

苏云金芽胞杆菌幕虫亚种晶胞粘连现象与晶体蛋白 基因 *cry26Aa* 所在质粒有关

鞠守勇 纪 芳 朱自敏 喻子牛 孙 明*

(华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘 要 苏云金芽胞杆菌幕虫亚种 T02 菌株的伴胞晶体在芽胞外壁内侧形成,呈现晶胞粘连的现象。在此菌株中克隆了 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 两个基因,并对晶胞粘连现象与质粒的相关性做了系统研究。通过消除幕虫亚种 T02 菌株的质粒,得到了仅消除 *cry26Aa* 所在质粒的菌株 BMB1151 和无质粒的菌株 BMB1152。通过穿梭载体将 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 两个基因分别和同时转化无质粒突变株 BMB1152 并表达,形成的晶体与芽胞独立存在不能粘连,表明在幕虫亚种染色体背景下仅仅 *cry* 的表达不能形成晶胞粘连现象,从而推断晶胞粘连现象可能与幕虫亚种两个基因所在的质粒有关。进一步的研究发现将 *cry26Aa* 在仅消除 *cry26Aa* 所在质粒的突变株 BMB1151 中表达,形成的晶体与芽胞也分别独立存在不能粘连,从而进一步推断幕虫亚种晶胞粘连现象与 *cry26Aa* 所在质粒有关。

关键词: 苏云金芽胞杆菌;幕虫亚种;晶胞粘连; *cry26Aa*; *cry28Aa*

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)01-0088-04

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一种革兰氏阳性细菌,在芽胞形成过程中伴有蛋白晶体的形成,称为伴胞晶体(parasporal crystal)。伴胞晶体是毒杀昆虫的主要活性物质,主要由一种或多种毒素蛋白组成,亦称杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal protein, 简称 ICP, 或晶体蛋白),这些 ICPs 的编码基因(即 *cry* 基因)通常定位在该菌的一些较大(大于 45kb)的质粒上^[1,2]。Bt 幕虫亚种(*B. thuringiensis* subsp. *finitimus*)能形成两种伴胞晶体^[3],已经克隆到这两种晶体蛋白基因 *cry26Aa* 和 *cry28Aa*^[4,5]。当芽胞形成细胞裂解后,一种晶体被释放出来,形成自由的伴胞晶体;另一种在芽胞外壁和芽胞衣之间形成,并始终和芽胞粘连在一起(称为晶胞粘连)。通过质粒消除和转移,证明幕虫亚种伴胞晶体的生成和其他亚种一样也与质粒有关^[3]。

晶胞粘连现象的研究既可以从理论上对苏云金芽胞杆菌伴胞晶体和芽胞的分化机制进行探讨,同时也为构建新型“生物囊”工程菌提供理论基础。

张睿等(2005)将基因 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 在 Bt 库斯塔克亚种(*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*)无质粒突变株 BMB171 中共同表达形成两个晶体,一个在芽胞外壁外侧形成;另一个则在芽胞外壁和芽胞衣之间形成,但是不能形成 Bt 幕虫亚种典型的晶胞

粘连现象^[4],此研究所用的受体菌为库斯塔克亚种无质粒突变株 BMB171 而不是 Bt 幕虫亚种,受体菌染色体背景的不同或许会影响到 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 表达进而影响到晶胞粘连现象,另外 Bt 幕虫亚种中的质粒^[3]也可能对晶胞粘连现象有所影响。本研究得到了 Bt 幕虫亚种 T02 仅消除 *cry26Aa* 所在质粒的菌株 BMB1151 和其无质粒菌株 BMB1152;将 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 分别和同时在 BMB1152 中表达,发现晶体与芽胞独立存在不能粘连,表明在幕虫亚种染色体背景下仅仅晶体蛋白基因的表达不能形成晶胞粘连现象,从而推测晶胞粘连现象与 Bt 幕虫亚种内生质粒有关;将 *cry26Aa* 在 BMB1151 中表达,发现晶体与芽胞也不能粘连,进一步推测晶胞粘连现象与 *cry26Aa* 所在内生质粒有关。本研究为进一步阐述晶胞粘连的机制指明了研究的方向和提供了很好的受体材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:所用菌株和质粒见表 1。苏云金芽胞杆菌 T02 菌株由本室保藏。用 LB 培养基于 30℃ 培养苏云金芽胞杆菌,37℃ 培养大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

