

# 类似 S-层蛋白的苏云金芽胞杆菌伴胞晶体蛋白基因的克隆\*

孙 明 朱晨光 喻子牛

(华中农业大学生命科学技术学院 农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

**摘 要:**芽胞杆菌 CTC 菌株被鉴定为苏云金芽胞杆菌,鞭毛血清型 H2,幕虫亚种;产生卵圆形伴胞晶体,伴胞晶体蛋白为 100kD;测定了该蛋白的 N-末端序列,该序列与炭疽芽胞杆菌的细胞表面 S-层蛋白具 92%~93% 相似性;根据 Southern 杂交制作了该晶体蛋白基因 *ctc* 所在位置的限制性酶切图谱,分别克隆了该基因 5' 和 3' 端所在的 2.9kb *Xba*I 片段和 3.1kb *Cla*I DNA 片段,彼此间具 0.6kb 重叠,通过拼接获得含完整 *ctc* 基因的克隆。含该基因的大肠杆菌与表达 S-层蛋白的大肠杆菌具相似生长特征。初步表明 CTC 菌株的伴胞晶体由细胞表面 S-层蛋白组成。苏云金芽胞杆菌区别于蜡状芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌的唯一标准是能形成伴胞晶体,由于 S-层是细胞表面的结构成分,本文对 CTC 菌株鉴定为苏云金芽胞杆菌以及伴胞晶体作为苏云金芽胞杆菌鉴别的唯一标准提出了质疑。

**关键词:**细胞表面 S-层,伴胞晶体,苏云金芽胞杆菌,蜡状芽胞杆菌群,基因克隆

**中图分类号:**Q781,Q939.124 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 02-0141-07

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)和蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)是极端相似的种群,前者区别于后两个种的唯一标准是前者在细胞内伴随芽胞的形成而产生由蛋白质组成的伴胞晶体<sup>[1]</sup>。该伴胞晶体对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等昆虫有杀虫活性,现已发现 28 群 180 多种杀虫晶体蛋白基因<sup>[2,3]</sup>。根据鞭毛抗原的差异可将苏云金芽胞杆菌划分为 69 个血清型共 82 个亚种<sup>[4]</sup>,然而在大多数亚种中并未发现杀虫活性,且对这些无毒菌株的伴胞晶体的结构和组成研究甚少。杀虫晶体蛋白基因主要位于质粒上<sup>[3]</sup>,由于一旦苏云金芽胞杆菌中携带杀虫基因的质粒丢失后,便无法与蜡状芽胞杆菌相区别。把苏云金芽胞杆菌作为一个独立种一直有争议,直到现在仍有人认为它应列为蜡状芽胞杆菌的一个亚种<sup>[5]</sup>。

许多细菌有一层由蛋白质或糖蛋白组成的细胞表面(S-层)结构,该结构是多孔的晶格状单分子层,完全覆盖在细胞外表面。在真细菌中,S-层存在于细胞壁外面<sup>[6,7]</sup>。本文报告了无毒苏云金芽胞杆菌 CTC 菌株的特征,显示其伴胞晶体由类似炭疽芽胞杆菌的 S-层蛋白组成,并克隆了该晶体蛋白基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

所用的菌株和质粒见表 1。苏云金芽胞杆菌 CTC 菌株由本室分离。用 BHI 培养基

\*国家自然科学基金资助(39870036 和 30080013)

**作者简介:**孙 明(1966-),男,江西省景德镇市人,华中农业大学生命科学技术学院教授,博士,1994 和 1997-1998 年赴美国俄亥俄州立大学、加拿大滑铁卢大学和新加坡分子农业生物研究所作访问学者,主要从事芽胞杆菌的分子生物学研究。

