

研究报告

苏云金芽胞杆菌 LM1212 质粒缺失对细胞分化的影响

马丽霞^{1,2} 彭琦² Lereclus Didier³ 张杰² 郭淑元^{1*} 宋福平^{2*}

(1. 北京理工大学生命学院 北京 100081)

(2. 植物病虫害生物学国家重点实验室 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100193)

(3. INRA, UMR1319 Micalis, La Minière, Guyancourt 78280, France)

摘要:【目的】苏云金芽胞杆菌 LM1212 与传统 Bt 相比,芽胞和晶体形成产生了分化,研究目的是明确质粒缺失对 LM1212 菌株细胞分化的影响。【方法】采用高温法对含有 *cry35-like* 基因启动子与 *lacZ* 基因融合质粒的 LM(p35'Z)菌株进行内源大质粒缺失。在含 X-gal 的 HCO 平板培养初步筛选缺失突变株,进一步提取野生型及突变株的质粒进行脉冲场凝胶电泳分析,并用 *cry* 基因引物进行鉴定、激光共聚焦扫描显微镜和光学显微镜观察、芽胞形成率分析及利用 SDS-PAGE 和 LC-MS/MS (Q-TOF)质谱分析质粒缺失对 LM1212 细胞分化和 Cry 蛋白表达的影响。【结果】筛选得到两株质粒缺失突变株 LM(p35'Z)-W 菌株和 LM(p35'Z)-DB 菌株,在含 X-gal 的 HCO 平板上,LM(p35'Z)-W 菌株菌落颜色为白色,LM(p35'Z)-DB 菌株菌落颜色为深蓝色,说明 *cry35-like* 基因启动子活性在这两株菌中受到影响;细胞形态观察发现 LM(p35'Z)-DB 菌株形成更多晶体产生细胞,LM(p35'Z)-W 菌株形成更少晶体产生细胞。SDS-PAGE 结果表明 LM(p35'Z)-DB 菌株 Cry 蛋白表达量提高,LM(p35'Z)-W 菌株 Cry 蛋白表达量减少。【结论】LM1212 质粒缺失可以影响细胞分化和晶体蛋白产量,此发现为深入解析 LM1212 细胞分化的调控机制和 Bt 菌株的遗传改良奠定了基础。

关键词: 苏云金芽胞杆菌 LM1212, 质粒缺失, Cry 蛋白, 细胞分化

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31530095)

***Corresponding authors:** GUO Shu-Yuan: Tel: 86-10-68914495-803; E-mail: guosy@bit.edu.cn

SONG Fu-Ping: Tel: 86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

Received: September 28, 2016; **Accepted:** December 06, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 19, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31530095)

***通讯作者:** 郭淑元: Tel: 86-10-68914495-803; E-mail: guosy@bit.edu.cn

宋福平: Tel: 86-10-62896634; E-mail: fpsong@ippcaas.cn

收稿日期: 2016-09-28; 接受日期: 2016-12-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-19

Effect of plasmid curing on cell differentiation of *Bacillus thuringiensis* strain LM1212

MA Li-Xia^{1,2} PENG Qi² Lereclus Didier³ ZHANG Jie²
GUO Shu-Yuan^{1*} SONG Fu-Ping^{2*}

(1. School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

(2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

(3. INRA, UMR1319 Micalis, La Minière, Guyancourt 78280, France)

Abstract: [Objective] Compared to traditional Bt strains, *Bacillus thuringiensis* strain LM1212 can differentiate into spore-formers and crystal-producers. In this study, we tried to reveal the effect of plasmid curing on the cell differentiation of LM1212 strain. [Methods] The endogenous large plasmids of LM(p35'Z) carrying *cry35-like* gene promoter and *lacZ* gene fusion plasmid p35'Z were cured by high temperature treatment. The mutants were selected at HCO plates with X-gal and identified by using primers of *cry* genes. We extracted plasmids of mutants and analyzed them by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Observation by laser confocal scanning microscope and optical microscope, calculation of spore formation rate, SDS-PAGE and LC-MS/MS (Q-TOF) mass spectrometry were used to determine the effect of plasmid curing on the cell differentiation and expression of *cry* genes in LM1212 strain. [Results] Two plasmid curing mutants LM(p35'Z)-W and LM(p35'Z)-DB strains were obtained. The colony of LM(p35'Z)-W was white and LM(p35'Z)-DB was dark blue on HCO plates containing X-gal. It indicated that the activity of *cry35-like* gene promoter was affected in these two strains. Cell morphology observation showed that more crystal-producers were found in LM(p35'Z)-DB than in both LM(p35'Z)-W and LM(p35'Z). Crystal protein production in LM(p35'Z)-DB increased, but not in LM(p35'Z)-W. [Conclusion] Plasmid curing affected cell differentiation of LM1212 strain and Cry protein expression. This will provide the excellent materials for better revealing the regulation mechanism of cell differentiation in LM1212 and genetic modification of Bt strain.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* strain LM1212, Plasmid curing, Cry protein, Cell differentiation

