

苏芸金芽孢杆菌 HD-1 质粒基因文库的构建

陈瑞春 范云六

(中国农业科学院分子生物学研究室, 北京)

本文报告以 λ 系列 Charon 28 为载体, 通过限制核酸内切酶 *Bam* HI 部分酶解获得“目的”质粒 DNA 片段, 构建了苏芸金芽孢杆菌 HD-1 的质粒 DNA 基因文库, 所得重组子值超过要求的理论值。为进一步研究苏芸金杆菌 HD-1 的基因结构以及基因功能奠定了基础。

关键词 质粒基因文库; 苏芸金芽孢杆菌 HD-1; Charon 28 载体 DNA; 重组子 DNA

迄今在已报道的 100 多种细菌昆虫病原菌中, 五种芽孢杆菌^[1] (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus popilliae* 和 *Bacillus luteosporus*^[2]) 有较详细的报道。它们都具有杀鳞翅目或双翅目害虫的作用。最近通过细胞融合技术已成功地得到既杀鳞翅目又杀双翅目的 *Bacillus thuringiensis* 稳定的融合子^[22]。苏芸金芽孢杆菌的伴孢晶体蛋白 (δ 内毒素) 是一种前毒素, 分子量为 136,000^[2], 对某些昆虫有致死作用。通过分子克隆技术已确定 *Bacillus thuringiensis* HD-1 Dipel^[3], *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73^[4], *Bacillus thuringiensis* berliner 1715^[5] 及 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*^[6] 的 δ 内毒素蛋白质基因分布在 30—150Md 大小不同的质粒上。但 *Bacillus thuringiensis* var. *wuhanensis* 的质粒 DNA 不与 pES1 质粒(带有 *Bacillus thuringiensis* HD-1 Dipel 晶体蛋白基因的 *Eco*RI-F 的 732bP 的 DNA 片段)探针杂交。其晶体蛋白基因可能位于染色体上^[7]。另外, 虽然有人曾报道 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 的晶体蛋白基因同时分布在染色体和质粒上^[8], 但 Whiteley 实验室用晶体蛋白基因的专一性探针杂交,

结果表明 HD-1 的晶体蛋白基因不在染色体上, 而是在质粒上^[7]。

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* HD-1 菌株含多种质粒^[7], 虽与 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 Dipel 是同一个来源, 由于两者的质粒和晶体蛋白基因位置有区别, 已成为两株不同的独立菌株。

用 pES1 质粒作探针发现, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 中的伴孢晶体蛋白基因分布在 3 个质粒上^[7]。其中 150Md 和 75Md 的两个质粒与 pES1 探针有强的杂交, 而 30Md 的质粒偶尔也有杂交现象。

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* HD-1 在我国防治鳞翅目的农业害虫上有良好的效果。为了研究该菌 δ 内毒素蛋白基因以及它们之间的关系及其表达, 我们采用了 Charon 28 为载体, 构建了 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 的质粒基因文库。

材料和方法

(一) 材料

本文于 1986 年 4 月 6 日收到。

1. 菌种:

(1) 苏芸金芽孢杆菌 HD-1 (*Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-1) 由中国林业科学院惠赠。

(2) *E. coli* LE392 [F^- , hsd R514 (rk^- , mk^+) sup E44, sup F58, lacY1 or Δ (lac IZY)6, galK2, galT22, matB1, trpR55, λ^-] 由美国国际卫生组织惠赠。

(3) *E. coli* Q359 [hsd RK^- , hsdMK $^+$, supE ϕ 80 P2] 由北京农业大学惠赠。

(4) *E. coli* BHB2688 [N205, recA $^-$ (λ imm 434 cIts, b2, red $^-$ Eam Sam/ λ)]

E. coli BHB2690[N205 recA $^-$ (λ imm434 cIts, b2, red $^-$ Dam Sam/ λ)] 由中国科学院遗传所提供。

2. 培养基:

(1) M9 培养基: 每升含 15.3g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 39.3g $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$, 0.5g NaCl, 1g NH_4Cl , 10 磅灭菌。使用前加入 10ml 20% 的葡萄糖和 2ml 1M 的 $MgSO_4$ 及 1ml 0.1M $CaCl_2$ 。

