

苏云金芽胞杆菌 *spoIII D* 基因缺失突变株的特点

张茜茜¹, 束长龙¹, 张杰¹, 黄大昉², 宋福平^{1*}

(¹中国农业科学院植物保护所植物病虫害生物化学国家重点实验室, 北京 100193)

(²中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 【目的】构建苏云金芽胞杆菌 *spoIII D* 基因缺失突变株, 并研究其与出发菌株的表型及性质差异。【方法】采用基因同源重组技术敲除了苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株中的 *spoIII D* 基因, 构建了 *spoIII D* 缺失突变株, 测定生长曲线, 并通过扫描电子显微镜观察, 芽胞计数分析及 SDS-PAGE 蛋白电泳比较突变株与出发菌株的差异。构建遗传互补菌株, 观察菌株性状的回复情况。【结果】通过温敏载体同源重组敲除技术获得了苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *spoIII D* 基因缺失突变株, 生长曲线测定表明, 突变株较出发菌株在平稳期后期生长较缓和, 扫描电子显微镜观察和芽胞计数分析显示, 突变株基本丧失了形成芽胞的能力, 但依然形成晶体。SDS-PAGE 结果显示, 在 SSM 培养基中, 突变株对伴胞晶体蛋白的形成量影响并不显著; 在营养较富集的 Luria-Bertani 培养基中, 突变株中伴胞晶体蛋白的形成量较野生型和互补株明显降低。利用载体 pHT315 携带 *spoIII D* 操纵子互补突变株, 互补株恢复了产生晶体和芽胞的能力。【结论】本研究证明 *spoIII D* 基因是苏云金芽胞杆菌芽胞形成所必需, 同时与晶体蛋白的表达相关。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 芽胞; 杀虫晶体蛋白; *spoIII D* 基因; 突变

中图分类号: Q936 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)09-1165-06

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一类广泛存在于土壤中的革兰氏阳性菌, 在芽胞形成的同时能够积累大量的 δ -内毒素(Delta-Endotoxin)并形成晶体, 杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal protein, ICPs)对许多昆虫具有特异性的毒杀作用^[1]。研究表明参与芽胞形成的重要调控因子 SigmaE 和 SigmaK 通过识别 *cryI* 或 *cry2* 类杀虫晶体蛋白基因的双启动子 Bt I 和(或)Bt II 来直接控制绝大多数 *cry* 基因的转录^[2], 而其它与芽胞形成相关的因子是否影响 *cry* 基因表达的研究还较少。

根据对模式菌株枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*, Bs)的研究发现, 芽胞形成的调控是通过级联反应实

现的。随着菌体密度增加、营养匮乏等不利因素的出现, Spo0A 因子被激活, 这标志着芽胞形成的开始。在芽胞形成的不同阶段, 信号蛋白在母细胞和前芽胞之间的信号传导。在母细胞中, 信号依次激活 *pro-sigmaE*、*spo III D*、*pro-sigmaK* 和 *gerE* 基因的表达, 并最终引导芽胞的产生。对枯草芽胞杆菌的研究发现, *spoIII D* 是信号传导通路中的一个重要的调控基因, 其编码的 Spo III D 蛋白, 属于小型序列特异性 DNA 结合蛋白, 可以与 SigmaE、SigmaK 因子参与转录的多个基因的启动子区域结合, 对这些基因的转录起激活或抑制作用, 例如 Spo III D 对 *cotC*、*cotD*、*spoIII D* 等基因具有转录负调控作用, 而对 *gerE*、*cotT*

基金项目: 国家 973 项目(2009CB118902); 国家 863 计划(2006AA10A212)

* 通信作者。Tel: +86-10-62896634; Fax: +86-10-62812642; E-mail: fjsong@ippcaas.cn

作者简介: 张茜茜(1983-), 女, 河北廊坊人, 硕士研究生, 主要从事苏云金芽胞杆菌功能基因组学的研究。Tel: +86-10-62815923; E-mail: peregrine2018@gmail.com

收稿日期: 2009-04-23; 修回日期: 2009-05-20

等基因具有转录正调控作用^[3-4]。

本研究利用同源重组技术构建了 HD-73 菌株中的 *spoIII D* 基因缺失突变株,分析了突变株生长情况、形成芽胞和晶体的能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基:所用菌株与质粒见表

