

mel 基因在苏云金芽孢杆菌中的转移和表达*

蔡信之¹ 周秋华² 刘忠权¹

(盐城师范学院生物系 盐城 224002)¹ (盐城师范学院化学系 盐城 224002)²

摘要: 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是研究较深入、使用较广泛的杀虫细菌, 野外使用易受阳光中紫外线的影响而失活。黑色素具有很强的抗辐射作用。将构建的含有嗜麦芽假单胞菌 *mel* 基因的质粒 pWSY 通过原生质体转化导入苏云金芽孢杆菌体内, 使后者获得了稳定产生黑色素的能力。并在转化子细胞内检测到与供体菌相同的质粒。SDS-PAGE 显示该转化子体内额外表达了一分子量约为 18kD 的蛋白, 该蛋白很可能就是转化子表达的酪氨酸酶。经测定, 转化子抗辐射作用明显增强, 有效杀虫时间显著延长。

关键词: 嗜麦芽假单胞菌, 苏云金芽孢杆菌, *mel* 基因, 转移, 表达

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0072-04

TRANSFER AND EXPRESSION OF TYROSINASE GENE OF *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* IN *BACILLUS THURINGIENSIS*

CAI Xin-Zhi¹ ZHOU Qiu-Hua² LIU Zhong-Quan¹

(Department of Biology, Yancheng Normal College, Yancheng 224002)¹

(Department of Chemistry, Yancheng Normal College, Yancheng 224002)²

Abstract: *Bacillus thuringiensis* was studied deeply and used widely. It easily die from effect of ultra-violet ray when exposed in the sun. Antiradiation effect of melanin is very strong. *Mel* gene of *P. maltophilia* AT18 has been introduced into *B. thuringiensis* and enables it the ability of producing melanin steadily. The plasmid as the donor's has been tested in the transformant. SDS-PAGE analysis also revealed that an additional protein of 18kD, which was the tyrosinase expressed by the transformant. The results of assay show that antiradiation effect of transformant is very strong, and the effect time of killing insect is longer than the recipient, while the transformant can't infect animals and fowls.

Key words: *Pseudomonas maltophilia*, *Bacillus thuringiensis*, Tyrosinase gene, Transfer, Expression

酪氨酸酶基因 (*mel*) 编码的酪氨酸酶是合成黑色素的关键酶, 广泛存在于细菌、放线菌、真菌、植物和动物体内, 其主要功能是产生黑色素。黑色素是一类结构复杂的类多酚聚合体, 具有独特的结构和性质, 有很强的抗辐射作用, 可以作为紫外线吸收剂, 对生物体具有保护作用^[1]。嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*) AT18 能稳定产生黑色素, 并已证明该系统是由酪氨酸酶控制的。已将该菌的酪氨酸酶基因 (*mel*) 片段克隆到 *E. coli* 质粒 pUC18 上, 构建了产生黑色素的工程菌 *E. coli*/pWSY^[2]。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) HD-1 菌株是研究较深入、使用较广泛的杀虫细菌, 野外使用易受阳光中紫外线的影响而失活。目前, 国内外细菌杀虫剂在使用中普遍存在的突出问题之一是有效期太短, 主要是菌体物质和杀虫物质易被阳光中的紫外线灭活和钝化。有人在细菌杀虫剂中添加紫外线防护剂, 以增强其对紫外线的抗性^[3], 其主要方法是将链霉菌产生的黑色素与 Bt 杀虫剂混合使用, 可以有效防止紫外线的破坏作用, 延长其杀虫有效期。但是, 该法不仅成本高, 而且在野外环境中黑色

* 江苏省社会发展基金资助项目 (No.1352001016)

