

# 苏云金芽孢杆菌以色列亚种 130kd 杀蚊蛋白 基因的克隆与鉴定

华学军 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心分子生物室, 北京 100081)

以人工合成的 130kd 杀虫蛋白基因的 18-base 序列为探针, 通过 Southern 分子杂交, 验证了在 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 4Q5 菌株 75Md 质粒上含有 130kd 杀蚊蛋白基因, 并且证明了提纯的晶体蛋白具有杀蚊幼虫活性。对该质粒进行 HindIII 完全酶切, 以 pUC18 为载体, 以 *E. coli* TG1 为受体, 得到四个与探针有强杂交信号的阳性克隆, 其中两个 (pFH2, pFH4) 含有 5.2kb HindIII 插入片段, 包含第一类 130kd 杀蚊蛋白基因; 另两个 (pFH1, pFH3) 含有 2.3kb HindIII 插入片段, 包含第二类 130kd 杀蚊蛋白基因的 3' 部分。pFH2 和 pFH4 中, 第一类 130kd 杀蚊基因的插入方位不同。

**关键词** 苏云金芽孢杆菌以色列亚种; 130kd 杀蚊蛋白基因; 分子克隆

苏云金芽孢杆菌以色列亚种对传播人畜传染病的蚊虫具有毒杀作用, 这主要是由其伴孢晶体产生的。据报道<sup>[1,2]</sup>, 在伴孢晶体的三个组分 (28kd, 68kd, 130kd) 蛋白中, 28kd 的组分有溶血性, 对很多真核生物, 包括哺乳动物的细胞有溶解作用<sup>[3]</sup>, 直接用含有 28kd 蛋白的该菌制剂进行灭蚊, 给人畜造成危害, 而 130kd 蛋白只有杀蚊作用, 而无溶血作用。1985 年, 人们报道了 130kd 杀蚊蛋白基因的克隆及其序列测定<sup>[4-10]</sup>。研究结果表明, 在苏云金芽孢杆菌以色列亚种的 75Md 大质粒上共含有两类 130kd 杀蚊蛋白基因, 它们在 3' 端有高度的同源性, 同源区占基因全长的 40%, 而 5' 端没有同源性。

苏云金芽孢杆菌以色列亚种对伊蚊的毒杀效果较好, 而对库蚊效果不理想。本室通过原生质体融合得到能同时杀松毛虫和蚊虫的杂种苏云金芽孢杆菌菌株<sup>[11]</sup>, 并报道了对库蚊有毒杀作用的球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus* strain 10) 的杀蚊蛋白及基因的克隆表达和定位<sup>[12-15]</sup>。本文对苏云金芽孢杆菌以色列亚种 130kd 杀蚊蛋白基因进行了克隆及鉴定。

## 材料与 方法

### (一) 菌种和质粒

苏云金芽孢杆菌以色列亚种 4Q5 菌株, 只含有 75Md 大质粒, 作为 130kd 蛋白基因的来源。 *E. coli* TG1 作为基因克隆的受体菌, pUC18 作为载体。

### (二) 质粒提取

苏云金芽孢杆菌以色列亚种 4Q5 菌株和大肠杆菌的质粒 DNA 的提取参照文献[16]

进行,纯化采用氯化铯密度梯度离心。

### (三) 伴孢晶体的提纯和分析

提纯方法采用泛影葡胺不连续密度梯度法进行<sup>[11]</sup>。提纯的晶体蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析<sup>[12]</sup>。生物活性检测参照文献[12]进行。

### (四) 探针的合成和标记

18-base 探针序列根据文献[8]报道的序列而定 5'-GGGATGTACGCTTATG-3'。

DNA 合成是在 Bicsystem 公司的 DNA 合成仪上进行。[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 对探针 5' 端标记按文献[19]进行。

### (五) Southern blot 探测 130kd 杀虫蛋白基因

提纯的 75Md 质粒用 HindIII 在 37℃ 酶切 1 小时,取 1 $\mu$ g 酶解产物进行 1% 琼脂糖电泳。Southern 转移参照文献[20],分子杂交参照文献[17],探针为 5' 端标记的 18-base 单链寡核苷酸。

### (六) 130kd 杀虫蛋白基因的克隆

对 75Md 质粒进行 HindIII 酶切。将酶切产物与经 HindIII 酶切过的 pUC18 载体混和,酚抽提一遍,酒精沉淀,沉淀物悬浮于连接反应缓冲液中,加入 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶,16℃ 过夜保温。连接产物转化 *E. coli* TG1 受体菌,转化的重组子在 LB 平板上筛选,每个平板中加入 Ap 100mg/L、5 $\mu$ l 2% X-gal 和 10 $\mu$ l IPTG。