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
Strains		
<i>E. coli</i> JM110	<i>Rpsl thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	This Lab
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rpsl thr leu endA dcm supE44 proAB</i>	This Lab
<i>Bt</i> HD-73	<i>Bt</i> strain carrying <i>cry1Ac</i> gene	This Lab
<i>Bt</i> HD-73(HD△ <i>spoIII D</i>)	HD-73 Mutant type ,HD△ <i>spoIII D</i>	This study
<i>Bt</i> HDHF <i>spoIII D</i>	Genetically complementary strain ,containing pHTHF <i>spoIII D</i> plasmid	This study
Plasmids		
pMAD	<i>Bt-E. coli</i> shuttle ,temperature-sensitive plasmid ,Amp ^r ,Ery ^r	[6 - 7]
pMAD <i>spoIII D</i>	pMAD carrying partial <i>spoIII D</i> gene	This study
pHT315	Amp ^r ,Erm ^r , <i>E. coli-Bt</i> shuttle vector ,6.5 kb	[8]
pHTHF <i>spoIII D</i>	Amp ^r ,Erm ^r pHT315 carrying <i>PspoIII D-spoIII D</i> gene	This study

1.1.2 酶和生化试剂: *Taq* DNA 聚合酶购自于博迈德生物技术公司; *KOD* DNA 聚合酶购自于 TOYOBO 生物技术公司、PCR 产物回收试剂盒购自于 AXYGEN 公司,相关的内切酶和 *T₄* DNA 连接酶均购自于北京六合通公司。营养肉汤购于北京奥博星生物技术有限责任公司,其它生化试剂和抗生素均为进口或国产生化级或分析纯级试剂。

1.2 细菌的培养条件

苏云金芽胞杆菌在 30℃ 培养;在突变过程中苏云金芽胞杆菌的培养温度为 37℃,摇床转速为 220 r/min,红霉素使用浓度为 5 μg/mL。大肠杆菌 JM110 在 37℃ 培养,摇床转速为 230 r/min,氨苄霉素使用浓度为 100 μg/mL,红霉素使用浓度为 5 μg/mL。

1.3 DNA 操作、转化、PCR

大肠杆菌质粒提取及转化,DNA 片段纯化参考文献[9]。苏云金芽胞杆菌总 DNA 提取^[10]和电击转化参考文献[11]。序列比对和搜索使用美国国立生物技术信息中心(NCBI)的基本工具 PSI-Blast 及 Blastx。根据 *Bt* 97-27 菌株的基因组序列设计引物,用于 *spoIII D* 基因的克隆与测序。PCR 反应采用 50 μL 体系,反应条件:94℃,5 min;94℃,1 min;55℃,1 min;72℃,2 min;30 个循环;72℃,10 min。

1.4 缺失突变株的构建

pMAD 是大肠杆菌-苏云金芽胞杆菌穿梭载体,

1. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)的培养采用 Luria-Bertan(LB)培养基;*Bt* 的培养采用芽胞生成培养基(Schaeffer's sporulation medium,SSM)^[5](营养肉汤 8 g,1.2% MgSO₄ 10 mL,10% KCl 10 mL,1 mol/L NaOH 1 mL,定容至 997 mL,1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min,补加过滤除菌的 1 mmol/L FeSO₄ 1 mL,1 mol/L Ca(NO₃)₂ 1 mL,10 mmol/L MnCl₂ 1 mL)。

