

苏云金芽胞杆菌 4.0718 菌株中杀虫晶体蛋白基因的定位及鉴定

付祖姣, 孙运军, 夏立秋*, 丁学知, 胡胜标, 李文萍, 张友明

(湖南师范大学生命科学学院, 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 长沙 410081)

摘要:【目的】对苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 4.0718 菌株中的杀虫晶体蛋白基因 (insecticidal crystal protein gene, 简称 *cry* 基因) 进行定位和鉴定, 系统分析高毒力 Bt 4.0718 菌株的杀虫基因背景。【方法】采用脉冲电泳 (PFGE) 分离 Bt 4.0718 菌株的基因组 DNA, 确定该菌株的 PFGE 图谱和质粒图谱; 采用 Southern 杂交分析该菌株中 *cry* 基因的定位, 并使用 PCR 及 PCR 产物限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP) 方法鉴定该菌株染色体和质粒上含有的 *cry* 基因类型。【结果】确定了 Bt 4.0718 菌株的 PFGE 图谱和质粒图谱, 鉴定到 Bt 4.0718 菌株的染色体和质粒上均定位有 *cry* 基因, 且分别包含 *cry1Aa*、*cry1Ac*、*cry2Aa* 和 *cry2Ab* 4 种基因成分。但染色体上含有的 *cry* 基因可能不如质粒上含有的 *cry* 基因具有完整的开放阅读框。【结论】首次在 Bt 4.0718 菌株的染色体上发现有丰富的 *cry* 基因, 且与质粒上含有的 *cry* 基因类型一致。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; *cry* 基因; 定位; 脉冲电泳 (PFGE); 限制性片段长度多态性分析 (RFLP)
中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1250-06

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一类革兰氏阳性细菌, 在芽胞形成过程中能产生对目标昆虫具有特异毒杀作用的晶体蛋白而被广泛地应用于害虫生物防治^[1]。为了扩大 Bt 杀虫剂在农林害虫防治中的应用范围, 延缓昆虫潜在抗性的发生, 继续寻找并鉴定新的高毒力、遗传背景特殊的 Bt 菌株仍然是必要的。目前, 研究人员已经从各种不同的资源中分离并鉴定到很多不同特异性的 Bt 菌株。这些不同来源的 Bt 菌株因为含有不同类型的杀虫晶体 (Cry) 蛋白, 而对不同种类的昆虫, 如鳞翅目 (Lepidoptera)、双翅目 (Diptera)、鞘翅目 (Coleoptera)、膜翅目 (Hymenoptera)、同翅目 (Homoptera)、直翅目 (Orthoptera) 和食毛目 (Mallophaga) 等, 具有特异性毒杀作用^[2]。目前, 从 Bt 菌株中鉴定到的 Cry 蛋白根据其氨基酸序列同源性的差异已多达 51 类 (Cry1-Cry51) (<http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/>

Neil_Crickmore/Bt/)^[3]。

Bt 4.0718 菌株能够在形成芽胞的同时产生菱形和方形两种伴胞晶体, 对鳞翅目昆虫表现出高效杀虫活性, 并已成功用于商业化生产^[4, 5]。本室丁学知等采用 PCR 方法已在该菌株的质粒上鉴定到 *cry1* 和 *cry2* 两类基因, 但该文未对 Bt 4.0718 菌株染色体上的 *cry* 基因进行分析, 且使用单纯的 PCR 检测方法鉴定 *cry* 基因有所局限^[6]。为了更好地利用该菌株研制杀虫剂, 有必要系统地分析该菌株染色体和质粒上含有的杀虫基因资源。本研究采用脉冲电泳 (Pulse field gel electrophoresis, 简称 PFGE), Southern 杂交, PCR 和 PCR 产物限制性片段长度多态性分析体系 (PCR and the restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified fragment, 简称 PCR-RFLP) 对 Bt 4.0718 菌株中 *cry* 基因的定位和类型进行分析, 阐述该菌株的遗传背景, 为该菌株的进一步应用打下基础。