**收稿日期:**2000-05-18,修回日期:2000-09-25

(Difco)和 LB 培养基分别于 30℃ 培养苏云金芽胞杆菌,37℃ 培养大肠杆菌。

表 1 实验所用的菌株和质粒

Table 1 The bacteria and plasmids used in this work

Strain/Plasmid	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> XL Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> Δ <i>M15 Tn10</i> (Ter <sup>f</sup> )]	Stored in this lab.
<i>Bacillus thuringiensis</i> CTC	Serotype H2	Stored in this lab. <sup>[8]</sup>
Plasmid pIJ2925	Amp <sup>r</sup> , pUC19 derivative, 2710bp	Stored in this lab.
Plasmid pBMB-C42	3.1kb <i>Cla</i> I fragment containing 3' <i>ctc</i> gene in <i>Acc</i> I site of pIJ2925	This work
Plasmid pBMB-X281	2.9kb <i>Xba</i> I fragment containing 5' <i>ctc</i> gene in <i>Xba</i> I site of pIJ2925	This work
Plasmid pBMB982	4.1kb <i>Eco</i> RI- <i>Cla</i> I fragment containing full <i>ctc</i> gene in <i>Eco</i> RI- <i>Acc</i> I site of pIJ2925	This work

1.2 伴胞晶体的观察

利用扫描电子显微镜观察伴胞晶体。为便于观察,菌体用 BHI 平板于 30℃ 培养 2d 后,每隔 12h 取样一次,培养物用 1mol/L NaCl 洗涤一次。

1.3 伴胞晶体蛋白的 SDS-PAGE

参照文献[9]用蔗糖密度梯度法提纯伴胞晶体。按修改的文献[10]方法用 SDS-PAGE 检测伴胞晶体的蛋白组成。将培养物用 1mol/L NaCl 洗涤三次,H<sub>2</sub>O 洗涤三次,用 100μL H<sub>2</sub>O 悬浮,加等量 2 倍上样缓冲液,100℃ 加热 2min,10000r/min 离心 2min,取上清液用于电泳。

1.4 蛋白质 N-末端氨基酸序列测定

用 Bio-Rad 公司蛋白质印渍转移仪,利用 Tris-甘氨酸缓冲液(25mmol/L Tris,192 mmol/L 甘氨酸,0.1 mmol/L thioglycolate,20% 甲醇,pH8.3),将蛋白质样品转移至 PVDF 膜,用 Applied Biosystem 公司蛋白测序仪(473A)测定蛋白质 N-末端氨基酸序列。

1.5 DNA 操作

1.5.1 DNA 的酶切、电泳、连接、转化大肠杆菌、Southern blotting、杂交和洗膜均按文献[11]进行。

1.5.2 从琼脂糖凝胶回收 DNA:采用 Glass Milk 法,参照 Bio-Rad 公司 DNA Purification Kit 操作手册进行。

1.5.3 苏云金芽胞杆菌总 DNA 的提取:取对数生长期细胞(*OD*<sub>600</sub> = 0.6~0.8),用 TES (100 mmol/L Tris·HCl,1 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,pH 8.0)洗涤菌体,悬浮菌体于含 1 mg/mL 溶菌酶的 SolI 溶液(50 mmol/L 葡萄糖,25 mmol/L Tris·HCl,10 mmol/L EDTA,pH8.0),37℃ 温育 30 min,加 SDS 至 2%,加 NaCl 至 1 mol/L,等量苯酚抽提,乙醇沉淀抽提液,TE 悬浮沉淀,加 RNase A,65℃ 温育 10 min,苯酚-氯仿抽提 1~2 次,乙醇沉淀,TE 溶解。

1.6 探针制备

1.6.1 探针种类:探针 I 为寡核苷酸 46,探针 II 为寡核苷酸 46 和 39 的 PCR 扩增产物,探针 III 为寡核苷酸 49 和 50 的 PCR 扩增产物。

**1.6.2 寡核苷酸序列 (5' → 3'):** 46: GCAGGAAAATCATTCCCAGACGTTC; 39: CAATAAATTGAGCAGCTTCTGC; 49: CACAGTTAAAGATGAAAACG; 50: ACAGTATATTTACCAGCTTC。

**1.6.3 PCR 扩增步骤:**利用 *Taq* DNA 聚合酶。反应程序:94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 45s, 25 个循环。

**1.6.4 探针标记和检测:**用 DIG 标记探针,其中对寡核苷酸作末端标记,对 DNA 片段作随机引物标记。采用 Boehringer Mannheim 公司的 DIG DNA Labeling and Detection Kit 和 DIG Oligonucleotide 3' End Labeling Kit 试剂盒标记探针和杂交检测。