含有革兰氏阳性菌温度敏感型的复制区,用于同源重组,进行基因敲除操作,方法参考文献[6-7]。根据 HD-73 菌株中的 *spoIII D* 基因及上下游片段的 DNA 序列设计引物引物 *spo3D1h*(5'-CGCGGATCCC-ACAAACGGAAGATCCAGCA-3')和 *spo3D2h*(5'-GATGTTTGCTACTGTAACGATTTCTCACCTCAAAC-3')配对扩增上游 1.2 kb 的 DNA 片段;引物 *spo3D3h*(5'-GTTTGAGGTGAGAAATCGTTACAGTAGCAAAC-ATTC-3')和 *spo3D4h*(5'-TCCCCCGGGGTCCGATGAT-ATCTGCAGATAATTC-3')配对扩增下游 1.1 kb 的 DNA 片段。通过重叠 PCR 方法将获得缺失了 *spoIII D* 基因的重组拷贝,大小为 2.3 kb。再将重组拷贝用 *Bam*HI 和 *Sma*I 进行双酶切处理后插入到载体 pMAD 的相应位点之间,得到了重组质粒,并将该质粒命名为 pMAD*spoIII D*。将重组质粒 pMAD*spoIII D* 电击转入 HD-73 菌株,经筛选获得阳性转化子。经 37℃ 诱导载体突变后,对不抗红霉素的菌落进行筛选鉴定,在重组片段外侧设计引物 3DjyF(5'-GATG-ATGGAATGCCGAGGAAGAAA-3')与引物 *spo3D4h* 配对进行 PCR 检测,鉴定结果与预期相符,获得 *spoIII D* 基因缺失突变株。

1.5 互补株的构建

根据 *Bt* 97-27 中 *spoIII D* 基因的序列,设计了的一对引物 HF*spoIII DFz*(5'-CCCAAGCTTATATAAAA-

ATACTCAATTTTCGAG-3') 和 HF $spoIII DR\Delta$ (5'-CGCGG-ATCCTTATTGACGTACAGGCTTCTCTAC-3') 用于扩增 *spoIII D* 全长操纵子序列(含启动子),扩增得到的 *spoIII D* 基因全长片段与穿梭载体 pHT315 连接,转化大肠杆菌 JM110,获得重组质粒 pHT $spoIII D$,继而转化 HD $\Delta spoIII D$ 菌株,获得互补株,命名为 HDHF $spoIII D$ 菌株。

1.6 生长情况分析

将各菌株接种于 SSM 培养基中 220 r/min、30℃ 培养,每 2 h 取样,利用分光光度计测定在 600 nm 的吸光值 OD_{600} ,确定各菌株的生长曲线,并确定 T_0 (T_0 是对数生长期结束的时间, T_n 是距离 T_0 前后的时间)。

1.7 显微镜观察

利用光学显微镜和电子扫描显微镜观察 Bt 菌株产生芽胞和形成蛋白晶体的能力。光学显微镜:将胞晶混合液滴于载玻片上,涂抹均匀,烘干固定,石炭酸复红染液染色 3 min,清水冲洗,100x 油镜进行镜检,石炭酸复红染液配制方法参见文献[12]。扫描电镜制样:胞晶混合液滴于玻璃片上,干燥,经锇酸固定,而后经酒精梯度脱水,临界点干燥,离子溅射喷金(2 nm),New Bio-TEM H-7500 扫描电镜观察拍照。

1.8 活芽胞计数分析

取已释放芽胞的培养液进行适度稀释,80℃ 热处理 15 min 后涂营养平板,24 h 后记录平板上长出的单克隆,即为活芽胞数。

1.9 菌株表达杀虫晶体蛋白能力分析

将各菌株接种于 SSM 培养基中 220 r/min、30℃ 培养,在菌体即将裂解之前取样,13000 g 离心 1 min,取适量水重悬至 OD_{600} 值一致,取相同量菌液,经破碎后,利用 SDS-PAGE 检测菌株产生的杀虫晶体蛋白,方法参见参考文献[9,13]。

2 结果

2.1 *spoIII D* 基因的克隆与序列分析

用引物 $spoIII DF$ (5'-GAGTGTGTTGAGGTGAGAA-ATCGTGA-3')与 $spoIII DR$ (5'-TACCTTTATTGACGTACCGGCTTTT-3')扩增 HD-73 基因组得到 HD-73 中 *spoIII D* 基因全长,经过测序并在 Genbank 登录,登录号为 FJ946513。HD-73 *spoIII D* 基因的核苷酸序列与 Bt 97-27 的同源性为 98%,与炭疽芽胞杆菌 *B. anthracis* str. Ames 和 *B. cereus* ATCC 10987 的同源性为 98%,与 *B. subtilis* str. 168 相似性为 74%。