基金项目: 国家自然科学基金(30670052); 国家博士点基金(20060542006); 国家“863 计划”(2006AA02Z187, 2006AA10A212)

*通讯作者。Tel: +86-731-8872298; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

作者简介: 付祖姣(1979-), 女, 湖南岳阳人, 博士研究生, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: fzjp2004@hotmail.com

收稿日期: 2008-02-27; 修回日期: 2008-05-03

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:地高辛高效随机引物标记试剂盒购自 Roch 公司,地高辛检测试剂盒 II 购自武汉博士德公司;Taq DNA 聚合酶和 DNA 凝胶回收试剂盒购自上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司;透析袋购自上海西巴斯公司;相关内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司;脉冲电泳用的琼脂糖、标准酵母菌染色体 DNA 购自美国 Bio-Rad 公司;其他生化试剂均为 BBI 产品或国产分析纯;CHEF DR-II 型脉冲电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;梯度 PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司。

1.1.2 菌株及培养条件:苏云金芽胞杆菌 4.0718 菌株 (CCTCC No. M200016),从中国湖南的土壤中分

离,在 LB 培养基中 30 °C 培养。酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*),用作染色体 DNA 对照,来自中国科学院微生物研究所,在豆芽汁培养基(黄豆芽 1%,蔗糖 0.5%)中 30 °C 培养。

1.1.3 引物:表 1 为本研究使用的所有引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 DNA 的制备

Bt 4.0718 菌株基因组 DNA 按 Carlson 和 Gavrira Rivera 等的方法包埋在低熔点琼脂糖块中进行处理^[7, 8]。经蛋白酶 K 处理好的琼脂糖包埋块浸泡在限制性内切酶 *Not* 的酶切缓冲液中,0 °C 放置 8 h,然后加入 20U *Not* 内切酶,37°C 处理 12 h。质粒 DNA 的提取按 Kronstad 的方法进行^[9]。酵母菌染色体按常规方法制备^[10]。

表 1 用来扩增 *cry* 基因的引物序列及预期 PCR 产物大小
Table 1 The primers and predicted PCR Product for identification of *cry* genes

Genes	Primers	Sequence (5' 3')	Predicted PCR product/bp	References
<i>cry1</i>	Un1(d)	CATGATTCATGCGGCAGATAAAC	274 or 277	[13]
	Un1(r)	TTGTGACACTTCTGCTTCCATT		
<i>cry2</i>	Un2(d)	GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG	689 or 701	[13]
	Un2(r)	CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT		
<i>cry3</i>	CJIII20	TTAACCGTTTTCGCAGAGA	652-733	[14]
	CJIII21	TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG		
<i>cry4</i>	Un4(d)	GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC	439	[13]
	Un4(r)	GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC		
<i>cry5</i>	gral-nem(d)	TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAAA	474-489	[15]
	gral-nem(r)	AAGACCAAATTCATACCAGGGTT		
<i>cry6</i>	S5un6	TAGAGAGTGGAAACGACTTTACC	784	[16]
	S3un6	CAACAAATCCTAGCAATGGTC		
<i>cry7</i>	S5un7	GGATATGAAGATAGTAATAGAAC	1377	[16]
	S3un7	GCTGTAGCATGACATAATCGATG		
<i>cry8</i>	S5un8	CGGCAAACCTTAGTAGAATGC	1212	[16]
	S3un8	CTGACTGATTTCCACCATCACG		
<i>cry9</i>	K5un2	AGGACCAGGATTTACAGGAGG	1553	[11]
	S3un9	CCCAATGCGAAAGAATAAG		
<i>cry10</i>	cry10A5	ATGAATCCATATCAAATAAG	2040	[17]
	cry10A3	AAGAACCTTGTTTAATTAAC		
<i>cry11</i>	gral-cry11(d)	TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC	305	[15]
	gral-cry11(r)	CATTTGTACTTGAAGTTGTAATCCC		
<i>cry1</i>	K5un2	AGGACCAGGATTTACAGGAGG	1640	[11]
	K3un2	GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC		
<i>cry2A</i>	S5un2	GGAAGAACTACTATTTGTGATGC	1230	[18]
	S3un2	AATAGTTTGAATTACCGGAGC		
<i>cry1Aa</i>	SB-1	TGCATAGAGGCTTTAAT	1500	[19]
<i>cry1Aa/cry1Ac</i>	U8-15c	CAGGATTCATTCAAGG		
<i>cry1Ac</i>	RB-19	GGGACTGCAGGAGTGAT	653	[19]
<i>cry1Ab</i>	SB-2	TCGGAAAATGTGCCAT	858	[19]
	U3-18c	AATGCTTTCATAGGCT		
<i>cry1Aa/cry1Ac</i>	Orf-F	GTCGACATGGATAACAATCCGAACAT	3530	This study
	Orf-R	GGATCCCTATTCCTCCATAAGGAGTA		

