

Bt 毒素蛋白基因的 PCR 鉴定及定位*

钟肖芬 袁美姝 张 萍 邓日强** 龙繁新 庞 义 王珣章

(中山大学生物防治国家重点实验室/昆虫学研究所 广州 510275)

摘 要:利用合成的 *cryI*、*cryIII* 和 *cryV* 基因专一性引物,检测了从土壤中分离到的 56 株苏云金芽孢杆菌菌株所含的晶体毒素蛋白基因。含有 *cryI* 基因的有 7 株,含有 *cryIII* 基因的有 2 株,同时含有 *cryI* 和 *cryV* 基因的有 21 株。斑点杂交及 Southern 杂交分析表明,*cryV* 基因定位于 150MD 的大质粒上。

关键词: Bt 毒素基因, 鉴定

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0293-05

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一种重要的微生物杀虫剂。由于它杀虫效果好, 对人畜和植物等非目标生物十分安全, 而且不造成环境污染, 所以成为目前世界上产量最大的微生物杀虫剂。

1983 年 Krieg 等人从拟步甲亚种菌株 B₁₂-56-82 中分离出对鞘翅目昆虫有毒性的 Bt 菌株^[1], 自此对鞘翅目有杀虫活性的 Bt 菌株及其晶体蛋白基因, 引起了人们的研究兴趣。到目前为止, 已发现的对鞘翅目有毒性的 *cry* 基因主要包括三类, *cryIB*, *cryIII* 与 *cryV*。*CryV* 蛋白除对鞘翅目昆虫有活性外^[2], 还对某些已经对 Bt 制剂产生高抗性或对 Bt 制剂不敏感的鳞翅目害虫具有高毒力, 暗示着 *cryV* 基因具有较大的应用潜力。

本文应用 PCR 方法对从土壤中新分离的 56 株 Bt 菌株的杀虫晶体蛋白基因类型进行鉴定, 并对含有 *cryV* 基因的 21 个 Bt 株菌进行基因定位研究。

1 材料和方法

1.1 菌株和标准抗血清

Bt 菌株均为从德国土壤分离到的新分离株, 共 56 株。对照菌株 Bt HD-1 来自商品制剂。27 种标准抗血清为本实验室保存。

1.2 培养基和试剂

LB 液体、固体培养基, TES 和 Southern 杂交液的配方参照 Sambrook^[3] 的方法。

1.3 酶和试剂盒

Taq 高保真酶为 Perkin Elmer 公司产品; 溶菌酶为 Serva 公司产品; 用于 PCR 克隆的 pGEM-T vector system 购自 Promega 公司; 用于杂交的地高辛 DNA 标记检测试剂盒 (DIG

* 广东省自然科学基金资助(970196); 广东省自然科学基金研究团队项目资助

** 通讯联系人

作者简介: 钟肖芬, (1973-), 女, 广东省三水人, 中山大学生物防治国家重点实验室, 98 级博士生, 主要从事分子生物学研究。

收稿日期: 2000-03-30, 修回日期: 2000-08-14

DNA Labeling and Detection Kit)购自 Pharmacia 公司;质粒快速纯化试剂盒(High Pure Plasmid Isolation Kit)购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.4 鞭毛血清型的鉴定

将 Bt 单菌落接种于 LB 半固体培养基上培养 15 ~ 20h,取边缘生长旺盛的菌体活化 2 ~ 3 代,转接到 LB 液体培养基上振荡培养 5h,离心收集菌体,用生理盐水稀释菌体浓度到 $10^6 \sim 10^9$ 细胞/mL,加入甲醛使终浓度为 0.5%,此液即为抗原母液,贮存于冰箱备用。抗原抗体凝集反应按参考文献[4]方法进行。

1.5 质粒 DNA 的提取

Bt 质粒的提取方法按 Kalman^[5]的方法进行,略作修改。

1.6 斑点杂交分析以及 Southern 杂交分析

按 Boehringer Mannheim 公司地地高辛 DNA 标记检测试剂盒的说明进行操作。

2 结果和讨论

2.1 56 株新分离 Bt 菌株鞭毛(H)血清型的鉴定

56 株新分离 Bt 菌株的鞭毛血清型经初步鉴定结果如表 1。同时含有 *cryI* 和 *cryV* 基因的 21 株菌株的鞭毛血清型除 S1-4 属 H14 外,其余都属于 H3ab。因为所用于检测的鞭毛标准抗血清只有 27 种,所以 S18-6 和 S8-4 没有确定鞭毛的血清型。

