

苏云金芽孢杆菌无晶体突变株的逐级升温筛选及其转化性能

李 林 杨 超 刘子铎 李阜棣 喻子牛

(华中农业大学微生物科学技术系 农业微生物农业部重点开放实验室 武汉 430070)

摘 要:逐级从 42℃ 到 44℃ 和 46℃ 升温培养,并用 0.05% SDS 处理苏云金芽孢杆菌 YBT-1463,获得了一系列内生质粒被部分或完全消除的无晶体(Cry^-)突变株,对 4 种 Cry^- 突变株的转化性能及导入的外源质粒的稳定性进行了研究。用限量培养基和 42℃ 培养筛选到 Cry^- 突变株后,升温至 44℃,从 Cry^- 突变株得到内生质粒被进一步消除的突变株;然后升温至 46℃ 来培养其中突变株 BMB170,并用 0.05% 的 SDS 进行处理,最终筛选到 1 株无质粒突变株 BMB171。用 pHT3101、pBMB1736、pBTL-1 和 pHV1249 等 4 种外源质粒进行的转化及稳定性研究表明,转化频率的大小及导入质粒的稳定性与用作受体菌的 Cry^- 突变株携带的内生质粒数之间呈现一定的相关性, Cry^- 突变株的转化频率显著高于出发菌株,其中 BMB171 的转化频率最高达 10^7 转化子/ μg DNA,且所导入的外源质粒的稳定性也高于其它 Cry^- 突变株及出发菌株 YBT-1463。

关键词:苏云金芽孢杆菌, Cry^- 突变株,筛选,转化

中图分类号:Q939.11 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0085-90

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)突出的特征是在形成芽孢的同时,可以形成一种由杀虫晶体蛋白(ICPs)组成的伴胞晶体^[1]。不同的 ICPs 已被证实对鳞翅目(Lepidoptera)、鞘翅目(Coleoptera)和双翅目(Diptera)等 8 个目的多种农林害虫有不同程度的毒性^[2]。这些 ICPs 的编码基因(即 *cry* 基因)通常定位在该菌的一些较大(通常分子量大于 45kb 的质粒上^[3,4])。通过部分或全部消除苏云金芽孢杆菌的内生质粒,是研究 *cry* 基因的定位、结构与功能,以及筛选受体菌的常用方法之一。不同苏云金芽孢杆菌的质粒在数量、大小及拷贝数等方面表现出较大的差异。一般野生菌株的内生质粒数有 2 至 16 个或更多;大小从 2.1kb 到 270kb^[1]。这些质粒,尤其是一些大质粒,是较为稳定的。苏云金芽孢杆菌质粒的消除方法有提高生长温度^[5]、使用质粒消除剂等^[3],但采用逐级升温的方法来消除质粒尚未见报道。本研究通过逐级采用 42℃、44℃ 和 46℃ 培养并结合质粒消除剂消除苏云金芽孢杆菌 YBT-1463 的质粒,获得了一系列无晶体、且质粒被部分或完全消除的突变株,并对其中部分突变株的转化性能等方面进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本文采用的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains or plasmids		Characteristics	Sources
<i>Bacillus thuringiensis</i>			
YBT-1463	subsp. <i>kurstaki</i> , H _{3abc}	is a highly toxic wild strain to Lepidoptera	Screened by our lab.
HD-2	subsp. <i>thuringiensis</i> , H ₁	is indicator bacteria of MW marker plasmid	From Dr. de Barjac in Pasteur Institute France
BMB151	Crymutant source of YBT-1463		This work
BMB155	Crymutant source of YBT-1463		This work
BMB160	Crymutant source of YBT-1463		This work
BMB168	Crymutant source of BMB154		This work
BMB170	Crymutant source of BMB160		This work
BMB171	Source of BMB170 no any resident plasmid		This work
Plasmids			
pHT3101	Ap ^r Erm ^r , shuttle vector, 6.6kb		Lereclus ^[6]
pBMB1736	Ap ^r Erm ^r , carry <i>cry 1 Ac</i> gene, 13kb		Constructed by our lab.
pBTL-1	Ap ^r Tc ^r , carry <i>cry 1 Ab</i> gene 9.9kb		Construfed by our lab.
pHV1249	Ap ^r Erm ^r Cm ^r , 9.1kb		Petit ^[7]

