

苏云金芽孢杆菌以色列亚种 P19 基因的初步研究

刘子铎¹ 孙 明¹ 喻子牛¹ Zaritsky A² Ben-Dov E² Manasherob R²

(¹ 华中农业大学农业微生物重点开放实验室, 微生物科学技术系 武汉 430070)

(² Department of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Israel)

摘 要 以含有 *P19* 和 *cyt1A* 基因的以色列亚种 72MD 质粒的 9.7kb Hind III 片段为模板进行 PCR 扩增, 分别获得 *P19* 基因和 *cyt1A* 基因片段。与表达载体 pUHE24 连接转化大肠杆菌 XL-1, 获得 3 个克隆株。LZ19 含有 *P19* 基因, pLZcyt1A 含有 *cyt1A* 基因, LZ19A 含有 *P19* 和 *cyt1A* 两个基因。利用 *cyt1A* 蛋白质可使大肠杆菌细胞致死的特性, 在 IPTG 诱导下, 测定了各克隆基因表达对大肠杆菌有致死作用; pLZ19A 对大肠杆菌的起始致死作用明显快于 pLZcyt1A, 这种现象可能是 *P19* 基因促进 *cyt1A* 基因高表达的结果。

关键词 苏云金芽孢杆菌以色列亚种, *P19* 基因, *cyt1A* 基因

分类号 Q939.11 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0114-19

苏云金芽孢杆菌以色列亚种(*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*)自 1977 年被发现对蚊幼虫有高毒性以来^[1], 一直是世界上用于防治疾病媒介蚊幼虫最好的微生物杀虫剂。由于进一步开发这一高毒菌株对人类的健康有着重大意义, 近年来, 人们对其杀虫物质及杀虫特性进行了广泛的研究。现已清楚, 杀虫物质是含有 *cry4A*, *cry4B*, *cry10A* 和 *cry11A* 基因所编码的杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Protein, 简称 ICP)和 *cyt1A* 基因编码的溶细胞蛋白^[2]。这些蛋白质的基因被定位在一个 72MD 大质粒上^[3], 并分别在大肠杆菌和芽孢杆菌中获得了克隆和表达^[4]。除上述基因外, 在 72MD 质粒上还有 19kD 和 20kD 两个辅助蛋白基因(简称 *P19* 和 *P20*), 与 *cry11A* 共处在一个操纵子上。以色列亚种的高毒性是否与这两个辅助蛋白基因有关呢? 对于 *P20* 基因, 已有较多的报道, 尤其认为该基因对 *cry11A* 和 *cry1A* 具有增强产物表达和促进晶体形成的作用^[5], 已受到人们的广泛重视。由于 *P19* 基因发现较晚^[6], 对其了解甚少。但 *P19* 蛋白质含有丰富的半胱氨酸, 推测可能与 *P20* 有类似的功能。如果真的如此, 这将为进一步利用该基因构建高表达工程菌奠定基础。本文对 *P19* 基因进行了克隆与表达, 并借助于 *cyt1A* 基因的溶细胞性质对其进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

本实验所用菌株和质粒(见表 1)。

1.2 LB 选择培养基

10% 蛋白胨, 5% 酵母粉, 10% NaCl, 加氨苄青霉素终浓度为 100ng/mL。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒	特性	来源
Strains and plasmids	Character	Source
大肠杆菌 XL-1 <i>E. coli</i> XL-1	(<i>mcrA</i>)183(<i>mcrCB</i> - <i>hdsMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 re1A1</i> [<i>F</i> <i>proAB lacIZ M15 Tn10(Tet^r)</i>]	由以色列本古里安大学 Dr. E. Ben-Dov 惠赠 From Dr. E. Ben-Dov in Ben-Gurion University of the Negev, Israel
大肠杆菌 DH5 α <i>E. coli</i> DH5 α	<i>recA</i> ⁻ <i>F</i> ⁻ <i>endA1 gyr96 thi-1 hsdR17(</i> <i>rk</i> ⁻ <i>mk</i> ⁺) <i>sup44 re1A1</i>	由以色列古里安大学 Dr. 胡东利惠赠 From Dr. HuDongli in Ben-Gurion University of the Negev, Israel
pM1	含有 <i>cry11A</i> , <i>crt1A</i> , <i>P19</i> 和 <i>P20</i> 基因的以 色列亚种 72MD 质粒的 9.7kbHindIII 片段 containing <i>cry11A</i> , <i>crt1A</i> , <i>P19</i> and <i>P20</i> genes from HindIII fragment of 72MD plasmid of subsp <i>israelensis</i>	由以色列本古里安大学 Dr. E. Ben-Dov 惠赠 From Dr. E. Ben-Dov in Ben-Gurion University of the Negev, Israel
pUHE24	Ap ^r 大肠杆菌表达载体 Ap ^r expression vector of <i>E. coli</i>	同上 ibid