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性产胞菌。大多数 Bt 菌株能在母细胞形成芽胞的同时产生一个或多个伴胞晶体, 伴胞晶体由具杀虫活性的 Cry 或 Cyt 蛋白组成。由于 Bt 晶体蛋白有特异杀虫活性, 对人畜无害, 目前已成为应用最广泛的微生物杀虫剂^[1]。

研究发现存在一类较特殊的 Bt 菌株, 具有晶体细胞和芽胞细胞的分化现象^[2-3]。我们前期也发现了一株具类似分化现象的 Bt 菌株 LM1212, 它的 *cry* 基因只在非芽胞细胞中特异性转录, 与传统 Bt 的 *cry* 基因在芽胞细胞中转录明显不同^[4-5]。有研究在群体水平表明 Bt 在侵染昆虫过程中经历的 3 个连续的途径(Virulence, Necrotrophism, Sporulation)中存在分化现象, 在生物被膜的生长过程中至少存

在 5 种细胞亚群(Virulent、Virulent/necrotrophic、Necrotrophic、Necrotrophic/sporulating 和 An undened physiological stage), 转录因子 PlcR、NprR 和 SigE 在细胞内被连续激活, 表明在生物被膜形成过程中, 这些转录因子的活性是相互关联并存在于不同细胞分化亚群中的^[6]。但是目前 Bt 晶体细胞分化的机制仍不清楚。模式微生物枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*, Bs)的分化机制研究较为深入, 由多个双组分信号系统控制着不同细胞亚群的分化, 可以分化为多种功能不同的细胞亚群, 在不同的环境中通过分工发挥重要作用; 而这些细胞亚群的分化机制是由复杂的调控因子网络来控制^[7-8]。

由于 *cry* 基因定位于 Bt 的大质粒上^[9], LM1212 菌株中 *cry* 基因的转录只在非芽胞细胞转录, 因此

我们推测晶体细胞分化可能与 LM1212 大质粒上未知调控因子有关,本研究旨在通过质粒缺失探索内源质粒在 LM1212 菌株细胞分化中的作用,结果发现质粒缺失对筛选到的两株质粒缺失株细胞分化产生了影响,这一发现为筛选控制 LM1212 细胞分化的转录因子奠定了基础,同时为构建高产晶体的 Bt 工程菌株提供了遗传材料。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

研究中所用菌株和质粒见表 1。

1.2 培养基

菌种活化、保藏采用液体 LB (Luria-Bertani)培养基(g/L): 蛋白胨(Tryptone) 10.0, 酵母粉(Yeast extract) 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0。

突变株筛选采用 HCO 固体培养基(HCO 液体培养基^[10]+1.3%琼脂)。

HCO 液体培养基(g/L): Casein hydrolysate (vitamin-free) 7.0, KH₂PO₄ 6.8, MgSO₄·7H₂O 0.12, MnSO₄·4H₂O 0.002 2, ZnSO₄·7H₂O 0.014, Fe₂(SO₄)₃ 0.020, CaCl₂·4H₂O 0.18, Glucose 3.0, pH 7.2, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

芽孢形成率分析及细胞形态观察采用 SSM 培养基^[11](g/L): 营养肉汤(Nutrient broth) 8.0, KCl 1.0, MgSO₄ 1.2, NaOH 0.4, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 加 Ca(NO₃)₂ 1.64, MnCl₂ 0.013, FeSO₄ 0.004 (过滤除菌)。

红霉素(Erm)和 X-gal 终浓度分别为 5 mg/L 和 100 mg/L。

1.3 主要试剂和仪器

2×Taq DNA 聚合酶 Mix, 北京博迈德生物技术有限公司; 引物, 上海生工生物工程有限公司。

PCR 仪, 型号 Master cycler Gradient AG5331, 德国 Eppendorf 公司; 核酸电泳仪, 型号 DYY-5, 北京六一仪器厂; 脉冲场凝胶电泳仪, 型号 CHEF-DRIII, 美国 Bio-Rad 公司; 蛋白电泳仪, 型号 Mini protein III, 美国 Bio-Rad 公司; 激光共聚焦显微镜, 型号 Leica TCS SL, 德国 Leica Microsystems Wetzlar 公司; 正置 BX61 研究级显微镜, 型号 BX61, 日本奥林巴斯公司。

1.4 实验方法

1.4.1 高温缺失质粒: 将过夜活化的 LM(p35'Z)菌株在不含抗生素的 LB 液体培养基中 39 °C 培养至 OD₆₀₀=2.0-2.2, 按 1%接种量转接 4 次后稀释涂布于含抗生素和 100 mg/L X-gal 的 HCO 平板上 30 °C 培养 2 d 后观察。

1.4.2 脉冲场凝胶电泳分析突变株质粒谱: LM(p35'Z)-W 菌株、LM(p35'Z)-DB 菌株及 LM(p35'Z)菌株的质粒使用德国 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 试剂盒提取, 方法见试剂盒说明书。

