

球形芽孢杆菌二元毒素基因的定位 及无芽孢突变株的生物学特性*

刘 云 孙 钊 袁志明 刘娥英 张用梅**

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘 要 DES 诱变得到了三株球形芽孢杆菌无芽孢突变株 G_5 、 C_4 、 L_5 经显微观察、超微结构分析、生物测定、蛋白质 SDS-PAGE 分析及质粒检测,观察到突变株 C_4 、 L_5 阻碍于芽孢形成的第Ⅱ期,突变株 G_5 阻碍于芽孢形成的第Ⅲ期,其细胞中已有晶体形成,它对致倦库蚊幼虫的毒力明显高于仅有二元毒素蛋白合成、而无毒素晶体形成的突变株 C_4 和 L_5 。突变株 L_5 消除了质粒,仍有二元毒素蛋白合成。Southern blot 分析表明含二元毒素基因部分 DNA 片段的探针仅与菌株 C_3 -41、BS-10 的染色体具有同源性,因此证明供试菌株的二元毒素基因定位于染色体上。

关键词 球形芽孢杆菌,无芽孢突变株,生物学特征,二元毒素基因

分类号 Q753 **文献标识码** A **文章编号** 0001-620X(1999)05-0426-29

苏云金芽孢杆菌以色列亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*)是最早用于生物防治蚊幼虫的昆虫病原菌^[1],但球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*,简称Bs)由于杀蚊毒力高、持效期长,越来越被世界各地的科研工作者所关注。其中 C_3 -41 是本实验室分离的一株高毒力菌株,对致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)幼虫的毒性及杀蚊持效性均高于高毒株 2362^[2],其发酵生产的杀蚊乳剂在我国被广泛用于蚊虫的生物防治^[3]。

二元毒素蛋白的合成与芽孢形成紧密相关^[4,5],利用阻碍芽孢发育不同时期的突变株研究二元毒素的生物合成是一种重要手段。研究表明,受阻于芽孢形成早期的突变株,二元毒素蛋白虽可产生,但其量较少,不能形成晶体,杀蚊活性低;受阻于芽孢形成中期的突变株,虽不能形成芽孢,但可形成晶体,且杀蚊活性较高^[6]。本文涉及无芽孢突变株的诱变、筛选及生物学特性的研究,发现 G_5 是一株杀蚊毒力较高的突变株,为进一步研究无芽孢突变株在水体中的杀蚊持效性和构建广谱、长效的杀蚊工程菌提供了材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*) C_3 -41 系本实验室分离保藏,BS-10 和 1691 系本实验室收藏菌株, C_3 -41 无芽孢突变株 C_4 、 G_5 和 L_5 本研究诱变获得。

1.1.2 培养基 LB 和 6 号培养基参照文献^[7,8]

* 本项研究得到中山大学生物防治国家重点实验室资助

** 通讯作者,蔡全信和高燕参加了部分工作

收稿日期:1997-08-14,修回日期:1998-01-26

1.1.3 主要药品和材料 :溶菌酶(Sigma 公司) ;Taq DNA 多聚酶(Promega 公司) ;核酸分子量标准、PCR Marker 和 Nick translation ki(华美生物工程公司) ; α -³²P dCTP(北京福瑞公司) ;DNA 快速回收 ki(原平生物工程公司) ;鲑鱼精 DNA(Gibco/BRL)。

1.2 方法

- 1.2.1 无芽孢突变株的诱变及筛选 :按文献 [6] 方法 ,诱变后挑取半透明菌落 ,划线纯化。
- 1.2.2 电镜观察 :对 6 号固体培养基上 72h 培养物按文献 [9] 方法进行处理观察。
- 1.2.3 生物测定 :参照文献 [10] 方法进行。供试蚊虫为野外采集的 3~4 龄致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 幼虫。
- 1.2.4 蛋白质分析 :收集 6 号培养基上 72h 培养物 ,按文献 [7] 中阳性克隆子蛋白质检测方法进行 ,二元毒素蛋白的分离和纯化参照文献 [11]。
- 1.2.5 质粒检测 :参照文献 [12] 方法进行 ,菌体需经两次液体活化 ,溶菌酶最佳作用条件为终浓度 2mg/mL ,37℃ ,15min。
- 1.2.6 标记探针的制备和 Southern 杂交 :PCR 引物及反应条件参照文献 [11] ,用 DNA 快速回收 Kit 纯化扩增产物 ,按 Nick translation kit 标记以制备放射性探针。DNA 印迹转移 ,预杂交 ,杂交参照文献 [13] 方法进行 ,为非甲酰胺法 ,杂交温度 68℃。

