

蜡状芽胞杆菌菌株中部分病原相关因子的检测

胡晓敏^{1,2} 蔡亚君¹ 周帼萍¹ 袁志明^{1*}

(¹ 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(² 中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 对 26 株蜡状芽胞杆菌菌株进行了肠毒素基因及其它病原相关因子的检测。PCR 结果表明,17 株蜡状芽胞杆菌菌株中含有病原调控因子 *plcR* 的同源序列。采用 3 组溶血肠毒素 *hbl* 基因和 3 组非溶血肠毒素 *nhe* 基因特异性引物,分别可从 73% 的菌株中至少扩增出一个与预期 DNA 片段大小一致的片段,其中,苏云金芽胞杆菌菌株中溶血素 *hbl* 基因和非溶血素 *nhe* 基因的阳性检出率为 83%。蜡状芽胞杆菌 DBt248 完全没有溶血活性,而且在溶血素 *hbl* 和非溶血素 *nhe* 基因的 3 个亚基以及病原调控因子 *plcR* 的 PCR 检测中均为阴性,有望作为宿主菌用于苏云金芽胞杆菌晶体蛋白的表达和应用。

关键词 :蜡状芽胞杆菌 苏云金芽胞杆菌 病原性 *plcR* 肠毒素

中图分类号 :Q785 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2007)03-0392-04

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*)是目前世界上应用最广泛的生物杀虫剂,在多种害虫的综合防治中发挥了重要的补充作用。*Bt* 与蜡状芽胞杆菌(*B. cereus*, 简称 *Bc*)以及炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis*, 简称 *Ba*)关系紧密,它们具有相似的形态特征和较高 DNA 同源性^[1]。事实上,*Bt* 同 *Bc*、*Ba*、蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*, 简称 *Bm*)、假真菌样芽胞杆菌(*B. pseudomycoides*)以及韦氏芽胞杆菌(*B. weihenstephanensis*, 简称 *Bw*)已经被归类于芽胞杆菌属蜡状芽胞杆菌群^[2,3]。已经证明一些 *Bc* 能导致人食物中毒和感染,是人畜的条件致病菌。由呕吐毒素和腹泻毒素引起的呕吐和腹泻是 *Bc* 引起的两种主要食物中毒类型^[4-6]。目前研究最全面的肠毒素是溶血毒素 Hb(hemolysin BL)和非溶血毒素 Nhe(nonhemolytic enterotoxin),它们都由 3 个亚基组成,并且 3 个亚基都是其红细胞溶血活性所必须的^[7]。

随着 *Bt* 作为昆虫病原菌在生物防治中越来越广泛的应用,人们开始关注 *Bt* 与 *Bc* 菌株间的同源性关系和 *Bt* 在环境中应用的安全性问题。目前研究显示许多 *Bt* 菌株都有类似于人畜条件致病菌 *Bc* 拥有的肠毒素特性和溶血活性。甚至一些目前被商品化应用的 *Bt* 菌株也广泛含有肠毒素基因^[8,9]。不仅如此,在蜡状芽胞杆菌菌株的基因组中还可以

检测到与炭疽芽胞杆菌中编码炭疽毒素的大质粒 pXO1 上的开放阅读框具有高度相似性的 DNA 序列^[10]。这些在蜡状芽胞杆菌菌株的基因组和质粒 pXO1 序列中存在的相似片段可能与芽胞杆菌的病原性和功能进化相关^[10]。

考虑到 *Bt* 与 *Bc* 及 *Ba* 菌株间的这种同源性关系,我们对本实验室保存的 26 株蜡状芽胞杆菌分离株包括 12 株 *Bt*、12 株 *Bc*、1 株 *Bm* 以及 *Bw* 进行了溶血性分析,溶血毒素相关的多效调控因子 *plcR*、*hbl* 和 *nhe* 等肠毒素基因在蜡状芽胞杆菌菌株基因组中的相似片段的 PCR 检测,为 *Bt* 菌株的安全性评估提供了基础数据和实验方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基 本试验中所检测的蜡状芽胞杆菌菌株及其特性见表 1。菌株在 LB 培养基中培养,溶血性检测时所用培养基为胰酪胨大豆羊血琼脂平板。其配方参考 FDA 描述方法。

