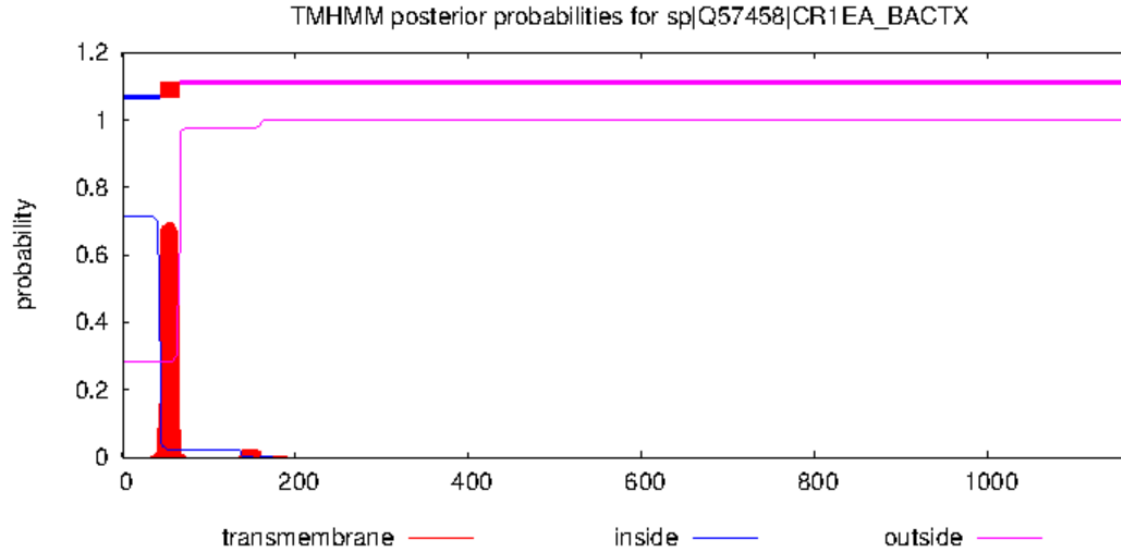
二、研究内容

Cry1Ea蛋白亲/疏水性分析



二、研究内容

Cry1Ea跨膜结构域

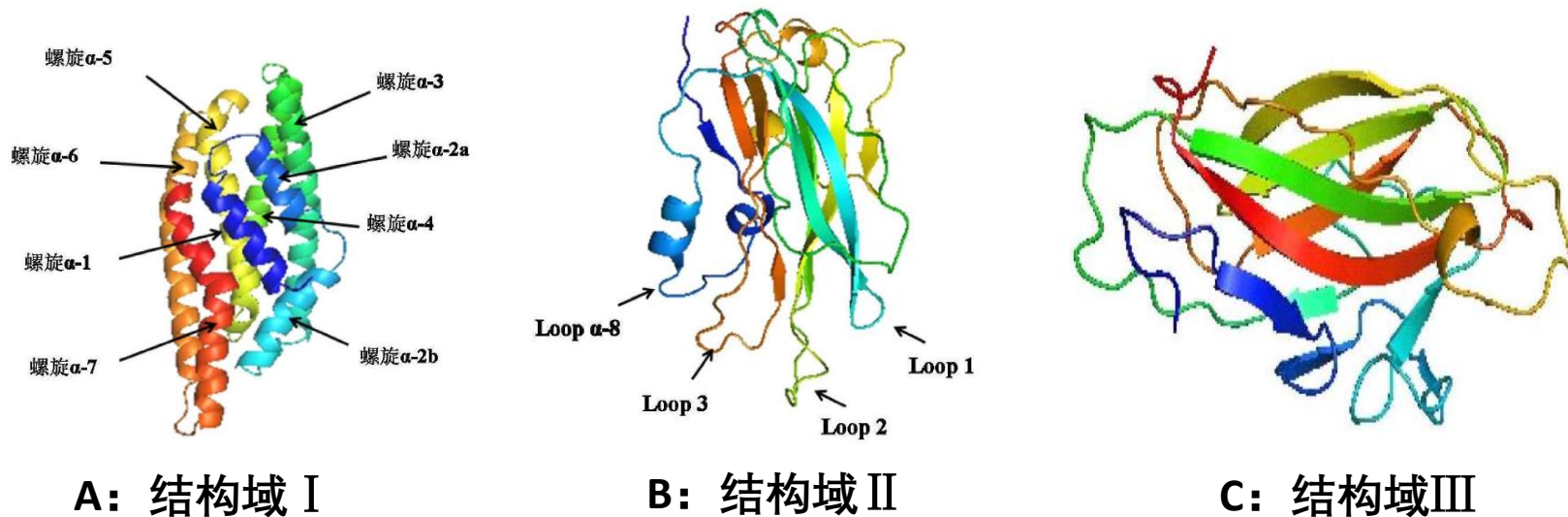


[plot](#) in postscript, [script](#) for making the plot in gnuplot, [data](#) for plot

