

杀蚊球形芽孢杆菌BS10的质粒限制图谱

韦北阳 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心分子生物学研究室, 北京)

本文报道一株国内分离的具有杀幼蚊活性的球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus* 下文简称BS) 的大质粒 (pFW1), 其分子量为 69.5×10^6 道尔顿; 绘制了该质粒的 Xho I 限制性核酸内切酶图谱。

以苏云金芽孢杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis israelensis* 下文简称BTI) 75×10^6 道尔顿质粒为探针与该菌株DNA进行核酸杂交, 结果表明BTI与该菌株为毒素蛋白编码的基因序列之间无同源性, 说明它们的进化来源是不相同的。

关键词 球形芽孢杆菌; 大质粒pFW1限制性图谱; 苏云金杆菌以色列变种; 毒素基因; DNA序列同源性

杀虫芽孢杆菌中研究最广泛和深入的是苏云金杆菌^[1]。在苏云金杆菌中以以色列变种具有杀双翅目昆虫的作用^[2,8]。除苏云金杆菌以色列变种外, 球形芽孢杆菌也具有杀幼蚊作用, 后者与前者具有不同的杀蚊谱, 而且杀蚊活性的持续时间优于前者。国内江苏里下河地区农科所分离的BS10对库蚊幼虫具有很强的毒杀活性, 其对致乏库蚊幼虫的毒性明显地高于世界卫生组织推荐的强毒株BS1593。

Ganesa等(1983)和Norton等(1985)分别把BS1593毒素蛋白基因克隆在大肠杆菌和枯草杆菌中并得到表达^[4,5]。但至今未见关于该克隆基因序列的资料发表。BS毒素基因定位尚不清楚。本文以BS10为研究材料, 研究BS10是否具有质粒, 同时还探讨BS与BTI的毒素蛋白基因在核苷酸序列上是否有同源性。

材料和方法

(一) 材料

1 菌种: BS10 由江苏里下河地区农科所提供; BTI由美国 J. Spizizen 教授

惠赠。

2 主要试剂: 蛋白酶 E (Pronase E) 为MERCK公司产品; 限制性核酸内切酶 Xho I 为华美产品, Sst I 为 BRL 产品; 氯化铯为日本半井产品, 硝酸纤维素膜为MILLPORE 产品; α - ^{32}P -CTP 为 DU PONT 产品; 蔗糖、低熔点琼脂糖以及 Nick translation 试剂均为 BRL 产品。

(二) 方法

1. 检测大质粒DNA: 按本室改良的Kado 方法进行^[6], 但某些步骤加以改变。球形芽孢杆菌在LB培养基(蛋白胨10g, 酵母粉 5g, NaCl 10g, 1000ml 水)中培养, 按每100mg湿菌加7—10ml裂解液(3% SDS, 50m mol/L Tris, pH 12.6), 于15℃裂解1h。用苯酚/氯仿抽提后的上层液装入透析袋用蔗糖包埋使样品体积浓缩5—10倍后, 在琼脂糖凝胶电泳上检测。

2. 蛋白酶法制备BS DNA: 按每100mg 湿菌加6—8ml裂解液(1mg Pronase E/ml, 0.5% SDS, 10m mol/L Tris, 1m mol/L EDTA, pH 8.0)。裂解在37℃水浴进行1h, 然后加1/5体积2mol/L

本文于1987年12月4日收到。本文得到WHO资助。

Tris, pH7.0, 加5mol/L NaCl 至最终浓度 1mol/L, 冰浴 4h, 15000r/min 离心 20min, 取上清液, 加2.5 倍体积95%乙醇, 在-20℃过夜后, 15000r/min离心10min, 弃上清液, 把沉淀吹干, 加少量 TE 缓冲液(10m mol/L Tris, 1m mol/L EDTA, pH8.0) 悬浮, 用Tris 饱和酚抽提两次。

3. BS10质粒DNA 的纯化及限制性内切酶图: 用Birboim 的碱解法^[7]提取 BS10质粒DNA, 通过氯化铯-溴化乙锭 (CsCl-EB) 密度梯度离心得到纯净的ccc 质粒DNA。用限制性核酸内切酶Xho I 于 37℃作用1h, 完全酶切BS10质粒 DNA, 同时控制Xho I 酶量及在37℃酶切时间, 使BS10质粒DNA部分酶切; 然后以 λ DNA, λ /Xho I 酶切片段, λ /Hind III 酶切片段为标准DNA分子量, 进行琼脂糖凝胶电泳, 确定BS10质粒DNA/Xho I 完全酶切及部分酶切各片段的分子量, 以确定BS10 质粒 Xho I 酶切位点, 绘制物理图。