1.3 PFGE

使用 Bio-Rad 公司生产的 CHEF DR-II 电泳仪, 通过脉冲电泳将 Bt 4.0718 菌株的基因组 DNA 进行分离。琼脂糖包埋块中酶切和未酶切处理的基因组 DNA 通过 1% 琼脂糖 (Certified megabase agarose, Bio-Rad), 改良的 0.25 × TBE (25 mmol/L Tris-borate buffer, 0.05 mmol/L EDTA), 在 14 ~ 16 下进行电泳。酶切基因组 DNA 的电泳条件为 4.5 V/cm、60 s、20 h, 未酶切基因组 DNA 的电泳条件为 6 V/cm、60 ~ 120 s、24 h。

1.4 Southern 杂交

将通过脉冲电泳分离的基因组 DNA 和普通琼脂糖凝胶分离的质粒 DNA 转移至带正电荷的尼龙膜上 (Amersham Pharmacia Biotech), 按标准方法进行杂交反应^[10]。cryI 基因的探针采用引物对 K5un2/K3un2 从 Bt 4.0718 菌株中扩增获得^[11], 并使用地高辛高效随机引物标记试剂盒进行标记。杂交后的 DNA 通过地高辛检测试剂盒进行显色检测。

1.5 PCR 分析

为了从 Bt 4.0718 菌株中获得不含质粒的染色体 DNA, 本研究采用特殊的脉冲电泳条件, 即 0.6% 的琼脂糖凝胶, 1 × TAE 电泳缓冲液, 2 V/cm, 20 ~ 30 min, 72 h, 分离 Bt 4.0718 菌株的基因组 DNA^[12]。将第一条含有染色体 DNA 的凝胶条带切下, 通过透析袋电洗脱法回收染色体 DNA, 再经 SalI 酶切后用作 PCR 模板。质粒 DNA 通过 0.7% 琼脂糖常规电泳分离后, 切下目的条带, 采用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化用作 PCR 模板。

本研究采用引物 Un1(d)/Un1(r)、Un2(d)/Un2(r)、CJIII20/CJIII21、Un4(d)/Un4(r)、gral-nem(d)/gral-nem(r)、S5un6/S3un6、S5un7/S3un7、S5un8/S3un8、K5un2/S3un9、cry10A5/cry10A3、gral-cry11(d)/gral-cry11(r) 分别扩增 Bt 4.0718 菌株染色体和质粒上的 cry1、cry2、cry3、cry4、cry5、cry6、cry7、cry8、cry9、cry10、cry11 基因 (表 1)。采用引物 K5un2/K3un2 和 S5un2/S3un2 扩增 Bt 4.0718 菌株染色体和质粒上的 cry1、cry2 亚类基因。引物 K5un2/K3un2 的扩增产物经 PstI/XbaI 酶切, 获得 cry1 亚类基因的 RFLP 图谱, 引物 S5un2/S3un2 的扩增产物经 HincII/MspI 酶切, 获得 cry2 亚类基因的 RFLP 图谱。

