

## 灭蚊球形芽孢杆菌 Ts-1 中大质粒 pNT-1 的分离和电子显微镜观察

高才昌 蔡宝立 张秀明

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

樊廷玉 崔同昌 宗茂坤 任改新

(南开大学生物学系, 天津)

由我国筛选的灭蚊球形芽孢杆菌 Ts-1 中分离到一种大分子质粒 pNT-1, 通过电子显微镜观察到环状 DNA 分子, 根据轮廓周长推算其分子量为  $114.13 \times 10^6$  道尔顿。本文还报道了球形芽孢杆菌中大质粒的分离纯化方法。

**关键词** 球形芽孢杆菌; 质粒

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 和苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是主要的二类蚊虫病原菌, 对于蚊虫的生物防治都具有实际应用价值<sup>[1,2]</sup>。近年来, 灭蚊球形芽孢杆菌和苏云金杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 BTI), H14 中质粒的研究已有报导。

González 等通过琼脂糖凝胶电泳检测, 发现 BTI 中含有 8 种质粒, 其中分子量为  $75 \times 10^6$  道尔顿的质粒与晶体毒素的产生有关<sup>[3]</sup>。

Abe 等对六株灭蚊球形芽孢杆菌进行了质粒检测, 其中 1593-4 和 1691 二株菌未检测到质粒, 而在 SSII-1 等四株菌中检测到 9 种质粒, 最大的质粒分子量为  $33.5 \times 10^6$  道尔顿, 最小的质粒分子量为  $2.0 \times 10^6$  道尔顿<sup>[4]</sup>。我们曾对 15 株球形芽孢杆菌进行了质粒的检测和凝胶电泳图谱的比较, 发现在对淡色库蚊有毒性的 1593、MR-4、SSII-1、Ts-1 和 1509 五株菌中均有一种分子量相近的大质粒, 而其它没有灭蚊作用的 10 株菌中均未检测到这种大

质粒<sup>[5]</sup>。

球形芽孢杆菌 Ts-1 是任改新等<sup>[6]</sup>从天津水塘中筛选得到的, 它对淡色库蚊的毒性与国外引进的 1593 相当。为了研究灭蚊球形芽孢杆菌中质粒与产毒素的关系, 本文选择 Ts-1 菌株, 采用我们修改的 NaOH-SDS 裂解菌体的方法进行质粒的分离纯化和电子显微镜观察, 研究了我们所检测到的大质粒的分子特性。

### 材料与方 法

#### (一) 菌株和培养条件

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) Ts-1, 南开大学生物学系提供。

液体培养基(%): 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, 氯化钠 0.5, 酵母膏 0.1, pH7.0。

菌体培养: 摇瓶在旋转摇床 (200r/min) 上, 30℃ 培养过夜 (14—16 小时)。

#### (二) 质粒 DNA 的分离和纯化

参照蔡宝立等<sup>[7]</sup>的方法。取  $A_{600} \approx 1.0$  的

本文于 1985 年 2 月 6 日收到。

本工作得到教育部和天津市科委的资助, 得到焦瑞身教授的指导, 一并致谢。

Ts-1 菌液 200ml, 将离心收集的菌体悬浮于 50 ml TE 缓冲液 (1mg 溶菌酶/ml, 50mM Tris-HCl, 20mM Na<sub>2</sub>EDTA pH8.0) 中, 4℃ 冰箱中放置 30 分钟, 然后加入 100ml 碱-SDS 裂解液 (0.2 N NaOH, 3% 十二烷基硫酸钠), 在室温或冰浴中反应 5—10 分钟, 至裂解液清亮为止, 立即加入 2M Tris-HCl (pH 7.0) 将裂解液的 pH 调至 9.0—9.5, 再加入地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 碱性蛋白酶溶液 (37℃ 预消化一小时, 该酶液由南开大学生物学系陈启明赠送) 至每毫升达到酶活力 200 单位。37℃ 保温 3 小时。加入 5M 氯化钠使终浓度达到 1M。置冰浴 1 小时后, 以 8000 r/min 离心 20 分钟。取上清液, 加入等体积冷无水乙醇, 于冰浴放置 1 小时, 再以 8000r/min 离心 20 分钟, 沉淀溶于 5ml TES 溶液 (50mM Tris-HCl, 5mM Na<sub>2</sub>EDTA, 50mM NaCl, pH8.0) 中, 用等体积氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提一次, 离心后取出水相即为质粒粗提液。

氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心参照文献[8]进行。用超速离心机 (RP55T 转头, Hitachi 55P-72), 15℃, 40,000 r/min 离心 40 小时。

### (三) 限制酶分析和琼脂糖凝胶电泳

限制性内切酶 *Eco* RI、*Egl* II 和  $\lambda$  DNA 均为中国科学院生物物理研究所生物化学试剂厂产品。*Kpn* I 为 BRL 产品。