1.2 培养基

菌种活化、保藏、质粒抽提及稳定性实验均采用 LB 培养基^[8]；质粒消除与 Cry⁻突变株的筛选采用 SCG 培养基^[3]；筛选转化子的选择培养基是在 NSM 培养基^[9]中分别加入红霉素(Erm)和四环素(Tc)，使其终浓度分别为 25μg/mL 和 20μg/mL。

1.3 实验方法

1.3.1 Cry⁻突变株的筛选:参照文献[5]进行。

1.3.2 Cry⁻突变株内生质粒的进一步升温消除:抽提各 Cry⁻突变株的质粒,电泳检测其质粒谱带。选择其中的突变株 BMB151、BMB154 和 BMB160 进一步升温至 44℃,用 SCG 培养液和 190r/min 振荡培养,每隔 8h 取样在 SCG 琼脂平板上划线,于 44℃ 培养过夜,取单菌落经转接活化后抽提质粒,电泳检查其质粒谱带,至最终振荡时间为 120h。

1.3.3 无内生质粒突变株 BMB171 的筛选:将经 44℃ 处理后的突变株 BMB170 点种于含有(或不含)0.05%SDS 的 SCG 琼脂平板上,继续升温至 46℃ 培养,每隔 48h 取其菌落的边缘部分点种于下一个 SCG 琼脂平板,同时抽提质粒并用电泳检查质粒谱带。

1.3.4 质粒 DNA 的抽提和定量:苏云金芽孢杆菌各菌株的总质粒采用碱法小量抽提。转化实验的供体质粒用碱法一次大量抽提,并用紫外分光光度法测定 DNA 的浓度^[8]。

1.3.5 苏云金芽孢杆菌内生质粒数的确定:采用双向电泳法,参照文献[10]进行。

1.3.6 外源质粒 DNA 向 Cry⁻突变株及出发菌株 YBT-1463 的电转化:按文献[11]稍作修改进行。离心收集的菌体用蔗糖/磷酸盐缓冲液^[12]洗涤菌体 4 次。电脉冲仪为 GenepulserTM(Bio-Rad 产品)。电脉冲参数为:12.5kV/cm, 25μF, 200Ω, 4.6ms。

1.3.7 外源质粒在受体菌中的稳定性:取各外源质粒导入 Cry⁻突变株和菌株 YBT-1463 的转化子各 100 个,用牙签点种于 LB 琼脂平板上。每隔 24h 取其菌落边缘部分点种转接于下一个 LB 平板上。每转接 10 次后在 Erm(或 Tc)平板上相应点种 1 次,计数不生长的菌落数,并计算质粒丢失的百分率。

2 结果

2.1 苏云金芽孢杆菌 Cry⁻ 突变株的筛选

2.1.1 42℃ 培养条件下 Cry⁻ 突变株的筛选:选取本室分离保藏的、分别对鳞翅目菜蛾科(Plutellidae)和夜蛾科(Noctuidae)以及鞘翅目害虫有活性的 YBT-1463 等 9 株苏云金芽孢杆菌(表 2)进行第一轮 42℃ 温度处理,并通过镜检伴胞晶体是否形成来筛选 Cry⁻ 突变株,结果见表 2。

表 2 的结果表明,9 个出发菌株经 42℃ 处理后出现 Cry⁻ 突变株的频率较低。在 YBT-9601 等 7 个出发菌株中未筛选到 Cry⁻ 突变株,反映出这些菌株在 42℃ 培养条件下其携带 cry 基因的内生质粒及其产品性能是较为稳定的。本文选择

表 2 42℃ 培养条件下苏云金芽孢杆菌 Cry⁻ 突变株的筛选结果

Table 2 Screening of acrySTALLIFEROUS mutants from 9 *Bacillus thuringiensis* strains at 42℃

Strains	Total colonies by microscopic examination	AcrySTALLIFEROUS colonies	Cry ⁻ mutants percent/ %
YBT-1463	740	3	0.41
YBT-9603	1620	6	0.37
YBT-9601	420	0	0
YBT-218	460	0	0
YBT-1416	210	0	0
YBT-1221	120	0	0
YBT-1345	160	0	0
YBT-1354	130	0	0
YBT-1535	80	0	0

