

苏云金芽孢杆菌生产菌株溶原性噬菌体 *pep* 基因的克隆、表达及功能分析

廖威^{1,2}, 陈维春^{1,3}, 贾艳华¹, 庞义^{1*}

(¹中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

(²广西职业技术学院食品技术系, 南宁 530226)

(³广东医学院生化和分子生物研究所, 湛江 524023)

摘要: 溶原性噬菌体的随机爆发是微生物杀虫剂苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, *B.t*)发酵生产的首要危害。【目的】本文的目的就是通过研究 *B.t* 生产菌株溶原性噬菌体的遗传背景, 以便从分子水平上控制其在生产中的随机爆发。【方法】通过对广东梅州某公司的生产菌株 MZ1 采用 Mitomycin C 进行诱导, 提取噬菌体颗粒 MZTP01 的基因组 DNA, 克隆和表达该噬菌体的 *pep* 基因, 并进行了功能分析。【结果】诱导获得的溶原性噬菌体 MZTP01 斑点清晰, 直径约 1mm, 成斑时间 12h; 从噬菌体基因组 DNA 双酶切(*Hind* /*EcoR*) 片段中回收长度为 2362bp 的 D 片段(Genbank 登录号: AY639599), 又从 D 片段中克隆了长度为 1101bp、编码 367aa、分子量为 47kDa 的 *pep* 基因, 表达载体 M15(pQE30*pep*)在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)中表达获得了 47kDa 的清晰表达带, 在 1h 时开始产生蛋白并有逐步上升的趋势; Western blot 也在 47kDa 处得到一条清晰的条带; 可溶性分析表明 PEP 蛋白在重组菌株中是以不可溶的包含体形式存在的, 该蛋白的产生明显地抑制了宿主的生长速度; 噬菌体 PEP 氨基酸序列之间的同源性比较表明, 噬菌体 MZTP01 PEP 蛋白与来自 *E.coli* K12 噬菌体的 PEP 蛋白的同源性程度最大。【结论】我们获得了一种新的噬菌体 MZTP01, 并首次报道了该噬菌体 D 片段的核苷酸序列及 *pep* 基因的功能, 试验证明 PEP 表达蛋白能够水解酪蛋白, 其活力相当于 0.3mg/mL 的胰蛋白酶。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 溶原性噬菌体; *pep* 基因; 克隆; 功能分析

中图分类号: Q784 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0459-07

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, *B.t*)作为高效又不污染环境的微生物杀虫剂已经广泛地投入生产应用之中, 但是从 83% 的苏云金芽孢杆菌亚种菌株中都能分离到相应的溶原性噬菌体, 在生产中由噬菌体引起的倒罐率轻者为 15%~30%, 重者达到 50%~80%。溶原性噬菌体是 *B.t* 微生物杀虫剂发酵生产的主要危害者^[1]。虽然很早就对噬菌体进行了分子生物学的研究, 但是发酵生产中导致溶原性噬菌体诱发为烈性噬菌体的分子机理还不清楚。到目前为止,

有 3 种苏云金芽孢杆菌的溶原性噬菌体的基因组全序列已被测定: *BamH35*, *GIL01* 和 *GIL16*; *BamH35* 基因组全长为 14935bp, 编码 32 个基因, *GIL01* 基因组全长为 14931bp, 编码 30 个基因; *GIL16* 基因组全长为 14844bp, 编码 31 个基因^[2]。

噬菌体 *pep* 基因编码 367aa 的蛋白质, 该蛋白与噬菌体的侵染过程有关^[3,4]。该基因是一个比较保守的基因, 编码的蛋白对噬菌体融合到宿主菌核酸中从而形成了溶原性噬菌体^[5-7]起到了重要的作用。本

基金项目: “十五”国家科技攻关计划项目—发酵工程关键技术研究与重大产品开发课题(2001BA708B07-03); 国家“863计划”(2001AA204011)

*通讯作者: Tel: +86-20-84113860; E-mail: pangy@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 廖威(1964-), 男, 广西人, 博士, 主要从事微生物研究。E-mail: lw@gxzjy.com

