

苏云金芽胞杆菌拟步行甲亚种质粒复制子 *ori165* 的克隆*

魏 芳 孙 明 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:以苏云金芽胞杆菌拟步行甲亚种菌株(*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*) YBT-1765 作为出发菌株,克隆了一个包含复制子的 *EcoRI* 酶切片段,大小约为 11kb,称为 *ori165*。这是国内外从此亚种中克隆到的第一个复制子。缩小到 8kb 左右后仍然能够复制。杂交结果显示,此复制子来源于菌株 YBT-1765 可以检测到的分子量最大的质粒。以此复制子构建的穿梭载体 pBMB6071 在不同受体菌中的稳定性差异很大,其中在以色列亚种无晶体突变株 4Q7 中,传 40 后代,稳定性 100%。质粒 pBMB6071 与含 *ori1030* 和 *ori2062* 在库斯塔克亚种无晶体突变株 BMB171 中是相容的。

关键词: 苏云金芽胞杆菌拟步行甲亚种, 质粒复制子, 质粒稳定性, 质粒相容性

中图分类号: Q343.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 01-0045-05

革兰氏阳性细菌苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)能够在胞内产生具有杀虫性的伴胞晶体。它含有丰富多样的质粒,不同亚种乃至同一亚种不同菌株中所包含的质粒数目、大小,拷贝数有很大的差异。现已证明绝大多数编码杀虫晶体蛋白的 *cry* 基因都位于质粒上,并且多分布在大于 30MD 的质粒上^[1,2]。根据质粒的大小将质粒分为两类:大质粒多数都遵循 θ 复制模式,拷贝数较低,依靠复制子内部分离稳定功能稳定遗传;大多数小质粒(< 15kb)则是滚环复制,稳定性主要依靠质粒的高拷贝^[2]。到目前为止,已从苏云金芽胞杆菌中克隆到了 12 个质粒复制子,它们大部分来自于库斯塔克亚种(*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*)^[1,3,4,5],部分来自苏云金亚种(*B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*)^[6,7]和以色列亚种(*B. thuringiensis* subsp. *isrealensis*)^[8]。目前还没有拟步行甲亚种质粒复制子的报道。从 Baum^[2]和 Wilcks^[9]的杂交结果得知,从库斯塔克亚种克隆的复制子与拟步行甲亚种及以色列亚种等菌株的质粒没有同源性。本室分离的拟步行甲亚种菌株 YBT-1765 可以检测到三个质粒,其中两个质粒均大于 23kb,本文以 YBT-1765 作为出发菌株克隆复制子,从而进行研究。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

本实验所用的菌株和质粒见表 1。

* 本文得到国家 863 计划课题、原国家教委出国留学基金、教育部博士点基金、武汉市晨光计划(9650001037-22)资助

作者简介:魏 芳(1977-),女,硕士,主要从事苏云金芽胞杆菌分子生物学研究工作,现在中国医学科学院肿瘤医院研究所分子肿瘤国家重点实验室攻读博士学位。

收稿日期:2000-12-29,修回日期:2001-05-28

表 1 本研究所用及构建的菌株和质粒质粒
Table 1 Strains and plasmids used or constructed in this study