表 1 56 株新分离 Bt 菌株的鞭毛血清型

Table 1 Flagellum serotypes of the 56 *Bacillus thuringiensis* isolates

Strain	Flagellum serotype	Strain	Flagellum serotype	Strain	Flagellum serotype	Strain	Flagellum serotype
S1-1	H3ab	S2-1	H3ab	S8-1	H3ab	S11-1	H3ab
S1-4	H14	S7-1	H3ab	S8-3	H3ab	S11-3	H3ab
S1-5	H3ab	S7-6	H3ab	S8-4	不确定	S11-4	H3ab
S3-2	H3ab	S7-8	H3ab	S8-7	H3ab	S11-6	H3ab
S10-1	H3ab	S10-1	H3ab	S12-1	H3ab	S12-2	H3ab
S18-4	H3ab	S1-8	H3ab	S3-3	H3ab	S2-3	H3ab
S3-1	H3ab	S7-2	H3ab	S11-2	H3ab	S11-5	H3ab
S18-6	不确定	S18-7	H5a5c	S11-7	H21	S21-2	h8ac
S8-5	H12	S3-r	H4a4b	S2-E	H8a8b	S21-K	H8ac
S12-5	H21	S10-m	H3a3c	S10-n	H8a8b	S10-q	H3a3b
S10-4	H3a3b	S21-26	H21	S21-13	H5a5c	S21-1	H8ab
S10-3	H11a11b	S14-2	H3ab	S14-3	H3ab	S12-3	H21
S4-1	H3ab	S4-2	H3ab	S4-3	H3ab	S10-7	H14
S8-8	H3ab	S12-4	H3ab	S13-1	H3ab	S13-3	H3ab

2.2 新分离菌株 cry 基因类型的鉴定

cryI 和 *cryIII* 专一性引物的设计按参考文献[6]进行。*cryV* 引物的设计则根据 Tailor 等人^[2]报道的 *cryV* 基因的序列,利用 DNASIS 软件设计出 *cryV* 专一性引物,以扩增 *cryV* 基因 5'端 726bp 片段。设计的引物及其预期扩增到的产物的大小详见表 2。

表 2 *cryI*、*cryIII*、*cryV* 基因专一性引物

Table 2 *cryI*、*cryIII*、and *cryV* specific primers

Genes	Upstream Primers	Downstream primers	Expected product length/bp
<i>cryI</i>	5'-TGTAGAAGAGGGAAGTCTATCCA-3'	5'-TATCGGTTTCTGGAAGTA-3'	272 ~ 290
<i>cryIII</i>	5'-TTAACCGTTTTTCGCAGAGA-3'	5'-TCCGCACITCTATGTGTCCAAG-3'	652 ~ 733
<i>cryV</i>	5'-ATGAAACTAAAGAATCAAGA-3'	5'-ACCTGTGCTATACAATTTCA-3'	726

以 56 株 Bt 土壤分离株煮沸裂解上清液为 PCR 模板,进行 PCR 扩增。为防止出现假阳性、假阴性结果,每个 PCR 反应均重复三次以上并设相应对照。*cryI*、*cryIII* 以及 *cryV* 专一性引物的 PCR 扩增产物(图 1、图 2 和图 3)均是一条特异性的扩增带,其大小与预期的相符。56 个新分离菌株中,7 个菌株(S1-8,S2-1,S2-3,S3-1,S7-2,S11-2,S11-5)含有 *cryI* 基因;21 个菌株(S1-1,S1-4,S1-5,S3-2,S3-3,S7-1,S7-6,S7-8,S8-1,S8-3,S8-4,S8-7,S11-1,S11-3,S11-4,S11-6,S10-t,S10-1,S18-4,S12-1,S12-2)同时含有 *cryI* 和 *cryV* 基因;2 个(S18-6,S18-7)含有 *cryIII* 基因。