4. BTI 75Md大质粒DNA的制备: 用低熔点凝胶电泳法分离纯化 BTI 75Md 大质粒DNA^[8]。用Kado 法提取BTI质粒 DNA, *E. coli* C83912株K99 75Md大质粒为分子量对照, 在4℃条件下, 0.7%低熔点琼脂糖凝胶上进行电泳分离。然后根据文献报道的方法从凝胶中回收 BTI 75Md 质粒DNA。

5. α -³²P同位素标记 BTI 75Md 质粒DNA: 根据BRL nick translation试剂盒标准方法进行。

6. 硝酸纤维素膜 (NC) 的blot及核酸杂交: 打点杂交以及 Southern blot 方法按文献[8,9]进行。

实验结果

(一) BS10质粒DNA的电泳图谱

采用Kado法和蛋白酶法提取 DNA, 在0.7%琼脂糖凝胶上电泳, 发现 BS10染色体DNA带上方约 139Md 处有一条质粒DNA带 (见图版 I -2C, E, 将该质粒命名为pFW1)。

(二) BS10质粒pFW1DNA的分子量及其限制性核酸内切酶Xho I 酶切图谱

采用碱解法提取 DNA, 经氯化铯密度梯度离心得到纯净的 pFW1 DNA, 用 Xho I 内切酶完全酶解后, 在0.8%琼脂糖凝胶上进行电泳, 并以 λ DNA、 λ DNA/Xho I 酶切片段及 λ DNA/Hind III 片段为标准分子量对照, 结果见图版 I -4。pFW1 DNA经Xho I 酶切成四个片段 (以pFW1-Xho I A, B, C, D命名), 分子量分别为 38.1、13.4、10.1和 7.9Md。根据这个结果pFW1分子量为69.5Md。为证实 Xho I 酶切片段的总和为 69.5Md的可靠性, 我们又用Sst I 内切酶完全酶切pFW1, 经琼脂糖凝胶电泳出现七条带, 它们的分子量分别为21.5、16、10、7.9、5.6、4.5 和 4Md。这样, 用Sst I 酶切片段的总和与用Xho I 解切结果得出分子量一致。

上面曾提到pFW1 在未经酶切进行电泳时, 出现约139Md 的质粒DNA带, 如何解释? 由于我们分别用两种酶切 (Xho I, Sst I) pFW1大质粒, 并计算各酶切片段的总和, 均得到相同结果, 因此我们认为用酶切片段的方法来确定pFW1 大质粒的分子量是比较准确的。139Md质粒带可能是由于该质粒成二聚体分子的缘故。至于为什么以二聚体形式存在, 还有待于进一步研究。

为确定pFW1 与 Xho I 的酶切位点, 我们用 Xho I 部分酶切 pFW1, 在琼脂糖凝胶上电泳可见6条带(图版 I -1A)。根据标准分子量计算这 6 条带的分子量分别为 38.1、23.5、18、13.4、10.1和7.9Md。

其中四条带分子量与完全酶切的四条带分子量相同,另外二条分子量为23.5和18Md的带是完全酶切时没有的。根据分子量的大小可以判断这二条带是pFW1-Xho I B片段和C片段,C片段和D片段之间一个酶切点没切开的结果,所以可以推论B片段与C片段相邻,C片段与D片段相接,它们的次序上应为B-C-D,剩下A片段只能有一个位置,它们的顺序是A-B-C-D,作为环状的质粒Xho I 酶切谱见图1。

(三) BS10 杀蚊幼虫的毒素基因与 BTI 75Md大质粒有无同源性问题

为分别确定BS10染色体DNA和质粒DNA是否与BTI 75Md质粒有同源性,采用两种方法制备BS10DNA。一是Kado法,它适于大质粒的提取,而且除去大部或全部染色体DNA。二是提取全部DNA的蛋白酶法。用低熔点琼脂糖凝胶分离纯化BTI 75Md大质粒DNA。经Nick translation 标记 α - 32 P 同位素,得到高比活放射性探针,与BS10, BS1593, BSMR4 DNA进行Southern blot杂交。除进行Southern blot外,还将BS10 DNA直接点在NC膜上进行打点杂交。图版I-2是Southern blot之前凝胶电泳照片,图版I-3是杂交后放射自显影照片。从图版I-3可见BS10(C,F), BS101593(A),BSMR4(F)与BTI 75Md DNA杂交阴性。图版I-5打点杂交结果也证明BS10 DNA与BTI 75Md DNA杂交阴性。