将提取好的质粒进行电泳分析。首先在电泳槽内倒入 0.5×TBE 缓冲液, 盖上盖子, 打开冷凝泵进行预冷至温度降为 14 °C, 小心地把胶放入预冷的电泳槽, 按顺序依次将 DNA marker 及菌株质粒样品点入胶孔, 设置电泳参数为夹角 120°, 14 °C, 电压梯度 6 V/cm, 电泳时间 10 h。电泳结束后, 关机。EB 染色, 拍照并记录实验结果。

1.4.3 PCR 鉴定引物设计: 根据 LM1212 菌株 *cry* 基因序列设计引物(LM1212 基因组序列 NCBI accession No.为 AYPV00000000) (表 2), PCR 鉴定突变株。

1.4.4 显微镜观察突变株形态及细胞比例统计: 分别挑取 LM(p35'Z)-W 菌株、LM(p35'Z)-DB 菌株及 LM(p35'Z)菌株的单菌落活化后, 1%接种量转接于

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	描述 Description	来源 Resource
LM1212	Wild-type strain	[4]
LM(p35'Z)	LM1212 strain carrying p35'Z	[4]
LM(p35'Z)-W	LM(p35'Z) white clone by curing of the plasmid	This study
LM(p35'Z)-DB	LM(p35'Z) dark blue clone by curing of the plasmid	This study
p35'Z	pHT304-18Z carrying the <i>lacZ</i> gene under the control of the P _{cry35-like}	[4]

表 2 LM1212 *cry* 基因引物
Table 2 The sequences of primers of *cry* gene in LM1212

基因名 Symbol	上游引物 Forward primer (5'→3')	下游引物 Reverse primer (5'→3')
<i>cry41Ca1</i>	TTGAGCCAAGATGGTTCGAGT	TAGCTCCATCATCGGCAATTC
<i>cry74Aa1</i>	GCGACAGTAGGCATAGAAAC	ACCTTTGAAACGAGCGATAT
<i>cry45Ba1</i>	GGCGTTGAGAATATCGAGTTAG	CCGGTTGCTTGATGATGAGGAGG
<i>cry32Wa1</i>	GGTCAATCTGTTGGGAAAGG	GCATACCCCATTCGTTTCCA
<i>cry32Va1</i>	GAATACGAGCGATCACCTAGGTA	GACCATTGCGGTAGAGCAGGA
<i>cry35-like2</i>	AGACCGCTTGAACCTGGATT	CAAAGCATTCGATACAGTAGCCAC
<i>cry35-like</i>	TAGAGTCTAGCTGGCCAATT	CTATCAGGATCGGATGGAT

50 mL SSM 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养至 T5、T14 (将对数生长期结束的时间规定为 T0, Tn 为 T0 后 n 小时); 使用激光共聚焦扫描显微镜观察这 3 株菌 T5 时期的细胞, 用 FM[®]-4-64 [N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)-hexatrienyl)Pyridiniumdibromide] 红色荧光染料对细胞膜进行染色。使用光学显微镜观察这 3 株菌 T14 时期的细胞。

分别选取 LM(p35'Z)-W 菌株、LM(p35'Z)-DB 菌株及 LM(p35'Z)菌株 T14 时期显微镜 3 个不同视野的细胞进行统计分析; 每个视野选取总细胞数为 100 个, 记录芽胞细胞个数为 n1, 晶体细胞个数为 n2。每 100 个细胞芽胞细胞比例=n1/100; 晶体细胞比例=n2/100。3 个不同视野的结果取平均值并绘制柱状图。

1.4.5 质粒缺失株芽胞形成率分析: 分别挑取 LM(p35'Z)-W 菌株、LM(p35'Z)-DB 菌株及 LM(p35'Z)菌株的单菌落活化后, 1%接种量转接于 50 mL SSM 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养至 T1; 从 50 mL 菌液中取 1 mL, 梯度稀释后取 100 μL 涂于 LB 固体平板, 计算 T1 时期的总细胞数; 将剩余菌液继续培养至芽胞完全释放, 从中取 1 mL 菌液置于玻璃试管中, 65 °C 温浴 30 min 杀死营养体; 从中取 1 mL 处理的菌液梯度稀释后取 100 μL 涂于 LB 固体平板, 计算芽胞萌发数; 芽胞形成率计算公式: 芽胞形成率=芽胞的萌发数/T1 的总细胞数(每个样品重复 3 次)。

1.4.6 质粒缺失株晶体蛋白表达分析: 挑取 LM(p35'Z)-W 菌株、LM(p35'Z)-DB 菌株及 LM(p35'Z)菌株的单克隆接种于 5 mL 液体 LB 培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 8–10 h; 按 1%接种量转接至相同体积(300 mL)的 SSM 培养基中; 待晶体完全释放后, 4 °C、8 000 r/min 离心 6 min 收集所有沉淀物, 用 ddH₂O 洗涤 2–3 次后加适量 ddH₂O 悬浮, 用冷冻干燥机将沉淀物冻干(48 h) 对所有冻干粉进行称重, LM(p35'Z)-W 菌株 0.112 0 g, LM(p35'Z)-DB 菌株 0.240 0 g, LM(p35'Z)菌株 0.181 7 g; 加 ddH₂O 稀释至相同浓度(9 mg/L); 取相同上样量进行 SDS-PAGE 分析。进一步选取相应的条带进行 LC-MS/MS (Q-TOF)鉴定, 所得质谱数据与本地 Bt 菌株蛋白数据库及在线数据库进行比对。