收稿日期: 2007-08-09; 修回日期: 2007-12-31

文研究的菌株是广东梅州某公司提供的微生物杀虫剂 *B.t* 生产菌株 MZ1, 该菌株的毒力很高但发酵生产不稳定, 推测其含有溶原性噬菌体; 以 MZ1 为出发菌株, 用 Mitomycin C 诱导, 获得了噬菌体颗粒 (MZTP01); 克隆和表达了该噬菌体的 *pep* 基因及其邻近序列, 并进行了功能分析, 为进一步控制 *B.t* 溶原性噬菌体的随机爆发提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株及其噬菌体: 溶原性噬菌体的宿主菌 MZ1 为广东梅州某公司微生物杀虫剂苏云金芽孢杆菌生产菌株 (*B. t* subsp. *kurstaki*, sv. H_{3a3b3c}); 指示菌 ZK1 (*B. t* subsp. *coreanensis*, sv. H₂₅) 是从本实验室保存的 113 株 *B.t* 菌株中采用交叉裂解法筛选获得的。噬菌体 MZTP01 通过 Mitomycin C 诱导菌株 MZ1 得到。

1.1.2 主要试剂和仪器: 克隆载体质粒和表达菌株 pUC18、pMD-T、pQE30、TG1 和 M15 为本实验室保存; 限制性内切酶和 DNA 片段快速纯化试剂盒, DNA、蛋白电泳的分子量标准均购自 New England 公司; Succinylated Casein、TNBSA、胰蛋白酶标准品均购自 Sigma 公司。凝胶成像系统(创美伟业, GEL MEDIA SYSTEM); 电子显微镜(日本, JEM-1011); 全自动 DNA 测序仪(ABI-PRISM, Model377)。

1.2 噬菌体 MZTP01 的诱导、纯化及其基因组 DNA 的提取和酶切分析等

筛选指示菌 ZK1、测定噬菌体滴度、诱导 MZ1 生产菌株、用透射电子显微镜观察包含体均根据 Yu 和 Si 的方法^[8]进行。抽提及纯化噬菌体基因组 DNA 根据 Sambrook 的方法^[9]进行。目的基因的构建和重组、表达菌株的生长曲线测定根据 Osber 等人的方法^[10]进行。纯化后的重组质粒使用全自动 DNA 测序仪测序(上海博亚公司)。

1.3 *pep* 基因的克隆

根据噬菌体基因组 DNA 双酶切(*Hind* /*EcoR*) 片段中的测序结果, 对 *pep* 开放读码框设计一对引物 (5'-GGATCCATGGGGCCGGATGCGCTGATTATG-3'; 5'-AAGCTTTTACCGTGGGGATTACGCGTGG-3)。以基因组为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 95 5min; 95 1min, 50 1min, 72 1min, 30 个循环; 72 10min。将 PCR 产物接入 T-载体, 用 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切鉴定正确后再连接到 pQE30 克隆载体中进行同样的双酶切鉴定。

1.4 *pep* 基因在 M15 中的表达

pep 基因在 M15 中的表达按照 Sambrook 的方法^[9]进行。表达菌的培养条件为 37 °C, 200 r/min; 蛋白电泳时使用 10% 的聚丙烯酰胺; Western blot 试验参照 pQE30 高效表达及纯化试剂盒的说明操作。

1.5 PEP 蛋白的功能分析

各加入 100μl Succinylated Casein 溶液到两排微孔中, 然后分别加入 50μl 不同浓度的表达蛋白溶液(稀释 10 倍)和标准的胰蛋白酶溶液, 空白对照 Assay Buffer 作同样处理。室温下温浴 20min 后, 再加入 50μl TNBSA 工作液至每个孔中, 又在室温下温浴 20min, 在 450nm 处测量光吸收值。每个浓度下的光吸收值减去相应的空白对照值得到反映酶活力的差值。以标准胰蛋白酶溶液的光吸收差值对蛋白浓度作标准曲线, 然后查找并计算出表达蛋白溶液的酶活力。

1.6 蛋白质同源性的比较

噬菌体 MZTP01 PEP 蛋白氨基酸序列与其它 16 种噬菌体 PEP 蛋白的氨基酸序列进行同源性比较使用软件 DNAsis 和 DNAsar。

2 结果和分析

2.1 噬菌体 MZTP01 基因组 DNA 的酶切 D 片段及其生物学信息学分析

MZ1 菌株经诱导后, 在双层琼脂平板上产生清晰的噬菌体斑点(即 MZTP01), 直径约为 1 mm, 成斑时间 12h, 滴度为 9×10^7 pfu/mL。