讨 论

近年来,国内外分离了几株杀蚊毒力高的BS菌株,这有可能使BS作为生物杀虫剂应用于蚊媒病的防治。BS和BTI一样,杀蚊虫不够广谱。BS对库蚊有很强的毒杀活力;对曼蚊、鳞蚊、按蚊也有

效,但对伊蚊作用不大。而BTI则主要毒杀伊蚊。王宪等通过苏云金芽孢杆菌种间原生质体融合,可以得到扩大杀虫寄主范围的融合子^[10]。目前尚未见到通过分子水平上基因操作以扩大杀虫谱的报道。利用基因工程技术解决这个问题具有理论和潜在的实用价值。

到目前为止,BS杀蚊毒素基因定位尚不清楚。对于大部分苏云金芽孢杆菌来说,编码杀虫毒素蛋白的基因定位于染色体以外的复制子——大质粒上^[11](包括BTI的杀蚊毒素基因)。是否在BS中有类似情况,那么首先要回答的一个问题是BS中是否有质粒特别是大质粒存在。我们以国内分离的强毒株BS10为材料,经琼脂糖凝胶电泳,首先发现在139Md的位置上有一条质粒DNA带。经氯化铯密度梯度离心纯化该质粒DNA,用限制性核酸内切酶Xho I和Sst I分别进行完全酶切,结果表明pFW1的分子量为69.5Md。而上面提到139Md的质粒DNA带,推测是pFW1的二聚体形式。BS10只有一个大质粒,把质粒与染色体DNA分开即得到单一纯化的质粒。一般来说,在提取纯化过程中,大质粒损失大,得率低,这是做大质粒的酶切图谱中存在的困难。本文分析确定了BS10大质粒pFW1的限制性核酸内切酶Xho I的酶切位点,首次绘制了BS10大质粒pFW1的限制性酶切图谱。pFW1-Xho I限制性图谱的研究为进一步研究BS毒素基因提供了有益的资料。至于BS10杀蚊毒素基因的定位工作正在进行中。

克隆BS的毒素基因,通过检测转化子毒素基因表达产物与毒素蛋白抗体的免疫学反应来检出阳性克隆是较省力、敏感的方法,但它要求分离纯化毒素蛋白。本室现已得到纯化的BS10杀蚊毒素蛋白^[11]。以不同生物的具有核酸序列同源

性的基因为探针筛选转化子中阳性克隆也是一种可行的办法。本室用不同属的野豌豆球蛋白基因为探针, 从大豆基因文库中筛选出大豆球蛋白基因克隆^[12]。本文试图探讨同属不同种的BS与BTI的杀蚊毒素蛋白基因序列的同源性。采用核酸杂交技术, 将BTI 75Md大质粒(毒素基因位于该质粒上^[13,14])与BS10 DNA进行杂交, Southern blot与打点杂交结果均为阴性, 与BS1593、BSMR4进行的Southern blot杂交也得阴性结果, 证明球形芽孢杆菌(包括BS10在内)与苏云金芽孢杆菌以色列变种的毒素基因之间无同源性。因此, 克隆BS杀蚊毒素基因时, 是不能用BTI杀蚊毒素基因作为探针的。由于BS和BTI杀蚊毒素蛋白基因不同, 所以克隆BS毒素基因, 一类不同于BTI的毒素基因, 具有重要意义。该工作正在进展中。

Baumann等(1985)报道BS2362毒素蛋白血清与BTI毒素蛋白抗原之间不发生免疫反应^[15]。本文进一步从基因分子水平上证明BS与BTI毒素基因之间无同源性。

根据以上结果, 我们认为尽管BS和BTI均杀蚊幼虫并同属芽孢杆菌属, 但它们的毒素蛋白基因的进化来源是不同的。

本文在提取BS DNA时, 根据本室制

备芽孢杆菌原生质体的经验, 建立了制备芽孢杆菌全部DNA(包括大质粒DNA)的蛋白酶法。它的优点在于: 1. 不损失染色体DNA, 2. 可得到大质粒DNA。这对于构建球形芽孢杆菌BS10全部DNA的基因文库提供了一种可行的办法。