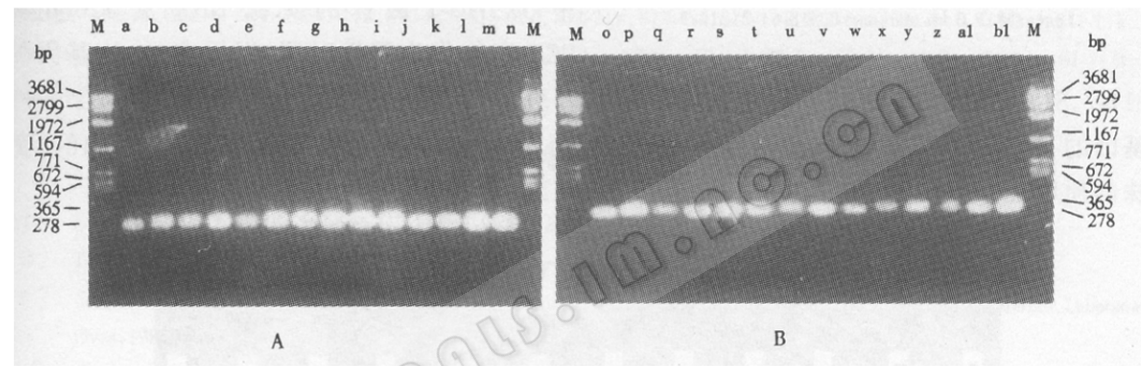


图 1 Bt 新分离菌株 *cryI* 基因的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR products amplified from 28 Bt strains with *cryI*-specific primers

A. Lanes: M, 3.6 kb marker; a, S1-1; b, S1-4; c, S1-5; d, S3-2; e, S3-3; f, S7-1; g, S7-6; h, S7-8; i, S8-1; j, S8-3; k, S8-4; l, S8-7; m, S11-1; n, S11-3. B. Lanes: M, 3.6 kb marker; o, S11-4; p, S11-6; q, S10-t; r, S10-1; s, S12-1; t, S12-2; u, S18-4; v, S1-8; w, S2-1; x, S3-1; y, S3-1; z, S7-2; a1, S11-2; b1, S11-5.

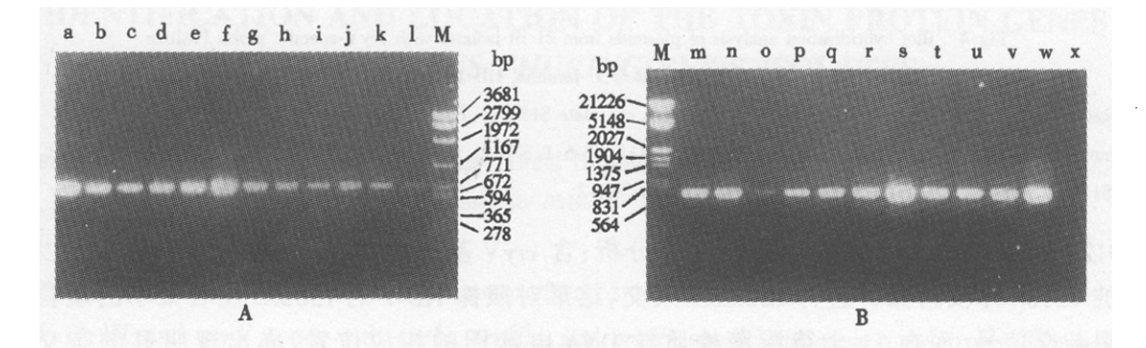


图 2 Bt 新分离菌株 *cryV* 基因的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR products amplified from 21 Bt strains with *cryV*-specific primers

A. Lanes: M, 3.6 kb marker; a, HD-1; b, S1-1; c, S1-4; d, S1-5; e, S3-2; f, S3-3; g, S7-1; h, S7-6; i, S7-8; j, S8-1; k, S8-3; l, S8-4. B. Lanes: M, λ DNA/*HindIII* + *EcoRI*; m, HD-1; n, S8-7; o, S11-1; p, S11-3; q, S11-4; r, S11-6; s, S10-5; t, S10-1; u, S12-1; v, S12-2; w, S18-4; x, Negative control.