Strains and Plasmids	Properties	Source
<i>Bacillus thuringiensis</i>		
YBT-1765	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> , H _{3ab}	stored in this lab
BMB171	Plasmidless, derivative of <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>hurstaki</i> strain 1463, H _{3abc}	stored in this lab ^[10]
4Q7	Plasmidless, derivative of <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> , H ₁₄	Provided by Dr. Wu Dong
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU</i> ₁₆₉ (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>has R17 recA1 end A1 gyr A</i> ₉₆ <i>thi</i> ⁻¹ <i>relA1</i>	stored in this lab
Recombinant strains		
BMB606-171	BMB171 (pBMB606)	This work
BMB6071-171	BMB171 (pBMB6071)	This work
BMB6071-4Q7	4Q7 (pBMB6071)	This work
BMB78-171	BMB171 (pBMB608 and pBMB6071)	This work
BMB74-171	BMB171 (pBMB6071 and pBK304)	This work
Plasmids		
pDG1726	3.9kb, ori/ <i>E. coli</i> , Ap ^r , Sp ^r ,	Provided by BGSC ^[11]
pDG780	4.4kb, ori/ <i>E. coli</i> , Ap ^r , Km ^r	Provided by BGSC ^[11]
pBMB606	~ 14.1kb, pDG1726 + <i>Eco</i> RI fragment containing plasmid ori165 from strain YBT-1765	This work
pBMB607	~ 12.9kb, pUC19 + <i>Eco</i> RI fragment containing plasmid ori165 from strain YBT-1765	This work
pBMB6071	~ 12kb, pDG780 + <i>Sau</i> 3AI partial digested insertion fragment in pBMB606	This work
pBMB608	6.0kb, containing ori2062 of <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>hurstaki</i> strain YBT-1520	Stored in this lab ^[12]
pBK304	Equal to pBMB-BK-304, 10.6kb, <i>cry1Ac</i> 10 + pHT304	Stored in this lab ^[13]

1.2 培养基

菌株的培养采用 LB 培养基。*E. coli* 在 37℃ 培养, 苏云金芽胞杆菌在 28℃ 培养。抗生素的终浓度分别为: 氨苄青霉素, 100 μ g/mL; 壮观霉素, 100 μ g/mL; 卡那霉素, 20 μ g/mL。

1.3 Southern 杂交

采用 Boehringer Mannheim 的 DIG 试剂盒标记探针和杂交检测。

1.4 质粒的稳定性检测

参照 Sanchis 等^[14]方法, 将待测菌株接种到添加了抗生素的 LB 培养液过夜培养, 培

养物每 8h 按 1/1000 接种量转接至新鲜无抗生素 LB 液体培养基,同时梯度稀释涂布 LB 琼脂平板,转接 3 次(即达到传 40 代以上)。30℃ 培养至长出单菌落,点种抗性及无抗性 LB 平板。

1.5 质粒的相容性检测

将携带有不同抗性基因的两个质粒转入到一个受体菌细胞中,抽提质粒验证后重组菌株接种到同时添加了两种抗生素 LB 培养液,以 1.4 节方法检测两种质粒在无抗性选择压力下的稳定性。

2 结果和讨论

2.1 复制子 ori165 的克隆

对菌株 YBT-1765 质粒抽提物做 *EcoRI* 酶切,回收每一条带,按 DNA 的大小从大至小编号,分别与载体 pDG1726 连接后,转化大肠杆菌 DH5 α 。混菌抽提质粒电转化 BMB171,以壮观霉素作为筛选标记,得到一个转化子。抽提转化子质粒,重组质粒命名为 pBMB606,其上所包含的外源 DNA 区段 ori165 大小约为 11kb,转入库斯塔克亚种菌株 BMB171 中得到的重组菌株则称为 BMB606-171。

利用 *EcoRI* 位点将完整的 ori165 插入载体 pUC19 后得到重组质粒 pBMB607,对其进行酶谱分析,质粒图如图 1。将含有 ori165 的 DNA 片段以 *EcoRI* 位点从 pBMB607 切下,回收后作 *Sau3AI* 部分酶切,控制时间使得酶切片段在 3~9kb 左右,酶切产物与复制子克隆载体 pDG70 经 *BamHI* 消化的片段相连接,转化大肠杆菌后混菌抽质粒,再电转化 BMB171,以卡那霉素作为筛选标记,得到转化子 BMB607-171,重组质粒 pBMB6071 上的外源片段大小为 8kb 左右的。

2.2 复制子 ori165 的定位

以 pBMB6071 的外源片段作探针,与 YBT-1765 质粒及其 *EcoRI* 酶切产物、pBMB607 的 *EcoRI* 酶切产物及其 *EcoRI/SacI* 双酶切产物作 Southern 杂交,杂交结果如图 2 所示。YBT-1765 质粒电泳图上与其相应的带为 YBT-1765 最大质粒带,即复制子 ori165 来自此菌株可检测到的分子量最大的质粒。