限制酶消化的反应条件参考文献[9]。

琼脂糖凝胶电泳采用卧式电泳槽。质粒 DNA 的电泳检测用 0.7% 琼脂糖凝胶, 电压梯度 3—4V/cm, 电泳 4—5 小时。限制酶消化质粒产生的 DNA 片段的电泳分析采用 1% 琼脂糖凝胶, 电压梯度 0.8—1.3V/cm, 电泳 15—17 小时。电泳缓冲液为: 40mM Tris, 20mM 乙酸, 2mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH8.1。示踪染料为: 0.25% 溴甲酚紫, 50% 甘油, 50mM Tris-乙酸, pH8.0。电泳结束后, 凝胶放在 0.5μg/ml 溴化乙锭中染色, 在 254nm 紫外光下加红色滤光片照相。

### (四) 电子显微镜观察

经氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心纯化的质粒 DNA 在 4℃ 冰箱放置二周后, 采用水相展开法制片<sup>[10]</sup>。用 Philips EM-400ST 电子显微镜观察并照相, 用 JTS-86 图形数字转换仪描述质粒分子的轮廓周长, 并计算质粒的分子量。

## 结果与讨论

### (一) 质粒 DNA 的分离

球形芽孢杆菌中大质粒的分离纯化方法尚未见到报道。我们按文献[7]的方法分离 Ts-1 菌株的质粒没有得到理想的结果。按文献[5]的方法制备的 Ts-1 菌株的质粒 DNA 粗提液, 虽然能够通过凝胶电泳检查到质粒带, 但是经过氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心后只出现一条 DNA 带, 不能分离到纯的质粒 DNA。我们以文献[7]的方法为基础作了修改, 按修改的方法制备的 Ts-1 菌株的质粒 DNA 粗提液, 经琼脂糖凝胶电泳检查可见到 1 条清晰的质粒带 (图 1)。质粒粗提液经过氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心后出现闭环质粒 DNA 带 (图 2)。考虑到球形芽孢杆菌的

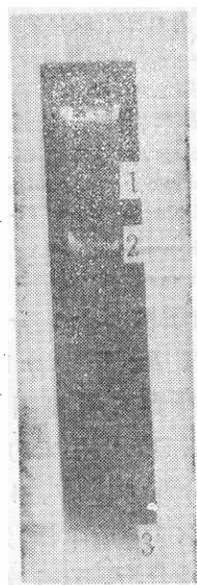


图 1 Ts-1 菌株质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

1. 质粒 DNA 带
2. 染色体片段 DNA
3. RNA

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA of strain Ts-1

1. Band of plasmid DNA
2. Fragments of chromosome DNA
3. RNA

细胞壁不易裂解,我们要分离的是大分子质粒,因此采用溶菌酶、氢氧化钠、SDS 处理使细胞充分裂解及染色体 DNA 断裂,然后用碱性蛋白酶消化,以除去裹绕在核酸中的蛋白质,便于大分子质粒的分离。

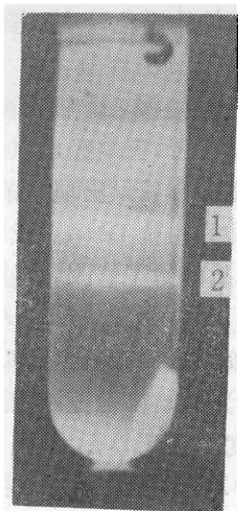


图2 Ts-1 菌株质粒 DNA 的氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心

1. 染色体 DNA
2. 质粒 DNA

Fig. 2 Photograph of CsCl-EtBr density gradient centrifugation of plasmid DNA of strain Ts-1

1. Chromosome DNA
2. Plasmid DNA

Ts-1 菌株的质粒 DNA 分别用限制性内切酶 *Eco*RI、*Bgl*II、*Kpn*I 消化,经琼脂糖凝胶电泳得到的限制图谱见图3。以 *Eco*RI 消化  $\lambda$  DNA 生成的六个 DNA 片段的分子量(分别为 13.7、4.74、3.78、3.48、3.02、 $2.13 \times 10^6$  道尔顿)为参照,根据凝胶电泳的谱带分析,Ts-1 菌株的质粒经 *Eco*RI 消化后至少可见到 24 个片段,*Bgl*II 消化后可见到 15 个片段,*Kpn*I 消化后可见到 13 个片段。

根据质粒粗提液的凝胶电泳只出现一条质粒带,氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心出现闭环质粒 DNA 带,限制性内切酶消化质粒后出现清晰的电泳谱带,可以证明

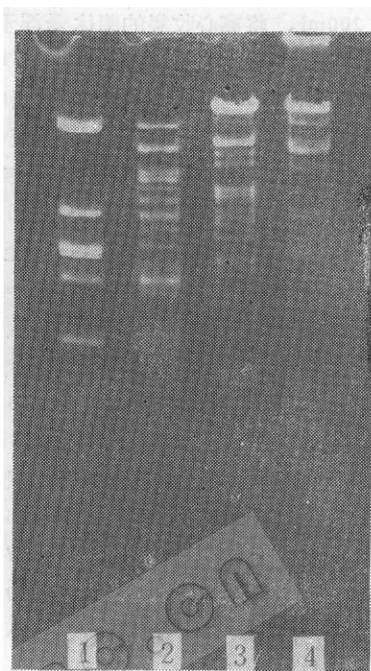


图3 Ts-1 菌株质粒 DNA 的限制酶消化图谱

1. *Eco*RI 消化  $\lambda$  DNA
2. *Eco*RI 消化 Ts-1 菌株质粒 DNA
3. *Bgl*II 消化 Ts-1 菌株质粒 DNA
4. *Kpn*I 消化 Ts-1 菌株质粒 DNA