### (七) 重组子分析

从筛选平板上挑选白色菌落,进行菌落原位杂交<sup>[17,20]</sup>。阳性克隆的质粒 DNA 经 HindIII 酶切后,通过 Southern 分子杂交进一步鉴定。

## 结 果

### (一) 苏云金芽孢杆菌 4Q5 的质粒检测

菌在 LB 液体中 28℃ 摇床上振荡培养到 O. D. 600  $\approx$  0.8, 取 1.5ml 菌液进行质粒 DNA 的快速提取,进行 1% 琼脂糖电泳分析,结果如图版 1-A。在野生型菌株中含有八条质粒带,在 4Q5 菌株中含有两条质粒带。根据报道<sup>[21]</sup>,在苏云金芽孢杆菌以色列亚种中含有七种质粒,最大的是 82Md,其次是 75Md,由图版 1-A 中可见在 4Q5 菌株中有与 75Md 相对应的质粒带。

### (二) 130kd 杀虫蛋白基因的探测

对纯化的 4Q5 菌株的 75Md 质粒进行 HindIII 酶切,然后以人工合成的 18-base 探针进行 Southern 分子杂交,结果如图版 1-B,共有三条杂交带,片段大小分别为 5.2kb、3.5kb 和 2.3kb。这说明在 4Q5 菌株的 75Md 质粒上含有 130kd 杀虫蛋白基因。进而又提纯了 4Q5 菌株的伴孢晶体,SDS-PAGE 显示有 130kd 的蛋白组分,还有两个组分,分子量分别为 68kd 和 28kd(图版 1-C)。杀蚊生物活性实验表明,晶体蛋白对伊蚊幼虫有强的毒杀作用。

以上结果说明,在 4Q5 菌株 75Md 质粒上确实存在着 130kd 杀蚊蛋白基因。为进一步分子克隆提供了依据。

### (三) 130kd 杀蚊蛋白基因的克隆

对 4Q5 菌株大质粒进行 HindIII 酶切, 连接到 pUC18 的 HindIII 克隆位点, 连接产物转化 *E. coli* TG1, 在筛选平板上获得 500 个白色菌落, 经菌落原位杂交, 挑选了四个强阳性克隆 (pFH1, pFH2, pFH3 和 pFH4), 提取其质粒 DNA, 进行 BamHI 酶切, 都产生一条带 (图版 I-D), 其中 pFH2 和 pFH4 的质粒为 7.9kb, pFH1 和 pFH3 的质粒为 5.0kb, 都大于 pUC18 载体。

HindIII 酶切的结果显示 (图版 I-E), 都产生两条 HindIII 片段, 除了一条共有的 pUC18 载体带之外, pFH2 和 pFH4 各有一条 5.2kb 的片段, 而 pFH1 和 pFH3 各有一条 2.3kb 的片段。

以合成的探针对以上酶切片段进行 Southern 分子杂交, 结果显示 (图版 I-F), 四个克隆的插入片段与探针有很强的杂交, 而 pUC18 DNA 与探针无任何杂交。说明克隆的外源片段含有 130kd 杀蚊蛋白基因。

#### (四) 基因的插入方位分析

由于在克隆时, 是以单酶切进行的, 所以外源片段就可能以两种方位插入。

用 PstI 酶切, 结果如图版 I-G, pFH1、pFH3 均产生 5.0kb 的一条带, 说明在 2.3 kb 的插入片段上没有 PstI 切点, 而 pFH2、pFH4 均产生两条带, 但图谱不同。pFH2 产生 5.9kb 和 2.0kb 的两条带, 而 pFH4 产生 4.7kb 和 3.2kb 的两条带。

根据 Kikuo Sen<sup>[6]</sup> 等的报道, 苏云金芽孢杆菌以色列亚种第一类 130kd 杀蚊蛋白基因位于 5.2kb 的 HindIII 片段上, 在基因中含有一个 PstI 切点, 距该片段的 5' 端 2.0kb, 距 3' 端 3.2kb (图 1)。如果 5.2kb 的片段以与 LacZ 基因相同的方向插入 HindIII 位点, 经 PstI 酶切则应产生 5.9kb 和 2.0kb 两条带, 如相反, 则产生 4.7kb 和 3.2kb 两条带 (图 2), 而图版 I-G 的结果正好说明在所克隆的 5.2kb HindIII 插入片段中, 含有第一类 130kd 杀蚊蛋白基因, 在 pFH2 和 pFH4 中, 该基因分别以正反方向插入。由于所用探针的序列是同源于 130kd 杀蚊蛋白基因的 3' 区, 所以 pFH1 和 pFH3 中 2.3kb 的克