1.1.2 试剂和仪器 :DNA 聚合酶(Taq I),DNA 分子量(DL 2000)标准均购自 TaKaRa 公司;无菌脱纤维羊血来自北京兰伯瑞生物技术有限公司;主要用到的仪器有 PCR 仪(Thermo Hybaid, Px2),水平电泳装置(DYY8B)和凝胶成像仪(SYNGENE)。

基金项目 :国家自然科学基金(30470037) ;国家“973”项目(2003CB114201)

* 通讯作者。Tel :86-27-87198195 ;Fax :86-27-87198120 ;E-mail :yzm@pentium.whiov.ac.cn

作者简介 胡晓敏(1978-),女,湖北省大冶市人,研究方向为病原微生物分子遗传学。E-mail :xiaomin.hu@gmail.com

收稿日期 2006-10-16 ;接受日期 2007-01-25 ;修回日期 2007-01-31

表 1 蜡状芽胞杆菌菌株的溶血性 肠毒素基因及其它与病原性可能相关的基因的检测结果

Table 1 Cytotoxicity and occurrence of enterotoxin related genes in some strains of <i>B. cereus</i> group									
Strains	Cytotoxic activity	<i>plcR</i>	Hbl complex			Nhe complex			
			<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
<i>Bc</i> B-4ac	+	+	-	-	+	+	+	-	
<i>Bc</i> F4433/73	+	+	-	+	+	+	+	+	
<i>Bc</i> F3502/73	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Bc</i> CIP 5832	+	+	+	-	+	-	-	-	
<i>Bc</i> DBi248	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bc</i> MADM 1279	+	+	-	-	+	+	+	+	
<i>Bc</i> MS 10362	+	+	+	-	+	-	+	+	
<i>Bc</i> AND1309	+	+	+	-	+	+	+	+	
<i>Bc</i> AND1313	+	+	+	-	-	+	-	-	
<i>Bc</i> 421-3	+	+	+	-	+	-	+	-	
<i>Bc</i> 421-4	+	+	-	-	+	-	-	-	
<i>Bc</i> ATCC 33018	+	+	+	-	-	+	-	+	
<i>Bt.</i> <i>kaurstaki</i> AW05	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bt.</i> <i>kaurstaki</i> HD1	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bt.</i> <i>kaurstaki</i> DMU67	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bt.</i> <i>kaurstaki</i> KT0	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bt.</i> <i>kaurstaki</i> Bi947	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Bt.</i> <i>kaurstaki</i> Bi657	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Bt.</i> <i>israelensis</i> HD567	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bt.</i> <i>israelensis</i> 4Q2-72	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bt.</i> <i>alesti</i> HD4	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bt.</i> <i>indiana</i> HD521	+	+	+	-	+	+	+	+	
<i>Bt.</i> <i>dakota</i> HD932	+	+	+	-	+	+	+	+	
<i>Bt.</i> <i>tenebrionis</i> DSM5526	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bm</i> DSMZ 2048	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Bw</i> DSMZ 11821	+	+	-	+	+	-	+	+	

1.2 溶血性检测

在胰酪胨大豆羊血琼脂平板上检测蜡状芽胞杆菌菌株的溶血性参考 FDA 描述的方法。斜面活化的菌株接种到胰酪胨大豆羊血琼脂平板上,在 35℃培养 24h 后,观察菌落周围完全透明或不完全透明的溶血圈。