2 结果与分析

2.1 质粒缺失株的筛选

LM(p35'Z)菌株由本实验室保藏, 携带有 LM1212 *cry35-like* 基因的启动子指导的 *lacZ* 基因, 在含有 X-gal 的 HCO 平板上菌落呈蓝色(图 1A)。

高温培养后发现有个别菌落的 *p35'-lacZ* 表达出现差异, 菌落颜色表现为白色(图 1B)或深蓝色(图 1C); 反复重复上述步骤 3 次, 突变菌株表型稳定(图 1D)。说明高温质粒的缺失影响了 *cry35-like* 启动子的活性。将菌落显白色的菌株命名为 LM(p35'Z)-W, 菌落显深蓝色菌株命名为 LM(p35'Z)-DB。

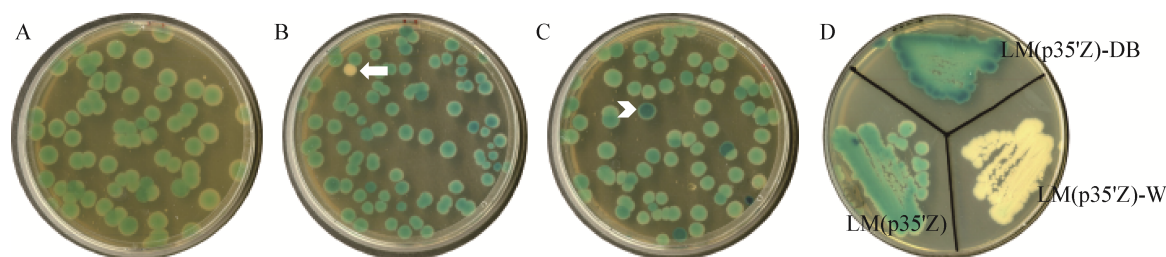


图1 突变菌株的筛选

Figure 1 Selection of mutants

注：深蓝色克隆用粗箭头表示，白色克隆用细箭头表示。A：30 °C 条件下在含 X-gal 的 HCO 平板上的 LM(p35'Z)菌株。B、C：39 °C 条件下在含 X-gal 的 HCO 平板上的 LM(p35'Z)菌株。D：重复 3 次后在含 X-gal 的 HCO 平板上的深蓝色和白色克隆表型。

Note: Dark blue clone are indicated by arrowheads and white clone are indicated by arrows. A: The colony of LM(p35'Z) strain on HCO plate (containing X-gal) when cultured at 30 °C; B, C: The colony of LM(p35'Z) strain on HCO plate (containing X-gal) when cultured at 39 °C. D: The phenotype of dark blue strain and white strain on HCO plate (containing X-gal) after repeating for 3 times.

2.2 突变株质粒谱分析

对 LM(p35'Z) 菌株、LM(p35'Z)-DB 菌株和 LM(p35'Z)-W 菌株提取质粒后进行脉冲场凝胶电泳分析，结果显示 LM(p35'Z)菌株可检测到 5 个条带（图 2 中 LM），从上至下依次命名为 1、2、3、4、5。结果显示条带 1 在 LM(p35'Z)-DB 菌株和 LM(p35'Z)-W 菌株中大小发生了明显变化，比原条

带变小，说明这条带所代表的质粒可能在两株突变体中发生了不同片段的缺失；条带 3 代表的质粒在 LM(p35'Z)-W 菌株中未检测到（图 2 中 W）；条带 5 根据其大小，推测其代表 Deng 等构建的 p35'Z 质粒^[4]，在 LM(p35'Z)-DB 菌株和 LM(p35'Z)-W 菌株中大小没有变化。以上结果说明两株突变体确实发生质粒的不同程度的缺失和大小的变化，而这些变化可能是引起两株突变体表型变化的原因。具体的结果还需要测序验证。

2.3 质粒缺失株的 *cry* 基因鉴定

分别挑取 LM(p35'Z)-W 菌株和 LM(p35'Z)-DB 菌株培养，利用根据 LM1212 菌株基因组序列设计的 7 对 *cry* 基因引物（表 1）进行 PCR 检测。结果显示 LM(p35'Z)-W 菌株可检测到 *cry32Wal*、*cry32Val*、*cry74Aa1* 和 *cry45Ba1*（图 3 泳道 1、2、3、7），而检测不到 *cry41Ca1*、*cry35-like* 和 *cry35-like2* 基因（图 3 泳道 4、5、6）；LM(p35'Z)-DB 菌株可检测到 *cry41Ca1*、*cry74Aa1* 和 *cry45Ba1*（图 3 泳道 8、9、13），而检测不到 *cry32Wal*、*cry32Val*、*cry35-like* 和 *cry35-like2* 基因（图 3 泳道 10、11、12、14）；说明这两株菌缺失了不同的 *cry* 基因。

