

苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因穿梭质粒的构建

孙良武¹ 巴峰² 梁平彦¹ 田颖川¹ 梅汝鸿² 莽克强¹

(¹中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(²北京农业大学植物生态工程研究所 北京 100094)

在农业生产中长期使用化学农药已对环境和生态平衡造成一定破坏作用,同时有不少害虫也逐渐产生抗药性从而引起某些害虫的大流行,给农业生产带来巨大损失。应用苏云金杆菌杀虫蛋白基因(Bt基因)可构建具有抗虫作用的抗虫工程菌,这样通过拌种或植物叶面喷雾可达到快速、经济、有效的防治虫害的目的。国际上抗虫工程菌研究应用很快,如美国将 Bt 基因转入到一种正常情况下定居在植物组织中的棒杆菌,将这种工程菌拌玉米种子,这样随植物生长该菌在植物体内大量繁殖,当玉米螟在茎和叶取食时,即因食用表达苏云金杆菌毒蛋白的工程菌而死亡。

田颖川等已克隆了苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因 CryIA(b)和 CryIA(c)^[1~2]。本文将 Bt 基因 CryIA(c)插入到大肠-枯草穿梭载体 pBE-2^[3]中构建成 Bt 毒蛋白基因穿梭质粒 pAMY,利用电穿孔法转入大肠杆菌 DH5 α ,枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* BR151, IA511,野生型蜡状芽孢杆菌 *B. cereus* a-47,短芽孢杆菌 *B. brevis* A-5和枯草芽孢杆菌 90-8^[4],获得了具有较高杀虫活性的工程菌克隆。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

菌株和来源见前文^[4]。TH48, B48.50 和 B48.110 为田颖川等构建^[1~5]。pBE-2 由郭兴华构建^[3]。

1.2 质粒提取、感受态细胞制备及转化

大肠杆菌质粒按 Maniatis^[6]方法。枯草杆菌质粒提取按 Hardy^[7]方法。快速提取质粒按 Hopwood^[8]方法。大肠杆菌感受态细胞制备及转化参照文献[6]。枯草杆菌感受态细胞制备按 Duibnau^[9],转化参照文献[4]和[10]。

1.3 限制性内切酶片段分离纯化及连接

按 Bio101 公司的 Gene-clean kit 及文献[6]方法进行。

1.4 Western blot

蛋白质的 SDS-PAGE 分析按前文所述^[1]方法进行。Western blot 分析按文献[5]方法进行。

1.5 抗虫生物活性测定

抗虫生物活性测定参见文献[1]。

1.6 促生效果测定

取油菜种子浸泡于菌悬液(10^{10} cfu/ml)及无菌水中 2h,晾干后播种,出苗后间苗使每盆留 3 颗,生长平均温度 21 $^{\circ}$ C,出苗 15d 后调查幼苗鲜重。

2 结果和讨论

2.1 带 Bt 基因穿梭质粒 pAMY 的构建

2.1.1 pBE48 的构建和 Bt 基因插入方向的确定:pBE-2 和 TH48 的质粒经 HindIII 酶解,用 T4 连接酶将 pBE-2 和 Bt 基因片段连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,在 Amp(50 μ g/ml)和 Neo(5 μ g/ml)平板上过夜培养得到转化子,提取质粒检验后命名为 pBE48。以 Sal I 和 Xho I 酶解 pBE48 得到一个约 3.2kb 的片段,而酶解 pBE48.110(见下)则得到一约 1.8kb 的片段,证明 pBE48 的结构正确。根据 Bt

基因插入方向该质粒定名为 pBE48 II。

2.1.2 pBE48.110 的构建: pBE-2 和 Bt48.110 质粒经 BamH I 和 Sal I 酶切后电泳, 分别回收 pBE-2 大片段和 Bt48.110 中的 Bt 基因片段, 经 T4 连接酶连接后得 pBE48.110, 经转化 DH5 α , 在含 Amp 及 Neo 平板上过夜培养获得重组转化子。

2.1.3 pAMY 的构建: 如图 1 所示, 将 pBE48 II 和 pBE48.110 分别用 BamH I 和 Xho I 酶解, 回收 pBE48 II 中含 Bt 基因 5'端的片段和 pBE48.110 的大片段(含 pBE-2 和 Bt 基因的 3'末端), 以 T4 连接酶连接后得 pAMY, 经转化 DH5 α , 检出重组子。pAMY 即为含有完整 Bt.CryIA (c) 基因及其 5'调控序列既可在大肠杆菌中表达、复制又可在芽孢杆菌中表达、复制的穿梭质粒。

2.2 芽孢杆菌转化

当用转化大肠杆菌感受态细胞的方法用 pBE-2 和 pAMY 进行转化时, 只有枯草杆菌 IA511 和 BR151 可以被转化, 而 4 株野生型菌株, 枯草杆菌 90-8, 蜡状芽孢杆菌 a-47, 83-10 及短芽孢杆菌 A-5 均不能被转化。电穿孔法则可以转化上述野生型菌株, 见前文^[4]。我们获得了上述三株枯草杆菌、两株蜡状芽孢杆菌和一株短芽孢杆菌的 pAMY 转化子。