HD-73 *spoIII D* 基因氨基酸序列与 Bt 97-27 的同源性为 99%,与 *B. cereus* ATCC 10987 的同源性为 98%,与 *B. anthracis* str. Ames 的同源性为 97%,与 *B. subtilis* str. 168 相似性为 85%,这说明 *spoIII D* 基因在芽胞杆菌属,尤其是在蜡样芽胞杆菌族中具有较强的保守性。

2.2 HD-73 *spoIII D* 基因缺失突变株的获得

对所获得的突变株进行 PCR 鉴定,用重组片段外侧设计引物 3DjyF 与 $spo3D4h$ 配对进行扩增,其结果见图 1,野生型菌株扩增结果大小为 2.9 kb,突变株菌株扩增结果大小为 2.5 kb,与设计位点序列的大小一致,说明突变株正确,命名为菌株 HD $\Delta spoIII D$ 。

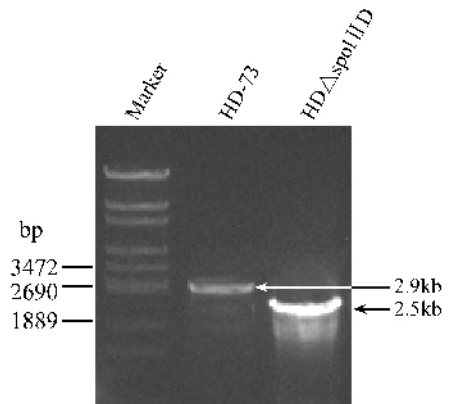


图 1 突变株 HD $\Delta spoIII D$ 的鉴定

Fig. 1 Identification of the mutant strain HD $\Delta spoIII D$.

2.3 野生型、突变株、互补株菌体生长情况对比

生长曲线测定结果表明(图 2):野生型、突变株、互补株的生长速度在对数生长期差别不大,进入稳定期后突变株 HD $\Delta spoIII D$ 生长逐渐变缓,这表明 *spoIII D* 对菌体在稳定期后期的生长有一定的影响;互补株 HDHF $spoIII D$ 的生长情况得到了一定的恢复。

2.4 突变株的产生芽胞和杀虫蛋白晶体的能力

用 1/2LB 固体培养基培养 HD-73 野生型菌株、突变株 HD $\Delta spoIII D$ 、互补株 HDHF $spoIII D$ 。经过 48 h 培养后,用电子显微镜观察野生菌株、突变株、互补株的细胞均已完全裂解,野生型菌株和互补株都释放出大量卵圆形的芽胞和菱形晶体(图 3-A, C),而突变株中只可见菱形晶体,未见芽胞(图 3-B)。这说明 *spoIII D* 基因的缺失导致 HD-73 菌株丧失了产生芽胞的能力。活芽胞计数分析显示,突变株已基本丧失了产生芽胞的能力(图 4)。各菌株在 LB 培养基中培养至 64 h 和 SSM 培养基中培养至 T_{19} ,至细胞裂解前,利用 SDS-PAGE 检测 Cry 蛋白表