SacI 及 *KpnI* 酶切分析表明,上游 *EcoRI* 位点后 1kb 左右的 DNA 片段以及从 *SacI* 位点到复制子下游 *EcoRI* 位点之间的 DNA 片段去除后,ori165 仍然能够复制。

2.3 质粒 pBMB606 及 pBMB6071 的稳定性

菌株的 BMB606-171, BMB6071-171 稳定性检测结果见表 2。在 BMB171 中质粒 pBMB606 及 pBMB6071 稳定性不高。将 pBMB6071 转入以色列亚种无质粒受体菌 4Q7 中,得到重组菌株 BMB6071-4Q7。从表 2 看出 pBMB6071 在 4Q7 中传 40 代后,稳定性为 100%。

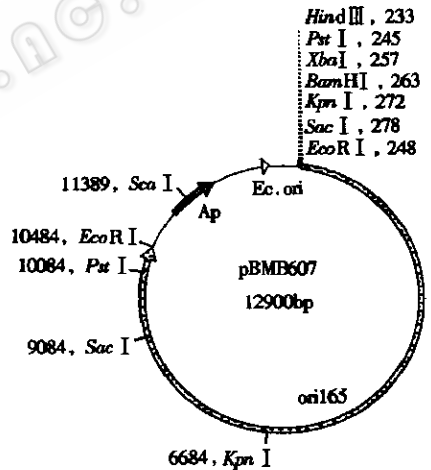


图 1 pBMB607 酶切图谱

Fig.1 The plasmid map of pBMB607

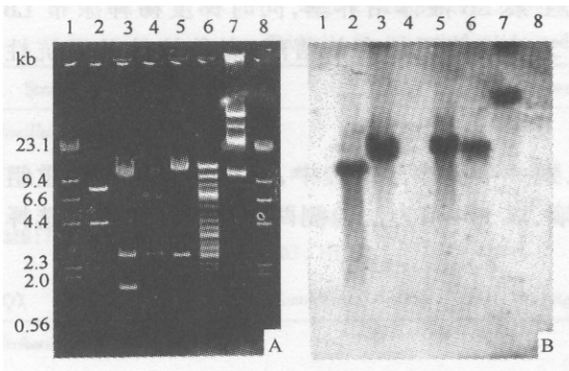


图2 ori165在菌株YBT1765内源质粒上的定位
Fig.2 The localization of ori165 in strain YBT-1765 native plasmids

A. Profile of agarose electrophoresis; B. Southern hybridization.

1. λ DNA/*Hind* III (top to bottom, 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, and 0.56kb, respectively); 2. pBMB6071/*Eco*RI + *Sac*I; 3. pBMB6071/*Eco*RI + *Sac*I; 4. pUC19/*Eco*RI; 5. pBMB6071/*Eco*RI; 6. plasmids of strain YBT-1765/*Eco*RI; 7. plasmids of strain YBT-1765; 8. λ DNA/*Hind* III.

表2 质粒 pBMB606 及 pBMB6071 的稳定性检测

Table2 The stability detected results of pBMB606 and pBMB6071

Strains	Plasmid lost/ %		
	8h	16h	24h
pBMB606-171	16.0	24.5	51.0
pBMB6071-171	50.5	61.5	76.0
BMB6071-4Q7	0	0	0

2.4 质粒 pBMB6071 的相容性

将质粒 pBMB6071 电转化到分别含有质粒 pBK304 及 pBMB608 的 BMB171 菌株中, 得到重组菌株 BMB74-171 及 BMB78-171, 做相容性检测。结果如图 3 所示, 从图中可以得出质粒 pBMB6071 分别与其他两个质粒共存于一个细胞中时, 各个质粒的稳定性没有降低。因此, 质粒 pBMB6071 与 pBK304 以及 pBMB608 是相容的。