1.3 质粒抽提

质粒抽提参照文献 [7] 进行。

1.4 PCR

根据已发表的 *P19* 和 *cyt1A* 基因核苷酸序列 [6], 用 AMPLIFY 程序设计了一套带有 NcoI, HindIII 和 XbaI 酶切位点的特异引物(见表 2)和具有 3'-端修饰功能的 Vent DNA 多聚酶进行 PCR 扩增。变性温度为 94℃ 1min, *cry11A* 进行 PCR 扩增, 变性温度为 94℃ 1min, *P19* 基因和 *cyt1A* 基因的退火温度分别为 40℃ 1min 和 60℃ 1min, 链延伸温度为 72℃ 1min。

1.5 基因的克隆

将上述 PCR 产物用不同内切酶直接进行酶解, 与载体 pUHE24 连接后, 转化大肠杆菌 XL-1, 分别获得 pLZ19 和 pLZeyt1A 重组质粒。然后用 HindIII/XbaI 酶解 pLZeyt1A, 纯化 *cyt1A* 片段, 插入 pLZ19 的 HindIII/XbaI 位点, 获得重组质粒 pLZ19A。

表 2 P19 和 *cyt1A* 的引物特征Table 2 Characteristics of primers for P19 and *cyt1A*

引物	序列	产物大小	退火温度
Primers	Sequences	Product size/bp	Annealing temperature
primers of P19			
3'-primer	5'-GGGAGAGAAGACCATGG GGAATATGAATTTTGA	553	40℃
5'-primer	5'-ATAGTGAAGTGAAGCTT TCCCTTTA		
primers of <i>cyt1A</i>			
3'-primer	5'-GGCCACTATTCTAATAA GCTTAAGGA	899	60℃
5'-primer	5'-GGGGAATCTAGATTAAC CCATGA		

1.6 克隆株的诱导表达及细胞计数。

当克隆株在 LB 液体培养基生长到 30~50K. U 单位(Klett unit ,1 个 K. U 相当于 1×10^7 细胞/mL)时。加 IPTG 终浓度为 0.5mmol/L,以 230r/min 继续培养。每隔 30min 用 Klett 比浊仪测定浊度 根据浊度观察不同克隆基因表达对大肠杆菌生长的影响。

2. 结果和讨论

2.1 引物设计和扩增条件

根据载体 pUHE24 的结构特点,为使基因处在正确的阅读框(ORF)内,利用基因的原始起始密码通过引物的点突变引进一个含有起始密子 ATG 的 NcoI 识别位点,使得 PCR 产物酶解后插入载体的 NcoI 位点,以确保阅读框的正确性。另外,为了使扩增基因不被突变,本研究使用具有 3'端外切酶活性修饰功能的 Vent DNA 聚合酶进行扩增。

2.2 克隆基因的特征

按照图 1 所示,分别获得了 3 个大肠杆菌克隆株。LZ-19 含有 P19 基因;LZ_{cyt1A} 含有 *cyt1A* 基因,LZ19A 含有 *cyt1A* 两个基因,这两个基因处在同一操纵子上,*cyt1A* 携带有自身的核糖体结合位点。为确证克隆株基因片段的正确与否,对重组质粒进行了酶解分析,结果表明,克隆基因的大小和酶切点都是正确的(图 2)。