噬菌体基因组 DNA 用 *Hind*III/*EcoR* I 酶切后回收 D 片段, 并与 pUC-18 构建成重组子 pUC-D, D 片段测序结果为 2362bp 的核苷酸序列(Genbank 登录号: AY639599)。

对 D 片段进行分析(图 1), 噬菌体 *pep* 基因开放阅读框位于 D 片段的正向序列 141~1240bp 之中, 长度 1101bp, 编码 367aa, 分子量为 47kDa。

2.2 *pep* 基因的克隆鉴定结果

以噬菌体基因组为模板, 对 *pep* 基因进行 PCR 扩增, 获得 1 kb 左右的扩增产物; 重组子 pQE30*pep*、M15(pQE30*pep*)进行 *Bam*H /*Hind* 双酶切, 也都获得了约 1kb 的目的片段。PCR 扩增产物的测序结果为 1101bp, 与 D 片段中 *pep* 基因的理论分析一致。

2.3 *pep* 基因在 M15 中的表达分析

将 M15(pQE*pep*)表达菌株经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 电泳观察到位于 47kDa 处的表达带(图 2-A)。

```

131 CTGAAACCGGTGGTGGAAATGGGGCCGGATGCGCTGATTATGTCGGATCCAGGGCTGATTATGCTG 186
1      M G P D A L I M S D P G L I M L 16
187 GGTGCGTGAGCACTTCCCTGAAATGCCGATCCACCTTTCGGTGCAAGGCTAACGCCGTGAACGGGC 252
17   V R E H L S V Q A N A V N W A T V K R E L G 38
253 GACGGTGAAATCTGGCAGCAAATGGGCCTGACCCGCGTGATCCTCTCTCGCGAGCTGTGCGTGGA 318
39   D G E I L A A N G P D P R D P L S R A V A G 60
319 AGAGATTGAAGAGATCCGCAATCAGGTGCCGGATATGGAGATCGAGATCTTCGTTACAGGCGCGCT 384
61   R D H R D P Q S G A G Y G D R D L R S R R A 82
385 GTGCATGGCCTACTCCGGTCTGCTGCTCTCTGGCTATATCAACAAGCGCGACCCGAACCAGGG 450
83   V H G L L R S L P A L W L Y Q Q A R P E P G 104
451 CACCTGCACCAACGCCTGCCGCTGGGAGTACAACGTCCAGGAAGGGAAAGAAGATGATGTTGGCAA 516
105  H L H Q R L P L G V Q R P G R E R R M C W Q 126
517 CATCGTACACAAGTACGAGCCGATTCCGGTGCAAAATGTTGAGCCGACGCTGGGTATCGGCGCAC 582
127  H R T Q V R A D S G A K C R A D A G Y R R T 148
583 AACCGACAAAGTGTATTGATCGAAGAGGCCAGCGTCCGGGCGAGTATATACCGCGTTTGAAGA 648
149  N R Q S V Y D R R T G P A S G R V Y D R V R R 170
649 TGAGCAGGCACCTACATCATGAACCTCGAAAGATCTGCGCGCCATCGCCATGTAGAACGCCTGAC 714
171  S A R H L H H E L E R S A R H R P C R T P D 192
715 CAAAATGGGCGTGCATTGCTGAAAATCGAAGGTACCAAATCTTTCTACTATTGTGCACGCACCGC 777
193  Q N G R A F A E N R R Y Q I F L L L C T H R 214
778 ACAGGTTTACCGCAAAGCTATCGATGACGCCGCTGCGGGAAAACCGTTTCGATACCAGCCTGCTGGA 843
215  T G L P Q S Y R S R R C G K T V R Y Q P A G 236
844 AACCTGGAAGGTCTGGCGCATCGTGGCTATACCGAAGGTTTCTGCGTCGTACATACTACGACGA 909
237  N S G R S G A S W L Y R R F P A S S Y S R R 258
910 TTATCAGAACTACGAATACGGTTATTTCAGTTTCTGACCGCCAGCAGTTTGTGGTGAGTTTACCGG 975
259  L S E L R I R L F S F Y P P A V C W Y V Y R 280
976 TGAGCGCAAGGGGACCTCGCGGCGGTAGCGGTGAAAAATAAATTCTCCGTTGGCGACAGCCTTGA 1041
281  Y A Q G P R G S G E K G I L R W R Q P A 302
1042 GCTGATGACCGCAAGGCAACATTAATTTTACCCTTGAGCACATGAAAAACGCCAAAGGCGAAGC 1107
303  A D D A A R Q H G F Y P Y A H G K R Q R R S 324
1108 TATGCCGATAGCACAGGCGATGTTTACTGTGTGGCTCCCGTCCCGCAGGATCTTGAGCTCAA 1173
325  Y A D S T R R W L Y C V A P G P A G S S A Q 346
1174 TTACGCGCTGTGATGCGTAATTTCTCCGGGACGGGAAACCACGCGTAATCCCAACGCGTAAGTG 1239
347  L R A A D A * F L R G R G N H A N S P R M 367
    
```

