

苏云金芽孢杆菌以色列亚种 130kDa 杀蚊蛋白基因在枯草芽孢杆菌中的表达

张向东 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心分子生物学研究室, 北京 100081)

本文将苏云金芽孢杆菌以色列亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) 130kDa 杀蚊蛋白基因亚克隆到 pNQ122 载体上, 通过枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 原生质体转化, 得到 Km^r Cm^r 的正反向克隆子 (pFZ1 和 pFZ2)。Western-blotting 免疫杂交证明 130kDa 杀蚊蛋白基因在枯草芽孢杆菌中表达了具有免疫活性的 130kDa 杀蚊蛋白。所表达的杀蚊蛋白在实验中具有杀蚊活性。

关键词 苏云金芽孢杆菌以色列亚种; 130kDa 基因; 基因表达

苏云金芽孢杆菌以色列亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 Bti) 的伴孢晶体对蚊幼虫和黑蝇具有强毒性, Bti 的伴孢晶体中含有 130kDa (二聚体)、65kDa、38kDa 和 28kDa 等蛋白。研究表明 28kDa 蛋白虽可杀蚊但具有溶血性(能溶解哺乳动物, 如小鼠的细胞)^[1], 对人、畜有毒害作用。130kDa 蛋白只具有杀蚊活性, 对人、畜安全无毒^[2]。建构 Bti 130kDa 杀蚊蛋白基因高效表达的工程菌可克服 Bti 菌株对人、畜毒害的缺点, 具有潜在的重要应用价值。

材 料 和 方 法

(一) 菌株和质粒

见表 1。

(二) 培养基

LB 培养基^[3]用于一般细菌培养, 固体加 1.2% 琼脂。SMMP 和 DM₃ 培养基^[4]用于枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 原生质体转化。

(三) 酶和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司或 Mannheim Boehringer Biochemica 公司。溶菌酶系中国科学院上海生物化学研究所产品, PEG-6000 为日本进口分装。

(四) 原生质体转化

原生质体制备、质粒转化和原生质体再生均按 Chang^[4] 法。LB 选择培养基抗生素的量为 Cm 20 µg/ml, 或 Km 20 µg/ml。DM₃ 培养基筛选 Km 转化子时含量为 500 µg/ml。

本文于 1991 年 1 月 31 日收到。

致谢: 南开大学生物系蒋如璋教授提供 *B. subtilis* AS1.1176 菌株及 pNQ122 载体, 陈启民老师指导枯草芽孢杆菌原生质体转化技术, 在此表示衷心感谢。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	基因型或表现型 Genotype or phenotype	来 源 Source
<i>B. subtilis</i> AS 1.1176	str ^r	南开大学生物系蒋如璋提供 Jiang Ruzhang, NanKai University
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> 4Q5	毒杀蚊幼虫 Killing mosquito larvae activity	本 室 This laboratory
in <i>E. coli</i> TG1 pFH2, pFH4	Amp ^r	本室华学军, 范云六构建 Fan Yunliu, Hua Xuejun This laboratory
in <i>B. subtilis</i> AS 1.1176 pNQ 122	Cm ^r , Km ^r	南开大学生物系蒋如璋提供 Jiang Ruzhang, NanKai University
in <i>B. subtilis</i> AS 1.1176 pFZ1, pFZ2	毒杀蚊幼虫 Killing mosquito larvae activity Cm ^r , Km ^r	本工作构建 This study

(五) 质粒 DNA 的提取

质粒 DNA 提取按 Gryczen 法^[5], 质粒 DNA 的酶切和琼脂糖凝胶电泳按 Maniatis 法^[3]进行。

(六) SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western-blotting 免疫杂交^[6]

B. subtilis 重组克隆中的粗蛋白用超声波破碎法提取。阳性对照 Bti 伴孢晶体采用泛影葡胺不连续密度梯度法^[7]提取。SDS-PAGE 凝胶电泳浓缩胶为 3%, 分离胶为 8%。

(七) 杀蚊试验^[8]