目前已公布的所有 Bt 基因组序列中 *cry* 基因均位于大质粒上^[12-15]，而两株突变株具有不同的 *cry* 基因缺失，结合突变株的质粒谱分析，推测 LM(p35'Z)菌株的 *cry* 基因位于图 2 中条带 1 所代表的大质粒上，其中 LM(p35'Z)-W 菌株缺失条带 1 所

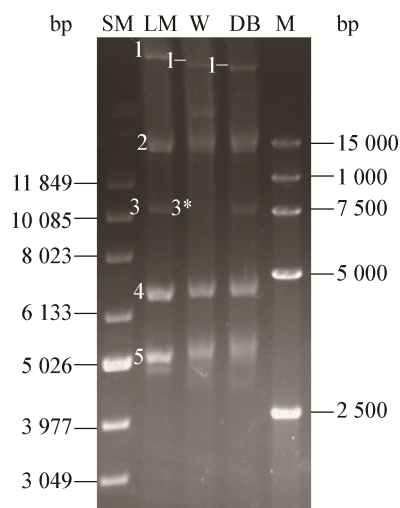


图2 突变菌株的质粒谱分析

Figure 2 Analysis of plasmids pattern in mutants

注：SM：超螺旋 DNA ladder marker；M：DNA ladder marker；LM：LM(p35'Z)；W：LM(p35'Z)-W；DB：LM(p35'Z)-DB；*：琼脂糖电泳检测缺失的质粒；-：琼脂糖电泳检测部分缺失的质粒。
Note: SM: Supercoiled DNA ladder marker; M: DNA ladder marker; LM: LM(p35'Z); W: LM(p35'Z)-W; DB: LM(p35'Z)-DB; *: The curing plasmids on agarose gel; -: Part of the plasmids were curing.

代表的大质粒上的 *cry41Ca1*、*cry35-like* 和 *cry35-like2* 基因所在片段, LM(p35'Z)-DB 菌株缺失条带 1 所代表的大质粒上的 *cry32Wal*、*cry32Val*、*cry35-like* 和 *cry35-like2* 基因所在片段。共同缺失 *cry35-like* 和 *cry35-like2* 基因所在片段。具体情况还需进一步测序验证。

2.4 质粒缺失株的细胞亚群观察及统计分析

LM(p35'Z)菌株在 T5 时期前芽胞已经形成, 未形成 Cry 晶体蛋白(图 4C), 在 T14 时期芽胞和 Cry 晶体蛋白都已形成(图 4F); 通过对 LM(p35'Z)-DB 菌株、LM(p35'Z)-W 菌株和野生型 LM(p35'Z)菌株 T5、T14 时期的细胞进行观察, 发现与野生型菌株

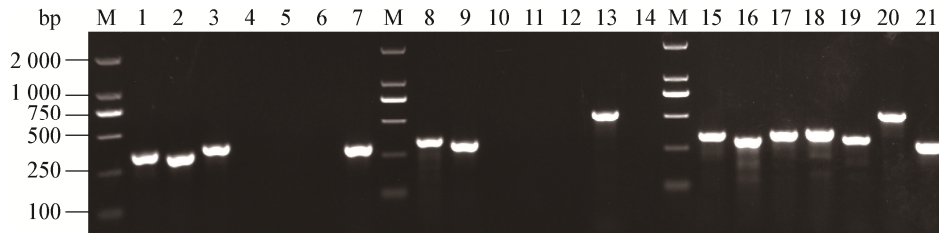


图 3 突变菌株的 *cry* 基因鉴定

Figure 3 The identification of *cry* gene in mutants

Note: M: Marker; 1, 8, 15: *cry74Aa1*; 2, 9, 16: *cry45Ba1*; 3, 10, 17: *cry32Wal*; 4, 11, 18: *cry35-like2*; 5, 12, 19: *cry35-like*; 6, 13, 20: *cry41Ca1*; 7, 14, 21: *cry32Val*.