图 1 *pep* ORF 的计算机分析结果

Fig. 1 Computer software analysis of *pep* ORF.

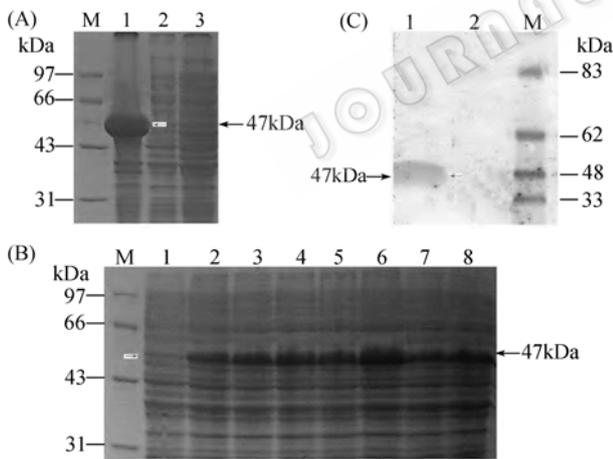


图 2 *pep* 基因的表达产物(A)、表达时相(B)及其蛋白的 Western blot 杂交(C)

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of PEP protein (A) and of time course expression of PEP protein (B) and PEP Western blot hybridization (C). A: lane 1-3: induced M15(pQE_{pep}), M15(pQE_{pep}) and M15; M: protein marker 1. B: Lanes 1-8: induced M15 (pQE_{pep}) of 0-7h after inoculation, respectively. C: Lane 1-3: Rabbit antiserum after and before injection; protein marker 2.

在菌株的整个时期维持较高水平的表达, 从 1h 开始检测到 47kDa 的表达带, 其后表达量有增加的趋势(图 2-B)。Western blot 结果表明, 在 47 kDa 处出现了一条清晰的杂交带(图 2-C), 这些都证明了 *pep* 基因在大肠杆菌中的表达。

2.4 表达菌株包含体的分析及生长曲线的测定

将含有可溶性蛋白的粗提物(上清)与含有不可溶性蛋白的粗提物(沉淀)分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果发现 PEP 蛋白存在于沉淀中, 以不可溶的包含体形式存在。经透射电子显微镜观察, 发现重组质粒的大肠杆菌菌体一头或两头有包含体形成(图 3-A); 而对照组没有包含体(图 3-B), 这进一步说明目的基因在大肠杆菌中的表达, 且表达蛋白的不可溶部分主要以包含体形式存在。图 3-C 是 M15(pQE_{pep})经 IPTG 诱导后产生的菱形包含体蛋白。

另外, 重组菌株 M15(pQE_{pep})经诱导后菌体的生长速度明显降低, *OD*₆₀₀ 的数值比对照组小很多(图 4), 说明表达的 PEP 蛋白可能对 M15(pQE_{pep})有毒,