为分析 Bt 4.0718 菌株染色体和质粒上 cry 基因的功能, 本研究还根据 GenBank 中 cry1Aa 和 cry1Ac 基因的序列同源性设计了引物对 Orf-F/Orf-R, 用来扩增 Bt 4.0718 菌株染色体和质粒上 cry1Aa 和 cry1Ac

基因的全长序列。

2 结果

2.1 Bt 4.0718 菌株基因组 DNA 的 PFGE 图谱与质粒图谱

通过 CHEF DR-II 分离系统, 发现 Bt 4.0718 菌株基因组 DNA 经 NotI 酶切后呈现 8 条以上的限制性酶切电泳带, 酶切片段的大小从 150 ~ 2000 kb 不等 (图 1-A)。经脉冲电泳分离的未酶切基因组 DNA 也呈现数条线状或环状大质粒^[20], 大小在 100 kb 以上 (图 1-B), 而 100 kb 以下的质粒因分子量偏小, 在该脉冲电泳条件下基本都迁移至凝胶之外。

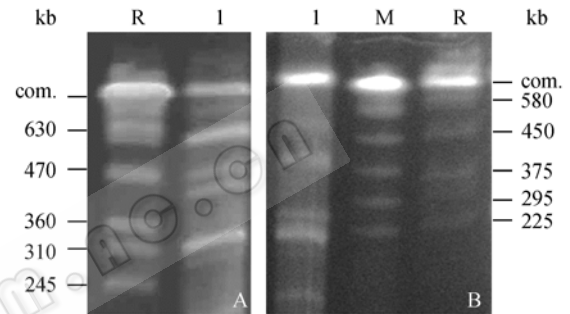


图1 Bt 4.0718 菌株 DNA 的脉冲电泳图谱

Fig. 1 PFGE patterns of DNA from Bt 4.0718. (A) R, chromosomes from reference strain *Saccharomyces cerevisiae*; I, *NotI* digested DNA from Bt 4.0718; com., compression zone for DNA. (B) I, undigested DNA from Bt 4.0718; M, DNA Marker (0.2–2.2 Mb, Bio-Rad).

为了更好地分离 Bt 4.0718 菌株 100 kb 以下的质粒, 本研究采用普通琼脂糖电泳分析了该菌株的中、小型质粒, 结果如图 2-A 所示。该图显示 Bt 4.0718 菌株有数条 2 ~ 100 kb 大小的质粒带。

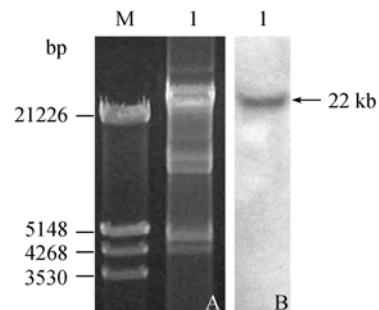


图2 Bt 4.0718 菌株质粒图谱(A) 及其与 cryI 探针的 Southern 杂交(B)

Fig. 2 Plasmid pattern of Bt 4.0718 (A) and Southern blot with *cryI* probe (B) M, λ DNA Marker/*EcoRI* and *HindIII*; I, plasmids from Bt 4.0718.

2.2 Bt 4.0718 菌株中 *cry* 基因的定位

为检测 *cry* 基因在 Bt 4.0718 菌株中的定位,本研究采用 *cryI* 探针对 Bt 4.0718 菌株的基因组 DNA 和质粒 DNA 进行严谨条件的 Southern 杂交分析。结果显示(图 3), Bt 4.0718 菌株基因组 DNA 上一段约 320 kb 的 *Not* 酶切片段与 *cryI* 探针杂交出现阳性信号,而未酶切基因组 DNA 中的大质粒与 *cryI* 探针杂交均没有显示阳性信号。从该结果可推出,该菌株的大质粒不含 *cryI* 基因,而基因组中含有 *cryI* 基因的 320 kb 的酶切片段来源于染色体^[7]。