从 Cry⁻ 检出率相对较高的菌株 YBT-1463 得到的 3 个 Cry⁻ 突变株进行第二轮质粒消除实验,并把经电泳检测其质粒谱带分别为 7、8 和 6 条的这三个 Cry⁻ 突变株分别命名为 BMB151、BMB154 和 BMB160。

2.1.2 在 44℃ 培养条件下 Cry⁻ 突变株质粒的进一步消除结果:将突变株 BMB151、BMB154 和 BMB160 分别置 44℃ 振荡培养不同时间,并划线于 44℃ 培养过夜后,抽提其质粒并电泳检查,其质粒消除结果见表 3。表 3 的结果表明,在 44℃ 培养条件下,随着振荡时间的延长,3 个 Cry⁻ 突变株的质粒进一步丢失,但部分内生质粒的稳定性较强,至振荡 72h 后,3 个突变株的内生质粒均不再减少。本文将突变株 BMB154 经振荡培养 24h 后得到的含 5 个内生质粒的突变株命名为 BMB168;将突变株 BMB160 经振荡培养 72h 后得到的含有 4 个内生质粒的突变株命名为 BMB170。

表 3 44℃ 培养条件下突变株 BMB151、BMB154 和 BMB160 质粒进一步消除的结果

Table 3 The plasmid-cured result of BMB151、BMB154 and BMB160 in different shaking time at 46℃

Cry ⁻ mutants	Numbers of plasmid bands										
	Shaking time/h										
	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	120
BMB151	7	7	6	6	6	6	6	6	5	5	5
BMB154	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
BMB160	6	6	6	6	6	5	5	4	4	4	4

2.1.3 无质粒突变株 BMB171 的筛选:将突变株 BMB170 分别点种于含 0.05% SDS 和不含 SDS 的 SCG 平板上,置 46℃ 培养,进行第三轮质粒消除实验,结果见表 4。

表 4 46℃ 培养条件下经 SDS 处理突变株 BMB170 质粒的消除结果

Table 4 The plasmid-cured result of BMB170 by SDS treatment at 46℃

SDS addition (+/-)	Dibbling times	Colonies examined	Percent of additional plasmid-cured mutants/%	Percent of complete plasmid-cured derivatives/%
SDS+	15	315	1.90	0.32
SDS-	15	315	0.65	0

从表 4 可见,进一步消除突变株 BMB170 的内生质粒时,添加 SDS 的处理比不添加 SDS 的效果好。经 46℃ 高温培养并结合 SDS 处理后,从突变株 BMB170 进一步筛选得到 1 株内生质粒被完全消除的 Cry⁻ 突变株,命名为 BMB171。几种 Cry⁻ 突变株的质粒电泳图谱见图 1。

2.2 Cry⁻ 突变株的转化性能

本文选择复制子相同、但大小不同的供体质粒 pHT3101 和 pBMB1736 以及复制子非苏云金芽孢杆菌来源的 pBTL-1 及 pHV1249 来电转化 Cry⁻ 突变株 BMB160、BMB168、BMB170、BMB171

及出发菌株 YBT-1463,其转化频率见表 5。表 5 的结果表明,转化频率的大小与受体菌的内生质粒数之间有一定的相关性。各 Cry⁻ 突变株的转化频率显著高于其出发菌株 YBT-1463d,而在 Cry 突变

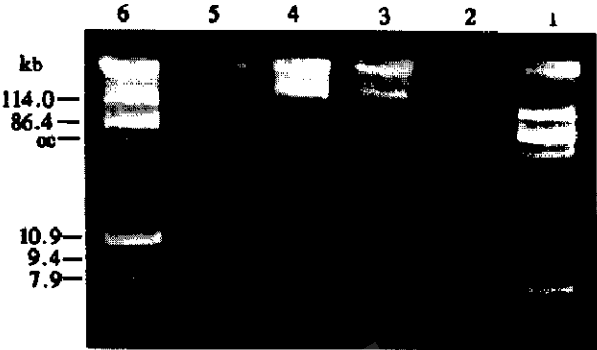


图 1 几种 Cry⁻ 突变株的质粒电泳谱带

Fig.1 Electrophoretic profile of plasmids isolated from several acrySTALLIFEROUS mutants and their parental strain YBT-1463

1.YBT-1463; 2.BMB160; 3.BMB168;
4.BMB170; 5.BMB171; 6.HD-2.