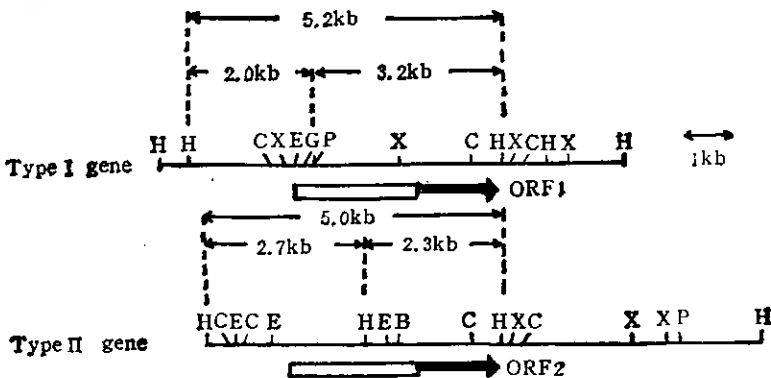


图 1 苏云金芽孢杆菌以色列亚种 75Md 质粒上两类 130kd 杀蚊蛋白基因的限制性图谱

Fig. 1 Restriction map of two HindIII restriction fragments of Bti 75Md plasmid containing two types of 130kd insecticidal protein gene

ORF: open reading frame; H: HindIII; X: XbaI; E: EcoRI; P: PstI; C: ClaI; arrow: direction of transcription and extent of ORF; solid box in arrow: identical region of two types of gene

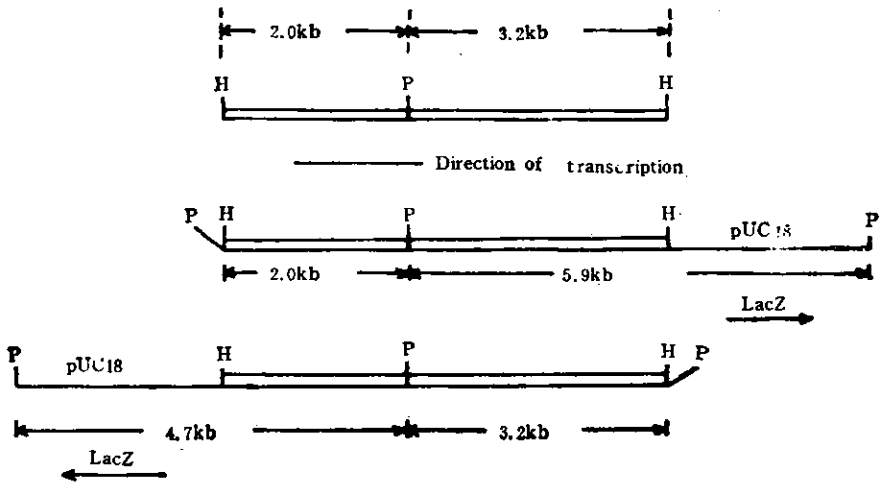


图 2 5.2kb HindIII 片段插入 pUC18 时两种可能的方位

Fig. 2 Two possible orientations of 5.2kb HindIII restriction fragment when it is inserted into the HindIII restriction site of pUC18

隆片段中含有第二类 130kd 杀蚊蛋白基因的 3' 部分。

为了进一步鉴定所克隆的第一类 130kd 杀蚊蛋白基因, 又对 pFH2 和 pFH4 进行 EcoRI 和 XbaI 酶切, 结果与文献[8]完全一致(结果未显示)。

## 讨 论

在苏云金芽孢杆菌以色列亚种 4Q5 菌株的质粒图谱中, 有二条质粒带, 这可能有两种解释, 即(1)是两种质粒; (2)是同一种质粒的两种构型。而经氯化铯梯度离心纯化的质粒中, 电泳显示只有一种质粒带, 这说明在 4Q5 菌株中只含有一种质粒, 即 75Md 质粒。

据报道, 苏云金芽孢杆菌以色列亚种 130kd 杀蚊蛋白基因定位于 75Md 质粒上, 其它质粒的缺失不影响杀蚊蛋白基因的克隆。本文结果也证明了在 4Q5 菌株中只含有 75Md 质粒, 且这一质粒上存在着 130kd 杀蚊蛋白基因。