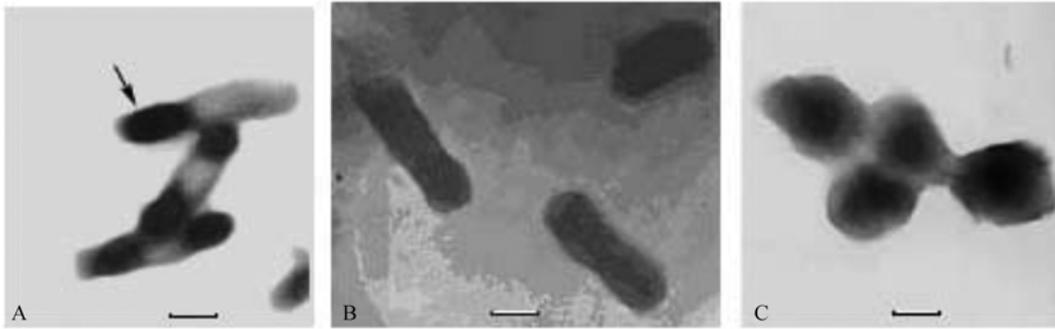


图3 转化重组质粒的大肠杆菌及其包含体的透射电子显微镜图

Fig. 3 Transmission Electron Micrographs of *E. coli* transformed with recombinant plasmids and inclusion bodies. A: the inclusion body in the cell of M15(pQEpep); B: the cell of M15; C: the inclusion body of M15(pQEpep); Bar: 2.5 μ m (magnification : 27,000); Arrows indicated the inclusion bodies.

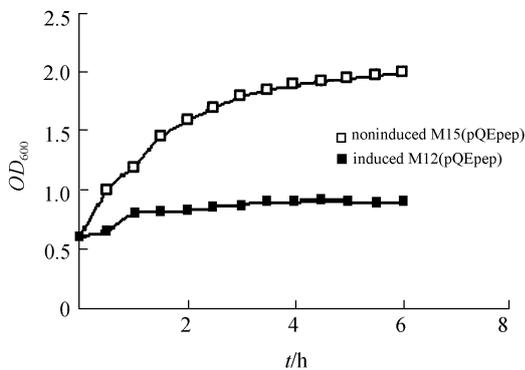


图4 表达菌株 M15(pQEpep)的 IPTG 诱导曲线

Fig. 4 Growth curve of M15(pQEpep) strain induced by IPTG.

影响了宿主的正常生长。

2.5 PEP 蛋白的功能分析及其同源性的比较

经检测标准蛋白酶溶液的光密度吸收值后,对酪蛋白的浓度作图,胰蛋白酶水解酪蛋白形成一条标准的曲线(图5)。经检测 PEP 蛋白的光密度差值为:0.256(实测值)-0.118(对照值)=0.128,查标准曲线得到相当于 0.03mg/mL 的胰蛋白酶活性。因表达蛋白溶液稀释 10 倍,所以原 PEP 蛋白溶液水解酪蛋白的活

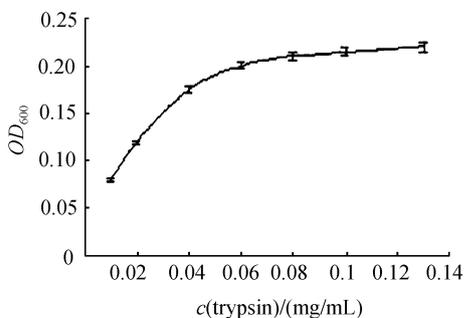


图5 胰蛋白酶水解酪蛋白的标准曲线

Fig. 5 Standard curve of peptidase during casein hydrolysis.

力相当于 0.3mg/mL 的胰蛋白酶活性。该表达蛋白可能为胰蛋白酶。

将噬菌体 MZTP01 PEP 蛋白氨基酸序列与其它 16 种噬菌体 PEP 蛋白的氨基酸序列进行同源性比较,结果表明(表 1),噬菌体 MZTP01 PEP (No.1) 与来自 *E. coli* K12 (No.2) 的噬菌体相比,它们之间的同源性程度达到 100%,与 No.3、No.4、No.5 和 No.8 的噬菌体 PEP 的同源性也比较高,均为 90% 以上;但与其它噬菌体相比较,同源性程度比较低,为 37%~84% 之间。

3 讨论

B.t 生产菌株 MZ1 经过 Mitomycin C 诱导后,出现了大小两种噬菌体斑点。本文研究的是小斑噬菌体 MZTP01,经 *EcoR/Hind* 双酶切 MZTP01DNA 后获得八条带,从中回收了 D 片段。D 片段经测序得到长度为 2362bp 的核苷酸序列,用 BLAST 搜索该序列,发现与该序列高度同源的片段并不多,但大多跟噬菌体的蛋白质有关。