Fig. 3 Restriction enzyme digestion patterns of plasmid DNA of strain Ts-1

1. *Eco*RI digests  $\lambda$  DNA
2. *Eco*RI digests plasmid DNA of strain Ts-1
3. *Bgl*II digests plasmid DNA of strain Ts-1
4. *Kpn*I digests plasmid DNA of strain Ts-1

我们分离到的质粒是分子量和一级结构均一的 DNA 分子,所以 Ts-1 菌株只含有一种质粒分子。

## (二) 质粒 DNA 的电子显微镜观察

纯化的 Ts-1 菌株质粒 DNA,在电子显微镜下可观察到开环的 DNA 分子(图版 I-a)和卷曲的 DNA 分子(图版 I-b)。用图形数字转换仪描迹分别测出 a 和 b 的轮廓周长,a 的分子周长为  $55.62\mu\text{m}$ ,b 的分子周长为  $54.65\mu\text{m}$ 。按照  $1\mu\text{m} = 2.07 \times 10^6$  道尔顿<sup>[11]</sup>计算,a 的分子量为  $115.13 \times$

$10^6$  道尔顿, b 的分子量为  $113.13 \times 10^6$  道尔顿, 取其平均值, Ts-1 菌株的质粒 DNA 的分子量为  $114.13 \times 10^6$  道尔顿。由于 Ts-1 菌株的质粒分子量很大, 在电镜制片时加入已知分子量的质粒(如 pBR322)作参考标准, 就较难找到完整的大分子质粒 DNA, 我们没有加入参考标准, 所以分子量的计算会有一些误差。但是根据电镜观察和限制酶消化图谱(图 3)中 DNA 片段分子量的估算, 都证明 Ts-1 菌株中存在一种大分子质粒, 我们命名它为 pNT-1。

Abe 等<sup>[4]</sup>从 6 株球形芽孢杆菌中检测到 9 种质粒, 其中最大的 pKA4 的分子量为  $33.5 \times 10^6$  道尔顿, 要比 pNT-1 小 3 倍多。Abe 等在 1593-4 菌株中没有检测到质粒, 在 SSII-1 中检测到的二种质粒的分子量分别为  $8.4 \times 10^6$  道尔顿和  $2.0 \times 10^6$  道尔顿, 而我们检测到蚊虫病原菌 SSII-1、1593、MR-4、1509 和 Ts-1 都有一种与 pNT-1 大小相当的质粒<sup>[5]</sup>。

灭蚊球形芽孢杆菌中的质粒与产生毒素的关系尚未见到报道。本文鉴定了 Ts-1 菌株中存在  $114.13 \times 10^6$  道尔顿的质粒

pNT-1, 并且曾报道过 5 株灭蚊球形芽孢杆菌都有一种与 pNT-1 大小相当的质粒, 为研究质粒与产毒素的关系提供了基础。目前正在通过质粒的消除和质粒的转化对质粒与产毒素的关系作深入的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Tyrell, D. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 656—658, 1979.
- [2] Singer, S.: *Biotech. Bioengin.*, **22**: 1335—1355, 1980.
- [3] Gonzalez, J. M. Jr. et al.: *Plasmid*, **11**: 28—38, 1984.
- [4] Abe, K. et al.: *J. Invert. Pathol.*, **41**: 328—335, 1983.
- [5] 高才昌等: 微生物学通报, **12**(3): 101, 1985.
- [6] 任改新等: 昆虫学报, **25**: 349—350, 1982.
- [7] 蔡宝立等: 环境科学学报, **4**: 291—295, 1984.
- [8] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 93—94, 1982.
- [9] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial Genetics (A Manual for Genetic Engineering)*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 227—230, 1980.
- [10] Kleinschmidt, A. K.: *Methods Enzymol.*, **12** B: 361—377, 1968.
- [11] Lang, D.: *J. Mol. Biol.*, **54**: 557—565, 1970.

## ISOLATION AND ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATION OF LARGE PLASMID IN *BACILLUS SPHAERICUS* Ts-1

Gao Caichang Cai Baoli Zhang Xiuming  
(Institute of Molecular Biology, Nankai University, Tianjin)

Fan Dingyu Cui Tongchang Zong Maokun Ren Gaixin  
(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

A large plasmid pNT-1 was isolated from *Bacillus sphaericus* Ts-1. The isolation method of large plasmid was modified for adaptating *Bacillus sphaericus*. Strain Ts-1 is a pathogene to some mosquito larva. Coil circular DNA molecules and open circular DNA molecules were observed under electron microscope. The molecular

weight of pNT-1 is  $114.13 \times 10^6$  daltons by measuring the average contour circular length.

### Key words

*Bacillus sphaericus*; plasmid