## 1.7 基因克隆步骤

通过 Southern 杂交,确定目标基因所在限制性 DNA 片段的大小,然后从琼脂糖凝胶中回收对应大小的 DNA 片段,与经相同或同尾限制性内切酶切割并经去磷酸的质粒载体 pIJ2925 连接,转化 *E. coli*;待 1mL 转化细胞恢复后,通过浓缩或稀释,取相当于 900、90、9、0.9、0.09 和 0.009 $\mu$ L 的转化细胞涂平板;长出菌落或菌苔后,将其影印到硝酸纤维素滤膜上,作菌落杂交,找到阳性菌落。如果阳性杂交斑点对应处不是单菌落,则将对应的菌苔挑出,用 1mL LB 培养基悬浮,再做一次涂平板和杂交实验,直至找到阳性单菌落。

## 2 结果和分析

### 2.1 CTC 菌株的特征

菌株 CTC 产生卵圆形伴胞晶体(图 1),鉴定为苏云金芽胞杆菌,鞭毛抗原血清型 H2,幕虫亚种,与巴斯德研究所的鉴定结果一致(International Entomopathogenic *Bacillus* Centre 编号为 T02010),该所为苏云金芽胞杆菌鉴定的唯一权威单位<sup>[4]</sup>。伴胞晶体由单一分子量的蛋白质组成(100kD,图 2)。毒力测定表明 CTC 菌株对小菜蛾、棉铃虫、库蚊、猿叶甲等鳞翅目、双翅目和鞘翅目昆虫均未显示毒性(未列数据)。

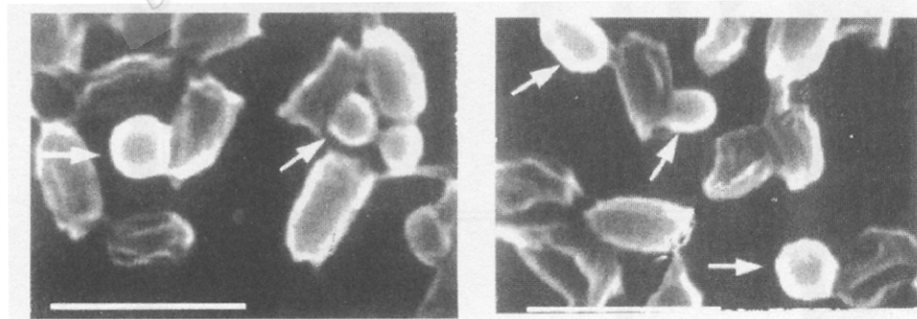


图 1 苏云金芽胞杆菌 CTC 菌株伴胞晶体(箭头所指)和芽胞的扫描电子显微镜照片

Fig.1 Photograph of parasporal bodies and spores of *Bacillus thuringiensis* CTC strain under scan electro-microscopy (Arrows point parasporal bodies; Bar = 2.9 $\mu$ m).

### 2.2 晶体蛋白的 N-末端氨基酸序列

CTC 菌株晶体蛋白的 N-末端氨基酸序列测定为: AGKSFPDVPADHWGI 和 AGKSFPDV(P)A,两次测定结果一致。由于 N-末端氨基酸序列是可测定的,说明 100kD 晶体蛋白由一种蛋白质或几种非常相似的蛋白组成。经美国国家生物技术信息

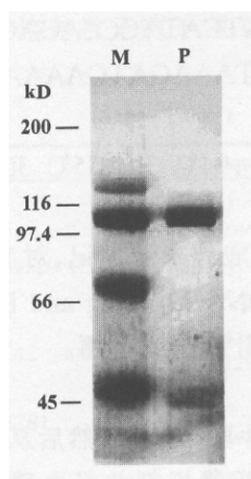


图2 苏云金芽胞杆菌伴胞晶体蛋白的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE profile of paraspore protein in *Bacillus thuringiensis* CTC strain. M. Marker; P. Paraspore body protein.

