

消除内生质粒对苏云金芽胞杆菌 YBT-1463 特性的影响

李 林 王 征 喻子牛

(华中农业大学微生物科学技术系 武汉 430070)

摘要: 研究了经完全消除苏云金芽胞杆菌野生菌株 YBT-1463 的内生质粒对该菌部分形态、遗传及生理生化特性的影响。结果表明,消除内生质粒后的无质粒突变株不形成伴胞晶体,但电转化 4 种供体质粒,即 pBMB121、pBMB304-1Ab、pBMBLC 和 pBMB9748 的效率显著提高,转化频率最高比出发菌株提高 6.8×10^4 倍,而无质粒突变株对红霉素等 10 种抗生素的敏感性、对葡萄糖等 19 种碳源和谷氨酸等 12 种氮源的利用能力及生长性能与出发菌株无明显差异。

关键词: 内生质粒,消除,苏云金芽胞杆菌,电转化

中图分类号: Q93-936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-025-03

INFLUENCE ON PROPERTIES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* YBT-1463 STRAIN BY CURING ITS RESIDENT PLASMIDS

LI Lin WANG Zheng YU Zi-Niu

(Department of Microbial Science and Technology, Key Laboratory of Agro-Microbiology, the Ministry of Agriculture, P. R. China, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: This paper reports the influence on morphological, genetic, physiological and biochemical properties of *Bacillus thuringiensis* Wild-type strain YBT-1463 by curing its resident plasmids. It showed that the plasmid-cured mutant BMB171 lost the ability to form the parasporal crystal, but its electro-transformation efficiency to 4 exogenous plasmids, pBMB121, pBMB304-1Ab, pBMBLC and pBMB9748 was much higher than that of YBT-1463, and the highest transformation frequency could reach up to 4.8×10^4 fold, whereas there was no obvious influence on the sensitiveness of 10 antibiotics, the utilization of 19 carbon sources and 12 nitrogen sources materials as well as the growth properties between BMB171 and YBT-1463 was observed.

Key words: Resident plasmids, Curing, *Bacillus thuringiensis*, Electroporation

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是一种革兰氏阳性土壤杆菌,由于能产生具有杀虫活性的伴胞晶体而受到重视。不同类型的苏云金芽胞杆菌野生菌株大多含有一定数量的内生质粒,其中的部分内生质粒除携带该菌特有的杀虫晶体蛋白的编码基因(即 *cry* 基因)外,往往还携带有与伴胞晶体的装配过程有关、并对杀虫活性有影响的一些蛋白质的编码基因,并

可能与该菌对某些药物的抗性和对某些营养物质的利用有关^[1,2]。苏云金芽胞杆菌 YBT-1463 是本室分离到的一株对鳞翅目(Lepidoptera)害虫有高毒力的野生菌株,在前一研究中,本室通过逐级提升生长温度并结合用 SDS 进行处理的方法,将该菌株的内生质粒完全消除,获得了

一株无质粒突变株 BMB171^[3]。本文报道苏云金芽胞杆菌野生菌株 YBT-1463 和无质粒突变株 BMB171 在培养特征、遗传学和生理生化特性方面的比较研究结果,以验证完全消除内生质粒对野生菌株 YBT-1463 特性的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

苏云金芽胞杆菌 YBT-1463 为对鳞翅目害虫有高毒力的野生菌株,由本室分离保存; BMB171 为来源于菌株 YBT-1463 的无质粒突变株,见文献 [3]。用于电转化的外源质粒 pBMB121、pBMB304-1Ab 和 pBMBLC 具 Ap^r Erm^r; pBMB9748 具 Ap^rKan^r,均由本室构建。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基:参见文献 [4]。

1.2.2 芽胞杆菌基本培养基: MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.5g, CaCl₂ · 2H₂O 0.1g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5g,定容至 1000mL。pH 值 7.0~7.2。