2.2 克隆基因的表达及功能

由于 *cyt1A* 蛋白质的溶细胞性质,对于在大肠杆菌中研究 *cyt1A* 蛋白质的定量表达不象在苏云金芽孢杆菌中那样可直接用 SDS-PAGE 测其蛋白质含量来描述基因的表达特性。因为一旦 *cyt1A* 基因在大肠杆菌中表达一定的量,马上会使大肠杆菌溶细胞而致死。本研究正是利用这一特性通过测定不同克隆株基因表达对大肠杆菌生长的影响来了解 P19 基因对 *cyt1A* 基因表达的作用。结果表明,当不同克隆株被 IPTG 诱导后,pLZ19 对大肠杆菌生长无影响(图 3 a);LZ_{cyt1A} 在加入 IPTG 诱导 30 和 60min 后,LZ_{cyt1A} 的浊度由 53 K. U 分别变为 65 K. U 和 75 K. U。而未被 IPTG 诱导的 LZ_{cyt1A} 则由 52 K. U 分别变为 70 K. U 和 90 K. U。诱导和非诱导的浊度之差分别为 5 K. U 和 20 K. U。说明 *cyt1A* 的表达产物对大肠杆菌具有明显的致死作用,使大肠杆菌细胞生长明显下降趋势,这与最初 Douek 等报道的结果相一致^[8],说明克隆的 *cyt1A* 基因在结构和功能上都保持着天然基因固有的溶细胞特性(图 3 b)。当 P19 基因和 *cyt1A* 基因重组后,所获得的克隆株 LZ19A 用 IPTG 诱导 30 和 60min 后,LZ19A 的浊度由 40 K. U 分别变为 50 K. U 和 45 K. U。未被 IPTG 诱导的 LZ19A 则由 38 K. U 分别升为 77 K. U 和 107 K. U。诱导和非诱导的浊度之差分别为 27 K. U 和 62 K. U,这说明 pLZ19A 对大肠杆菌的起始致死速度明显快于仅含有 *cyt1A* 的 pLZ_{cyt1A} 对大肠杆菌的起始致死速度(图 3 c),这意味着 P19 基因对 *cyt1A* 基因的起始表达有一定的促进作用,从而使细胞起始致死速度加快。同时 LZ19A 用 IPTG 诱导 150~180min 后,其浊度下降到 40 K. U,即保持在加 IPTG 诱导前的水平。而 LZ_{cyt1A} 在同样条件下诱导 150~180min 后,其浊度为 66 K. U,仍高于加入 IPTG 诱导前的水平,说明 P19 基因的表达产物除了能促使 *cyt1A* 的致死起始速度外,可能在整体水平上增加了 *cyt1A* 产物的表达量。实际上,早期有人把携带有上游序列不完整 *cry11A* 基因的 5'-端片段与 *cyt1A* 重组后,转入苏云金芽孢杆菌无晶体