2.3 Western blot 分析

将大肠杆菌 DH5 α 、分别含质粒 TH48, B48.50, pAMY 的 DH5 α 及含 pAMY 的枯草菌 IA511, 通过 Western blot 分析表明, 作为对照的 E. coli DH5 α 和枯草芽孢杆菌 IA511 的菌体蛋白与 Bt 毒蛋白抗体无反应, 而分别含 TH48, B48.50, pBE48.50, pAMY 的 DH5 α 以及含 pAMY 的枯草芽孢杆菌 IA511 都有相同的免疫反应带, 说明它们都能产生相同的 Bt 毒蛋白(资料略)。

2.4 抗虫生物活性测定

调整菌液浓度为 10^{10} cfu/ml, 在 25ml 饲料中分别加入 0.2ml、0.25ml、0.8ml 和 1.0ml 菌液, 分别将清水对照、DH5 α 、TH48 和不同的转化子饲喂玉米螟、烟青虫, 结果见表 1。表 1 说明, 与阴性对照 DH5 α 和清水相比含 pAMY 的 a-47 转化子在 6d 内对玉米螟校正死亡率可达 100%, 而 Bt 基因原始克隆 TH48 为 94.4%。与阴性清水对照和未转基因的 a-47 相比, a-47 转化子浓度在 0.2ml 量时, 对烟青虫 6d 校正死亡率为 36.8%, 在 0.8ml 量时为 100%, 而 Bt 基因原始克隆 TH48 在 0.8ml 量时 6d 校正死亡率只有 78.9%。转化子处理后存活的棉铃虫的生长发育也受到很大的抑制。6d 后虫体平均重量仅为对照(水)的 1.24%。含 pAMY 转化子 6d 死亡率最高达 58.8%, 与 Bt 基因原始克隆 TH48 的 56.3% 相当, 说明在转入 Bt 基因后, 转化子对棉铃虫具有一定的毒杀作用。以上结果表明含 pAMY 的蜡状芽孢杆菌转化子有潜在的应用价值。

表 1 不同转化子对玉米螟和烟青虫的毒杀作用

处理	玉米螟			烟青虫		
	菌浓度 c / ml.25ml ⁻¹	4d 校正死亡率 / (%)	6d 校正死亡率 / (%)	菌浓度 c / ml.25ml ⁻¹	4d 死亡率 / (%)	6d 死亡率 / (%)
水	0	0	0	0	0	0
DH5 α	1.00	0	0	0.2*	5.3	0
pAMY / a-47 转化子 1	0.25	100	100	0.2	5.3	36.8
pAMY / a-47 转化子 2	1.00	94.4	100	0.8	86.7	100
TH48	1.00	94.4	94.4	0.8	52.6	78.9

* 未转化的蜡状芽孢杆菌 (Non-transformed a-47)

2.6 促生效果测定

分别用野生型及转化子和清水在油菜上进行促生效果测定。结果表明转化子与野生型芽孢杆菌之间促生作用差异不显著,而与对照清水相比均存在显著差异,说明野生型芽孢杆菌在导入杀虫基因后,