1.2.3 选择培养基:分别在 LB 培养基中加入红霉素(Erm)和卡那霉素(Kan),使其终浓度分别为 25μg/mL 和 20μg/mL。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒 DNA 的提取与定量:参照文献 [4] 进行。

1.3.2 外源质粒向苏云金芽胞杆菌的电转化:按文献 [5] 稍作修改进行。离心收集的菌体用 SG 缓冲液 (272mM 蔗糖, 15% 甘油) 洗涤 4 次。电脉冲参数为: 10.0kv/cm, 25μF, 200Ω。

1.3.3 碳源和氮源物质利用的测定:将实验中使用的 19 种碳源物质和 12 种氮源物质配制成 10% 的贮备液, 0.55 × 10⁵Pa 灭菌 15min。测定时取 1.0mL 贮备液,加入 19.0mL 已熔化的固体基本培养基,混匀后倒平板。用灭菌牙签点种少量菌体于供测平板上,于 30℃ 培养 48h 后观察生长情况,并分别以点种基本培养基和 LB 培养基的培养物作阴性和阳性对照。

1.3.4 抗生素敏感谱实验:将红霉素等 10 种抗生素的贮备液倒系列稀释梯度的 LB 抗性平板,

接种经 LB 平板活化培养过夜的菌株 YBT-1463 及无质粒突变株 BMB171,置 30℃ 培养 48h 后观察生长情况。

1.3.5 生长曲线的测定:将菌株 YBT-1463 和突变株 BMB171 用 LB 培养液活化培养过夜后,调整至相同菌数水平,并等量接种于 100mL LB 培养液中,于 30℃ 以 210r/min 振荡培养,定期取样测定 OD_{650nm} 值,并制作生长曲线。

1.3.6 生物量的测定:分别取培养 48h 的菌液 100.0mL,以 8000r/min 离心 5min 后收集沉淀物,并用 0.85% NaCl 溶液洗涤 2 次,冷冻真空干燥 30min 后称重,即菌体湿重。将相同处理的沉淀物在 105℃ 烘至恒重,即为菌体干重。

2 结果与讨论

2.1 无质粒突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 培养特征的比较

经用 LB 等不同培养基和用固体划线或液体摇瓶发酵等方式来培养无质粒突变株 BMB171 和野生菌株 YBT-1463,结果观察到突变株 BMB171 在个体形态(包括营养体、芽胞囊及芽胞)及菌落特征等方面与出发菌株 YBT-1463 未见明显差异,但 BMB171 不形成伴胞晶体,SDS-PAGE 电泳结果亦显示该突变株不产生杀虫晶体蛋白,而出发菌株 YBT-1463 则形成典型的菱形伴胞晶体。因此可以推断野生菌株 YBT-1463 的 *cry* 基因是定位在该菌的内生质粒,而非染色体上。

2.2 无质粒突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 转化性能的比较

选取具有相同复制子,但携带不同 *cry* 基因的外源质粒 pBMB121、pBMB304-1Ab、pBMBLC 和穿梭载体质粒 pBMB9748 分别电转化突变株 BMB171 和其出发菌株 YBT-1463,其转化频率见表 1。

表 1 的结果表明,经完全消除内生质粒的突变株 BMB171 转化 4 种供体质粒的频率均显著高于出发菌株 YBT-1463。推测这是由于消除内生质粒后,避免了质粒不相容性的影响和菌株限制修饰能力的降低,从而提高了对供体质粒的转化频率。由此可见,消除(或部分

表1 4种外源质粒电转化突变株BMB171及出发菌株YBT-1463的频率
(单位: 转化子CFUs/ μg DNA)

菌株	pBMB121	PBMB304-1Ab	pBMBLC	pBMB9748
BMB171	3.4×10^6	2.1×10^5	1.2×10^6	4.7×10^5
YBT-1463	50	26	44	11