结果表明，Cry1Ea蛋白存在一个明显的跨膜区域，但是肽链其他部位都位于膜外，这与它没有明显的疏水性一致。

二、研究内容

3D-Cry蛋白包含三个结构域



A: 结构域I是造成上皮细胞膜形成穿孔的关键区域;

B: 结构域II上Loop区域与蛋白活性的发挥直接相关;

C: 目前人们对结构域III的研究较少,功能还不确定,推测结构域III在与受体结合中扮演重要角色,但仍存在争议。

二、研究内容

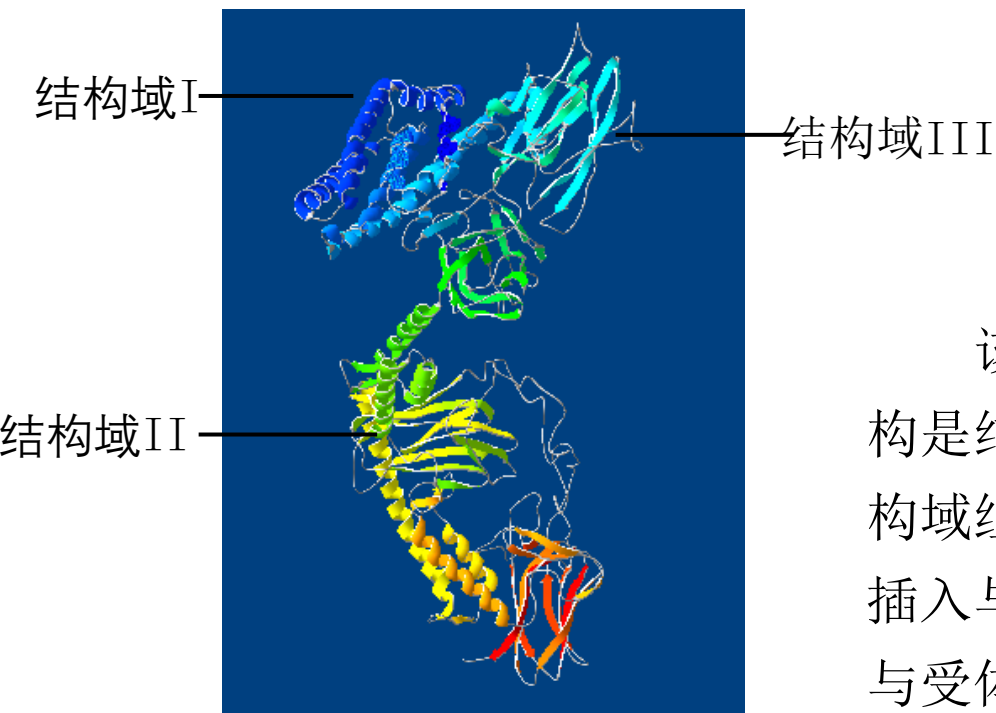
结构域III突变改变蛋白活性

有研究表明，Cry1Fa结构域III中 β 16的第507位氨基酸天冬酰胺突变成丙氨酸后，对草地贪夜蛾的杀虫活性提高了大约5倍（Gómez I, *et al.*, 2018）；Cry1Ac结构域III上509QNR511、Q506、R511、Y513突变为丙氨酸后，突变体蛋白对舞毒蛾和烟芽夜蛾的杀虫活性只降低了2-3倍，而与中肠BBMV结合的能力却降低了4-10倍（Lee MK, *et al.*, 1999）。