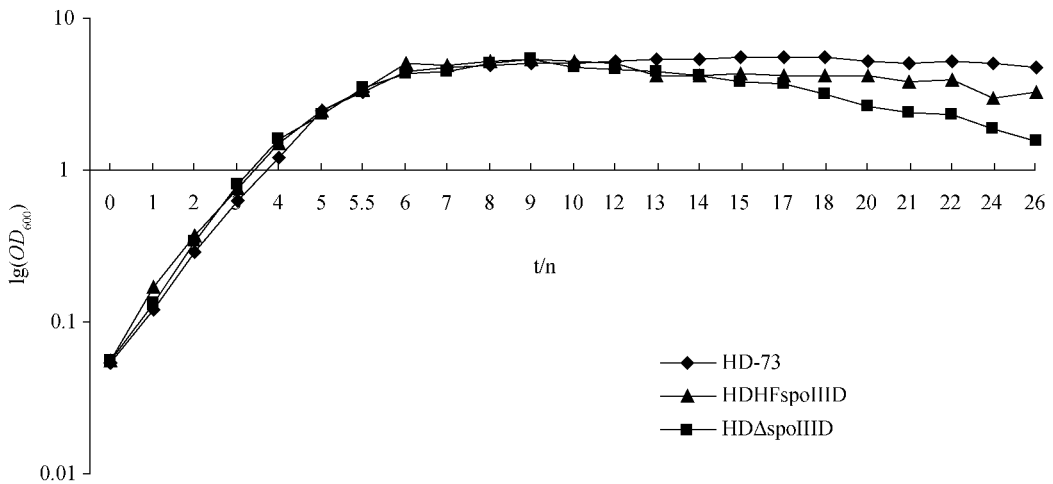


图2 菌株的生长速率比较

Fig.2 Comparison of the growth speed of Bt strains.

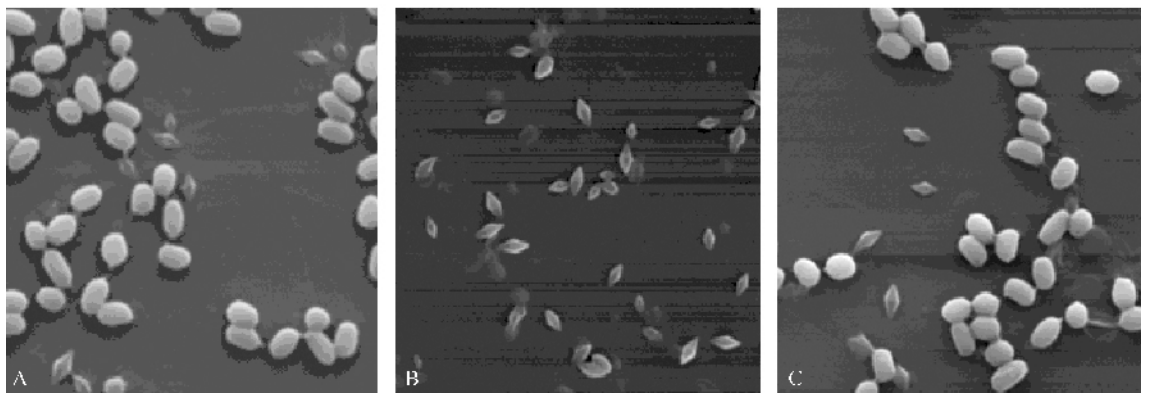
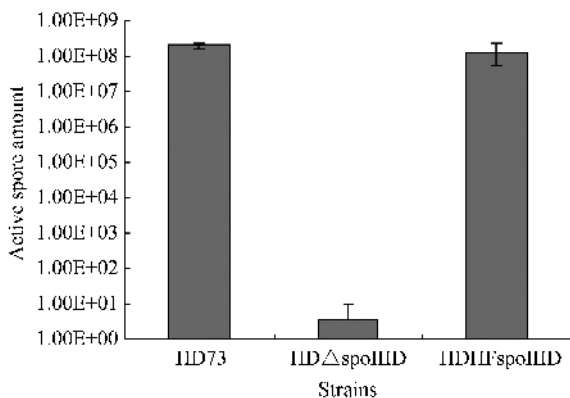


图3 不同菌株的扫描电镜观察结果

Fig.3 Scanning electron microscopic images of different strains. A: HD-73; B: HDΔspoIIID; C: HDHFspoIIID.

达情况,在 LB 培养基中,突变株 HDΔspoIIID 产生杀虫晶体蛋白(130 kDa)的能力要低于出发菌株和互补株(图 5-A);在 SSM 培养基中,出发菌株 HD-73、突变株 HDΔspoIIID、互补株 HDHFspoIIID(图 5-B)产生杀虫晶体蛋白(130 kDa)的能力区别不大。



不同菌株活芽孢计数分析

Fig.4 Active spores analysis of different strains.