消除)受体菌株的内生质粒,不失为提高外源质粒导入该受体菌的导入频率的一种有效方法。

2.3 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对 10 种抗生素的敏感性

将无质粒突变株 BMB171 及出发菌株 YBT-1463 在含有红霉素等 10 种抗生素的抗性平板上进行培养, 抗生素的浓度范围为 0.1~100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 结果表明, 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对 10 种抗生素的敏感程度未见差异, 即二者对红霉素、庆大霉素和利福平最为敏感, 其浓度大于 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时就能抑制生长; 对四环素、氯霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素和壮观霉素等抗生素则在浓度大于 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制生长; 而对氨苄青霉素则表现出抗性。本文进一步提高培养基所含氨苄青霉素的浓度至 300.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 时仍能良好生长, 说明突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 具有某种拮抗氨苄青霉素的机制, 如可能携带有氨苄青霉素抗性基因, 且该基因是定位在染色体上。

2.4 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对碳源和氮源物质的利用

经测定突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对 19 种碳源物质和 12 种氮源物质的利用能力, 结果表明两菌株均能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、半乳糖、海藻糖、木糖、麦芽糖、淀粉和柠檬酸作为唯一碳源物质, 但不能利用乳糖、棉子糖、阿拉伯糖、蜜二糖、L-岩藻糖、纤维素、甘露醇、肌醇、山梨醇和丁二酸钠作为唯一碳源物质; 同时两菌株均能利用谷氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸、尿素、干酪素、 NaNO_3 、 NaNO_2 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为唯一氮源物质。突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对以上试验范围内的碳、氮源物质的利用能力上表现为一致性, 说明消除内生质粒对碳、氮源营养需求没有明显影响。

2.5 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 的生长曲线与生物量

突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 在相同培养条件下测定的生长曲线见图 1。从图 1 可见, BMB171 与 YBT-1463 在 LB 液体培养基上的生长性能无明显差异。经测定, 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 培养 48h 的培养物细胞湿重分别 12.4g/L 和 12.1g/L, 而细胞干重分别 8.1g / L 和 7.9g/L, 可见两菌株在生物量上亦无明显差异。

以上实验结果表明, 采用逐级从 42 $^{\circ}\text{C}$ 、44 $^{\circ}\text{C}$ 和 46 $^{\circ}\text{C}$ 提升生长温度, 并在 46 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下添加 0.05%SDS 进行处理, 从而将内生质粒完全消

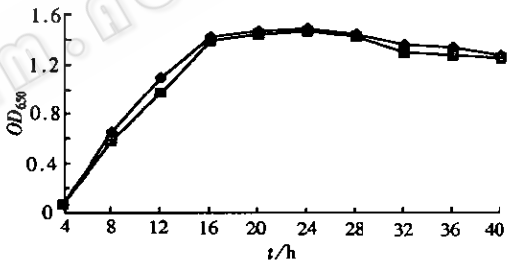


图1 突变株BMB171与出发菌株YBT-1463的生长曲线
—■— YBT-1463, —□— BMB171

除的突变株 BMB171, 一方面在对几种常用抗生素的敏感性、对试验范围内的碳源和氮源物质的利用能力以及生长性能方面与出发菌株 YBT-1463 无明显差异, 另一方面则显著提高了对几种供体质粒的转化频率, 因而具有作为构建高效杀虫工程菌的受体菌的特性。目前, 本室对用突变株 BMB171 作为构建几类杀虫工程菌的受体菌正在进行进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 喻子牛主编, 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990, 129~154.
[2] 李 林, 刘子铎, 孙 明等. 农业生物技术学报, 1998, 6(1): 90~95.
[3] 李 林, 杨 超, 刘子铎等. 微生物学报, 1999(待发)

表1 4种外源质粒电转化突变株BMB171及出发菌株YBT-1463的频率
(单位: 转化子CFUs/ μg DNA)

菌株	pBMB121	PBMB304-1Ab	pBMBLC	pBMB9748
BMB171	3.4×10^6	2.1×10^5	1.2×10^6	4.7×10^5
YBT-1463	50	26	44	11