1.3 DNA 提取和 PCR 检测

制备 DNA 模板的菌裂解法见参考文献[11]。用于 *hbl* 和 *nhe* 等肠毒素基因在蜡状芽胞杆菌菌株基因组中的相似片段的 PCR 检测的序列和预计扩增片段的大小及在 GenBank 上的注册号见表 2。用于多效调控因子 *plcR* 的 PCR 检测引物,是对 NCBI 上发表的很多 *Bc* 菌株的 *plcR* 基因的序列进行了比对分析后再设计的序列简并型引物。引物均在上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应条件: 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 2min, 30 个循环; 72℃ 7min。在 1.5% 琼脂糖凝胶进行 PCR 反应产物的检出分析。

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 PCR primers used in this study			
Primer	Sequence(5'→3')	Product size/bp	GenBank accession No.
Deg- <i>plcR</i> -S *	CGGGTGC(AG)GTATACCCAAGT	377	
Deg- <i>plcR</i> -A *	AAT(AG)TTTGAATTCG(AG)TTTTCAT		
<i>hblA</i> -S	GTGCAGATGTGTATGCCGAT	320	120441
<i>hblA</i> -A	ATGCCACTGCGTGGACATAT		
<i>hblC</i> -S	AATCAAGAGCTGTACGCAAT	750	U63928
<i>hblC</i> -A	CACCAATTGACCATGCTAAT		
<i>hblD</i> -S	AATGCTCATGGAACTCTAT	430	U63928
<i>hblD</i> -A	CTCGCTGTCTCTGTGTAAT		
<i>nheA</i> -S	TACGCTAAGGAGGGCCA	500	Y19005
<i>nheA</i> -A	GTTTTTATGTCTTCATCGGCT		
<i>nheB</i> -S	CTATCAGCACTTATGGCAG	770	Y19005
<i>nheB</i> -A	ACTCTAGCGGTGTGTC		
<i>nheC</i> -S	CGGTAGTGAATGCTGGG	583	Y19005
<i>nheC</i> -A	CAGCAATGCTACTTGCCAA		

* Degenerate primer pair designed considering the variation of *plcR* gene sequences of *B. cereus* group strains.

2 结果

2.1 溶血性结果和周质病原调控因子 *plcR* 的检测

在所检测的菌株中,有 21 株菌株能在胰酪胨大豆羊血琼脂平板上形成完全透明的溶血圈,4 株菌株能形成不完全透明的溶血圈,而用于肠毒素基因检测的阴性对照菌株蜡状芽胞杆菌 DBi248 不具有任何溶血活性(表 1)。利用 *plcR* 基因的简并性引物,可从 17 株蜡状芽胞杆菌基因组 DNA 中扩增出 *plcR* 基因片段,但在其它菌株中未检测到 *plcR* 基因相似片段(图 1)。

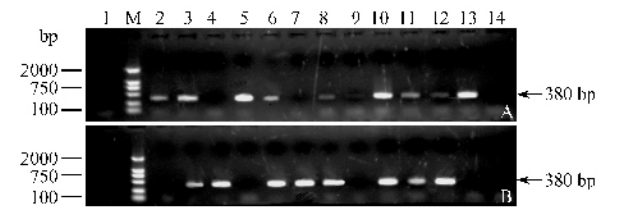


图 1 周质病原调控因子 *PlcR* 编码基因的 PCR 检测

Fig.1 PCR analysis of the gene encoding Pleiotropic virulence regulator *PlcR*. M. DL2000; 1.Negative control; A: 2.4Q2-72; 3.AW05; 4.MADM 1279; 5.KT0; 6.DMU67; 7.DSMZ 2048; 8.CIP 5832; 9.DBi248; 10.AND1309; 11.AND1313; 12.ATCC 33018; 13.421-3; Lane 14. 421-4; B: 2. F4433/73; 3.F3502/73; 4.MS 10362; 5.DSMZ 11821; 6.HD567; 7.DSM 5526; 8.HD1; 9.B-4ac; 10.HD4; 11.HD521; 12.HD932; 13.Bi657; 14.Bi947.