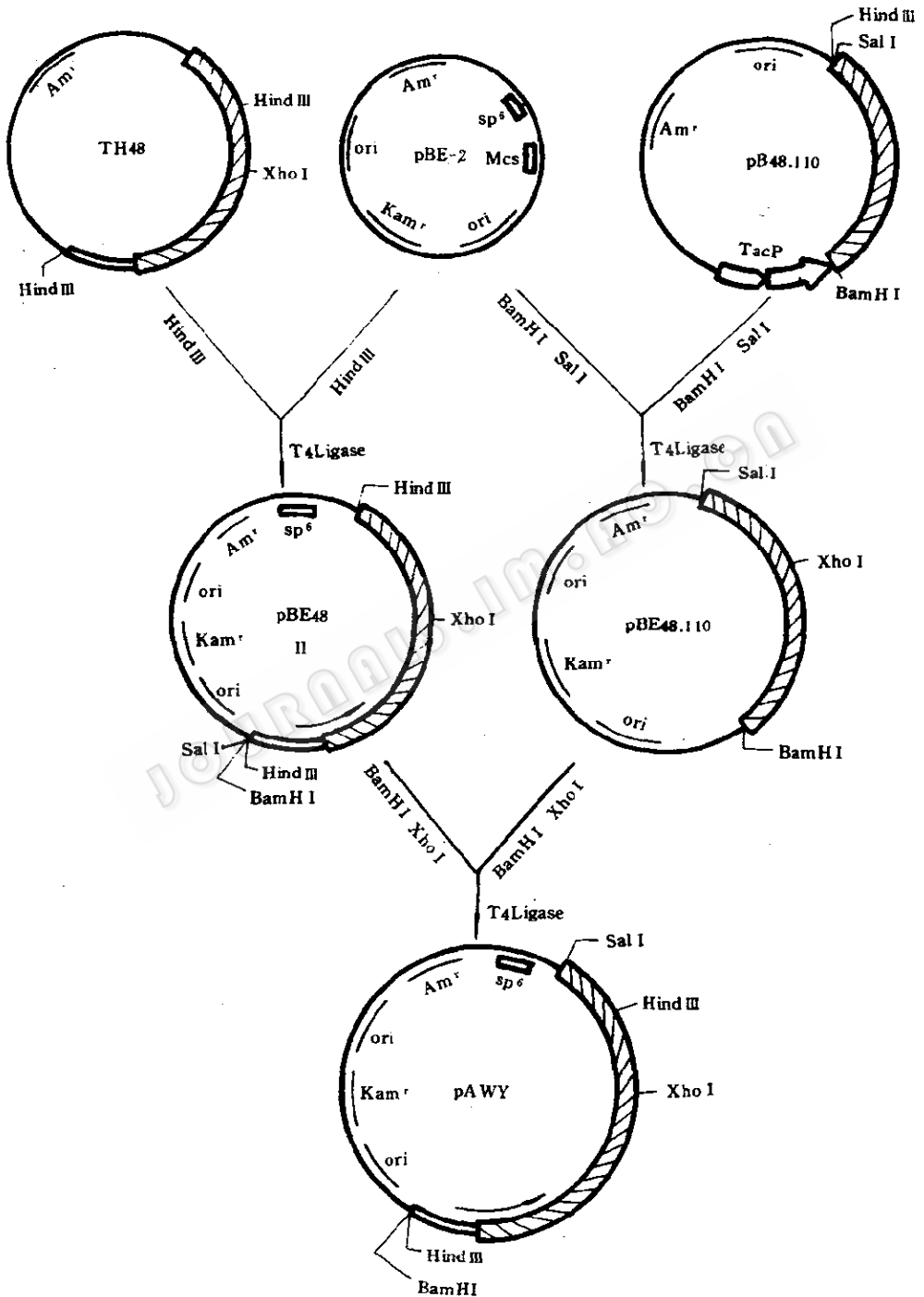


图1 表达苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因的穿梭质粒 pAWY 的构建

可以继续保持原有的优良性状并获得新的杀虫特性(资料略)。

参 考 文 献

- [1] 田颖川,蔡发兴,王 瑛,等. 生物工程学报,5(1):11~18,1989.
- [2] 乔利亚,田颖川,莽克强,等. 微生物学报,33(5):383~386,1993.
- [3] 郭兴华,熊 占,周 民,等. 生物工程学报,7(3):224~229,1991.
- [4] 孙良武,梁平彦,田颖川,等. 生物工程学报,10(1):1~6,1994.
- [5] 田颖川,秦晓峰,许丙寅,等. 生物工程学报,7(1):1~10,1991.
- [6] Maniatis T *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual. New York: cold spring harbour laboratory, 1982.
- [7] Hardy K G. Bacillus cloning Methods. In: Clover D M ed. DNA Cloning. A practical approach. IRL Press, 1985. 2:1~17.
- [8] Hopwood D A. Genetic manipulation of Streptomyces, A laboratory manual. Norwech: The John Innes Foundation, 1985.85.
- [9] Duibnau D, Davidoff-Abelson. *J Mol Biol*, 56: 209~221, 1971.
- [10] 郭兴华,贾士芳,陈乃用,等. 微生物学报,22(3):263~268,1982.

CONSTRUCTION OF SHUTTLE VECTOR CONTAINING δ -ENDOTOXIN GENE OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Sun Liangwu¹ Ba Feng² Liang Pingyan¹ Tian Yingchuan¹ Mei Ruhong²
Mang Keqiang¹

⁽¹⁾*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*

⁽²⁾*Institute of Plant Ecological Engineering, Beijing Agricultural University, Beijing 100094*

Abstract The *Bacillus thuringiensis* toxin gene CryIA (c) was inserted into the shuttle vector pBE-2 to construct pAMY for expressing the B.t. gene in both Gram-negative and -positive bacterial systems. pAMY was introduced into wild type *Bacillus cereus*, *B.brevis* and *B.subtilis* by electroporation. Transformants containing δ -endotoxin gene produced proteins reacted with B.t. crystal protein antibody. Upon biological toxicity tests, the transformants gave a mortality of 100% against *Ostrinia furnacilis*, 58.8% against *Heliothis armigera* and 100% against *Heliothis assulta*. The ability of promoting plant growth of the original strains is retained.

Key words *Bacillus thuringiensis*, Shuttle vector, δ -endotoxin gene