3 讨论

在芽孢形成的过程中, *spoIII D* 基因于芽孢形成的第三阶段进行表达,下列四个因子, SigmaE、SpoIII D、SigmaK、GerE 先后作用,控制芽孢形成的一系列基因的转录与调控,其中 SigmaE、SigmaK 作为转录 Sigma 因子, *spoIII D* 基因与 *gerE* 基因类似,其表达产物为小型序列特异性 DNA 结合蛋白,主要对 SigmaE 或 SigmaK 因子控制转录的相关基因起特异性激活或者抑制的转录调控作用。

本研究通过同源重组方法构建了 *spoIII D* 基因缺失突变株,发现突变株不能正常产生芽孢,但能产生晶体蛋白。通过遗传互补,使突变株重新恢复了产生芽孢的能力,证明 *spoIII D* 基因为菌体产生芽孢所必需。SDS-PAGE 发现,突变株产生晶体蛋白的能力在较贫瘠的 SSM 培养基中没有明显变化,而在营养较丰富的 LB 培养基中,低于野生型和互补株。

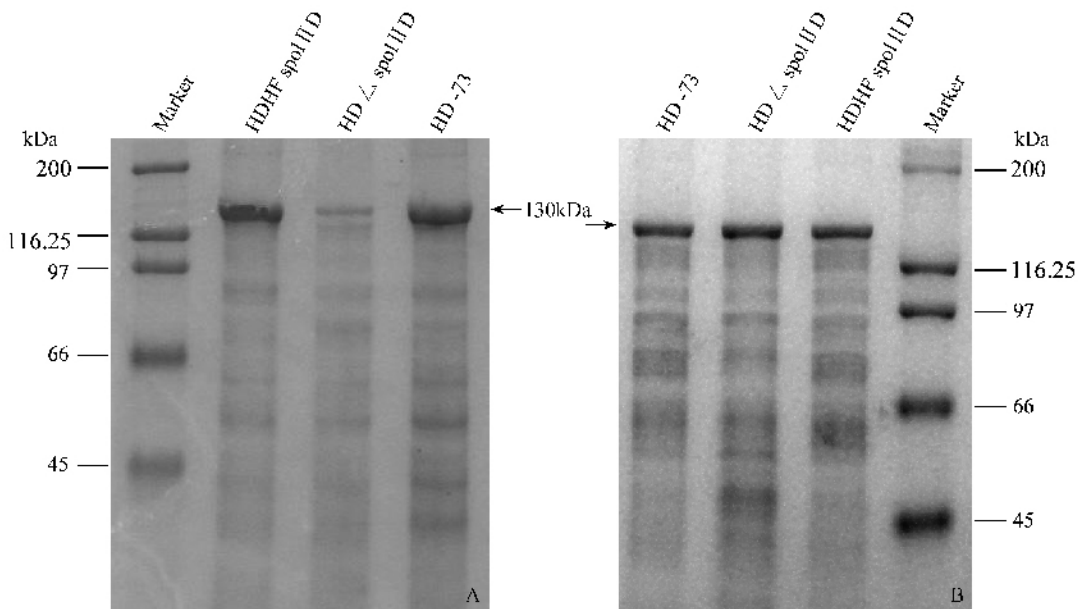


图5 不同菌株产生杀虫晶体蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the production of ICPs from different strains. A LB medium B SSM medium.

目前研究表明,在枯草芽胞杆菌中,*Spo III D* 蛋白对由 *SigmaE* 和 *SigmaK* 因子激活转录的大多数基因表现为抑制转录,对 12 个转录单位表现为激活转录,其中包括 9 个由 *SigmaE* 因子控制的转录单位和 3 个由 *SigmaK* 因子控制的转录单位,例如 *cotF*、*cotT*、*spoIVCA*、*spoIVCB*、*spoVD* 等基因^[4,14],在苏云金芽胞杆菌中,*spoIII D* 基因缺失后导致芽胞形成受阻,有可能是因为抑制了这些基因的转录所致。

研究表明 *cry* 基因的转录由 *SigmaE*、*SigmaK* 识别其双启动子 *Bt I* 和 *Bt II* 来直接控制^[21],*spoIII D* 基因缺失对杀虫晶体蛋白表达的影响,可能由于 *spoIII D* 基因的缺失影响了 *pro-sigmaE*、*pro-sigmaK* 基因的表达所致。*spoIII D* 基因缺失后所获得的这种不产生芽胞而只产生晶体蛋白的新型菌株,在 *Bt* 工程菌的构建上具有重要的应用价值,能有效提高工程菌的田间应用的安全性。虽然 *spoIII D* 基因的缺失使杀虫晶体蛋白的表达有所降低,但是我们可以继续寻找 *spoIII D* 下游其它与芽胞形成有关的调控基因例如 *gerE* 等进行研究。以期发现不产生芽胞而晶体表达影响较小的重组菌株,为 *Bt* 新型工程菌株的构建和为解决 *Bt* 田间应用安全性问题提供良好的解决思路。

参考文献

[1] Schnepf E ,Crickmore N ,Van J ,et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ,1998 62(3) :775 - 806 .