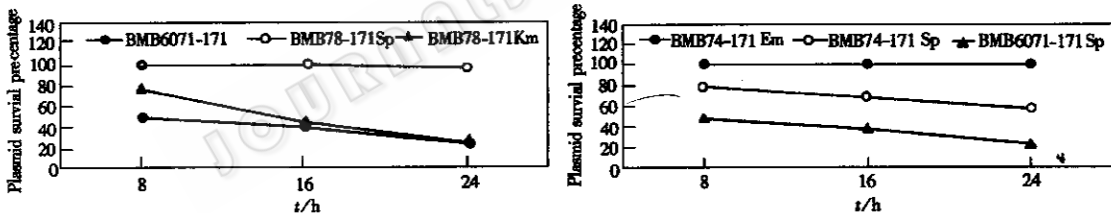


图3 质粒 pBMB6071 与 pBK304、pBMB608 在 BMB171 中相容性检测结果

Fig.3 The incompatibility detected results of pBMB6071 with pBK304 and pBMB608

3 讨论

质粒 pBMB6071 的稳定性较质粒 pBMB606 低。是否在去除的片段中有帮助质粒 pBMB606 在菌株 BMB171 中稳定的片段, 尚待进一步研究。同源性不高的质粒可能具有不同的复制调控系统和质粒分配系统。以来源于拟步行甲亚种同源性不高的内源质粒复制子构建的穿梭载体, 可以解决其与 pHT304 和其衍生质粒之间的不相容性问题, 从而为工程菌的构建提供载体。

参 考 文 献

[1] Baum J A, Coyle D M, Jany C S, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56:3420 ~ 3428.
[2] Baum J A, Gonzalez J M. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 96:143 ~ 148.
[3] Camel P H, Piot J C. *Gene*, 1992, 120:17 ~ 26.

- [4] Lereclus D, Arants O. *Mol Microbiol*, 1992, **6**(2):35 ~ 46.
- [5] Schnepf E, Crickmore E, Rie J N, et al. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(3):775 ~ 806.
- [6] Hoflaek L, Seurinck J, Mahillon J. *J Bacteriol*, 1997, **179**(16):5000 ~ 5008.
- [7] Mahillon J, Seurinck J. *Nucleic Acid Res*, 1988, **16**(24):11827 ~ 11828.
- [8] Boe L, Nielsen T, Madsen S M, et al. *Plasmid*, 1991, **25**:190 ~ 197.
- [9] Wilcks A. *J Bacteriol*, 1999, **181**(10):3193 ~ 3200.
- [10] 李 林, 喻子牛. 应用与环境生物学报, 1999, **5**(4):395 ~ 399.
- [11] Guerout-Fleury A M, Shazand K, Frandsen N, et al. *Gene*, 1995, **167**:333 ~ 336.
- [12] 孙 明, 魏 芳, 刘子铎, 等. 遗传学报, 2000, **27**(10):932 ~ 938.
- [13] 孙 明, 吴 岚, 刘子铎, 等. 农业生物技术学报, 2000, **8**(3):229 ~ 232.
- [14] Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(2):779 ~ 784.

The Cloning of Plasmid Replicon ori165 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*

Wei Fang Sun Ming Yu Ziniu

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

Abstract: An *Eco*RI DNA fragment containing the plasmid replicon, named ori165, was cloned from the plasmids of *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* strains YBT-1765. The replicon ori165 was the first replicon cloned from this subspecies. Its size is ~ 11kb. The replicon was minimized to an 8kb fragment by deletion analysis. Southern hybridization exhibited that ori165 was coming from the plasmid detected with the highest molecular weight. A shuttle vector pBMB6071 based on ori165 was constructed. The stabilities of pBMB6071 in different *B. thuringiensis* host had great discrepancy. In strain 4Q7, a crystal-negative derivative of *B. thuringiensis* subsp. *isrealensis*, the stability was 100%. ori165 was compatible with ori1030 and ori2062 in strain BMB171, a crystal-negative derivative of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Key words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, Plasmid replicon, Plasmid stability, Plasmid compatibility