据文献报道的 130kd 杀蚊蛋白的两类基因的图谱, 第一类基因位于 5.2kb HindIII 片段上, 第二类基因则位于两个相邻的 HindIII 片段上, 5' 区位于 2.7kb 的片段上, 3' 部分位于 2.3kb 片段上, 所以当用 HindIII 完全酶切, 以具同源性的两类基因的 3' 部分序列为探针克隆时, 可以得到全长的第一类基因和第二类基因的 3' 区。本文所得到的重组子 pFH2 和 pFH4 中的插入片段中含有第一类 130kd 杀蚊蛋白基因, 而 pFH1 和 pFH3 则含有第二类基因的 3' 端, 这一片段可以作为克隆全长的第二类基因的探针。

在得到的重组子 pFH2 和 pFH4 中, 所含的第一类基因插入片段方位不同, 这为研究基因表达提供了两种相反的基因插入方位。

## 参 考 文 献

- [1] Waalwijk, C. et al.: *Nucleic Acids Research*, 13:8207-8217, 1985.
- [2] Harley, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126:961-965, 1985.
- [3] Thomas, W. E. et al.: *FEBS Lett.*, 154: 362-368, 1983.

- [4] Sekar, V. et al.: *Gene*, **33**:151—158, 1985.
- [5] Bourguoin, C. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **205**:390—397, 1986.
- [6] Augsuthanasombat, C. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **208**: 384—389, 1987.
- [7] Ward, E. S. et al.: *J. Bacteriol.*, **170**:727—739, 1988.
- [8] Sen, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**(3):873—878, 1988.
- [9] Ward, E. S. et al.: *Nucleic Acids Research*, **15**:7195, 1987.
- [10] Yamamoto, T. et al.: *Gene*, **66**:107—120, 1988.
- [11] 王 亮, 范云六: 生物工程学报, **3**(1): 29—37, 1987.
- [12] 刘国华等: 科学通报, **34**: 61—64, 1989.
- [13] 韦北阳, 范云六: 生物工程学报, **5**(1): 46—50, 1989.
- [14] 刘 阳等: 生物工程学报, **6**(3): 195—198, 1990.
- [15] 刘 阳, 范云六: 中国科学, **7**: 720—725, 1990.
- [16] Birnboim, H. C. et al.: *Nucleic Acids Research*, **7**:1513, 1979.
- [17] Wiley, J. et al.: *Current Protocols in Molecular Biology*. p.640. Greene Publishing Associates, New York, 1987.
- [18] 王 河等: 生物工程学报, **3**: 2—6, 1987.
- [19] Wallace, R. B. et al.: *Method in Enzymology*, **152**:432—442, 1987.
- [20] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*. p. 382. Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- [21] Himeno, M. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**:573, 1988.

## MOLECULAR CLONING AND IDENTIFICATION OF 130kd MOSQUITOCIDAL PROTEIN GENE OF *BACILLUS* *THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENIS* (BTI)

Hua Xuejun Fan Yunliu

(Lab. of Molecular Biology, Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

The location of 130kd mosquitocidal protein gene of Bti 4Q5 strain on its 75Md plasmid was confirmed by southern hybridization using a 18-base oligonucleotide probe. The crystal protein containing the component of 130kd toxic protein was purified. The crystal protein exhibiting the mosquitocidal activity against larvae of *Aedes aegypti* was shown by bioassay. The purified 75Md plasmid DNA of Bti 4Q5 strain was completely digested with HindIII restriction enzyme, ligated with the vector pUC18 and transformed into the recipient cells of *E. coli* TG1. From Ap<sup>r</sup> transformants, four clones with HindIII restriction fragment inserts highly homologous to the 18-base oligonucleotide probe were obtained by *in situ* hybridization and southern hybridization. The 5.2kb HindIII restriction fragment insert was obtained in clone pFH2 and clone pFH4, and 2.3kb HindIII restriction fragment insert in clone pFH1 and pFH3. For pFH2 and pFH4, the 5.2kb fragment was inserted in pUC18 in opposite orientation. It contained 130kd mosquitocidal protein gene (type I) identified by restriction enzyme map analysis. The 2.3kb Hind III fragment insert in other two clones (pFH1 and pFH3) harbored a part of the type II mosquitocidal protein gene which can be used as a probe for cloning of the type II mosquitocidal protein gene.

**Key words** *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; 130kd mosquitocidal protein gene; Molecular cloning