基金项目:国家自然科学基金(30470026),国家 973 项目(2003CB114201),国家 863 计划(2003AA223081,2004AA214092)

* 通讯作者。Tel: 86-27-87283455; Fax: 86-27-87280670; E-mail: jmsun@mail.hzau.edu.cn

作者简介:鞠守勇(1981-),男,山东人,硕士研究生,主要从事苏云金芽胞杆菌分子生物学研究。E-mail: Williams@webmail.hzau.edu.cn

其他作者:汤治国,张 睿

收稿日期:2006-04-25;接受日期:2006-05-30;修回日期:2006-06-07

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

表 1 菌株和质粒

Table 1 The bacteria and plasmids used in this work

Strains/plasmids	Characteristics	Sources
<i>Bacillus thuringiensis</i>		
T02	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>finitimus</i>	Stored in this lab
BMB1151	T02 curing of the plasmid harboring <i>cry26Aa</i>	This work
BMB1152	T02 curing of all resident plasmids	This work
BMB1153	BMB1152 derivative with plasmid pBMB0617	This work
BMB1154	BMB1152 derivative with plasmid pBMB0619-R	This work
BMB1155	BMB1152 derivative with plasmids pBMB0617 and pBMB0619-R	This work
BMB1156	BMB1151 derivative with plasmid pBMB0617	This work
Plasmids		
pHT304	Shuttle vector, Amp ^r , Erm ^r , 6.6kb	Stored in this lab ^{6]}
pBE2	Shuttle vector, Amp ^r , Neo ^r , 6.4kb	Stored in this lab ^{7]}
pBMB0617	pHT304 containing full <i>cry26Aa</i> gene	This work
pBMB0619-R	pBE2 containing full <i>cry28Aa</i> gene	This work

1.1.2 培养基 :Bt 幕虫亚种 T02 菌株质粒突变株的筛选采用 SCG 培养基^[8], 筛选转化子的选择培养基是在 LB 培养基中分别加入红霉素(Erm) 25 μ g/mL, 新霉素(Neo) 5 μ g/mL。

1.1.3 生化试剂 :DNA 限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品。

1.1.4 检测引物 :由北京奥科有限公司合成。

1.2 重组质粒的构建

大肠杆菌质粒的提取、酶切、连接、转化均按文献 9 进行, 苏云金芽胞杆菌质粒的提取类似大肠杆菌质粒的碱裂解法, 但需 30 $^{\circ}$ C 培养菌体, 且加 Solution I 震荡悬浮菌体后, 每 100 μ L 菌悬液要加 10 μ L 溶菌酶(浓度 50mg/mL)冰上作用 2h 以上, 细胞壁溶解后再加 Solution II。

1.3 Bt 幕虫亚种 T02 菌株质粒的消除

参考文献 8 将 Bt 幕虫亚种 T02 菌株 30 $^{\circ}$ C 过夜活化, 转接 1/50 到新鲜的含有 0.025% SDS (sodium dodecyl sulphate) 的 LB 液体里面 44 $^{\circ}$ C 培养 24h, 稀释涂布到 SCG 培养基^[8]中 44 $^{\circ}$ C 培养 72h。

1.4 脉冲电泳

参考文献[10]制备包埋块。电泳条件: 0.5 \times TBE, 起始脉冲时间 1.0ms, 终止脉冲时间 25.0ms, 转换角度 120 度, 电压 6V/cm, 电泳时间 20h。

1.5 PCR 扩增及预期片段的检测

依据 *cry26Aa* 序列设计引物 p26-1 (5'-ACGATGATTGTTCCAGTCT-3') 和 p26-2 (5'-ATCTTCCTACAACAAACGGT-3'), 扩增 830bp 片段检测 *cry26Aa* 是否存在。同理依据 *cry28Aa* 的序列设计引物 p28-1 (5'-GTATTGGACCGAGGAGATGA-3'), p28-2 (5'-TCAGCGACATCATTCGCGTC-3') 扩增 959bp 片段检测 *cry28Aa* 是否存在。引物 p26-1 p26-2 p28-1 p28-2 混合扩增, 设定扩增循环条件: 94 $^{\circ}$ C 5min;

94 $^{\circ}$ C 1min, 51 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5min。将产物点于 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳, 检测预期大小片段是否存在。