保守性,设计出寡核苷酸 39、49 和 50(后二者间的跨度对应 S 层蛋白基因中部约三分之一的序列)。PCR 扩增显示,寡核苷酸 46/39 和寡核苷酸 49/50 均能从 CTC 菌株的总 DNA 扩增出与预计大小相近的 DNA 片段(517bp 和 759bp),该扩增产物分别用作探针 II 和 III。

**2.3.2 Southern 杂交:**用探针 I、II、III 分别对 CTC 菌株的总 DNA 作 Southern 杂交,图 3 为探针 II 和探针 III 的主要杂交图,以探针 II 作杂交时,其阳性片段包含了以探针 I 作杂交的阳性片段(未列照片),因此可用探针 II 替代探针 I,以提高杂交信号。所有杂交结果总结于表 2。

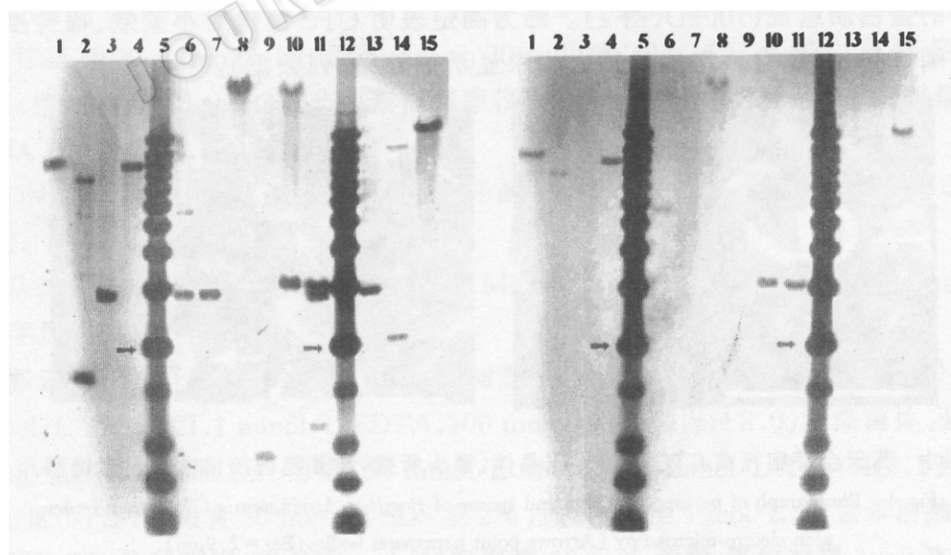


图3 苏云金芽胞杆菌 CTC 菌株总 DNA 酶切后的 Southern 杂交

Fig.3 Southern hybridization for the digested total DNA of *Bacillus thuringiensis* CTC left:probe II;Right:probe III  
1. *EcoRI*;2. *EcoRI/XbaI*;3. *XbaI*;4. *HpaII*;5. kb ladder (from top to bottom, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.5, 1, 0.75, and 0.5 kb; arrows point 2.0 kb bands.);6. *HpaII/XbaI*;7. *XbaI/KpnI*;8. *KpnI*;9. *SpeI/XbaI*;10. *SpeI*;11. *ClaI*;12. kb ladder;13. *XbaI*;14. *XbaI/NheI*;15. *NheI*.

中心(NCBI)因特网信息查询,该蛋白质 N-末端氨基酸序列与炭疽芽胞杆菌<sup>[12,13]</sup>和地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)<sup>[14]</sup>的细胞表面 S-层蛋白具有 92%~93%的同源性。现已从这两个种中发现三个 S-层蛋白基因,其产物分别由 814、862 和 874 个氨基酸残基组成,它们在 N-末端均有由 29 个氨基酸残基组成的信号肽序列。本文测定的序列正好对应于这三个 S-层蛋白 N-末端第 30~44 个氨基酸的序列。

## 2.3 基因克隆

**2.3.1 探针的设计:**根据上述蛋白质 N-末端序列及炭疽芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌的 S-层蛋白基因的核苷酸序列,设计出探针 I (寡核苷酸 46);根据 S-层蛋白基因序列的