白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 卵由军事医学科学院五所六室提供。在 25℃ 蒸馏水中, 孵化蚊卵至 2 龄, 取 30 头至含 20ml 蒸馏水的平皿中, 准备做杀蚊试验。

结 果

(一) 130kDa 杀蚊蛋白基因在 *B. subtilis* PNQ122 载体上的亚克隆

亚克隆的程序见图 1。

在含 500 μg/ml 的 DM₃ 平板上, 得到约 3000 个 Km^r 转化子, 从 1700 多个 Km^r 转化子中, 筛选出 12 个为 Cm^rKm^r。克隆子经 BamHI 酶切产生一个 10.0kb 的片段 (图 2 中 1、2、4、5、8 和 12)。克隆子 5 和 6 经 Hind III 酶切, 在 Agarose 凝胶电泳上表现为一条带 (图 2 中 7、11), 这是由于 4.8kb 的载体片段和 5.2kb 的插入片段的分子量相差很小, 在电泳中未能分开。克隆子 5 的重组质粒被命名为 pFZ2, 经 PstI 酶切, 产生 3.8 和 6.2kb 两条带 (图 2 中 6)。克隆子 6 的重组质粒命名为 pFZ1, 经 PstI 酶切产生 2.6 和 7.4kb 两条带 (图 2 中 10)。根据插入片段与载体上 Cm 抗性基因的转录方向, 在 pFZ1 中 Bti 5.2kb HindIII 片段为正向插入, 相反, 在 pFZ2 中为反向插入。

(二) SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western-blotting 免疫杂交

含有 pFZ1 的 *B. subtilis* 克隆子, 在 LB 培养液中, 分别培养 1、2 和 4 天, 从培养物中提取菌体蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果见图 3-A。图 3-B 乃 Western-