1.6 苏云金芽胞杆菌质粒的电转化

按文献 11 的方法进行操作。

1.7 杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE

Bt 菌株用 ICPM 培养基(蛋白胨 0.16%, 葡萄糖 0.15%, CaCO₃ 0.11%, MgSO₄ 0.105% ~ 0.11%, KH₂PO₄ 0.105%, 调节 pH 值 7.0) 培养。Bt 芽胞和伴胞晶体的收集, 晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析等其它操作参照文献 12 所述方法。

1.8 苏云金芽胞杆菌的复红简单染色

按文献 13 的方法进行操作。

2 结果和分析

2.1 晶体蛋白基因 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 的克隆

张睿等(2005)已经克隆出了基因 *cry26Aa* 和 *cry28Aa*^[4], 本研究从 T02 菌株中重新克隆了基因 *cry26Aa* 和 *cry28Aa*, 并测定了其核苷酸序列, GenBank 注册号分别为 DQ242519 和 DQ242520。这两个基因被苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因命名委员会命名为 *cry26Aa2* 和 *cry28Aa3*。

2.2 Bt 幕虫亚种 T02 菌株质粒消除突变株的筛选

按 1.3 中的方法, 对 T02 菌株进行质粒消除, 从处理过的 SCG 平板上随机挑取 2162 个单菌落通过 PCR 检测质粒消除情况, 75 个菌落消除了 *cry26Aa*, 定名为 A 类菌; 19 个菌落同时消除了 *cry26Aa* 和 *cry28Aa*, 定名为 B 类菌。从两类菌中各随机挑取三株按 1.4 中描述的方法做脉冲电泳, 检测其质粒组成情况。图 1 表明突变株 A-1, A-2, A-3 都消除了第二个质粒, 说明 *cry26Aa* 定位于此质粒(简称 plasmid 26)上, 选取菌株 A-2 定名为 BMB1151, 同时

消除了 3 个质粒的无质粒菌株 B-3 定名为 BMB1152。

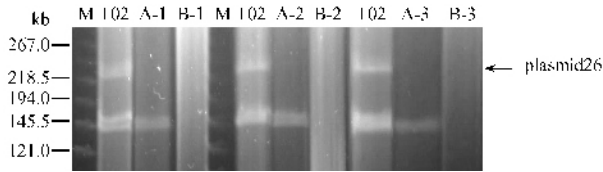


图 1 幕虫亚种 T02 及其突变株质粒的脉冲电泳

Fig. 1 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) of plasmids in strain T02 and its mutants.

2.3 晶体蛋白基因 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 在 BMB1151 和 BMB1152 中的表达

将 *cry26Aa* 基因连接到 pHT304 构建成了穿梭质粒 pBMB0617; 将 *cry28Aa* 基因连接到 pBE2 构建成了穿梭质粒 pBMB0619-R。

2.3.1 晶体蛋白基因 *cry26Aa*、*cry28Aa* 在 BMB1152 分别表达及共表达: 用电转化法将质粒 pBMB0617 和 pBMB0619-R 分别导入 BMB1152 中, 得到转化子 BMB1153 和 BMB1154, 将质粒 pBMB0617 和 pBMB0619-R 共同导入突变株 BMB1152, 得到转化子 BMB1155。将转化子 BMB1153、BMB1154、BMB1155

在 ICPM 固体平板上培养 72h, SDS-PAGE 检测形成的蛋白大小与 T02 大小一致如图 2。复红简单染色观察产生的伴胞晶体情况如图 3(D, E, F)。SDS-PAGE (图 2) 检测发现转化子 BMB1154 中能表达 *cry28Aa* 基因, 但是显微观察没有看到典型的晶体 (图 3-E), 推测是晶体很小显微观察不到。图 3 显示转化子形成的晶体与芽胞都不粘连, 表明在染色体背景下 *cry26Aa* 与 *cry28Aa* 基因的分别表达和共表达都不能形成晶胞粘连现象, 从而推断晶胞粘连现象与幕虫亚种的内生质粒有关。

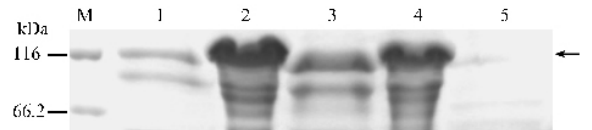


图 2 Bt 幕虫亚种 T02、BMB1152 和转化子 BMB1153、BMB1154、BMB1155 晶体蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-PAGE of crystal proteins of *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* T02, BMB1152 and transformants: BMB1153, BMB1154 and BMB1155. 1: T02 2: BMB1153 3: BMB1154 4: BMB1155 5: BMB1152. The arrow indicates Cry26Aa (131kDa) and Cry28Aa (127kDa).