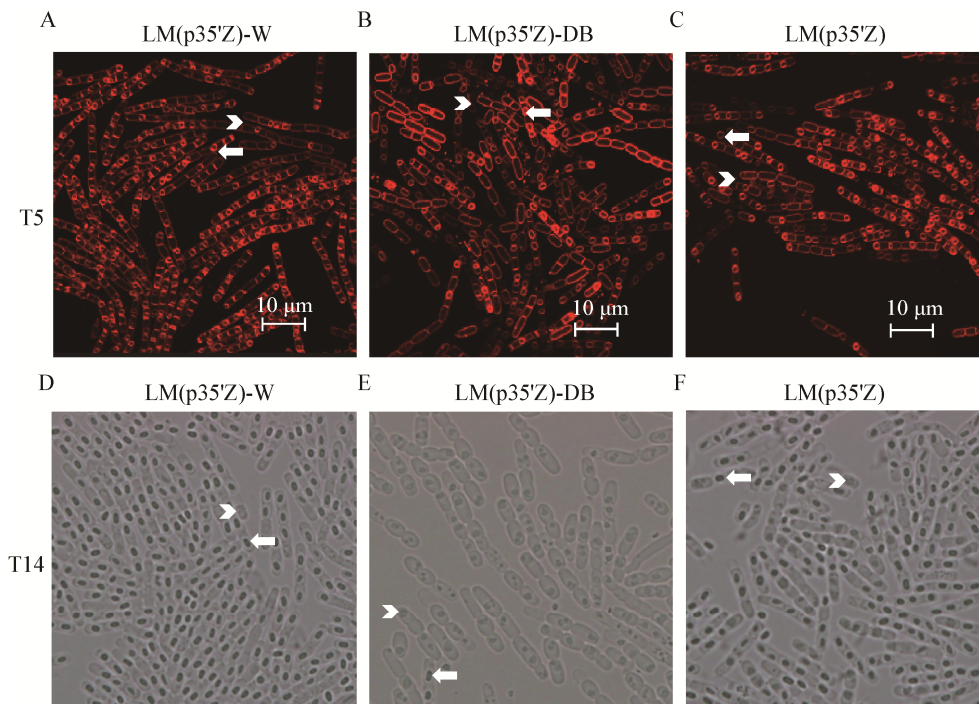


图 4 菌株的形态观察

Figure 4 Observation of morphological features in mutants

注: 光学显微镜放大倍数(1 000×); 芽胞形成细胞(具有不对称隔膜的细胞, 前芽胞及芽胞)用粗箭头表示, 晶体产生细胞用细箭头表示; 细胞在含红霉素的 SSM 培养基中培养; 细胞膜用 FM[®]-4-64 进行染色。

Note: Optical microscope (1 000×); Spore-formers (cell with asymmetric septum, prespore or spore) are indicated by arrows and crystal-producers are indicated by arrow heads; Cells were cultured in SSM medium with erythromycin; The cell walls were stained with FM[®]-4-64.

LM(p35'Z) (图 4C, 4F)相比, 在 LM(p35'Z)-DB 中形成更多晶体产生细胞(图 4B, 4E), 在 LM(p35'Z)-W 中形成较少晶体产生细胞(图 4A, 4D)。

通过对突变株 T14 时期显微镜视野中的芽孢和晶体细胞所占比例分别进行计数统计分析, 结果显示, 与野生型 LM(p35'Z)菌株相比, LM(p35'Z)-W 菌株的晶体细胞比例降低, 芽孢细胞所占比例提高(图 5); 而 LM(p35'Z)-DB 菌株的晶体细胞比例提高, 芽孢细胞所占比例降低(图 5)。

说明 LM(p35'Z)-DB 菌株和 LM(p35'Z)-W 菌株晶体产生细胞和芽孢形成细胞比例发生了变化; 质粒缺失影响了 LM1212 菌株芽孢细胞和晶体细胞比例。

2.5 质粒缺失株的芽孢形成率分析

分析了 LM(p35'Z)-DB 菌株和 LM(p35'Z)-W 菌株的芽孢形成率, LM(p35'Z)菌株作为对照; 发现在 LM(p35'Z)-DB 菌株的芽孢形成率很低, LM(p35'Z)-W 菌株的芽孢形成率略低于 LM(p35'Z) (图 6)。进一步说明在 LM(p35'Z)-DB 菌株中晶体细胞比例提高, 在 LM(p35'Z)-W 菌株中晶体细胞形成减少。说明质粒缺失影响了 LM1212 菌株芽孢细胞和晶体细胞比例。

2.6 质粒缺失株的晶体蛋白表达量分析

通过对 LM(p35'Z)-DB 菌株和 LM(p35'Z)-W 菌株及野生型菌株 LM(p35'Z)的晶体蛋白表达量进行 SDS-PAGE 分析, 发现与野生型菌株相比, LM(p35'Z)-DB 菌株晶体蛋白表达量增多, LM(p35'Z)-W 菌株晶体蛋白表达量减少(图 7)。

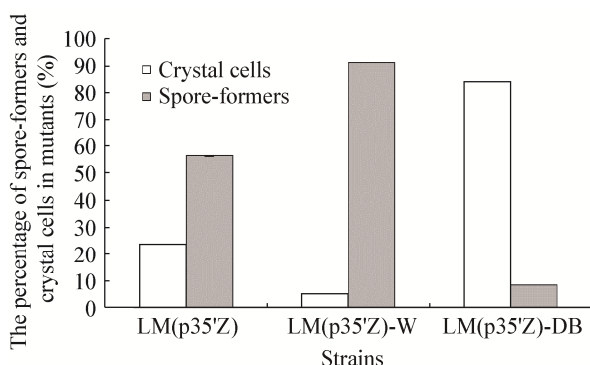


图 5 LM(p35'Z)-DB 菌株和 LM(p35'Z)-W 菌株芽孢和晶体细胞所占比例

Figure 5 The percentage of spore-formers and crystal cells in LM(p35'Z)-W and LM(p35'Z)-DB strains