收稿日期: 2003-02-17, 修回日期: 2003-04-02

素易被水冲洗掉,影响使用效果。若是杀虫菌体能产生黑色素,可望大大提高细菌杀虫剂抵抗紫外线对菌体物质和杀虫物质破坏的能力,使其杀虫活性保持稳定^[4,5]。

将嗜麦芽假单胞菌 *mel* 基因通过原生质体转化导入苏云金芽孢杆菌 HD-1,使后者能稳定产生黑色素,可抵抗紫外线的辐射,提高其杀虫效果。并且,由于黑色素惰性,不会与杀虫菌剂的有效成分作用。国内外尚未见到这方面的研究报告。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*) AT18、工程菌 *E. coli*/pWSY、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) HD-1 均由武汉大学生命科学院提供。

1.1.2 试剂:各种限制性内切酶、DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准等均购自华美或原平公司。地高辛标记检测试剂盒购自 Boehringer-Mannheim 公司。

1.1.3 培养基:LB 培养基、酪素培养基、发酵培养基、诱导培养基配制参照文献[2, 5~8]。

上述后两种液体培养基在振荡培养 12h 后加入底物 L-酪氨酸至终浓度 1mg/mL。

以上各种培养基使用前加氨苄青霉素至终浓度为 100 mg/L。

肉汤蛋白胨培养基、高渗肉汤蛋白胨培养基、转化用溶液配制参照文献[6~8]。

1.1.4 菜青虫幼虫:盐城师范学院生物系实验室饲养。

1.1.5 安全性试验:所用畜禽系盐城市城区南洋镇农民饲养的成年畜禽。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取、纯化及检测:参照文献[7]进行。

1.2.2 苏云金芽孢杆菌原生质体制备:参照文献[8]进行。

1.2.3 转化反应:参照文献[7, 8]进行。

1.2.4 苏云金芽孢杆菌原生质体再生:采用夹层培养法,参照文献[8]进行。

1.2.5 DNA 斑点杂交:将转化子质粒 DNA、供体 pWSY 质粒 DNA、受体及对照菌株总 DNA 点在尼龙膜上,经固定、预杂交后,加入 DIG 标记的 *mel* 基因探针,按文献[7]的方法进行杂交和洗膜。探针制备按文献[5]的方法进行,探针标记及杂交结果的免疫检测均参照 B.M 公司地高辛标记检测试剂盒说明说进行。

1.2.6 转化子 *mel* 基因的诱导表达及检测:参照文献[2~7]进行。

1.2.7 转化子的抗辐射作用:参照文献[5]进行。

1.2.8 转化子的杀虫作用:参照文献[3]进行。

1.2.9 转化子的安全性试验:参照文献[9, 10]进行。

2 结果与讨论

2.1 苏云金芽孢杆菌原生质体制备

苏云金芽孢杆菌 G⁺ 细胞壁中肽聚糖层厚,原生质体较难制备。本实验采用幼龄菌体,加 0.5 mg/mL 溶菌酶,37℃,摇床处理 1h,效果较好。经镜检,绝大多数杆菌已变为球状。

2.2 酪氨酸酶基因 (*mel*) 的转移

将含酪氨酸酶基因的质粒 pWSY 通过转化导入苏云金芽孢杆菌 HD-1 原生质体,再将转化子悬液预培养 18h 后与高渗酪素培养基混匀,倒入夹层培养基的中层,30℃ 培养

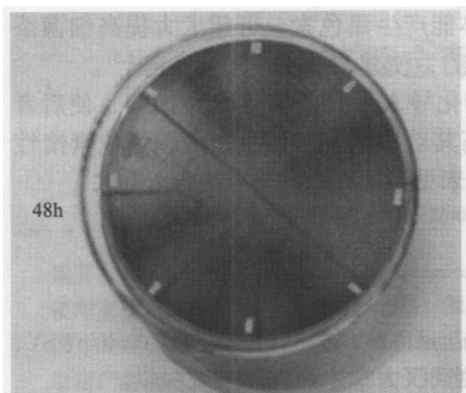


图1 各菌株在酪素平板上产生黑色素的比较

1, 5 受体, 2, 6 *P. maltophilia* AT18, 3, 7 *E. coli*/pWSY, 4, 8 HD-1 转化子

3d, 有的菌落周围出现淡淡的棕色, 表明该菌落产生水溶性黑色素, 它们可能是本实验所需要的克隆有酪氨酸酶基因的阳性转化子。

将上述产黑菌株反复在酪素培养基中转换、培养, 稳定产生黑色素。将其与供体菌、受体菌同时划线接种在含有氨苄青霉素的同一酪素平板培养基上, 30℃培养 48h, 结果如图1。受体菌在酪素培养基中虽经长时间的培养, 始终不能产生黑色素。可见转化子产生黑色素的能力是外源酪氨酸酶基因赋予的。