表 5 4 种外源质粒 DNA 电转化 4 种 Cry⁻ 突变株和出发菌株 YBT-1463 的转化频率

Table 5 Electro-transformation frequencies of 4 acrySTALLIFEROUS mutants and YBT-1463 strain with 4 exogenous plasmid DNA

Strains	Transformation frequencies(transformants/ μ gDNA)			
	pHT3101	pBMB1736	pBTL-1	pHV1249
BMB160	2×10^5	7×10^4	1×10^3	5
BMB168	3×10^5	1×10^4	2×10^3	5
BMB170	4×10^5	3×10^4	2×10^3	40
BMB171	8×10^7	2×10^5	7×10^5	200
YBT-1463	0.1	6	25	0

株中,也表现为内生质粒较少的,转化频率较高,其中以无质粒突变株 BMB171 的转化性能最优,转化频率最高达 10^7 个转化子/ μ gDNA。同时,转化频率的大小与供体质粒的复制子来源及大小有关。如供体质粒 pHV1249 的复制子来源于金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*),在芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的细菌中不稳定,用该质粒转化出发菌株 YBT-1463 时未筛选到转化子,而转化突变株 BMB171 的频率也较低;供体质粒 pBTL-1 在各 Cry⁻ 突变株中的转化频率亦较 pHT3101 和 pBMB1736 低;而复制子来源于苏云金芽孢杆菌的其它两种质粒中,以较小的 pHT3101 转化频率较高。

2.3 外源质粒在 Cry⁻ 突变株中的稳定性

将各外源质粒转化 4 种 Cry⁻ 突变株和出发菌株 YBT-1463 的转化子在 LB 琼脂平板

上连续点种转接培养,以验证其稳定性,结果见表 6。表 6 的结果表明,几种外源质粒的稳定性与受体菌携带的内生质粒数有关。各质粒在 Cry⁻ 突变株中的稳定性均高于出发菌株,且在 Cry⁻ 突变株中,以导入无质粒突变株 BMB171 的外源质粒最为稳定。另外,外源质粒 pHV1249 导入除 BMB171 以外的其它 Cry⁻ 突变株经转接 10 次后均全部丢失(在 BMB171 中也不超过 20 次),pBTL-1 也存在类似的情况,反映出在 Cry⁻ 突变株中导入的外源质粒的稳定性与其复制子类型有较密切的关系。

表 6 4 种外源质粒在 Cry⁻ 突变株和出发菌株 YBT-1463 中的稳定性

Table 6 The stability of 4 exogenous plasmids introduced in 4 acrySTALLIFEROUS mutants and their parental strain YBT-1463

Plasmids	Percent of plasmid-lost/ %																													
	BMB160					BMB168					BMB170					BMB171					YBT-1463									
	Dibbling times					Dibbling times					Dibbling times					Dibbling times					Dibbling times									
	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
pHT3101	0	0	5	5	10	0	0	5	6	8	0	0	4	5	9	0	0	4	6	8	60	75	75	85	92					
pBMB1736	10	25	55	100	-	10	24	55	100	-	8	19	37	84	100	0	15	20	30	40	75	84	100	-	-					
pETL-1	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	90	100	-	-	-	58	100	-	-	-	100	-	-	-	-					
pHV1249	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	90	100	-	-	-	-	-	-	-	-					

3 讨 论

绝大多数苏云金芽孢杆菌均含有数量不等的内生质粒,这些质粒按其大小可分为两类:小于 15kb 的小质粒和大于 45kb 的大质粒。这两类质粒在细胞内的拷贝数和复制方式有所不同,前者一般拷贝数较高,以滚环方式复制,稳定性不高;后者拷贝数较低,以 θ 方式复制,在细胞中较稳定^[1,13]。考虑到消除这两类内生质粒的难易程度不同,本文选择了一种逐级升温的消除方式来消除苏云金芽孢杆菌的内生质粒,结果表明这种消除方式是行之有效的。本文进一步对无质粒突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 在营养需求、生长曲线和生物量等方面进行的比较测定,结果表明,BMB171 突变株的营养需求和生长性能与出发菌株无明显差异(未发表资料)。