(2) M9CA 培养基: 在 M9 培养基中加无菌的水解酪素至 0.2%。

(3) SPY 培养基: 每升含 2g $(NH_4)_2 SO_4$, 18.3g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 6g KH_2PO_4 , 1g NaAcO, 0.39g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5g 葡萄糖, 1g 酵母粉。

3. 主要生化试剂: T4DNA 连接酶 (日本 Zoon 公司); 限制核酸内切酶 *Bam*HI、*Sal*I、*Hind*III、*Bgl*II (BRL 产品); 超纯度蔗糖 (Sigma); 氯化铯 (LKB 产品); DNA 酶 I、RNA 酶 I, 水解酪素 (Sigma); 酵母粉 (Oxoid 产品)。

4. 缓冲液:

(1) CH 缓冲液: 40mM Tris $\cdot$ Cl pH8.0, 1mM 亚精胺; 1mM 丁二胺, 0.1% β -巯基乙醇, 7% DMSO, 用孔径为 0.45 μ 的滤器除菌。

(2) E 缓冲液: 40mM Tris pH7.9 (用冰醋酸调节) 2mM EDTA。

(二) 方法

1. 包装提取物的制备以及效价的测定 参考 Maniatis 等人^[9]的方法, 放液氮中保存。

2. 载体 DNA 的制备:

(1) Charon 28 噬菌体的扩增和纯化: 宿主菌和噬菌体的活化及鉴定按 Maniatis^[9] 方法,

Charon 28 噬菌体的扩增和纯化按 Blattner 等人^[10]方法, 并参考 Maniatis^[11] 和 Yamamoto 等人^[12]的方法。

(2) Charon 28 噬菌体 DNA 的制备和 *Bam*HI 酶解鉴定: 在上述纯化的 Charon 28 噬菌体液中, 加 DNA 酶 I 和 RNA 酶 I 至 5.0 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 处理 30 分钟, 加 EDTA (0.5M, pH8.0) 至 20 mM, 加链霉蛋白酶 E 至 500 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 处理 1.5 小时, 然后用酚、酚/氯仿 (1:1) 和氯仿依次抽提, 在 TE 缓冲液中透析过夜。将 Charon 28 DNA 用 *Bam*HI, *Sal*I *Hind*III 等限制核酸内切酶进行酶解鉴定。参考 de Wer 等人^[13]的方法。

(3) Charon 28 DNA 的“左、右臂”的分离主要参考 Maniatis 等人^[9]的方法。通过 *Bam*HI 消化, “退火”cos 相连, 蔗糖密度梯度超离心的方法进行。此方法同时可以验证 cos 顺序的完整性。

3. 苏芸金芽孢杆菌 HD-1 质粒 DNA 和“目的”DNA 片段 (15—20kb) 的制备:

按 Spizizen 等人^[14]的方法, 提取苏芸金芽孢杆菌 HD-1 的 DNA。通过氯化铯密度梯度超离心将质粒 DNA 从染色体 DNA 中分离纯化。

质粒 DNA 的部分酶解方法是通过将酶 2 倍稀释的方法进行的。“目的”DNA 片段 (15—20kb) 的蔗糖梯度超离心参考 Maniatis^[9] 的方法。

4. DNA 体外重组和体外包装:

体外连接重组按 John^[15]的方法, 体外包装按 Hohn^[17]的方法。

5. 重组子鉴定和基因文库的扩增:

(1) 从 LE392 宿主菌上随机挑选出数百个噬菌斑, 分别感染 Q359(Spy $^-$) 后观察是否有感染 Q359 的能力。

(2) 用 Fritsch 等人^[16]的方法提取随机选择的重组子 DNA, 用限制核酸内切酶 *Bam*HI 进行酶解, 检查插入片段的情况。

(3) 基因文库的扩增按 Karn^[19]法。

6. 苏芸金芽孢杆菌 HD-1 伴孢晶体基因探针的合成:

根据 Schnepf 等人^[23]的苏芸金芽孢杆菌 HD-1 Dipel 的 DNA 序列, 用 Biosystem 产的全自动 DNA 合成仪合成 30bp 的 DNA 保守序列片段。

然后,用 ^{32}P 5' 末端标记法进行同位素标记。

结 果

(一) 包装提取物的制备

1. 溶源菌株主要特性的鉴定:

BHB2688 和 BHB2690 带有 $\text{cl}857\text{ts}$ 和 recA^- 的两个突变基因。首先对它们在 32°C 和 42°C 的生长以及对紫外线的敏感性进行鉴定,同时以非溶源菌株 C600 作为对照菌株。在 32°C 培养时,三者皆正常生长(图 1-A);而在 42°C 时,只有 C600 能正常生长(图 1-B)。BHB2688 和 BHB2690 由于 cl 阻遏物失活诱导噬菌体释放,故无菌落出现。当用 0—40 秒区紫外线 ($2537\text{\AA}$) 照射之后,溶源菌只在 0 秒区出现菌落,而 C600 生长不受影响 (图 1-C)。

2. 包装提取物的制备:

在无超声波装置的条件下,采用热诱导的方法进行包装提取物的制备,但效价一直停留在每微克 DNA $10^5\text{--}10^6\text{ pfu}$ 水平。后来通过迅速升温的方法^[22]获得了效价为每微克 DNA 10^8 pfu 的包装提取物(表 1)。

表 1 包装提取物的效价

Table 1 Titration of packing extract

试验 Test No.	DNA λ DNA	Ch28 DNA	对照 Control
No. 1	8.0×10^8	5.0×10^8	0
No. 2	1.3×10^8	9.0×10^7	0
No. 3	4.0×10^8	3.2×10^8	0

(二) 载体 Charon28 DNA 和“左、右臂”的制备

1. 通过感染指示菌 LE392,经扩增、浓缩和甘油梯度纯化等步骤,得到效价为 10^4 pfu 的 Charon28 噬菌体,再经链霉蛋

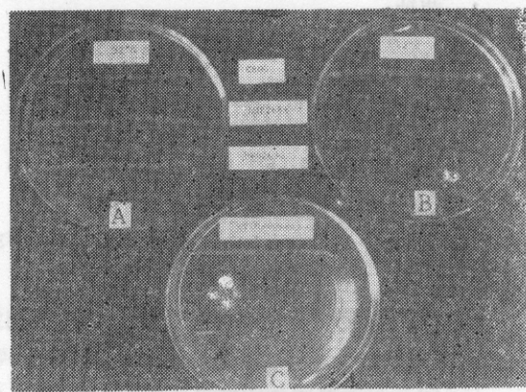


图 1 溶源菌株的鉴定

A. 32°C 培养 B. 42°C 培养 C. 紫外线照射 0—40 秒后 32°C 培养

Fig. 1 Identification of lysogenic strain BHB2688 and BHB2690

A. Incubated at 32°C B. Incubated at 42°C
C. Treated with UV from 0 to 40 seconds and incubated at 32°C

白酶 E 处理,最终制得浓度为 $0.5\mu\text{g/ml}$ 纯的 Charon 28 DNA。紫外吸收值 $A_{260}/A_{230} = 2.0$ $A_{260}/A_{280} = 1.9$,为典型核酸吸收比值。

2. 用 Sal I , Bam HI Hind III 三种限制核酸内切酶对上述纯化的 Charon 28 DNA 进行酶解鉴定,结果和理论值完全一致(图 2,表 2)。

表 2 Charon 28 DNA 的酶切鉴定

Table 2 Identification of Ch28 DNA with several restriction endonucleases digestion

内 容 Contents	主要酶切片段 Main fragments (kb)
Ch28 DNA	40.3
Ch28 DNA/ Sal I	29.2, 11.0
Ch28 DNA/ Bam HI	23.5, 9.2, 7.4
Ch28 DNA/ Hind III	24.4, 15.8
$\lambda/\text{Bgl II}$	32.6, 22.8, 13.6, 9.8