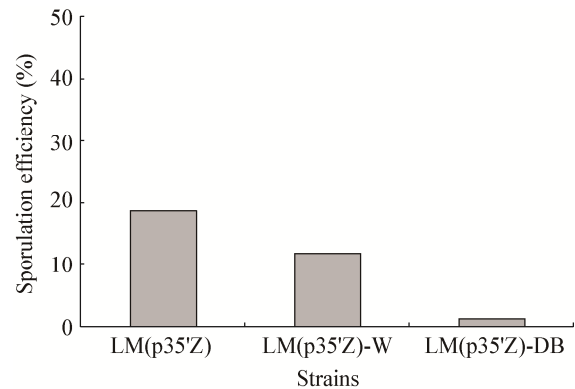


图 6 LM(p35'Z)-DB 菌株和 LM(p35'Z)-W 菌株芽孢形成率分析

Figure 6 Analysis of sporulation efficiency in LM(p35'Z)-W and LM(p35'Z)-DB strains

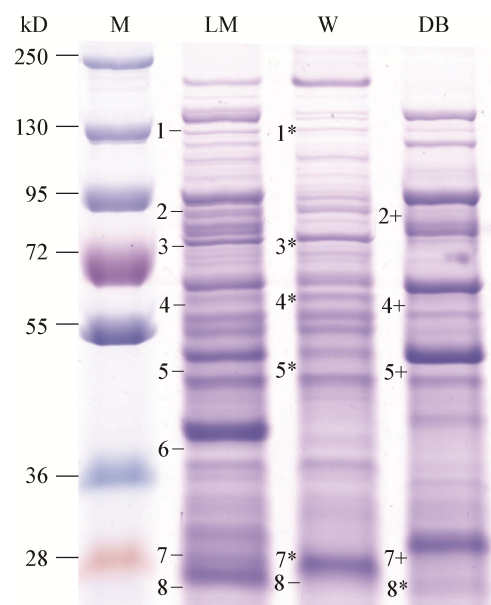


图 7 质粒缺失对突变株蛋白表达量的影响

Figure 7 Effect of plasmid curing on protein expression

注: M: Marker; LM: LM(p35'Z); W: LM(p35'Z)-W; DB: LM(p35'Z)-DB; 1: Cry32Va1; 2: Cry41Ca1; 3: Cry32Wa1; 4: Cry69Aa-like; 5: NT32-like; 6: Cry35-like+Cry35-like2; 7: Cry74Aa1; 8: Cry45Ba1; -: 野生型菌株表达的蛋白水平(对照); *: 蛋白表达量减少; +: 蛋白表达量增加。

Note: M: Marker; LM: LM(p35'Z); W: LM(p35'Z)-W; DB: LM(p35'Z)-DB; 1: Cry32Va1; 2: Cry41Ca1; 3: Cry32Wa1; 4: Cry69Aa-like; 5: NT32-like; 6: Cry35-like+Cry35-like2; 7: Cry74Aa1; 8: Cry45Ba1; -: The protein expression of wild strain (control); *: The protein whose expression is reduced; +: The protein whose expression is increased.

LC-MS/MS (Q-TOF)鉴定结果检测到了之前报道过的 LM1212 菌株的晶体蛋白组成成分, 包括 7 种 Cry 蛋白及一种 NT32-like 蛋白^[4], Cry 蛋白分别为 Cry32Val、Cry41Ca1、Cry32Wa1、Cry35-like2、Cry35-like、Cry74Aa1 和 Cry45Ba1; 此外, 还检测到一种新的 Cry69Aa-like 蛋白; 其中 LM(p35'Z)-DB 菌株缺失 Cry32Wa1、Cry32Val、Cry35-like、Cry35-like2 蛋白, Cry74Aa1、Cry41Ca1、Cry69Aa-like 及 NT32-like 蛋白表达量提高, Cry45Ba1 蛋白表达量很少或检测不到; LM(p35'Z)-W 菌株缺失 Cry41Ca1、Cry35-like、Cry35-like2 蛋白, Cry32Val、Cry32Wa1、Cry74Aa1、Cry69Aa-like 及 NT32-like 蛋白表达量很少或检测不到(图 7); 说明质粒缺失影响了 LM1212 Cry 蛋白的表达。

3 讨论

通过高温突变, 结合蓝白斑筛选得到两株 *cry35-like* 启动子活性发生变化的突变株, 脉冲场凝胶电泳分析突变株质粒谱及基因鉴定发现分别具有不同的质粒基因片段及 *cry* 基因缺失。目前报道的 Bt 菌株中 *cry* 基因均定位于内源大质粒上, 基因组上未发现有 *cry* 基因^[12-15]。因此我们推测 LM1212 菌株中的 *cry* 基因也应该位于大质粒上, 而本研究所获得的两株突变株代表了不同的质粒基因缺失情况。进一步的工作需要完成这些菌株质粒序列的测定, 以确定缺失的质粒基因序列。