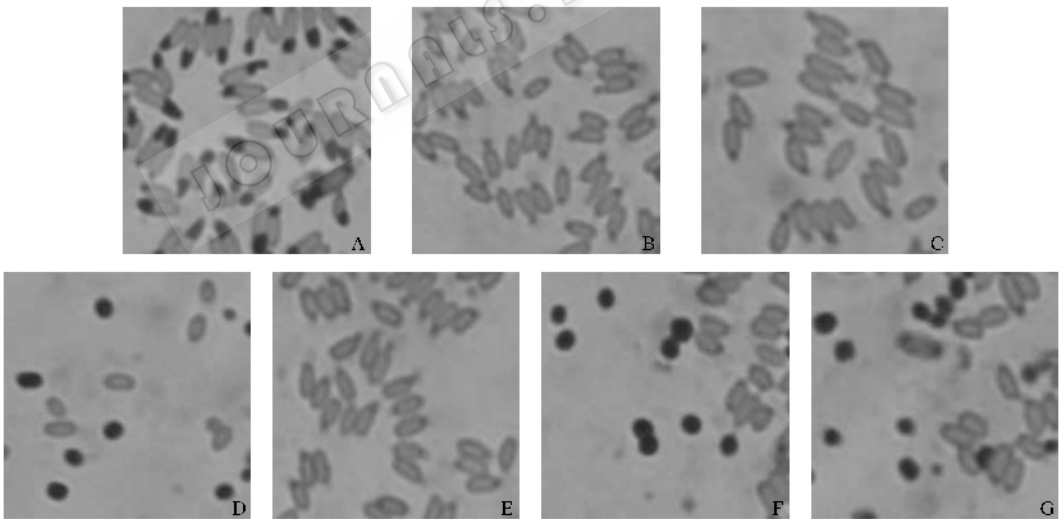


图 3 Bt 幕虫亚种 T02 (A) 及其突变株 BMB1153 (B), BMB1152 (C) 以及转化子 BMB1153 (D), BMB1154 (E), BMB1155 (F) 和 BMB1156 (G) 产生的芽胞和伴胞晶体

Fig. 3 Photograph of parasporal crystals and spores of *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* T02 (A), BMB1153 (B) and BMB1152 (C) and transformants: BMB1153 (D), BMB1154 (E), BMB1155 (F) and BMB1156 (G).

2.3.2 晶体蛋白基因 *cry26Aa* 在 BMB1151 中的表达: 将 pBMB0617 转化 BMB1151 得到转化子 BMB1156, 将 BMB1156 在 ICPM 固体平板上培养 72h。复红简单染色观察产生的伴胞晶体情况图 3-G, 晶体与芽胞独立存在, 不能粘联, 进一步推断幕虫亚种晶胞粘连现象与 *cry26Aa* 所在质粒中的其他

因子有关。

3 讨论

通过消除 T02 菌株的质粒得到了仅消除质粒 plasmid26 的 A 类菌和同时消除了质粒 plasmid26 和 *cry28Aa* 所在质粒 (简称 plasmid28) 的 B 类菌, 而没

有得到单独消除 plasmid28 的菌株, 通过大量的 PCR 都没有筛选到单独消除 plasmid28 的菌株, 由此推测可能 plasmid28 与 plasmid26 存在着一定的联系, 在消除 plasmid28 同时 plasmid26 也被消除。

Wojciechowska 等(1999)推测晶胞粘连现象与 *cry26Aa* 有关^[5], 但本研究将 *cry26Aa* 在 T02 无质粒突变株 BMB1152 中单独表达发现晶体不与芽胞粘连, 表明在幕虫亚种 T02 染色体背景下, 仅仅 *cry26Aa* 的表达不足以引发晶胞粘连现象; 进一步将 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 共同在 BMB1152 中表达也观察到晶体与芽胞独立存在不能粘连, 说明 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 的共表达也不足以形成晶胞粘连现象; 从而推测幕虫亚种晶胞粘连现象与内生质粒有关。