2.3 DNA 斑点杂交

挑取上述产黑菌株分别在 LB 液体培养基中振荡培养, 进行质粒检测, 在部分产黑菌株中发现 pWSY 质粒。转化子细胞中多了一个分子量与 pWSY 质粒相同的质粒。由于没有找到

能同时切割转化子各质粒的限制性内切酶, 不能准确测定其分子量。

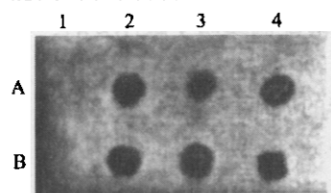


图2 *mel* 基因的斑点杂交

1 *B. thuringiensis* HD-1 总 DNA, 2 转化子质粒 DNA, 3 pWSYDNA, 4 *P. maltophilia* AT18 总 DNA

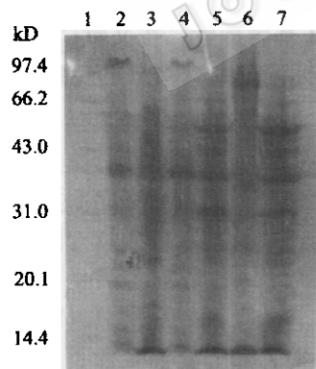


图3 几株细菌总蛋白的 SDS-PAGE 图谱比较

1 蛋白质分子量标准, 2, 4 转化子, 3 *B. thuringiensis* HD-1, 5 *E. coli*/pWSY, 6 *P. maltophilia* AT18, 7 *E. coli* HB101

DNA 斑点杂交结果 (图2) 清楚表明, 转化子质粒 DNA、pWSYDNA 及对照菌株 *P. maltophilia* AT18 总 DNA 呈阳性, 而受体 *B. thuringiensis* HD-1 总 DNA 阴性。

2.4 转化子酪氨酸酶基因的诱导表达

转化子、受体菌、供体菌及 *P. m*AT18、*E. coli* HB101 在诱导培养基中经过 L-酪氨酸诱导表达后, 其总蛋白的 SDS-PAGE 图谱 (图3)。经过比较, 清楚地看到转化子额外表达了一分子量约为 18kD 的蛋白。这一结果与根据核酸序列中 OFR504 推断所表达的酪氨酸酶分子量基本一致^[2]。说明该蛋白即为转化子表达的酪氨酸酶。

2.5 转化子的抗辐射作用

2.5.1 转化子的抗紫外线作用: 将相同浓度的转化子与受体苏云金芽孢杆菌 HD-1 悬液同时放在紫外灯下照射, 每隔 5min 吸取 0.5mL 菌液进行不同程度的稀释 (试管外裹有黑纸, 红光下操作), 吸取 0.2mL 稀释菌液涂布于肉汤蛋白胨平板上, 每个稀释度重复 3 次, 在黑布袋中 30℃培养 3d 进行菌落计数, 求出各自的存活率, 结果如图4。

紫外线照射 5min 后, 受体菌 HD-1 被杀死的达 90.9%, 而转化子仅死亡 50.7%; 照射 10min, 受体菌死亡率高达 99.1%, 而转化子的死亡率只有 83.9%。转化子由于含酪氨酸酶基因, 能产生黑色素, 可抵抗紫外线的辐射作用, 存活率明显提高。