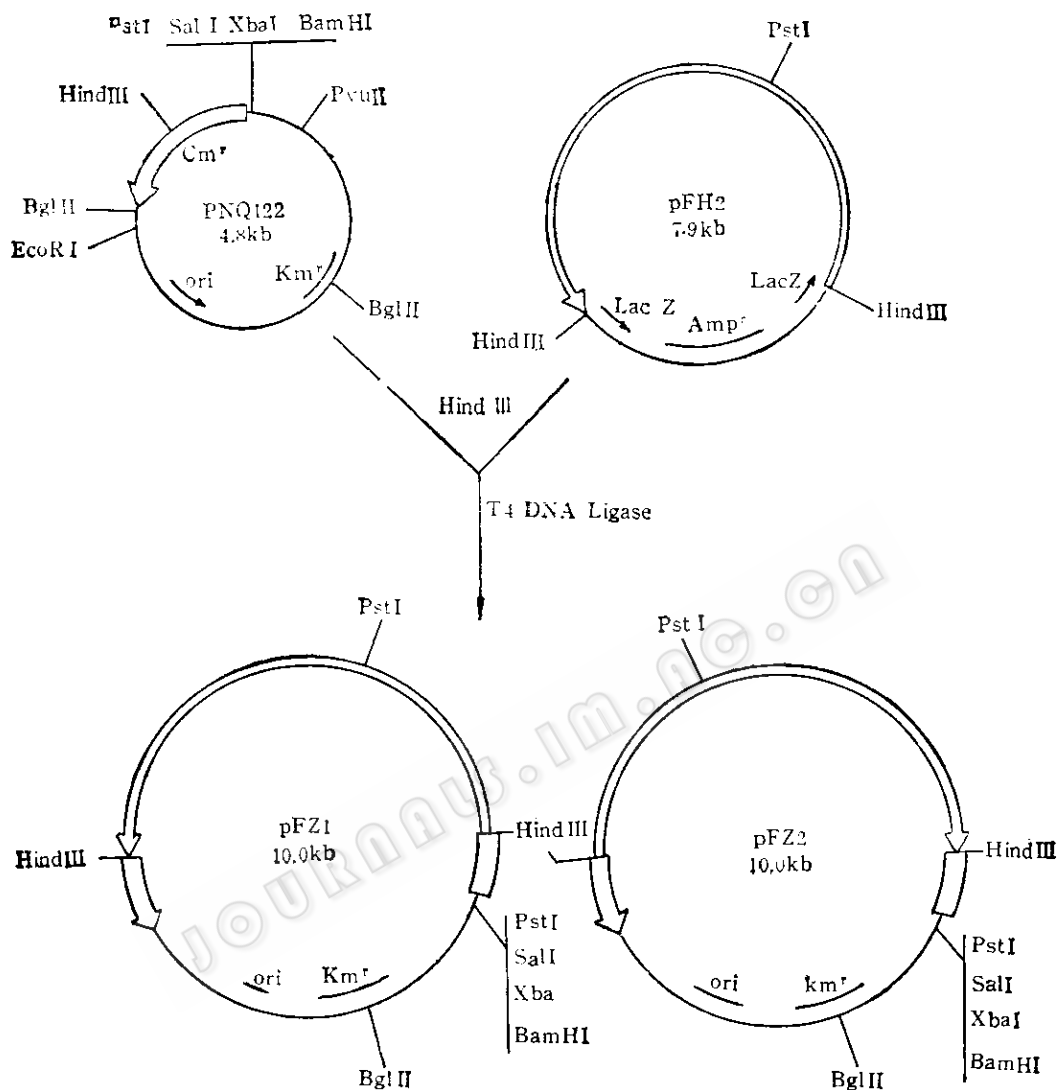


图1 重组质粒 pFZ1 和 pFZ2 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pFZ1 and pFZ2

blotting 免疫杂交结果,在正对照 Bti 晶体蛋白中,出现 130kDa、90kDa、65kDa、45kDa 和 28kDa 免疫杂交带,其中 90kDa 的免疫杂交带推测是 130kDa 蛋白的降解产物。 *B. subtilis* (pFZ1) 的蛋白质样品 1、2、3 (图 3-B 中 4、5、6) 在 130kDa 蛋白处有强的免疫杂交带,样品 1 还有分子量约 100kDa 和 80kDa 的浅带,推测是在处理样品过程中 130kDa 蛋白降解的结果。

(三) 杀蚊试验

将培养两天的测试样品 (*B. subtilis* pFZ1 和 pFZ2 正反向克隆子) 负对照 (Bti 4Q5 菌株) 离心沉淀,用 TE 缓冲液悬浮菌体 (为原体积的 1/20),用超声波破碎,取该混合液 1ml 到含 30 头二龄白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 的平皿中,每组实验 (包括正负对照)



图2 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳分析

1、2、4、5、8、12. 重组质粒 1、2、3、4、5、6/BamHI; 3. 载体 pNQ122/BamHI; 6. 重组质粒 5/PstI; 7. 重组质粒 5/HindIII; 9. λ DNA/HindIII; 10. 重组质粒 6/PstI; 11. 重组质粒 6/HindIII

Fig. 2 Electrophoretic analysis of recombinant plasmid on agarose gel

1、2、4、5、8、12. Recombinant plasmid 1、2、3、4、5、6/BamHI; 3. Vector pNQ122/BamHI; 6. Recombinant plasmid 5/PstI; 7. Recombinant plasmid 5/HindIII; 9. λ DNA/HindIII; 10. Recombinant plasmid 6/PstI; 11. Recombinant plasmid 6/HindIII

做三个平行。放入 25℃ 培养箱培养,在 24、48 和 72 小时后,分别统计活虫数,结果见图 4。

杀蚊结果表明,在 *B. subtilis* 中表达的 Bti 130kDa 蛋白质具有杀蚊活性,正向克隆 (pFZ1) 的杀蚊效果比反向克隆 (pFZ2) 高: 正向克隆 (pFZ1) 在 24、48 和 72 小时,可分别杀死 50%、70% 和 83% 的蚊幼虫,而反向克隆子 (pFZ2) 到 72 小时,只杀死 30% 的蚊幼虫。