本实验用低熔点琼脂糖凝胶电泳方法制备75Md质粒DNA作探针, 从凝胶中回收的质粒DNA经电泳检测, 80%75Md质粒DNA已降解为25Md大小的DNA分子。本室通过氯化铯密度梯度离心和凝胶电泳分离纯化大质粒DNA时也多次出现这种现象^[16]。因此, 从凝胶中回收完整大质粒并希望回收率高, 在方法学上还需要探讨。

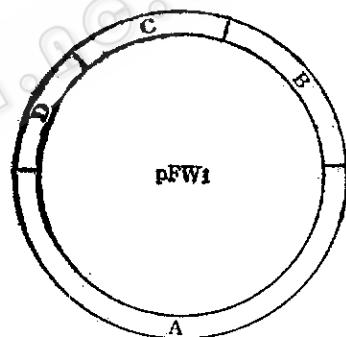


图1 BS10质粒pFW1-Xho I限制性图谱
Fig.1 Restriction map of BS10 plasmid pFW1
(the molecular weight of BS10 plasmid pFW1 is 69.5Md)
A. 38.1Md B. 13.4Md C. 10.1Md D. 7.9Md

参 考 文 献

- [1] 范云六: 杀虫微生物, 第一卷, 北京农业大学出版社, p.3, 1987.
- [2] de Barjac, H.: *CR Acad. Sci. Paris, Ser. D.*, 286:797, 1978.
- [3] Thomas, W.E. and Ellar, D.J.: *J. Cell Sci.*, 60:181, 1983b.
- [4] Ganesa, S. et al.: *Mol. Gen. Gent.*, 189:181, 1983.
- [5] Norton, N.B. et al.: *Plasmid*, 13:211, 1985.
- [6] 王璋瑜, 范云六: 生物工程学报, 3 (3):230, 1987.
- [7] Birnboim, H.C. and Doly, J.: *Nucleic Acids Res.*, 7:1513, 1979.
- [8] Maniatis, T. et al.: *In Molecular cloning*, Cold spring Harbor Laboratory, pp.170, 383, 1982.
- [9] Kafatos, F.C. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 7:1541, 1979.
- [10] 王宪, 范云六: 生物工程学报, 3 (1):29, 1987.
- [11] 刘国华等: 科学通报, 34(1):61, 1989.
- [12] 杜杰等: 生物工程学报, 4 (3):171-174, 1988.
- [13] Gonzalez, Jr. et al.: *Plasmid*, 11:28, 1984.

- [14] Sekar, V. and Carlton, B.C.: *Gene*, 33:151, 1985.
 [15] Baumann, P. et al.: *J. Bacteriol.*, 163:738, 1985.
 [16] 陈瑞春, 范云六: 微生物学报, 27 (1): 30, 1987.

PLASMID RESTRICTION MAP OF *BACILLUS* *SPHAERICUS* STRAIN 10

Wei Beiyang Fan Yunliu

(Laboratory of Molecular Biology, Biotechnology Research Center, Chinese
Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

The restriction map of a large plasmid pFW1 with molecular weight 69.5 Md in *Bacillus sphaericus* strain 10 (BS10) isolated from Jiang Shun Province of China was constructed.

There was no homology between toxin gene of BS10 (BS1593, BS MR4 as well) and of *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI) using a 75Md plasmid of BTI as a probe for hybridization (both southern and dot hybridization). These results suggested that the toxin genes of BTI and BS have evolved from different origin.

Key words

Bacillus sphaericus, large plasmid pFW1, restriction map, *Bacillus thuringiensis israelensis*, toxin genes, DNA sequence homology

Explanation of plate

- Electrophoresis of plasmid FW1 of BS10 with Xho I partial digestion
A. pFW1/Xho I (partial digestion) B. λ DNA C. λ DNA/Hind III
- Electrophoresis of BS10, BS1593, BS MR4 before Southern blotting
A. BS1593 (DNA prepared by the method of pronase)
B. C83912 (molecular weight mark)
C. BS10 (DNA prepared by Kado method)
D. BTI DNA
E. BS10 (DNA prepared by the method of pronase)
F. BS MR4 (DNA prepared by the method of pronase)
- Southern blot hybridization of BS10, BS1593 and BS MR4 with BTI 75Md plasmid used as a probe (Note: the samples were same as plate I-2)
- Electrophoresis of plasmid FW1 of BS10 with Xho I digestion
A. λ -DNA/Xho I B. pFW1/Xho I C. λ DNA/Hind III D. λ DNA
- Dot hybridization of BS10 with BTI 75Md Plasmid
A. BTI DNA B. BS10 DNA