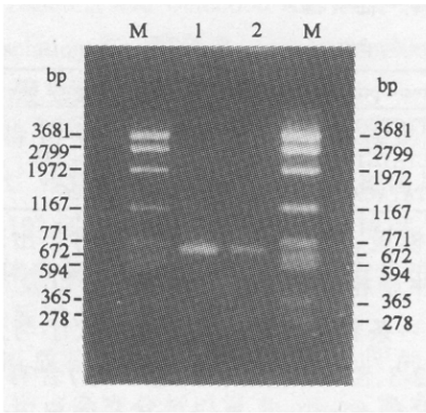


图3 Bt 新分离菌株 *cryIII* 基因的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR products amplified from 2 Bt strains with *cryIII*-specific primers
Lanes: M, 3.6 kb marker; 1, S18-6; 2, S18-7.

本文所检测的 56 个新分离菌株中,凡是含有 *cryV* 基因的菌株也同时含有 *cryI* 基因,进一步证明 *cryV* 基因与 *cryI* 基因是相串联的^[7]。

2.3 *cryV* 基因在质粒上的定位

2.3.1 斑点杂交结果:以含 *cryV* 基因的 *kurstaki* 亚种 HD-1^[7] 的质粒 DNA 为模板,用 *cryV* 专一性引物扩增出其 5'端 726bp 的片段并克隆进载体质粒 pGEM-T。经序列测定证明正确后,回收该 726bp 片段,标记后做为探针,用于含 *cryV* 基因的质粒 DNA 的斑点杂交以及 Southern 杂交分析。在斑点杂交实验中,以 HD-1 菌株的质粒 DNA 及 726bp 的 PCR 产物作为阳性对照,以不含 *cryV* 基因的

S11-7、S18-6 及 S18-7 菌株的质粒为阴性对照。斑点杂交结果显示,所检测的 21 个含 *cryV* 基因的 Bt 新分离菌株的质粒都为阳性信号,而不含 *cryV* 基因的 S11-7、S18-6 及 S18-7 菌株的质粒无阳性信号,表明 *cryV* 基因存在于菌细胞的质粒上(图 4)。

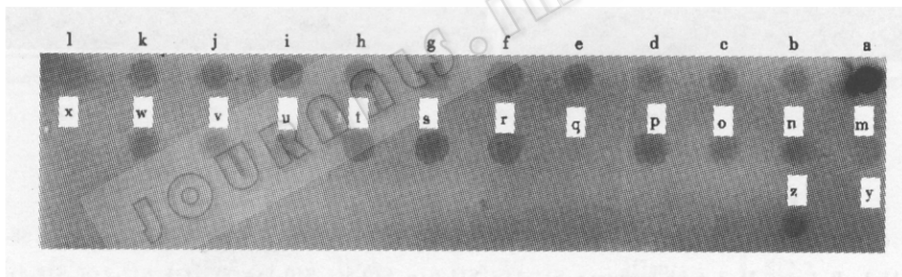


图4 21 株 Bt 新分离株质粒 DNA 的斑点杂交分析

Fig.4 Blot hybridization analysis of plasmids from 21 Bt isolates with *cryV*-specific probe Positive control: a, PCR product of the 726bp fragment of 5'-terminal HD-1 *cryV* gene; z, Plasmid DNA of HD-1. Negative control: q, Plasmids of isolate S11-7; x, Plasmids of isolate S18-6; y, Plasmids of isolate S18-7. Samples: b, S1-1; c, S1-4; d, S1-5; e, S3-2; f, S3-3; g, S7-1; h, S7-6; i, S7-8; j, S8-1; k, S8-3; l, S8-4; m, S8-7; n, S11-1; o, S11-3; p, S11-4; r, S11-6; s, S10-1; t, S10-1; u, S18-4; v, S12-1; w, S12-2.