讨 论

前文报道^[9]已将 Bti 130kDa typeI 型杀蚊蛋白基因片段 (5.2kb) 克隆到 pUC18 载体上,并转化 *E. coli* TG1,但这个基因的表达产物未能通过杀蚊试验和 Western-blotting 免疫杂交检测出来(未发表资料)。我们推测有可能是受检测方法灵敏度的限制,而未能检测出来,因本室采用的二抗是羊抗兔的辣根过氧化物酶 IgG 抗体,它的效果不如磷酸酯酶和放射性免疫法灵敏。另一种可能是 130kDa 杀蚊蛋白基因片段克隆在 pUC18 载体上,虽可利用 LacZ 启动子,但没与 LacZ 形成正确读码的融合蛋白,或由于某种原因使该基因本身的 ATG 不能起始翻译。

本工作用枯草芽孢杆菌作受体,将 Bti 130kDa typeI 基因亚克隆到 *B. subtilis* pNQ122 载体^[10]上,并得到 Cm^r、Km^r 的正反向转化子,通过 Western-blotting 和杀蚊试验,证明了 130kDa 杀蚊蛋白基因在枯草芽孢杆菌中得到表达。在 Bti 130kDa 杀蚊蛋白基因的 5.2kb 插入片段中,含有该基因自身的启动子^[11]。本实验结果表明, pFZ2 反向

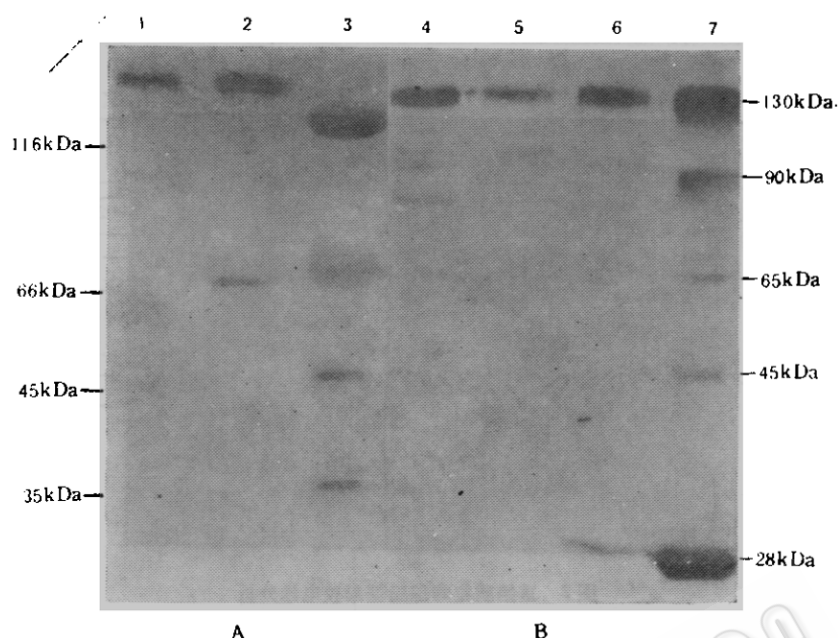


图3 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western-blotting 免疫杂交

超声波破碎 400ml 培养液的菌体,透析后上清液为 15ml,上样量为 50 μ l。样品 1、2、3 分别为培养 1 天、2 天、4 天克隆 (pFZ1) 培养物中提取的蛋白。

A. SDS-PAGE 凝胶电泳图谱

1. 样品 3; 2. Bti 伴孢晶体蛋白; 3. 标准分子量蛋白

B. Western-blotting 免疫杂交

4. 样品 1; 5. 样品 2; 6. 样品 3; 7. Bti 伴孢晶体蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE gel electrophoresis and Western-blotting

Sample 1,2,3: Protein extracted from 1 day, 2nd day, 4th day culture of clone (pFZ1) respectively.