与普通琼脂糖凝胶上分离的中型、小型质粒 DNA 的杂交结果显示, Bt 4.0718 菌株的一个与 22 kb 线性

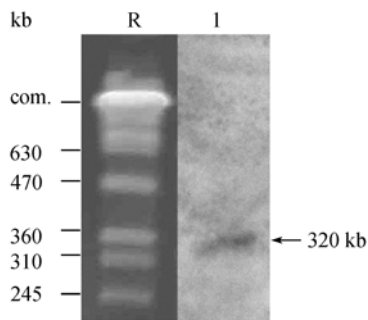


图 3 Bt 4.0718 菌株 DNA 与 *cryI* 探针的 Southern 杂交
Fig. 3 Southern blot of DNA from Bt 4.0718 with *cryI* probe.
R, chromosomes from *Saccharomyces cerevisiae*; I, *Not* digested DNA from Bt 4.0718.

DNA 标准大小一致的质粒携带 *cryI* 基因(图 2-B)。

2.3 Bt 4.0718 菌株中染色体上 *cry* 基因类型的鉴定

分别采用 *cry1*、*cry2*、*cry3*、*cry4*、*cry5*、*cry6*、*cry7*、*cry8*、*cry9*、*cry10*、*cry11* 基因的通用引物对 Bt 4.0718 菌株的染色体 DNA 进行 PCR 扩增,获得了与 *cry1*、*cry2* 基因预期大小一致的 2 个片段(277 bp 和 701 bp)(图 4-A), 而其他的 *cry* 基因均未检测到目的大小的 PCR 产物。

采用特异引物 K5un2/K3un2 和 S5un2/S3un2 对 Bt 4.0718 菌株染色体 DNA 进行 PCR 扩增,分别获得了预期大小为 1.6 kb 和 1.2 kb 的 PCR 产物。将 1.6 kb 的 PCR 产物进行 *Pst* /*Xba* 酶切,获得了染色体上 *cryI* 基因的 RFLP 图谱(图 4-B)。从此图可以看出,染色体上扩增获得的 1.6 kb PCR 产物经酶切后产生了 4 个酶切片段,大小分别为 1117 bp, 802 bp, 518 bp 和 322 bp。根据 Kuo 和 Chak 的研究结果^[11],该 RFLP 图谱与 *cryIAa* 和 *cryIAc* 基因片段的理论酶切图谱一致。而染色体上扩增获得的 1.2 kb 的 PCR 产物经 *Hinc* /*Msp* 酶切后,产生了 958 bp, 791 bp, 297 bp, 273 bp 和 143 bp 的片段,与 *cry2Aa* 和 *cry2Ab* 基因的理论酶切图谱一致^[18](图 4-B)。该结果证实了 Bt 4.0718 菌株染色体 DNA 上含有 *cryIAa* 和 *cryIAc*、*cry2Aa* 和 *cry2Ab* 基因。