2.2 肠毒素基因的检测

采用 3 组溶血素 *hbl* 基因的特异性引物,可从大部分 *Bt* 菌株中至少扩增出 320bp、750bp 或者 430bp 的特异性片段中的一个片段。在本研究中检测的 26 株蜡状芽胞杆菌中溶血素 *hbl* 基因的阳性检出率为 73%。12 株 *Bc* 菌株中溶血素 *hbl* 基因的阳

性检出率为 83%。同样采用 3 组非溶血素 *nhe* 基因特异性引物,可从 16 株菌株中至少扩增出一个与预期 DNA 片段大小一致的片段(表 1,图 2,图片未全部列出)。

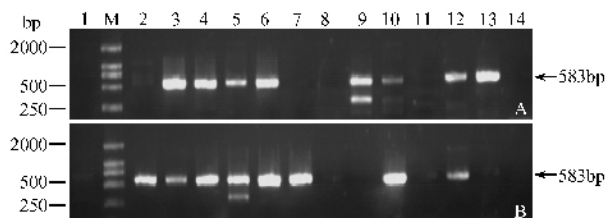


图 2 非溶血毒素基因 *nheC* 的检测

Fig. 2 PCR amplification to detect the occurrence of *nheC*. M. DL2000; 1. Negative control; A: 2. 4Q2-72; 3. AW05; 4. MADM 1279; 5. KT0; 6. DMU67; 7. DSMZ 2048; 8. CIP 5832; 9. AND1309; 10. 421-3; 11. AND1313; 12. ATCC 33018; 13. 421-4; 14. Bt657; B: 2. F4433/73; 3. F3502/73; 4. MS 10362; 5. DSMZ 11821; 6. HD567; 7. DSM5526; 8. HD1; 9. B-4ac; 10. HD4; 11. HD521; 12. HD932; 13. DBt248; 14. Bt947.

3 讨论

PlcR 是一个广泛存在于蜡状芽胞杆菌群菌株中的多效调控因子,它可以激活多种编码毒力因子的基因的表达,例如磷脂酶 C 和溶血毒素等^[12]。Salamito 等发现 *Bt* 407 和蜡状芽胞杆菌 ATCC 14579 中 *plcR* 的敲除可以使其溶血活性消失,并且其突变株的芽胞与 Cry 毒素的协同作用对鳞翅目幼虫的毒力远远低于未敲除 *plcR* 的野生菌与 Cry 毒素的协同作用产生的毒力,证实这个调控因子与溶血活性及其他蛋白酶的表达有关^[13]。蜡状芽胞杆菌群菌株,包括多数苏云金芽胞杆菌中广泛存在 *plcR* 和具有溶血活性的现象表明这些菌株中可能存在一些与溶血性相关的毒素因子。

我们的试验结果表明绝大部分 *Bt* 菌株中都含有溶血性和非溶血性肠毒素基因,但 *Bt* 已在害虫的生物防治中成功应用了几十年,尚未有造成人畜危害的报道。这可能是由于 *Bt* 肠毒素同 *Bc* 肠毒素氨基酸序列之间的差异,使其不具有致病性或者致病性非常低所导致的。虽然已有研究证明在临床感染的组织中可分离到 *Bt* 菌株,但是这些 *Bt* 是否具有感染能力并没有被证明,同时研究也发现这些 *Bt* 菌株与商业化应用的 *Bt* 杀虫剂的遗传性质差别很大。因此,尽管 *Bt* 菌株广泛含有肠毒素基因和具有肠毒素活性,但到目前为止 *Bt* 仍然被认为是害虫防治中最安全的生物杀虫剂之一。

由于杀虫质粒和其它人类致病毒素编码基因在

不同芽胞杆菌中可以以很低的频率发生转移^[14-16],因此, *Bt* 制剂的广泛使用可能引起的安全性问题有必要进行深入研究并通过菌株的筛选和遗传改良获得不含肠毒素基因和肠毒素活性的杀虫菌株用于害虫的控制。*Bc* DBt248 菌株不含有溶血素 *hbl* 基因、非溶血素 *nhe* 基因、周质病原调控因子 *PlcR* 编码基因,而且不具有溶血活性,是一株安全的蜡状芽胞杆菌,有望作为宿主菌用于苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白的表达以构建安全的杀虫工程菌。