二、研究内容

Cry1Ea蛋白改造

查找UniProt数据库，发现Alphafold与SMR预测的Cry1Ea蛋白的三维结构，使用spdv软件观察SMR预测结果，视图如下：

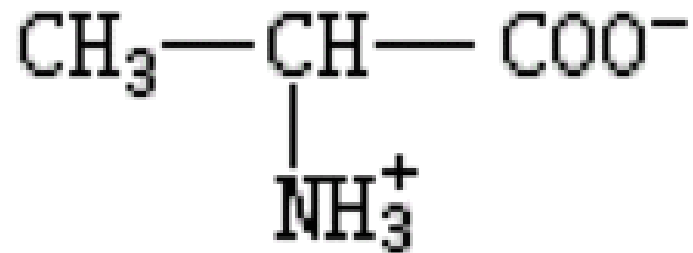


螺旋结构	24.68%
折叠结构	30.66%
成环结构	44.66%

该蛋白不含信号肽序列，三维空间结构是结合不紧密的球状结构其整体由3个结构域组成，其中N-末端螺旋状结构域与膜插入与孔隙形成有关，第二第三个结构域与受体结合有关。

二、研究内容

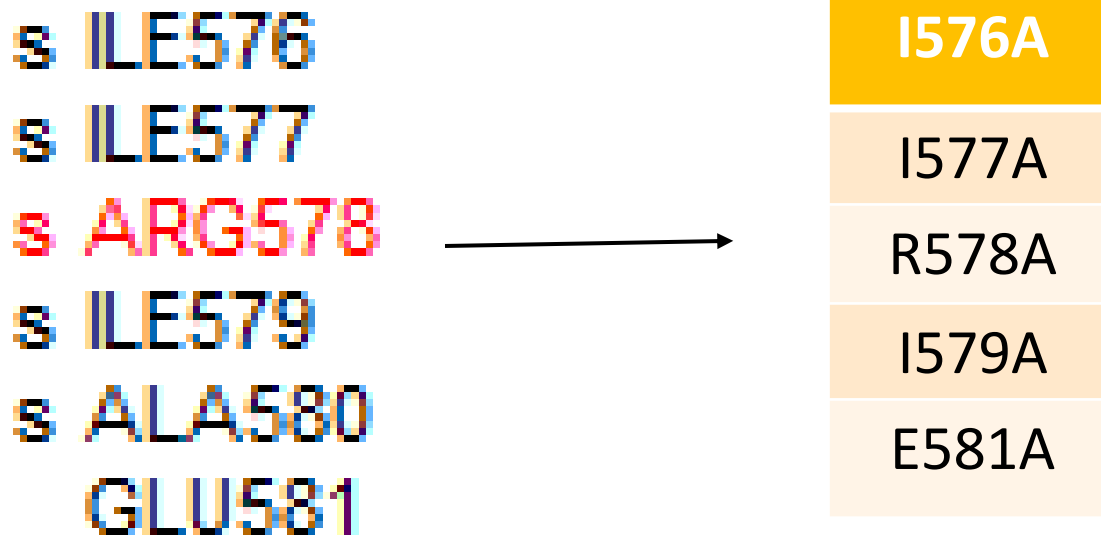
研究表明，在蛋白改造中把极性或带电的一些特殊氨基酸突变为丙氨酸后容易对其活性产生影响，丙氨酸的性质为非极性。其他氨基酸突变为丙氨酸后，自身结构变得简单，对蛋白整体三维结构也不会造成太大的影响。



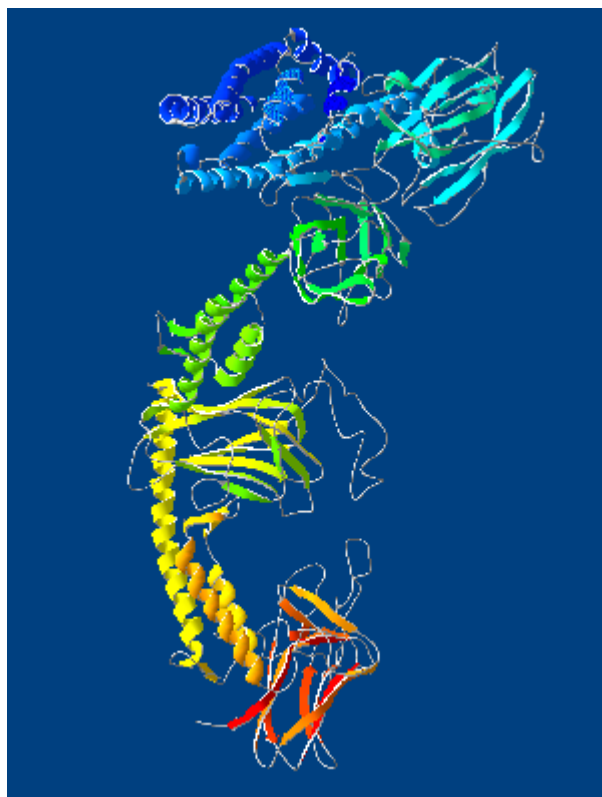
丙氨酸

二、研究内容

所以，以此为基础，我们试图将Cry1Ea蛋白结构域III的氨基酸序列稍作改造，设计得到Cry1Ea蛋白突变体。计划将结构域III的 β -sheet的部分氨基酸统一改变为丙氨酸。



二、研究内容



Cry1Ea突变体

ARG571
ALA572
ASN573
PRO574
s ASP575
s ALA576
s ALA577
s ALA578
s ALA579
s ALA580
ALA581
GLU582
LEU583

使用 Swiss-pdbviewer 软件将 Cry1Ea 结构域 III 中的 Loop 区域进行改造，将部分氨基酸突变为丙氨酸。突变后的 Cry1Ea 蛋白在三维结构上未见明显改变，但杀虫活性是否改变需要进一步验证。

三、总结与展望

通过使用uniprot数据库， protparam、 protscale等工具获得了Cry1Ea蛋白氨基酸序列的基本信息与特征；然后设计Cry1Ea结构域III突变位点,并使用Swiss-pdbviewer软件进行了氨基酸突变获得Cry1Ea蛋白突变体模型。

下一阶段，主要进行实验操作，构建Cry1Ea蛋白突变体；最后，在蛋白突变体构建成功之后，检测蛋白是否可以正常表达，如果能够获得表达蛋白，我们则需要对突变体蛋白的活性进行测定，确定Cry1Ea蛋白结构域III突变后对其活性的影响。



中国农业科学院植物保护研究所

Institute of Plant Protection(IPP),Chinese Academy of Agricultural Sciences(CAAS)

请老师和同学们批评指正！