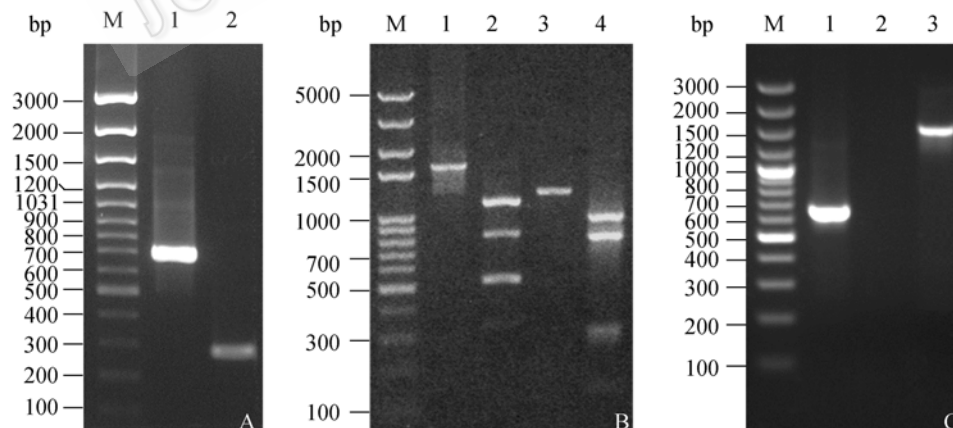


图 4 Bt 4.0718 菌株质粒中 *cry* 基因的 PCR 检测和鉴定

Fig. 4 PCR detection and identification of *cry* genes from Bt 4.0718. M: 100bp Marker. (A) PCR amplification of *cry1* and *cry2* genes on chromosomal DNA from Bt 4.0718 with Un1 and Un2 primers. 1: *cry2* gene; 2: *cry1* gene. (B) Identification of *cryI*- and *cry2*- type genes on chromosomal DNA from Bt 4.0718. 1: PCR products of *cryI* genes; 2: RFLP pattern of *cryI* genes; 3: PCR products of *cry2* genes; 4: RFLP pattern of *cry2* genes. (C) Specific PCR amplification of *cryIA* genes from Bt 4.0718. 1: *cryIAa*; 2: *cryIAb*; 3: *cryIAc*.

2.4 Bt 4.0718 菌株中质粒上 *cry* 基因类型的鉴定

根据 Southern 杂交的结果,将携带 *cryI* 基因的质粒纯化,并采用特异引物 K5un2/K3un2 和 S5un2/S3un2

对其进行 PCR 扩增,同样获得了 1.6 kb 和 1.2 kb 的 PCR 产物。对质粒上扩增的 PCR 产物进行 RFLP 分析,获得了与染色体 DNA 一致的结果,即目标质粒上也含有

cryIAa、*cryIAc*、*cry2Aa* 和 *cry2Ab* 基因。

2.5 Bt 4.0718 菌株中染色体和质粒上全长 *cry* 基因的 PCR 扩增

采用引物 Orf-F/Orf-R (表 1) 对染色体上 *cryIAa*、*cryIAc* 基因的完整开放阅读框进行 PCR 扩增, 但未能获得目的大小的 PCR 产物。但是, 采用该引物对质粒 DNA 进行 PCR 扩增时, 获得了与 *cryIAa* 和 *cryIAc* 基因全长序列预期大小一致的 3.5 kb 的 PCR 产物。经 TA 克隆后测序的结果显示, 这两个基因序列与 GenBank 中 *cryIAa11* (Accession no. Y09663) 和 *cryIAc5* (Accession no. M73248) 基因的序列一致。多次尝试更换染色体上 PCR 的退火温度及其他扩增条件, 均无法获得全长的 *cry* 基因序列, 暗示了该菌株染色体上含有的 *cry* 基因可能不完整。

3 讨论

本文采用 PFGE 对 Bt 4.0718 菌株的基因组 DNA 进行分离, 通过严谨条件的 Southern 杂交分析了 Bt 4.0718 菌株中 *cry* 基因的定位, 发现该菌株的染色体和质粒上均含有 *cry* 基因。在此基础上, 本研究采用 PCR-RFLP 体系分别鉴定了该菌株染色体和质粒 DNA 上 *cry* 基因的类型, 首次鉴定到该菌株染色体和质粒上均含有 *cryIAa*、*cryIAc*、*cry2Aa* 和 *cry2Ab* 基因。重复对质粒上的 *cry* 基因进行 PCR-RFLP 分析, 未鉴定到 *cryICb* 和 *cry2Ac* 基因。本文在前文的研究基础上^[6], 在技术上进一步采用脉冲电泳和 Southern 杂交对该菌株染色体和质粒上 *cry* 基因进行了定位, 并对其进行了扫描 PCR 扩增和特异 PCR 产物 (1.6 kb 和 1.2 kb 片段) 的 RFLP 分析, 从而获得了重要的研究结果。为了进一步证实该菌株中 *cryI* 基因的类型, 本文还采用 *cryIAa*、*cryIAb*、*cryIAc* 基因的特异引物 (表 1) 进行了 PCR 扩增^[19], 获得了 2 个 PCR 产物 (图 4-C)。经测序证实, 该 PCR 产物对应于 *cryIAa* 和 *cryIAc* 基因。该结果同时证明了 Bt 4.0718 菌株不含有 *cryIAb* 基因, 是一株不同于 Bt 库斯塔克亚种 HD1 的独特的苏云金芽孢杆菌^[21, 22]。本文对 Bt 4.0718 菌株的杀虫基因背景进行的系统分析, 为该菌株后续的功能基因组研究和应用提供了重要的基础。