2.3.2 定位 *cryV* 基因的 Southern 杂交分析:含 *cryV* 基因的 21 株新分离菌株的质粒以标记的 726bp 片段为探针进行 Southern 杂交,结果对照株 HD-1 的 150MD 左右大小的质粒带出现杂交信号,而在 21 个待测菌株质粒 DNA 电泳图的相应位置,亦出现明显的杂交带(图 5)。因为在 HD-1 菌株中, *cryI* 基因与 *cryV* 基因串联在一起^[7],故可确定这一 21 株菌株的 *cryV* 基因定位在分子量约为 150MD 的大质粒上。

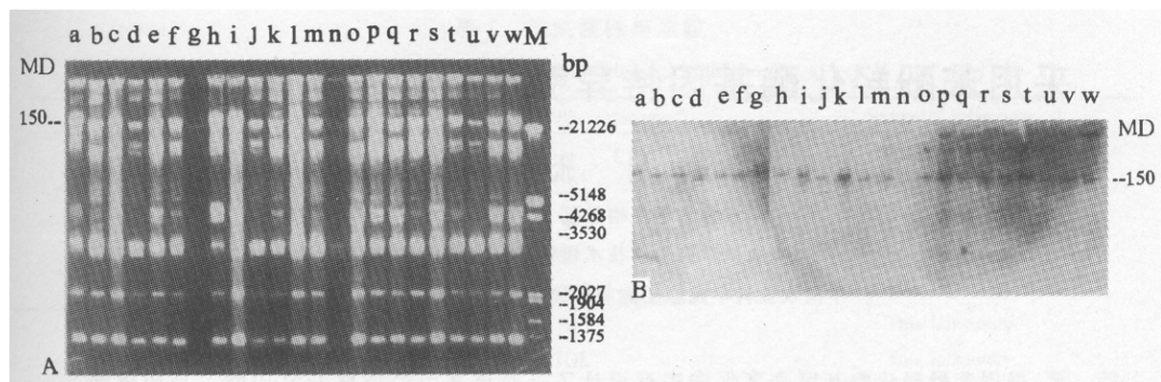


图 5 *cryV* 基因的 Southern 杂交分析

Fig.5 Southern hybridization analysis of plasmid DNAs from the *cryV* gene containing Bt isolates

A. Plasmid DNAs from the 21 isolates containing *cryV* gene.

B. Southern analysis of plasmid DNAs probed with a labelled *cryV*-specific fragment which is a 726bp PCR product amplified from HD-1. Lanes: a, Positive control: HD-1; b, S10-1; c, S18-4; d, S12-2; e, S12-1; f, S10-1; g, S11-6; h, S11-4; i, S11-3; j, S11-1; k, S8-7; l, S8-4; m, S8-3; n, Negative control: S11-7; o, S8-1; p, S7-8; q, S7-6; r, S7-1; s, S3-3; t, S3-2; u, S1-5; v, S1-4; w, S1-1; M, ADNA/HindIII.

参 考 文 献

- [1] Krieg A, Huger A M, Langenbruch G A, et al. *Z Ang Entomol*, 1983, **96**: 500 ~ 508.
- [2] Tailor R, Tippett J, Gibb G, et al. *Molecular Microbiology*, 1992, **6**: 1211 ~ 1217.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] Krywienczyk J, Dulmage H T, Fast P G. *J Invert Pathol*, 1989, **31**: 372 ~ 375.
- [5] Sue K, Fristine L K, John L L, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **56**(9): 1131 ~ 1172.
- [6] Ceron J, Ortiz A, Quintero R, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 3826 ~ 3831.
- [7] Byung-Sik Shin, Seung-Hwan Park, Soo-keun Chol, et al. *Environ Microbiol*, 1995, **61**: 2402 ~ 2407.

IDENTIFICATION AND LOCATION OF THE TOXIN PROTEIN GENES IN 56 *BACILLUS THURINGIENSIS* ISOLATES

Zhong Xiaofen Yuan Meijin Zhang Ping Deng Riqiang Long Qingxin Pang Yi Wang Xunzhang
(Institute of Entomology and State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Polymerase chain reaction was performed to screen *Bacillus thuringiensis* isolates for *cryI*, *cryIII*, and *cryV* genes with *cryI*-, *cryIII*-, and *cryV*- specific primers respectively. The results indicated that, in the 56 Bt isolates examined, 7 isolates contain *cryI* gene, 2 isolates contain *cryIII* gene, and 21 isolates contain both *cryI* and *cryV* genes. The *cryV* gene was located by Southern hybridization in the large plasmid of about 150MD molecular mass.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Toxin protein genes, Identification