2 结果

2.1 无芽孢突变株的生物学特性

- 2.1.1 形态特征及超微结构特征 :同样在 6 号培养基上生长 72h ,野生株已形成成熟的芽孢 ,并有菱形或不规则形伴孢晶体产生 (图版 I -1a ,1b) ;突变株 G₅ 菌体一端略有膨大 ,发育阻碍于芽孢形成的第Ⅲ期 ,形成前芽孢 ,并有菱形晶体产生 (图版 I -2a ,2b) ;突变株 L₅、C₄ 菌体为营养体形态 ,发育阻碍于芽孢形成的第Ⅱ期 ,形成隔膜 ,无晶体形成 (图版 I -3a ,3b ,4a ,4b)。
- 2.1.2 生物测定 :48h 的生物测定结果如表 1。结果表明 ,野生株 C₃-41 全发酵液的毒力分别是突变株 G₅、L₅ 和 C₄ 的 43.57、1766.8 和 1044.8 倍。
- 2.1.3 蛋白质 SDS-PAGE 分析 :野生株 C₃-41 与突变株 G₅、C₄、L₅ 中均有二元毒素蛋白的合成。但突变株 C₄、L₅ 中仅有微量的毒素蛋白合成 ,加大一倍点样量才可观察到二元毒素蛋白带 ,而且 42kD 蛋白的合成量大于 51kD 蛋白的合成量。突变株 G₅ 中有较大量二元毒素蛋白合成 (图 1)。

2.2 二元毒素基因定位的分析

用改良的大质粒提取方法检测到野生株 C₃-41 ,突变株 C₄、G₅ 均有一个大质粒 ,而 B_s1691 和突变株 L₅ 未检测到质粒 (图 2 ,3)。以根据二元毒素基因序列设计、合成的一组寡核苷酸为引物 ,C₃-41 菌株的总 DNA 为模板 ,通过 PCR 扩增出横跨两个二元毒素蛋白基因的 1.1kbDNA 片段 ,用

表 1 球形芽孢杆菌 C3-41 及其无芽孢突变株的杀蚊毒力 *
Table 1 Toxicities of *B. thpaeicus* and its asporogenous mutants

菌株 Strains	LC50/ (μ g/mL)	LC90/ (μ g/mL)	回归方程 y = bx + a	相关系数 r
C ₃ -41	0.028	0.086	y = 689.6x + 30.6	0.925
G ₅	1.222	3.95	y = 14.65x + 32.1	0.923
C ₄	49.47	99.3	y = 0.802x + 10.3	0.954
L ₅	26.12	49.95	y = 1.67x + 6.139	0.985

* 48h 结果
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

nick translation 方法制备得到放射性同位素探针。经 DNA 印迹转移和 Southern 杂交 ,结果表明二元毒素基因的探针只与染色体 DNA 具有同源性(图 3)。

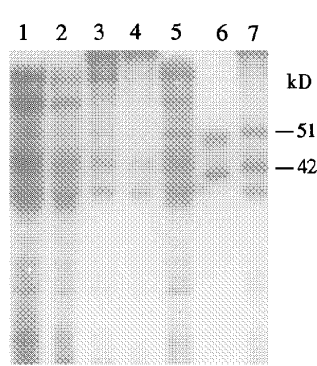


图 1 野生株 C₃-41 与无芽孢突变株毒素蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE patterns of protein in wild strain C₃-41 and its asporogenous mutants
1~2. Mutant L₅ ;3~4. Mutant C₄ ;5. Mutant G₅ ;
6. Purified binary toxin ;7. Wide-type strain.

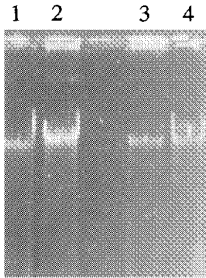


图 2 球形芽孢杆菌 C₃-41 及其无芽孢突变株的质粒图谱

Fig.2 Plasmid patterns of *B. sphaericus* C₃-41 and asporogenous mutants
1. Mutant L₅ ;2. C₃-41 ;3. Mutant C₄ ;4. Mutant G₅

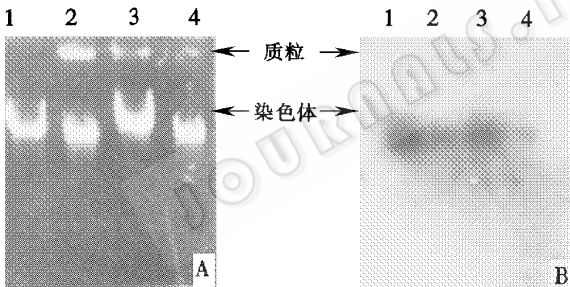


图 3 球形芽孢杆菌 C₃-41 二元毒素基因的 Southern blot 分析

Fig.3 Southern blot analysis of binary toxin gene of *B. sphaericus* C₃-41
1. 1691 ;2~3. C₃-41 ;4. BS-10
A Map of plasmid B Southern hybridization