表 2 苏云金芽胞杆菌 *ctc* 基因的 Southern 杂交片段(kb) \*

Table 2 Restriction fragments (kb) concerning <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>ctc</i> gene detected by Southern hybridization			
Restriction fragments	Probe I	Probe II	Probe III
<i>Eco</i> RI	-	9.6	9.6
<i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I	-	1.6,8.0	8.0
<i>Xba</i> I	2.9	2.9	NS
<i>Hpa</i> II	9.0	9.0	9.0
<i>Hpa</i> II/ <i>Xba</i> I	-	2.9,5.7	5.7
<i>Xba</i> I/ <i>Kpn</i> I	-	2.9	NS
<i>Kpn</i> I	-	>23	>23
<i>Spe</i> I/ <i>Xba</i> I	-	0.9	2.2
<i>Spe</i> I	-	3.2	3.2
<i>Cla</i> I	1.2	1.2,(2.9),3.1	3.1
<i>Xba</i> I/ <i>Nhe</i> I	2.1	2.1,(3.6),10.1	10.1
<i>Nhe</i> I	12.2	12.2	12.2
<i>Cla</i> I/ <i>Hpa</i> II	1.2	-	-
<i>Eco</i> RI/ <i>Hpa</i> II	-	7.3	-
<i>Nhe</i> I/ <i>Spe</i> I	-	3.2,(8.0)	-

\* Those in parentheses probably resulted from partial digestion; - :not detected;NS:no signal.

根据上述杂交结果可制做该晶体蛋白基因(*ctc* 基因)所在位置的限制性酶切图谱(图 4),即该基因位于 9.6kb *Eco*RI 片段、9.0kb *Hpa* II 片段和 12.2kb *Nhe*I 片段内,而且其 5'末端和 3'末端分别位于 2.9kb *Xba*I 片段内和 3.1kb *Cla*I 片段内,二者之间有 0.6kb 重叠。

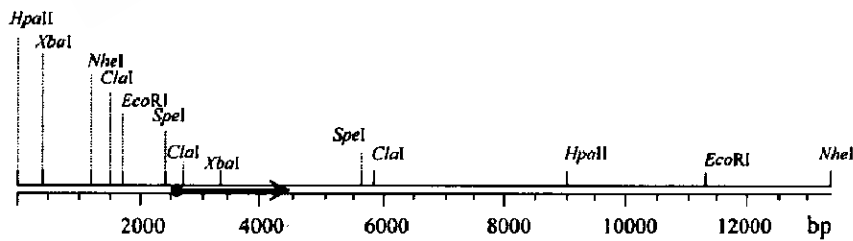


图 4 苏云金芽胞杆菌 CTC 菌株伴胞晶体蛋白基因 *ctc* 所在位置的限制性酶切图谱

Fig.4 Restriction location of the parasporal body protein gene *ctc* in *Bacillus thuringiensis* CTC strain  
Arrow shows the start point and direction of the potential *ctc* gene.

2.3.3 基因克隆:将该 *ctc* 基因 5'末端所在的 2.9kb *Xba*I 片段和 3'末端所在的 3.1kb *Cla*I 片段分别克隆于 pIJ2925 的 *Xba*I 位点和 *Acc*I 位点,分别通过探针 II 和探针 III 作筛选,得到重组质粒 pBMB-X281 pBMB-C42。将 pBMB-X281 中 1.6kb *Eco*RI-*Xba*I 片段、pBMB-C42 中 2.5kb *Xba*I-*Cla*I 片段和 *Eco*RI/*Acc*I 双酶切的 pIJ2925 载体连接,得到

重组质粒 pBMB982,即含有完整 *ctc* 基因的重组质粒。当该晶体蛋白基因 *ctc* 存在于大肠杆菌 [*E. coli* (pBMB982)] 时,宿主细胞的生长受到抑制,且有溶菌现象(未列数据),该生长现象与表达 S-层蛋白基因的大肠杆菌的生长现象相似<sup>[15]</sup>。在试图克隆完整 *ctc* 基因所在的 9.6kb *Eco*RI 片段和 9.0kb *Hpa*II 片段时,多次努力均未能成功,这可能与此生

### 3 讨论

本研究表明苏云金芽胞杆菌 CTC 菌株的伴胞晶体仅由与炭疽芽胞杆菌 S-层蛋白相似的细胞结构蛋白质组成,由于 S-层蛋白是与芽胞形成无关的结构蛋白,因此 CTC 菌株的伴胞晶体与传统苏云金芽胞杆菌的伴胞晶体明显不同,显示该菌株伴胞晶体的特殊性。后续研究表明组成 CTC 菌株的伴胞晶体蛋白与 S-层蛋白具 82%~83% 氨基酸序列同源性,且 *ctc* 基因在苏云金芽胞杆菌无晶体突变株中可表达,并可形成伴胞晶体。S-层蛋白广泛存在于古细菌和真细菌的细胞壁外层,可形成晶格栏栅状细胞结构。由于 S-层蛋白可自发组装成晶格结构<sup>[6]</sup>,因此 CTC 菌株的伴胞晶体有可能是 S-层蛋白表达过量而形成的内含体。如果该假设正确的话,那么 CTC 菌株就不应归类为苏云金芽胞杆菌。然而按现行分类标准及权威单位鉴定,CTC 菌株确为苏云金芽胞杆菌。对这一矛盾的现象还待进一步研究。对于 CTC 菌株能否形成 S-层还有待进一步检测。