本研究中质粒缺失影响了晶体细胞的比例, 对 LM1212 菌株的细胞分化产生了影响。质粒编码的基因可以对细菌的多种功能产生影响, 如质粒介导的多粘菌素抗性基因编码的多粘菌素可治疗对碳青霉烯类抗生素耐药菌引起的感染^[16]; 来源于溶血素(ehxA)亚型的产志贺氏毒素的大肠杆菌的 ehxA 亚型质粒, 编码与大肠杆菌有关的多种毒力因子^[17]; 来源于 Bs 3610 菌株的 pBS32 质粒编码的一种 σ 因子同源蛋白 ZpdN 对质粒应对 DNA 损伤是必需的^[18]。此外, 也有研究表明解淀粉芽胞杆菌 B3 菌株中发现的来源于质粒的 RapQ-PhrQ 系统可

控制 Bs OKB105 菌株中芽胞和感受态细胞的形成及胞外活性肽的产生, 影响分化^[19]。但是, 关于 Bt 质粒缺失对细菌分化的影响, 本研究是首次报道, 同时也说明影响晶体细胞分化的转录因子极可能定位于质粒上。

本研究发现质粒缺失突变株 LM(p35'Z)-DB 产生了非常少的芽胞, 而晶体细胞比例明显增加。传统 Bt 菌株都在形成芽胞的同时在同一个母细胞内产生晶体蛋白, *cry* 基因在芽胞细胞内转录^[20]; 而 LM1212 菌株晶体蛋白与芽胞独立产生于不同细胞内, LM1212 菌株的 *cry* 基因只在非芽胞细胞中特异性转录, 与传统 Bt 的 *cry* 基因转录明显不同, 受新的调控机制控制^[4], 具体的调控机制有待进一步探究。本研究中质粒缺失株 LM(p35'Z)-DB 菌株具有很好的应用潜力及研究价值, 细胞亚群基本为晶体产生细胞, 对于构建一种全新的无芽胞 Cry 蛋白大量表达体系提供了宝贵的遗传材料, 为新一代 Bt 工程菌的构建开辟了遗传改良的新途径。

参 考 文 献

- [1] Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(7): 423-431
- [2] Ohba M, Aizawa K. Crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis* are produced only in asporogenous cells[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1986, 48(2): 254-256
- [3] Srinivas G, Vennison SJ, Sudha SN, et al. Unique regulation of crystal protein production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis* is mediated by the Cry protein-encoding 103-megadalton plasmid[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2792-2797
- [4] Deng C, Slamti L, Raymond B, et al. Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain[J]. The ISME Journal, 2015, 9(2): 286-296
- [5] Liu GM, Deng C, Song L, et al. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain LM1212, isolated from the cadaver of an *Oryctes gigas* Larva in madagascar[J]. Genome Announcements, 2014, 2(3): e00516-14
- [6] Verplaetse E, Slamti L, Gohar M, et al. Cell differentiation in a *Bacillus thuringiensis* population during planktonic growth, biofilm formation, and host infection[J]. mBio, 2015, 6(3): 00138-15
- [7] López D, Vlamakis H, Kolter R. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(1): 152-163
- [8] López D, Kolter R. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(2): 134-149
- [9] Palma L, Muñoz D, Berry C, et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity[J]. Toxins, 2014, 6(12): 3296-3325
- [10] Lecadet MM, Blondel MO, Ribier J. Generalized transduction in

- Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715 using bacteriophage CP-54Ber[J]. Journal of General Microbiology, 1980, 121(1): 203-212
- [11] Schaeffer P, Millet J, Aubert JP. Catabolic repression of bacterial sporulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1965, 54(3): 704-711
- [12] Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 775-806
- [13] Hu XM, Hansen BM, Yuan ZM, et al. Transfer and expression of the mosquitocidal plasmid pBtoxis in *Bacillus cereus* group strains[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 245(2): 239-247
- [14] Adams V, Li J, Wisniewski JA, et al. Virulence plasmids of spore-forming bacteria[J]. Microbiology Spectrum, 2014, 2(6): 1-24
- [15] Berry C, O'Neil S, Ben-Dov E, et al. Complete sequence and organization of pBtoxis, the Toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5082-5095
- [16] von Wintersdorff CJ, Wolffs PF, van Niekerk JM, et al. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-I* in faecal metagenomes of Dutch travellers[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016, 71(12): 3416-3419
- [17] Lorenz SC, Monday SR, Hoffmann M, et al. Plasmids from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of strains with rare Enterohemolysin gene (*ehxA*) subtypes reveal pathogenicity potential and display a novel evolutionary path[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(21): 6367-6377
- [18] Myagmarjav BE, Konkol MA, Ramsey J, et al. ZpdN, a plasmid-encoded sigma factor homolog, induces pBS32-dependent cell death in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(21): 2975-2984
- [19] Yang Y, Wu HJ, Lin L, et al. A plasmid-born Rap-Phr system regulates surfactin production, sporulation and genetic competence in the heterologous host, *Bacillus subtilis* OKB105[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(17): 7241-7252
- [20] Deng C, Peng Q, Song FP, et al. Regulation of *cry* gene expression in *Bacillus thuringiensis*[J]. Toxins, 2014, 6(7): 2194-2209

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