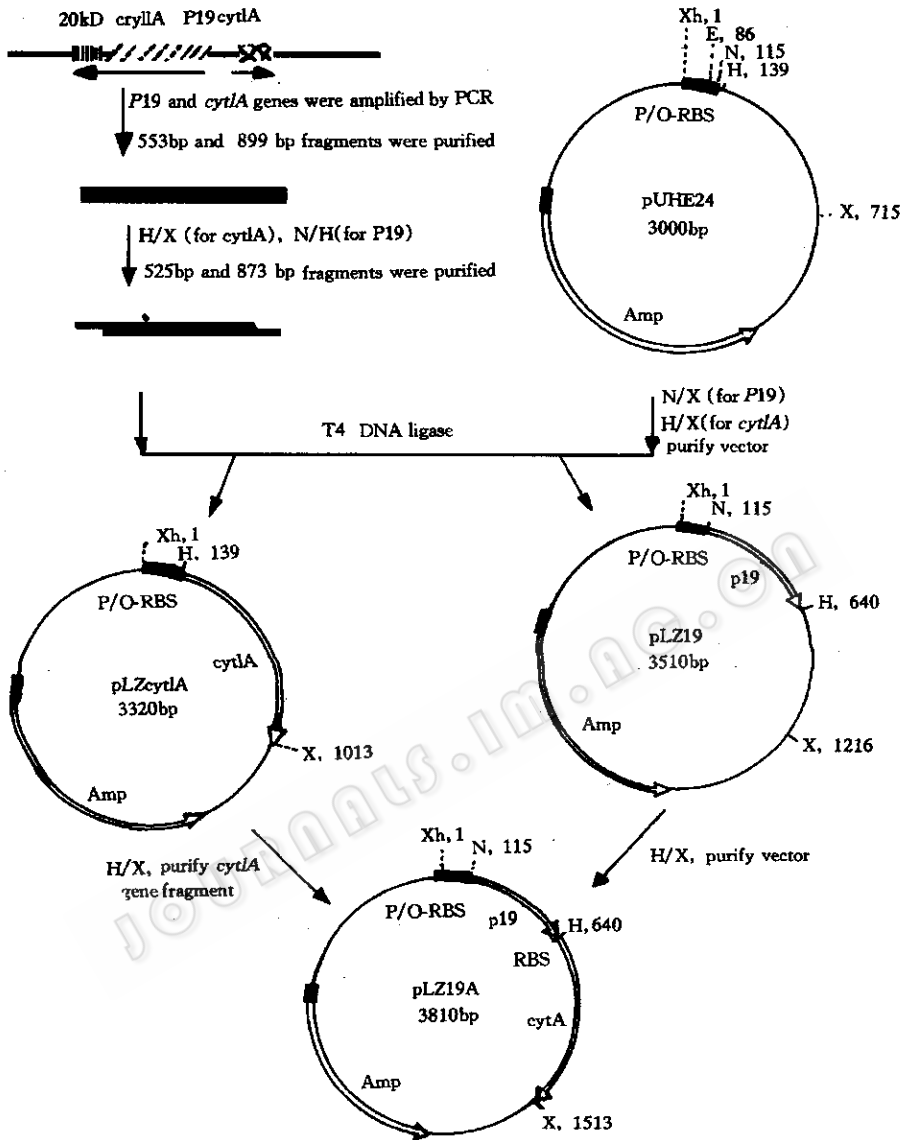


图 1 pLZ19, pLZeyt1A 和 pLZ19A 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of pLZ19, pLZeyt1A and pLZ19A recombinant plasmids Abbreviation: E. EcoRI; N. NcoI;

H. HindIII; X. XbaI; Xh. XhoI; Amp. Ampicillin; P/O. promoter/operator; RBS. Ribosome binding site.

突变株中, 发现能使 *cyt1A* 基因的表达产物量大为提高^[9]。但当时尚未发现 1A 基因的上游存在的 P19 基因的阅读框, 而事实上, 该克隆片段包括了完整的 P19 基因。也就是说, 促进 *cyt1A* 基因表达的因素可能是 P19, 而不是不完整的 *cry11A* 基因片段。从本研究结果看, P19 在大肠杆菌中能促进 *cyt1A* 基因的表达, 与在苏云金芽孢杆菌中的作用是相一致的。但在什么水平上以及如何调节 *cyt1A* 基因高表达尚需进一步研究。从 P19 蛋白质的一级结构看, 它含有丰富的半胱氨酸, 约占整个蛋白质的 11%。同时, 发现与

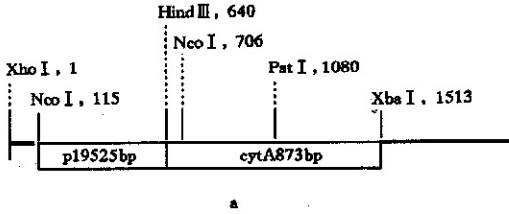


图 2 pLZ19A 重组质粒的线性图谱和不同限制性内切酶解图谱

Fig.2 The linear graphic and digested analysis of pLZ19A recombinant plasmid

a. The linear graphic of pLZ19A recombinant plasmid.

b. The profile of pLZ19A recombinant plasmid digested by different restriction endonuclease.

- 1. DNA standard molecular weight; 2. pLZ19A/NcoI; 3. pLZ19A/NcoI + PstI; 4. pLZ19A/PstI + XbaI.

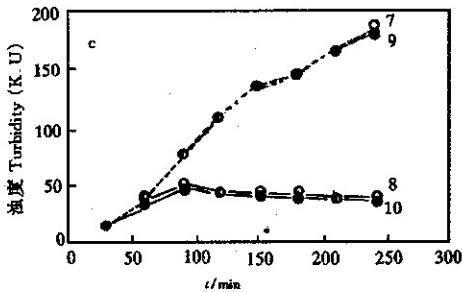
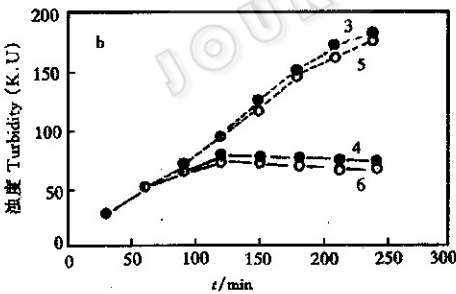
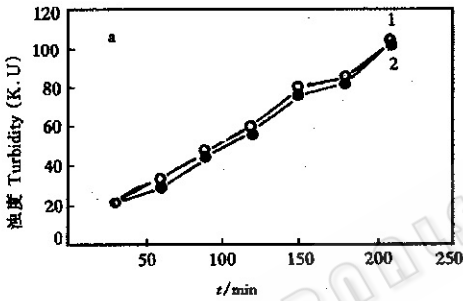
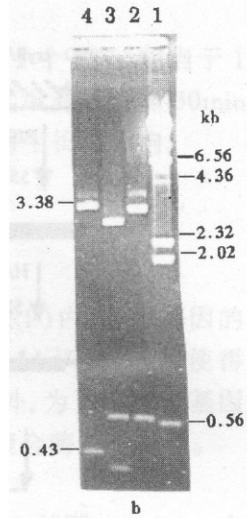