### 参 考 文 献

- [1] Sneath P H A. Endospore-forming gram-positive rods and cocci (section 13). In: Sneath P H A, Mair N S, Shapre M E, et al. *Bergey's manual of systematic determinative bacteriology* (vol 2). Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. 1104~1207.
- [2] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, et al. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 807~813.
- [3] Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, et al. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 775~806.
- [4] Lecadet M M, Frachon E, Dumanoir V C, et al. *J Appl Microbiol*, 1999, **86**: 660~672.
- [5] Helgason E, Okstad O A, Caugant D A, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 2627~2630.
- [6] Sleytr U B, Messner P, Pum D, et al. *Angew Chem Int Ed*, 1999, **38**: 1034~1054.
- [7] Sara M, Sleytr U B. *J Bacteriol*, 2000, **182**(4): 859~868.
- [8] 孙 明, 朱晨光, 刘子铎, 等. 中国学术期刊文摘, 2000, **6**(2): 215~216.
- [9] Thomas W E, Ellar D J. *J Cell Sci*, 1983, **60**: 181~197.
- [10] 孙 明, 喻子牛. 微生物学报, 1996, **36**(4): 303~306.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T 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.
- [12] Etienne-Toumelin I, Sirard J-C, Duflot E, et al. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 614~620.
- [13] Mesnage S, Tosi-Couture E, Mock M, et al. *Mol Microbiol*, 1997, **23**: 1147~1155.
- [14] Zhu X, Mc Veigh R R, Malathi P, et al. *Gene*, 1996, **173**: 189~194.
- [15] Kuen B, Sara M, Lubitz W. *Mol Microbiol*, 1995, **19**(3): 495~503.

## CLONING OF PARASPORAL BODY PROTEIN GENE RESEMBLING TO S-LAYER PROTEIN GENES FROM *BACILLU* *THURINGIENSIS* CTC STRAIN\*

Sun Ming Zhu Chenguang Yu Ziniu

(College of Life Science and Technology, Key Laboratory of Agricultural Microbiology of Ministry of  
Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** *Bacillus* CTC strain was identified as *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus* (serotype H2) and Pasteur Institute confirmed this identification. The parasporal body formed by CTC strain is oval shaped, and consists of 100kD protein. The determination of the N-terminal amino acid sequence showed this protein shares 93% similarity to that of *B. anthracis* S-layer proteins. The restriction map covering the related protein gene (*ctc*) was deduced according to southern hybridization. The DNA fragments containing the 5' and 3' end of *ctc* gene with 0.6kb overlap were isolated, respectively. Full length *ctc* gene was then constructed. *B. thuringiensis* is a specie similar to *B. cereus* and *B. anthracis*, and only can be distinguished by forming parasporal bodies. The growth of *E. coli* maintaining *ctc* gene is similar to that of *E. coli* expressing S-layer protein gene. The above preliminary results showed that the parasporal body protein in CTC strain is a cell surface-like protein. So identifying CTC strain as a specie of *B. thuringiensis* and the unique criterion for the identification of *B. thuringiensis* by forming parasporal body should be reconsidered.

**Key words:** S-layer protein, *Bacillus thuringiensis*, Parasporal body, *Bacillus cereus* group, Gene cloning

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39870036 and 30080013)

### 《微生物学报》检索报告

中国科学技术信息研究所信息研究中心 2000 年 11 月查询结果如下:本刊总被引频次:401;影响因子:0.381;即年指标:0.139;自引总引比:0.1;地区分布数:20;基金和资助论文比例:0.72;海外作者论文数:7;指标综合加权评分:48.79。

被国际六大检索系统中“CA”,“苏联文摘杂志”等收录。