参 考 文 献

- [1] Helgason E, Caugant DA, Olsen I, *et al.* Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(4): 1615–1622.
- [2] Lechner S, Mayr R, Francis KP, *et al.* *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **48**(4): 1373–1382.
- [3] Nakamura LK. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **48**(3): 1031–1035.
- [4] Asano N, Nukumizy Y, Bando H, *et al.* Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(3): 1054–1057.
- [5] Drobniowski FA. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev*, 1993, **6**(4): 324–338.
- [6] Lund T, Granum PE. The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **178**(2): 355–361.
- [7] Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **157**(2): 223–228.
- [8] Damgaard PH. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1995, **12**(3-4): 245–249.
- [9] Hansen BM, Hendriksen NB. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(1): 185–189.
- [10] Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, *et al.* *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacteriol*, 2002, **184**(1): 134–141.
- [11] Hansen BM, Damgaard PH, Eilenberg J, *et al.* Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *J Invertebr Pathol*, 1998, **71**(2): 106–114.
- [12] Ivanova N, Sorokin A, Anderson I. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 2003, **423**(6935): 87–91.
- [13] Salamito S, Ramisse F, Lereclus D. The *plcR* regulon is involved in opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*.

- [14] Battisti L , Green BD , Thorne CB. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis* , *Bacillus cereus* , and *Bacillus thuringiensis* . *J Bacteriol* , 1985 , **162** (2) : 543 – 550.
- [15] Vilas-Boas GFLT , Vilas-Boas LA , Lereclus D , *et al.* *Bacillus thuringiensis* conjugation in environmental conditions. *FEMS Microbiol Ecol* , 1998 , **25** (44) : 369 – 374.
- [16] Thomas DJI , Morgan JAW , Whipps JM , *et al.* Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* strains in laboratory culture , river water , and dipteran larvae. *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** (1) : 330 – 338.

Detection of some toxin genes related to pathogenicity in *Bacillus cereus* group strains

HU Xiao-min^{1,2} , CAI Ya-jun¹ , ZHOU Guo-ping¹ , YUAN Zhi-ming^{1*}

(¹ Wuhan Institute of Virology , CAS , Wuhan 430071 , China)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100039 , China)

Abstract : *Bacillus thuringiensis* is a member of the *B. cereus* group , which also contains *B. cereus* , *B. mycoides* , *B. pseudomycoides* , *B. anthracis* and *B. weihenstephanensis* . Among them , *B. thuringiensis* and *B. cereus* share a high level chromosomal similarity and are phenotypically similar except that *B. thuringiensis* has insecticidal plasmid encoding crystal proteins . Twenty-six *B. cereus* group strains were surveyed in this study for the presence of enterotoxin genes and other toxin genes related to pathogenicity . PCR results showed that the pleiotropic virulence regulator *plcR* was presented in 17 *B. cereus* group strains . About 73% of the *B. cereus* group strains and 83% of the *B. thuringiensis* strains contained at least one of the three *hbl* genes and one of the three *nhe* genes , indicating that *B. thuringiensis* , including strains used commercially , had enterotoxin encoding genes . Additionally , *B. cereus* DBt248 was proved to be devoid of all three *hbl* genes , three *nhe* genes or *plcR* . Thus this strain might be a potential candidate as a host strain for expressing *B. thuringiensis* crystal toxins to construct safety insecticidal engineering strains without enterotoxic activity .

Keywords : *B. cereus* ; *B. thuringiensis* ; pathogenicity ; *plcR* ; enterotoxin

Foundation item : Chinese National Natural Science Fund (30470037) ; Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB114201)

* Corresponding author . Tel : 86-27-87198195 ; Fax : 86-27-87198120 ; E-mail : yzm@pentium.whiov.ac.cn

Received : 16 October 2006 / Accepted : 25 January 2007 / Revised 31 January 2007