[2] Sedlak M ,Walter T ,Aronson A. Regulation by overlapping promoters of the rate of synthesis and deposition into crystalline Inclusions of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Journal of Bacteriology* 2000 ,182(3) :734 - 741 .

[3] Wang L ,Perpich J ,Driks A , et al. Maintaining the transcription factor *Spo III D* level late during sporulation causes spore defects in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* ,2007 ,189(20) :7302 - 7309 .

[4] Eichenberger P ,Fujita M ,Jensen ST , et al. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biology* , 2004 , 2 (10) :1664 - 1683 .

[5] Jongbloed J ,Martin U ,Antelmann H , et al. *TatC* Is a Specificity Determinant for Protein Secretion via the Twin-arginine Translocation Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2000 275 (52) :41350 - 41357 .

[6] Arnaud M ,Chastanet A ,Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable , low-GC-content , gram-positive bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 2004 70(11) :6887 - 6891 .

[7] 魏娟 ,孙长坡 ,宋福平 ,等. 苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigE* 基因敲除突变株的构建与特点. 微生物学通报(*Microbiology*) 2008 35(10) :1581 - 1586 .

[8] Arantes O ,Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* ,1991 ,108 (1) :115 - 119 .

[9] Sambrook J ,Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂 ,等译. 第三版. 北京 :科学出版社 2002 .

[10] Stobdan T ,Kaur S ,Singh A. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters* 2004 26(14) :1153 - 1156 .

- [11] Lereclus D ,Arantes O ,Chaufaux J ,et al. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis* . *FEMS Microbiology Letters* ,1989 ,5(1) 211 – 217 .
- [12] Stohl EA , Milner JL , Handelsman J. Zwittermicin A Biosynthetic Cluster , *Gene* ,1999 ,237 :403 – 411 .
- [13] 彭琦 ,朱莉 ,宋福平 ,等 . 苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株 *sigL* 基因突变株的特性分析 . 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*) 48(9) :1147 – 1153
- [14] Zhang B ,Daniel RA ,Errington J ,et al. *Bacillus subtilis* Spo III D protein binds to two sites in the *spoVD* promoter and represses transcription by sigmaE RNA polymerase . *Journal of Bacteriology* ,1997 ,179 (3) 972 – 975 .

Characterization of *Bacillus thuringiensis* *spoIII D* gene Mutation

Qianqian Zhang¹ ,Changlong Shu¹ ,Jie Zhang¹ ,Dafang Huang² , Fuping Song^{1*}

(¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests ,Institute of Plant Protection ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Beijing 100193 ,China)

(² Btotechnology Research Institute ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Beijing 100081 ,China)

Abstract [**Objective**] Construction and characterization of a *spoIII D* gene deletion mutant of *Bacillus thuringiensis* . [**Methods**] Scanning electron microscopy and spore formation analysis were used to detect the ability of sporulation and formation of crystal protein in both the mutant and the wild strain. SDS-PAGE analysis was used to detect the expression of crystal protein. [**Results**] Scanning electron microscopy and spore formation analysis showed that spores were hardly produced and the crystal existed in the *spoIII D* deletion strain. SDS-PAGE results showed that the expression of *cry* gene in the mutant was decreased in Luria-Bertani medium ,but not affected obviously in Schaeffer's sporulation medium (SSM). [**Conclusion**] This indicated that the *spoIII D* gene was one of the essential genes for the sporulation of *Bacillus thuringiensis* ,and influenced the expression of crystal protein.

Keywords : *Bacillus thuringiensis* ; *spoIII D* ; spore ; crystal protein

(本文责编 :张晓丽 ,谷志静)