导致枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中外源质粒的不稳定性有两方面的影响因素,一是由于质粒分离的不稳定性,这是由于细胞在分裂时发生质粒的不准确分配,从而造成一个子细胞整个质粒的丢失;二是由于发生缺失、插入等而造成结构上的不稳定性^[14,15],这种情况在苏云金芽孢杆菌中也同样存在^[12]。因此,通过消除(或部分消除)苏云金芽孢杆菌的内生质粒来筛选表达外源基因的受体菌株,是提高外源基因的表达水平和稳定性,从而构建工程菌株的有效途径之一。本文通过部分或完全消除苏云金芽孢杆菌的内生质粒而获得的 Cry⁻ 突变株,其转化频率和导入质粒的稳定性均显著高于天然菌株。尤其是无质粒突变株 BMB171,经本室用 20 余种不同大小、不同类型的质粒进行转化实验,均表现出良好的转化性能(结果待报道),已显示出用作构建工程菌的受体菌的潜能和优势。

参 考 文 献

[1] 喻子牛主编. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990.
[2] 喻子牛, 孙 明, 刘子铎, 等. 中国生物防治, 1996, 12(2): 85~89.
[3] Gonzalez J M, Dulmage H T, Carlton B C. *Plasmid*, 1981, 5: 351~365.

- [4] Kronstad J W, Schnepf H E, Whiteley H R. *J Bacteriol*, 1983, **154**:419~428.
- [5] 张剑冰, 欧广东, 孙明, 等. 华中农业大学学报, 1993, **12**(6):579~584.
- [6] Lereclus D, Arantes O, Chauvaux J, et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **60**:211~218.
- [7] Petit M, Bruand C, Janniere L, et al. *J Bacteriol*, 1990, **172**(12):6736~6740.
- [8] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯主编(金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 第二版, 北京: 科学出版社, 1992.
- [9] Baum J A, Coyle D M, Gilbert M P, et al. *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**:3420~3428.
- [10] Hintermann G, Gramero R, Kieser T, et al. *Arch Microbiol*, 1981, **130**:218~222.
- [11] Bone E J, Ellar D J. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **58**:171~178.
- [12] Crickmore N, Nicholls C, Earp D J, et al. *Biochem J*, 1990, **270**:133~136.
- [13] 李林, 刘子铎, 孙明, 等. 农业生物技术学报, 1998, **6**(1):90~95.
- [14] Gruss A, Ehrlich S D. *Microbiol Rev*, 1989, **53**:231~241.
- [15] Peijnenburg A, Venema G, Bron S. Structural plasmid stability in *Bacillus subtilis*. In: Butler L O, Harwood C, Moseley B E B. ed. Genetic transformation and expression. UK: Intercept Limited, 1989. 221~229.

SCREENING OF ACRYSTALLIFEROUS MUTANTS FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* AND THEIR TRANSFORMATION PROPERTIES

Li Lin Yang Chao Liu Ziduo Li Fudi Yu Ziniu

(Dept. of Microbial Science and Technology, key Lab. of Agri-Microbiology, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: After elevating growth temperature of YBT-1463 and other 8 *Bacillus thuringiensis* parental strains to 42℃, 9 acrySTALLIFEROUS(Cry⁻) mutants were obtained, and then a series of partial plasmid-cured mutants were further obtained from 3 Cry⁻ mutants BMB151, BMB154 and BMB160 by elevating temperature to 44℃. One of which, BMB170, was further treated by elevating temperature to 46℃ and adding 0.05% SDS as the plasmid-curing agent. The resulting mutant, which was designated BMB171 and had no resident plasmid, was finally obtained. The studies on the transformation efficiency and stability of Cry⁻ mutants showed that the transformation frequencies, as well as stability of several exogenous plasmids(pHT3101, pBMB1736, etc.) introduced into Cry⁻ mutants by electroporation, were correlated with the numbers of resident plasmids bearing by the relevant recipients, the patterns of plasmid replicons and the sizes of those exogenous plasmids. Meanwhile, a much higher electro-transformation frequencies of Cry⁻ mutants than the parental strain YBT-1463 was found, and the highest of the transformation frequency, in BMB 171, could reach up to 10⁷ transformants/μg DNA, and the stability of those exogenous plasmids in BMB171 were also higher than in other Cry⁻ mutants and YBT-1463 strain.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Cry⁻ mutant, Screening, Transformation