本研究中 D 片段的序列与已发表的第一条 *B.t* 噬菌体(GIL01)的序列相比^[2],相似程度近约 25%。根据生理学特性的差异,推测噬菌体 MZTP01 与噬菌体 GIL01 不属于同一个家族;而且与同一宿主的噬菌体 MZTP02 基因组的相应序列也不同^[11],尽管这两种噬菌体在生理和理化特性方面有很多相似的地方,如琼脂糖电泳上的条带相近等。由此可见,苏云金芽孢杆菌有很多种噬菌体类型,对它们的分类还需要考虑到核酸的序列分析,同一宿主的各种噬菌体的核酸序列的同源性不能太高,否则会发生免疫作用。

采用 DNAsis, DNAsstar 对 D 片段序列进行编码框分析,发现在正向序列中位于 141~1240bp 范围内

表 1 MZTP01 噬菌体的 PEP 蛋白同源性与其它 PEP 蛋白的比较
Table 1 Homologous comparison of PEP from phage MZTP01 with other PEPs

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		100	98	97	97	62	63	97	54	50	51	61	47	45	41	41	37
2			98	97	97	62	63	97	54	50	51	61	47	45	41	41	37
3				98	98	62	63	100	56	50	51	61	47	45	45	41	36
4					97	62	63	97	56	50	46	61	47	41	38	35	31
5						62	63	97	56	50	51	61	47	45	45	41	36
6							70	52	61	55	54	57	48	50	44	48	43
7								56	61	55	54	57	52	45	41	43	40
8									47	45	50	41	43	39	39	32	30
9										53	52	57	52	49	43	40	36
10											68	63	63	38	41	38	36
11												64	91	34	38	32	34
12													64	43	42	40	43
13														37	41	37	38
14															62	50	48
15																44	44
16																	84

Data in table 1 was homology percentage. Number of phages referred to the following: 1. phage MZTP01; 2. prophage P2 PEP protein; 3. phage WPhi PEP; 4. phage L-413C PEP; 5. Enterobacteria phage P2; 6. Enterobacteria phage 186; 7. phage PSP3; 8. protein phage WPhi PEP; 9. prophage p2 PEP [IP 32953]; 10. Phage Fels-2; 11. Prophage P2 PEP [CFT073]; 12. prophage p2 PEP [IP 32953]; 13. Salmonella enterica regulator; 14. Salmonella enterica subsp.; 15. Erwinia carotovora subsp. regulatory protein; 16. Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043.

有 *pep* 基因开放阅读框, 基因长度为 1101bp, 这一理论分子量大小与后来的试验结果相吻合。根据后面的功能试验分析, *pep* 基因很可能位于 3' 末端。另外, 在反向序列中, 有 *ogr* 基因读码框, 长度为 216bp, 编码 72aa, 分子量为 8kDa。

虽然 *pep* 基因是从 D 片段中用生物学软件分析出来的, 但是对 *pep* 基因进行克隆时, 采用的模板是噬菌体基因组 DNA。PCR 扩增产物经过与 T-载体连接并构建重组子 pQE30*pep* 和表达载体 M15 (pQE30*pep*)。PCR 扩增产物连接 T-载体的片段, 测序结果显示该扩增产物序列与 D 片段中的 *pep* 基因序列一致, 证明了 D 片段序列测定的正确性。用 *Bam*H/*Hind* 双酶切 M15(pQE30*pep*) 产生的两条带分别为: 4.5kb 和 3.6kb; 前者为重组质粒 pQE30*pep*, 后者为 M15 中自带的质粒。

M15(pQE*pep*) 表达菌株被诱导剂 IPTG 的诱导后, 用 SDS-PAGE 电泳检测到 47kDa 的清晰表达带, *pep* 基因在 *E. coli* 中得到了过量的表达。从时相表达中可见, 在菌株的整个表达时期均维持较高水平的表达, 在 1h 时就能够检测到 47kDa 的表达带, 其后表达量稍有增加, 直到 7h 后表达量才开始减少, 这种表达的趋势符合 pQE 表达载体的行为。Western blot 试验也在 47kDa 处出现一条清晰的杂交带, 进一步说明了

pep 基因在大肠杆菌中的表达。当利用 Ni-NTA resin 对该表达蛋白进行纯化时, 获得了相应的目的蛋白, 这说明这些融合蛋白带有 6×His 寡聚多肽接头, 可以结合 Ni-NTA resin。