经生物测定, 紫外线照射 3h 后菌液的杀虫作用, 受体苏云金芽孢杆菌 HD-1 的杀虫率仅为 44.6%, 而转化子的杀虫率仍达 82.3%。

2.5.2 转化子的抗日光辐射作用:将相同浓度的转化子与受体苏云金芽孢杆菌 HD-1 悬液同时放在日光下直接照射,每隔 1h 吸取菌液 0.5mL 进行不同程度的稀释(试管外裹有黑纸,红光下操作),分别吸取 0.2mL 稀释菌液涂布于肉汤蛋白胨平板培养基上,每个稀释度重复 3 次,在黑布袋中 30℃ 培养 3d 进行平板菌落计数,计算存活率,结果如图 5。

日光照射 1h 后菌体的存活率,受体苏云金芽孢杆菌 HD-1 为 31.3%,转化子为 56.1%;照射 2h,受体菌为 14.1%,转化子为 34.3%。转化子的抗日光辐射作用显著增强。

生物测定结果表明,烈日照射 3d 菌剂的杀虫率,受体为 41.7%,转化子达 63.4%。

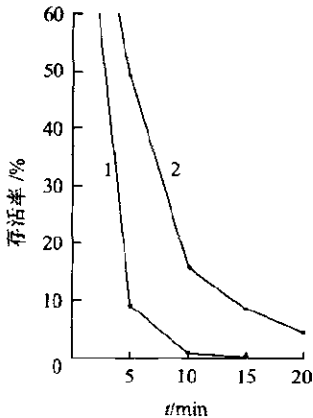


图 4 紫外线照射不同时间的菌体存活率

1 *B. thuringiensis* HD-1, 2 转化子

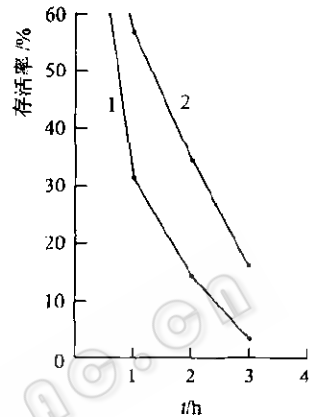


图 5 日光照射不同时间的菌体存活率

1 *B. thuringiensis* HD-1, 2 转化子

2.6 转化子的杀虫作用

多次生物测定的结果表明,转化子的杀虫作用与受体 BtHD-1 菌株基本相同。 LC_{50} (稀释倍数)前者为 3,250 倍,后者为 3,270 倍。

2.7 转化子的安全性试验

在两地同时进行的安全性试验的结果表明,转化子与受体菌一样,对猪、兔、鸡、鸭等畜禽安全,连续饲喂 3d,给药后连续观察 30d,均无死亡,亦无异常反应。

综上所述,将嗜麦芽假单胞菌酪氨酸酶基因,通过原生质体转化导入苏云金芽孢杆菌 HD-1 中,使后者获得了稳定产生黑色素的能力,可抵抗紫外线的辐射作用,延长其有效期,提高其杀虫效果。并且,黑色素不易被雨水冲洗掉,不影响其使用效果,使其杀虫活性保持稳定。转化子的杀虫机理与受体苏云金芽孢杆菌 HD-1 有无区别,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Donald A R. Copper Proteins and Copper Enzymes, 1984, 2: 207 ~ 234.
- [2] 王戈林,沈萍,杨澜,等.遗传学报,1999,26(3): 274 ~ 279.
- [3] 崔云龙,刘训理,田明.苏云金芽孢杆菌制剂紫外线防护剂的研究(杀虫微生物,第4卷).武汉:武汉大学出版社,1994. 64 ~ 65.
- [4] Patel K R, Wyman J A, Patel K, et al. J Invertebr Pathol, 1996, 67 (2): 120 ~ 124.
- [5] 蔡信之,谢志雄,沈萍.微生物学报,2001,41(5): 553 ~ 558.
- [6] Liu Y T, Sui M J. J Invertebr Pathol, 1993, 62: 131 ~ 136.
- [7] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.
- [8] 张义正,刘白玲,何先棋.微生物学通报,1997,24(4): 210 ~ 213.
- [9] 蔡信之.微生物学报,2000,40(5): 559 ~ 562.
- [10] 蔡信之.微生物学报,2001,41(6): 699 ~ 703.