为避免 Bt 4.0718 菌株中染色体和质粒 DNA 的相互污染, 本研究分别采用脉冲电泳和普通琼脂糖电泳分离该菌株染色体、大质粒和中小质粒, 并采用严谨的 Southern 杂交对其进行分析, 确定 *cry* 基因的定位。此外, 为获得不含质粒的纯染色体 DNA, 以对染色体上 *cry* 基

因的类型进行分析, 本研究根据 Turmel 和 Lalande 分离裂殖酵母菌 3 个染色体分子 (5.7 Mb, 4.6 Mb and 3.5 Mb) 的条件^[12], 采用 20~30 min 的脉冲, 电泳 72 h, 分离 Bt 4.0718 菌株的基因组 DNA, 并采用透析袋电洗脱方法回收第一条最大的染色体 DNA 条带, 排除了质粒 DNA 的污染。同时采用经典的 Bt 质粒提取方法制备 Bt 4.0718 菌株的质粒, 并采用 DNA 凝胶回收试剂盒对目标质粒进行切胶回收, 排除染色体 DNA 的污染。

已有的研究表明, 苏云金芽孢杆菌的 *cry* 基因大部分定位于质粒上, 也有研究发现部分菌株的染色体上定位有 *cry* 基因^[7, 23], 但在质粒 DNA 上丰富的 *cry* 基因类型被鉴定的同时, 却很少有关于染色体上 *cry* 基因亚类类型的报道。本研究采用脉冲电泳分离出 Bt 4.0718 菌株的染色体, 并对其进行了 PCR-RFLP 分析, 首次鉴定到 Bt 4.0718 菌株的染色体上含有 *cryIAa*、*cryIAc*、*cry2Aa* 和 *cry2Ab* 4 种 *cry* 基因, 且与质粒上含有的 *cry* 基因类型一致。这是目前发现的一个遗传背景比较特殊、且已投入商业化应用的苏云金芽孢杆菌。Bt 4.0718 菌株染色体上 *cryI* 和 *cry2* 两类基因的存在, 可能为该菌株 *cry* 基因的稳定遗传提供了重要基础, 还可能成为苏云金芽孢杆菌菌株进化的证据之一。此外, 本研究为 Bt 菌株染色体上 *cry* 基因的鉴定提供了一种新方法, 在不进行全基因组测序的情况下, 也能有效阐述 Bt 菌株的杀虫基因背景, 评估其杀虫潜力。

参 考 文 献

- [1] Glare TR, O'Callaghan M. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. London: John Wiley & Sons, 2000.
- [2] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 775-806.
- [3] Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 807-813.
- [4] 丁学知, 夏立秋. 苏云金杆菌高毒力菌株 4.0718 的快速选育. *中国生物防治* (*Chinese Journal of Biological Control*), 2001, 17(4): 163-166.
- [5] 丁学知, 邹先琼, 孙运军, 等. 苏云金芽孢杆菌 4.0718 菌株晶体毒素性质的研究. *农业生物技术学报* (*Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*), 2005, 13(3): 365-371.
- [6] 丁学知, 刘全兰, 莫湘涛, 等. 苏云金芽孢杆菌 4.0718 菌株的杀虫晶体蛋白基因分析. *微生物学报* (*Acta Microbiologica Sinica*), 2003, 43(3): 413-417.
- [7] Carlson CR, Kolstø A-B. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J Bacteriol*, 1993, 175: 1053-1060.
- [8] Gaviira Rivera AM, Priest FG. Pulsed field gel electrophoresis of chromosomal DNA reveals a clonal population structure to *Bacillus thuringiensis* that relates in general to crystal protein gene