消除)受体菌株的内生质粒,不失为提高外源质粒导入该受体菌的导入频率的一种有效方法。

2.3 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对 10 种抗生素的敏感性

将无质粒突变株 BMB171 及出发菌株 YBT-1463 在含有红霉素等 10 种抗生素的抗性平板上进行培养, 抗生素的浓度范围为 0.1~100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 结果表明, 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对 10 种抗生素的敏感程度未见差异, 即二者对红霉素、庆大霉素和利福平最为敏感, 其浓度大于 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时就能抑制生长; 对四环素、氯霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素和壮观霉素等抗生素则在浓度大于 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制生长; 而对氨苄青霉素则表现出抗性。本文进一步提高培养基所含氨苄青霉素的浓度至 300.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 时仍能良好生长, 说明突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 具有某种拮抗氨苄青霉素的机制, 如可能携带有氨苄青霉素抗性基因, 且该基因是定位在染色体上。

2.4 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对碳源和氮源物质的利用

经测定突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对 19 种碳源物质和 12 种氮源物质的利用能力, 结果表明两菌株均能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、半乳糖、海藻糖、木糖、麦芽糖、淀粉和柠檬酸作为唯一碳源物质, 但不能利用乳糖、棉子糖、阿拉伯糖、蜜二糖、L-岩藻糖、纤维素、甘露醇、肌醇、山梨醇和丁二酸钠作为唯一碳源物质; 同时两菌株均能利用谷氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸、尿素、干酪素、 NaNO_3 、 NaNO_2 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为唯一氮源物质。突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 对以上试验范围内的碳、氮源物质的利用能力上表现为一致性, 说明消除内生质粒对碳、氮源营养需求没有明显影响。

2.5 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 的生长曲线与生物量

突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 在相同培养条件下测定的生长曲线见图 1。从图 1 可见, BMB171 与 YBT-1463 在 LB 液体培养基上的生长性能无明显差异。经测定, 突变株 BMB171 与出发菌株 YBT-1463 培养 48h 的培养物细胞湿重分别 12.4g/L 和 12.1g/L, 而细胞干重分别 8.1g / L 和 7.9g/L, 可见两菌株在生物量上亦无明显差异。

以上实验结果表明, 采用逐级从 42 $^{\circ}\text{C}$ 、44 $^{\circ}\text{C}$ 和 46 $^{\circ}\text{C}$ 提升生长温度, 并在 46 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下添加 0.05%SDS 进行处理, 从而将内生质粒完全消

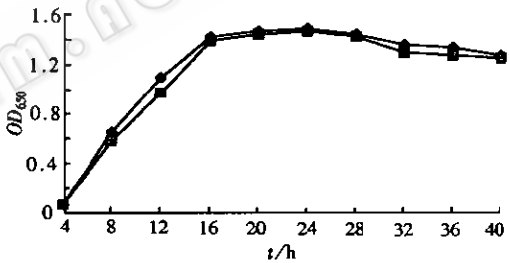


图1 突变株BMB171与出发菌株YBT-1463的生长曲线
—■— YBT-1463, —○— BMB171

除的突变株 BMB171, 一方面在对几种常用抗生素的敏感性、对试验范围内的碳源和氮源物质的利用能力以及生长性能方面与出发菌株 YBT-1463 无明显差异, 另一方面则显著提高了对几种供体质粒的转化频率, 因而具有作为构建高效杀虫工程菌的受体菌的特性。目前, 本室对用突变株 BMB171 作为构建几类杀虫工程菌的受体菌正在进行进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 喻子牛主编, 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990, 129~154.
[2] 李 林, 刘子铎, 孙 明等. 农业生物技术学报, 1998, 6(1): 90~95.
[3] 李 林, 杨 超, 刘子铎等. 微生物学报, 1999(待发)

表).

出版社, 1993.

[4] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯主编 (金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南, 第二版, 北京: 科学

[5] Bone E J, Ellar D J. FEMS Microbiol Lett, 1989, 58: 171~178.