将上清液与沉淀同时进行 SDS-PAGE 分析。电泳结果发现 PEP 蛋白主要存在于沉淀中。M15(pQE*pep*) 经 IPTG 诱导后, 透射电子显微镜观察发现, 在重组质粒的大肠杆菌细胞中的一头或两头有菱形的包含体, 进一步说明目的基因在大肠杆菌中确实获得了表达, 且表达蛋白以不溶解的包含体形式存在。但是诱导后菌体的生长速度明显降低, 可能是因为在 M15(pQE*pep*) 中表达的 PEP 蛋白对宿主有毒, 从而影响了宿主的正常生长。

将噬菌体 MZTP01 PEP 蛋白氨基酸序列用 BLAST 搜索同源性, 结果发现噬菌体 MZTP01 PEP (No.1) 与来自 *E. coli* K12 (No.2) 的噬菌体的同源性程度高达 100%; 与少数噬菌体的 PEP 同源性也达到 90% 以上; 但与大多数噬菌体的同源性程度比较低, 为 37% 到 84% 之间。各噬菌体的 PEP 蛋白存在一个的保守区, 保守区的结构性质未明。

通过表达蛋白与胰蛋白酶同时水解酪蛋白的试验, 说明了表达蛋白可能为胰蛋白酶。稀释 10 倍的 PEP 表达蛋白的实际光密度为 0.128, 查标准曲线后

并折算得到原 PEP 蛋白溶液水解酪蛋白的活力相当于 0.3mg/mL 的胰蛋白酶活性。该表达蛋白可能为一种水解肽键的酶。这一点在其它种类的噬菌体上也能够观察得到^[12-14]。

噬菌体 *pep* 基因结构及同源性分析表明:很多种类的噬菌体基因组中都包含此类基因,但是主要是大肠杆菌中的溶原性噬菌体,特别是 phage P2 和 phage P4 两类。这两类噬菌体中的 *pep* 基因的功能最典型。已经报道的噬菌体 *pep* 基因有 16 种;非噬菌体的 *pep* 基因有 6 种。如果从结构上分,可以把 *pep* 基因分为 3 个类型,本文中所研究的这一种属于 delta 型。噬菌体 MZTP01 PEP 蛋白与大肠杆菌的 PEP 蛋白有最高的同源性。因此,推测它可能属于 P2 或 P4 家族的噬菌体。

致谢 感谢比利时食品和环境实验室的 Jacques Mahillon 教授和 Nadine Fornelos 博士在筛选指示菌和抽提噬菌体核酸时所提供的建设性意见。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌. 1990, 北京: 科学出版社.
- [2] Celine V, Gert J, Jacques M. pGIL01, a linear tectiviral plasmid prophage originating from *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis. *Microbiology*, 2003, 149, 2083–2092.
- [3] Tuler TR, Callanan, MJ, Klaenhammer TR. Overexpression of Peptidases in *Lactococcus* and Evaluation of Their Release from Leaky Cells *J. Dairy Sci.*, 2002, (85): 2438–2450.
- [4] Schwartz D, Recktenwald J, Pelzer S, *et al.* Isolation and characterization of the PEP-phosphomutase and the phosphonopyruvate decarboxylase genes from the phosphinothricin tripeptide producer *Streptomyces viridochromogenes* Tu494. *FEMS Microbiol Lett.*, 1998, 63(2): 149–57.
- [5] Wei J, Liu Y, Yang S, *et al.* Screening of single-chain variable fragments against TSP50 from a phage display antibody library and their expression as soluble proteins. *J Biomol Screen.* 2006, 11(5): 546–52.
- [6] Halling C, Sunshine MG, Lane KB. A mutation of the transactivation gene of satellite bacteriophage P4 that suppresses the *rpoA109* mutation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1990, 172(7): 3541–8.
- [7] Christie GE, Calendar R. Interactions between satellite bacteriophage P4 and its helpers. *Ann Rev Genet*, 1990, 24: 465–490.
- [8] 余茂效, 司樵东. 噬菌体实验技术. 1991, 北京: 科学出版社.
- [9] Sambrook J, David WR. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, pp147–185.
- [10] Osber F, Brent R, Kingsden RE. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [11] 廖威, 孙钊, 宋少云, 等. 苏云金芽孢杆菌两株溶原性噬菌体的生物学特性. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(2): 180–183.
- [12] Buist KJ, Leenhouts KJ, Dabrowska M. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *J Bacteriol*, 1995, 177: 1554–1563.
- [13] Caldenty J, Hanninen AL, Bamford DH. Gene XV of bacteriophage PRD1 encodes a lytic enzyme with muramidase activity. *Eur J Biochem*, 1994, 225: 341–346.
- [14] Husson-Kao C, Mengaud J, Benbadis L. Mur1, a *Streptococcus thermophilus* peptidoglycan hydrolase devoid of a specific cell wall binding domain. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 187: 69–76.