A. SDS-PAGE electrophoresis

Lane 1: Sample 3; 2: Bti crystal protein; 3: Protein molecular-weight marker

B. Western-blotting

Lane 4: Sample 1; Lane 5: Sample 2; Lane 6: Sample 3; Lane 7: Bti

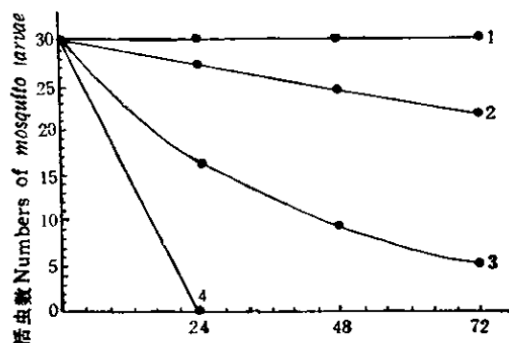


图4 杀蚊试验(白纹伊蚊二龄幼虫)

Fig. 4 Mosquito-larvicidal assay (2nd instar larvae of *Aedes albopictus*)

1. *B. subtilis* AS 1.1176 (pNQ122), negative control; 2. *B. subtilis* AS 1.1176 (pFZ2) with negative inserted orientation; 3. *B. subtilis* AS 1.1176 (pFZ1) with positive inserted orientation; 4. *B. thuringiensis* subsp *israelensis* 4Q5, positive control

克隆子也具有杀蚊活性,这说明 130kDa 杀蚊蛋白的表达利用了插入片段自身的启动子。正向克隆子(pFZ1)比反向克隆子(pFZ2)的杀蚊效果好,说明在 *B. subtilis* (pFZ1)中,130kDa 杀蚊蛋白基因的表达还受插入方向的影响,推测在正向克隆子中 130kDa 杀蚊蛋白基因的表达还利用了载体上的启动子。

Bti 伴孢晶体中主要的蛋白组份之一为 28kDa 蛋白,它具有杀蚊和溶血活性,能溶解哺乳动物细胞。据报道^[12],168ppm 子灵稀释放液从白鲢卵的原肠期开始,就对卵有明显的毒杀作用,最终孵化率仅 15%。而 130kDa 蛋白只有杀蚊活性,对人、畜和鱼类无害。本工作克隆和表达 130kDa 杀蚊蛋白基因(不含有 28kDa 蛋白基因),对构建高效表达的安全无毒工程菌株提供了有效的基因来源。

参 考 文 献

- [1] Thomas, W. E. et al.: *PEBS letters*, 154: 362—368, 1983.
- [2] Sekar, V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137:748, 1986.
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning*, p. 153—162, Cold Spring Harbor Lab., New York 1982.
- [4] Chang, S. et al.: *M. G. G.*, 168: 111—115, 1979.
- [5] Gryczan, T. L. et al.: *M. G. G.*, 177: 459—467, 1980.
- [6] 伍宁丰、范云六: 科学通报, 6: 455—459, 1990.
- [7] 王 先、范云六: 生物工程学报, 3(1): 29, 1987.
- [8] 刘 阳、范云六: 中国科学, B(7): 720—725, 1990.
- [9] 华学军、范云六: 微生物学报, 32(5): 314—319, 1992.
- [10] 蒋如璋等: 遗传学报, 14(5): 323—331, 1987.
- [11] Chanani, A. et al.: *M. G. G.*, 208: 384—389, 1987.
- [12] 喻子牛: 苏云金杆菌(第一版),第 409—410 页,科学出版社,北京,1990 年。

THE EXPRESSION OF 130kDa MOSQUITOCIDAL PROTEIN GENE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENIS* IN *BACILLUS SUBTILIS*

Zhang Xiangdong Fan Yunliu

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

Two recombinant plasmid pFZ1 and pFZ2 containing Bti 130kDa mosquitocidal protein gene in opposite insertion orientation were constructed. The expression of 130kDa mosquitocidal protein of Bti in *Bacillus subtilis* was confirmed by western blotting. The mosquitolarvical activity against the larvae of *Aedes albopictus* was shown by the bioassay.

Key words *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; Gene encoding for 130kDa protein; Gene expression in *Bacillus subtilis*