图 3 不同克隆基因在 IPTG 诱导下表达对大肠杆菌生长的影响

Fig.3 Effects of expression products of different cloned genes on the growth of *E. coli* under IPTG induction LZX.

The host is *E. coli* XL1; LZD. The host is *E. coli* DH5 α ; a. Effects of P19 expression product on the growth of *E. coli*;

b. Effects of cytA expression product on the growth of *E. coli*;

c. Effects of P19 and cytA expression products on the growth of *E. coli*.

- 1. LZ19; 2. LZ19 (IPTG); 3. LZx cytA; 4. LZx cytA (IPTG); 5. LZD cytA; 6. LZDcytA (IPTG); 7. LZx19A; 8. LZx19A (IPTG); 9. LZD19A; 10. LZD19A (IPTG).

cry2Aa 和 *cry2Ac* 基因的阅读框架 1 有 32% 的同源性^[10], 推测 P19 可能是通过稳定

其新生肽的高级结构而不被细胞内蛋白酶水解来增加表达量的。也就是说最终产物的增加可能是在翻译水平上分子间相互作用的结果。对 *cyt1A* 来说,产量的增加并未改变它固有的溶细胞特性,故量的增加表现为溶细胞作用的加强,使细胞致死速度加快。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛(主编). 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990, 345~364.
- [2] Margalit J, Norbert B, Christan B *et al.* *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Environmental Benefits, *Academia Sinica, Taipei, Taiwan*, 1994, Vol. 521~556.
- [3] Ben-Dov E, Einav M, Peleg N *et al.* *Applied Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 9.
- [4] Ben-Dov E, Boussiba S, Zaritsky A. *Journal Bacteriology*, 1995, **177**: 2851~2857.
- [5] Dong W, Brian A F. *J Bacteriology* 1993, **175**: 5276~5280
- [6] Etienne D, Sanderien D, Andre K *et al.* *J Bacteriology*, 1995, **177**: 2283~2291.
- [7] 刘子铎, 洪玉枝, 潘学文等. 农业生物技术学报, 1993, **1**: 43~49.
- [8] Douek J, Einav M, Zaritsky A. *Molec Gen Genet*, 1992, **232**: 162~165.
- [9] Chang C, Yu Y, Dai S *et al.* *Applied Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 815~821.
- [10] Baum J A, Malvar T. *Molecular Microbiology*, 1995, **18**: 1~12.

PRELIMINARY STUDY OF P19 GENE FROM BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP ISRAELENIS

Liu Ziduo¹ Sun Ming¹ Yu Ziniu¹

Zaritsky A² Ben-Dov E² Manasherob R²

(Key Lab. of Agri-Microbiology, Ministry of Agriculture, Dept. of Microbial Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

(²Dept. of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Israel)

Abstract The P19 gene and *cyt1A* gene were obtained by PCR with 9.7kb HindIII fragment containing P19 gene and *cyt1A* gene from 72MD plasmid of Bt as a template. Digested PCR products were ligated to expression vector pUHE24 and transformed into *E. coli* XL-1. Three clones, pLZ19 harboring P19 gene, pLZcyt1A harboring *cyt1A* gene, pLZ19A harboring P19 gene and *cyt1A* gene, were screened. The growth curve of cloned strains were determined under IPTG induction. The result showed that pLZ19 did not affect the growth of *E. coli*, pLZcyt1A is typically lethal for *E. coli*, Lethal initial efficiency of pLZ19A is much higher than that of pLZcyt1A. Probably, this was a result that P19 gene enhanced initial expression of *cyt1A* gene in *E. coli*.

Key words *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*, P19 gene, *cyt1A* gene