晶胞粘连形成的机制可能很复杂, 仅仅单个质粒的作用^[3]或者仅仅染色体背景下表达 *cry* 基因都不能形成典型的晶胞粘连, 推测是质粒上包括 *cry* 基因在内多种基因与染色体上的因子共同调控的结果。本研究中 *cry26Aa* 在仅消除了 plasmid26 的菌株 BMB1151 中表达, 形成的晶体与芽胞独立存在不能粘连, 更进一步推测幕虫亚种晶胞粘连现象与 plasmid26 上的其它因子的作用有关。从而为进一步研究晶胞粘连的分子机制指明了研究方向并且提供了很好的受体材料。由此启示我们的下一步工作克隆出 plasmid26 中不同的片段, 连接到载体上并转化 BMB1156, 使 BMB1156 回复晶胞粘连现象,

从而揭示晶胞粘连现象的分子机制。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] Schnepf HE, Crickmore N, Rie JV, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 775 - 806.
- [3] Debro L, Fitz-James PC, Aronson A. Two different parasporal inclusions are produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriology*, 1986, **165**(1): 258 - 268.
- [4] 张睿, 赵昌明, 喻子牛, 等. 苏云金芽胞杆菌 *cry26Aa* 和 *cry28Aa* 基因共表达可在芽胞外壁内侧形成伴胞晶体. *微生物学报*, 2005 **45**(6): 955 - 958.
- [5] Wojciechowska JA, Lewitin E, Revina LP, et al. Two novel delta-endotoxin gene families *cry26* and *cry28* from *Bacillus thuringiensis* ssp. *finitimus*. *FEBS Letters*, 1999 **453**: 46 - 48.
- [6] Arants O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 1991, **108**: 115 - 119.
- [7] 郭兴华, 熊占, 周民, 等. 枯草杆菌大肠杆菌多功能穿梭载体的构建. *生物工程学报*, 1991, **7**(3): 224 - 229.
- [8] 李林, 杨超, 刘子铎, 等. 苏云金芽胞杆菌无晶体突变株的逐级升温筛选及其转化性能. *微生物学报*, 2000, **41**(1): 85 - 90.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [10] Rondon MR, Raffel SJ, Goodman RM, et al. Toward functional genomics in bacteria: analysis in gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **96**: 6451 - 6455.
- [11] Laura A, Silo-Suh, Benjamin J, et al. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(6): 2023 - 2030.
- [12] 孙明, 吴岚, 刘子铎. 苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry218* 的克隆和表达. *农业生物技术学报*, 1996, **4**(3): 293 - 297.
- [13] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002.

The plasmid harboring *cry26Aa* may contribute to the phenomenon of spore-crystal connection in *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*

JV Shou-yong, JI Fang, ZHU Zi-min, YU Zi-niu, SUN Ming*

(College of Life Science and Technology, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Parasporal crystal in *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* T02 forms inside the exosporium and remains attached to the spore after mother cell lysis. Two crystal protein gene *cry26Aa* and *cry28Aa* were cloned from this strain. The relationship between the phenomenon of spore-crystal connection and the plasmids was investigated in this work. Mutants BMB1151 curing of the plasmid harboring *cry26Aa*, and BMB1152 curing of all plasmids were obtained from *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* T02. The spore-crystal connection didn't appeared when *cry26Aa* and *cry28Aa* were transformed back into the strain BMB1152 by shuffle vector alone or in combination together. It suggested the plasmids of *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* T02 may contribute to the phenomenon. When gene *cry26Aa* was transformed back into the strain BMB1151, spore-crystal connection didn't form either. So the plasmid harboring *cry26Aa* may also contribute to the phenomenon of spore-crystal connection in *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* T02.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Spore-crystal connection; *cry26Aa*; *cry28Aa*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30470026); National Basic Research Program of China (2003CB114201); Chinese National Program for High Technology Research and Development (2003AA223081, 2004AA214092)

* Corresponding author. Tel: 86-27-87283455; Fax: 86-27-87280670; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

Other authors: TANG Zhi-guo, ZHANG Rui

Received: 25 April 2006/Accepted: 30 May 2006/Revised: 7 June 2006