3 讨论

关于二元毒素基因定位 ,多篇报道均认为在染色体上^[13] ,但也有学者报道大质粒上^[14]。本试验获得了以下结果 :二元毒素基因探针只与染色体 DNA 发生杂交反应 ;已消除了质粒的突变株 L₅ 仍有二元毒素蛋白合成 ;杀蚊高毒株 1691 无质粒存在。证明了二元毒素蛋白基因定位于染色体上。

参 考 文 献

[1]Goldberg L H ,Margalit J. *Mosquito News* ,1977 ,**37** 355~358.
[2]Napstad K ,Becker N ,Beck M. Abstracts of First International Congress of Vector Ecology ,U S A ,1993 ,60.
[3]张用梅 ,蔡昌建 ,刘娥英等.中华流行病学杂志 ,1989 ,**10**(7) 20~26.
[4]Ahmed H K ,Mithell W J ,Priest F G. *Appl Microbiol Biotechnol* ,1995 ,**43** 310~314.
[5]刘娥英 ,周志宏 ,张用梅.中国媒介生物学及控制杂志 ,1995 ,**6** 337~339.
[6]Charles J F ,Kalfon A ,Bourgouin C. *Ann Inst Peser /Microbiol* ,1988. **139** 234~259.
[7]萨姆布鲁克 J ,弗里奇 E F ,曼尼阿蒂斯 T 著.金冬雁等译 ,分子克隆实验指南(第二版) 北京 科学出版社 ,1992 ,876~877.

- [8]张用梅,刘娥英,蔡昌建等.杀虫微生物,1987,1:98~101.
- [9]张用梅,戴顺英,刘娥英等.电子显微学报,1987,6(4):11.
- [10]张用梅主编.球形芽孢杆菌及其杀蚊原理和应用.北京:科学出版社,1995:202~205.
- [11]袁志明,Nielsen LeRoux C,Pasteur N等.微生物学报,1999,39(1):29~35.
- [12]Jensen G B, Andrea W, Susanne S *et al.* J Bacteriol. 1995, 177:2914.
- [13]Proter A G, Davidson E W, Liu J W. Microbiol Review, 1993, 57(4):838~861.
- [14]刘阳,范云六.中国科学 B 辑,1990,7:720~725.

LOCATION OF THE BINARY TOXIN GENE OF *BACILLUS SPHAERIUCS* AND SOME BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ITS ASPROGENOUS MUTANTS

Liu Yun Sun Fan Yuan Zhiming Liu Eying Zhang Yongmei
(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of sciences, Wuhan 430071)

Abstract Location of the binary toxin gene of *Bs C₃-41* and some biological characteristics of its asporogenous mutants which obtained by DES treatment were studied in this paper. Mutant *C₄*, *L₅* with blocked at the stage II of sporulation course were not possessed of any crystalline inclusion, but the binary toxin proteins were detected in their cells by SDS-PAGE analysis. Another mutant *G₅* which blocked at the stage III of sporulation course formed parasporal crystal in the cells, and its toxicity to larvae of *Culex quinquefasciatus* was about 50 times higher than those of mutant *C₄* and *L₅*. The result of curing plasmid and Southern blot analysis confirm the binary toxin gene of *Bs C₃-41*, *Bs 1691* and *Bs-10* locate on the chromosome.

Key words *Bacillus sphaericus*, Asporogenous mutant, Biological characteristics, Binary toxin gene

图 版 说 明

Explanation of plate

野生株及突变株在 6 号培养基上 72h 培养物的形态特征(1a, 2a, 3a, 4a)(放大 2,000×)及超微结构(1b, 2b, 3b, 4b)(放大 30,000×)

Morphological characteristics and ultrastructure of *BsC₃-41* and its asporogenous mutants(incubated for 72h on No 6 solid medium)

1. 野生株 *C₃-41*(wild type strain *C₃-41*) 2. 无芽孢突变株 *G₅*(asporogenous mutant *G₅*) 3. 无芽孢突变株(*L₅* asporogenous mutant *L₅*) 4. 无芽孢突变株 *C₄*(asporogenous mutant *C₄*) OC: outer coat; LMC: lamellar coat; IC: inner coat; PC: parasporal crystal; S: spore; F: forespore; FS: forespore septum; IF: incient forespore.)