Cloning, Prokaryotic Expression and Functional Analysis of *pep* Gene from *Bacillus thuringiensis* Lysogenic bacteriophage

Wei Liao^{1,2}, Weichun Chen^{1,3}, Yanhua Jia¹, Yi Pang^{1*}

(¹State Key Laboratory of Biocontrol and Institute of Entomology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

(²Department of Food Technology, Guangxi Polytechnic, Nanning, Guangxi 530226, China)

(³Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: [Objective] Random outbreak of lysogenic bacteriophage from *Bacillus thuringiensis* was very harmful to the production of *Bacillus thuringiensis* insecticide. We clarified the background of the phage from *Bacillus thuringiensis* MZ1 at the molecular level to solve the problem of random outbreak. **[Methods]** After the strain MZ1 from a company in Meixian County of Guangdong Province was induced, we obtained phage particles. Then phage DNA was extracted and *pep* gene was cloned, expressed and analyzed. **[Results]** We obtained a lysogenic bacteriophage MZTP01 with clear plaque and 1 mm diameter. Fragment D with 2362bp (Genebank No. AY639599) was obtained after the phage DNA hydrolyzed

by *Hind* III/*Eco*R I. Among fragment D, the *pep* gene with molecular weight of 47 kDa and length of 1101bp was cloned and expressed. Recombinant M15 (pQE30*pep*) was built and overexpressed in *Escherichia coli* with a 47kDa clear band. At the same place a clear band was observed by Western blot. Judging from the time course expression, we could conclude that PEP protein produced at 1 hour after induction and then increased gradually. PEP protein was mainly in the form of inclusion body in the recombinant and slowed the growth speed of host. Homologous comparison of PEP protein from phage MZTP01 with other PEPs from BLAST were that phage MZTP01 PEP protein had 100% homologue with that of *Escherichia coli* K12, and most of others took the similarity in the range between 37%~84%. **[Conclusion]** PEP protein had ability to hydrolyze casein with the enzyme activity of 0.3mg/ml trypsin. PEP protein may be a kind of trypsin.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; lysogenic bacteriophage; *pep* gene; clone; functional analysis

Supported by the Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2001BA708B07-03) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2001AA204011)

*Corresponding author. Tel: +86-20-84113860; Fax: +86-20-84037472; E-mail: pangy@mail.sysu.edu.cn

First author: Wei Liao, E-mail: lw@gxzyjy.com

Received: 9 August 2007/ Revised: 31 December 2007

1953 年创刊以来的所有文章已经全文上网

2008 年 1 月中旬,《微生物学报》自 1953 年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载摘要和全文!

建立全文数据库的工作是从 2007 年初开始,经过多方人员的共同努力,历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史久远,其间经历了期刊的变化。将变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

《微生物学报》刊、期统计表

	刊期	卷号	期号
1953-1956	半年刊	1-4	1-2
1957-1958	季刊	5-6	1-4
1959	季刊	7	1-2
1959-1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3-4
1963-1965	季刊	9-11	1-4
1966	季刊	12	1-2
1966-1972	停刊 6 年半		
1973-1988	季刊	13-28	1-4
1989-2007	双月刊	29-47	1-6
2008	月刊	48	2