- content. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 223: 61–66.
- [9] Kronstad JW, Schnepf HE, Whiteley HR. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J Bacteriol*, 1983, 154: 419–428.
- [10] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [11] Kuo WS, Chak KF. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1369–1377.
- [12] Turmel C, Lalonde M. Resolution of *Schizosaccharomyces pombe* chromosomes by field inversion gel electrophoresis. *Nucl Acids Res*, 1988, 16: 4727.
- [13] Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E, et al. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(12): 4883–4890.
- [14] Cerón J, Ortíz A, Quintero R, et al. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3826–3831.
- [15] Bravo A, Sarabia S, Lopez L, et al. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(12): 4965–4972.
- [16] Yu H, Zhang J, Huang DF, et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the Asian Cockchafer: *Holotrichia parallela*. *Curr Microbiol*, 2006, 53(1): 13–17.
- [17] Choi YS, Cho ES, Je YH, et al. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 encoding δ -endotoxin *CryI*Ac. *Curr Microbiol*, 2004, 48(1): 47–50.
- [18] 宋福平, 张杰, 黄大昉, 等. 苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立. *中国农业科学(Scientia Agricultura Sinica)*, 1998, 31(3): 1–4.
- [19] Bourque SN, Valero JR, Mercier J, et al. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(2): 523–527.
- [20] Carlson CR, Johansen T, Lecadet M-M, et al. Genomic organization of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715. *Microbiol*, 1996, 142: 1625–1634.
- [21] Carlton BC, Gonzalez JM. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. In: *The molecular biology of the bacilli*. New York: Academic Press Inc, 1985, 211–249.
- [22] Thomas DJ, Morgan JA, Whipps JM, et al. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in Lepidopteran and Coleopteran larvae. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(1): 118–124.
- [23] Lövgren A, Carlson CR, Eskils K, et al. Localization of putative virulence genes on a physical map of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *gelechiae* chromosome. *Curr Microbiol*, 1998, 37: 245–250.

Localization and identification of crystal protein genes in *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718

Zujiao Fu, Yunjun Sun, Liqiu Xia*, Xuezhi Ding, Shengbiao Hu, Wenping Li, Youming Zhang

(Key Laboratory of Molecular Microbiology of Hunan Province, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: [Objective] To localize and identify the insecticidal crystal protein genes (*cry* genes) in high-toxic *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718. [Methods] The genomic DNA of *B. thuringiensis* strain 4.0718 was isolated by pulse field gel electrophoresis (PFGE), and the PFGE pattern and plasmid pattern were characterized. The *cry* genes in the strain were analyzed by Southern blot and the *cry* gene types on the chromosome and plasmid were identified by PCR and restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified fragments (PCR-RFLP). [Results] Southern blots showed that the *cry* genes in *B. thuringiensis* strain 4.0718 are present on both chromosome and plasmid. PCR and RFLP patterns showed that the chromosome and plasmid contain four *cry* genes, *cryIAa*, *cryIAc*, *cry2Aa*, and *cry2Ab*. However, the *cry* genes on the chromosome may be incomplete, while the *cryIAa* and *cryIAc* genes localized on the plasmid were found to contain the full coding sequence. [Conclusion] The abundant *cry* genes were first found on chromosome of *B. thuringiensis* strain 4.0718, and the *cry*-type genes are the same as the plasmid.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; *cry* gene; localization; pulse field gel electrophoresis (PFGE); restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670052), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20060542006) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z187, 2006AA10A212)

*Corresponding author. Tel: +86-731-8872298; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

Received: 27 February 2008/ Revised: 3 May 2008