3. 用 Bam HI 酶解 Charon28 DNA,分成三个片段,在 42°C “退火”使其 cos 相连,图 3-D 为部分“退火”的电泳图谱。将 cos 相连而成的“左、右臂”通过蔗糖密度梯度超离心和“非必要区”片段分离开。获得

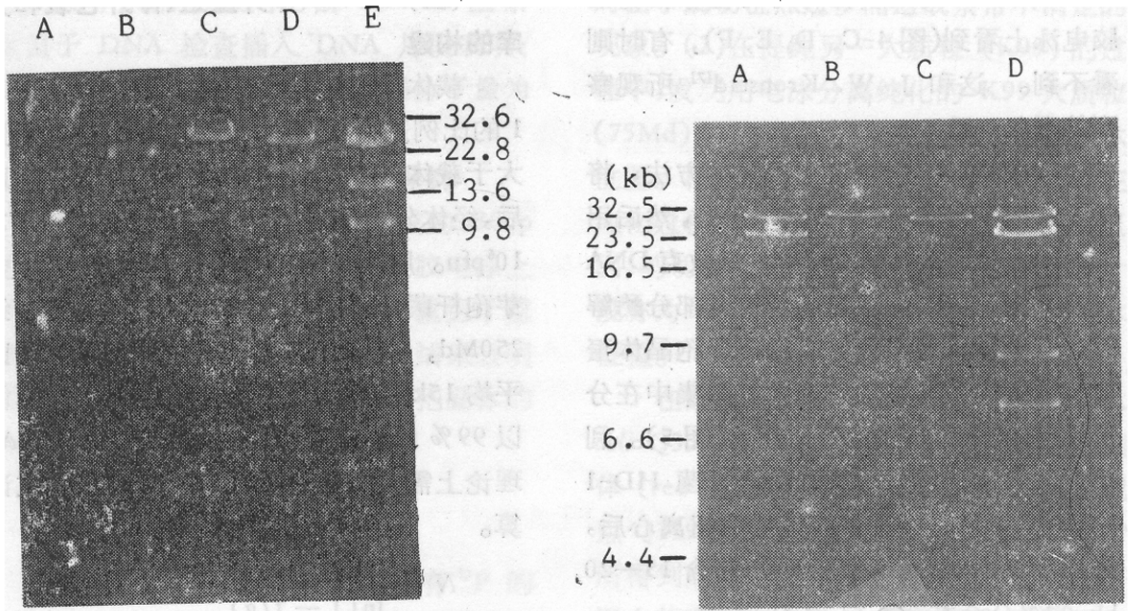


图2 Charon 28 DNA 的酶解鉴定

Fig. 2 Identification of Charon 28 DNA by restriction endonuclease digestion

- A. Charon 28 DNA
- B. Ch28 DNA/*Bam* HI
- C. Ch28 DNA/*Sal* I
- D. Ch28 DNA/*Hind* III
- E. λ /*Bal*II 作为标准分子量
 λ /*Bg*II as a standard molecular weight

图3 Charon 28 DNA “臂”的制备

- A. λ /*Sal*I + *Hind*III; B. Ch28 DNA; C. “臂”;
 - D. Ch28 DNA 用 *Bam*HI 酶切后,部分“退火”
- Fig. 3 Preparation of “Arms” from Charon 28 DNA
- A. λ /*Sal*I + *Hind* III; B. Charon 28 DNA; C. “Arms”;
 - D. Ch28 DNA/*Bam*HI and partial annealing

的“左、右臂”在 0.6% 琼脂糖电泳上呈一条带 (图 3-C) 与标准分子量的第一条带 (32.5kb) 和部分“退火”形成的“左、右臂”大小一致 (图 3)。

(三) 苏芸金芽孢杆菌 HD-1 质粒 DNA 和“目的”DNA 片段的制备

1. 苏芸金芽孢杆菌 HD-1 含质粒多达 10 个以上^[15]而我们感兴趣的是 150Md、47Md 和 30Md 的大质粒,故选用 Spizizen 方法提取 HD-1 的 DNA, 除染色体外, 可在 0.6% 琼脂糖凝胶电泳上出现 7 条质粒带。为了进行横向比较,同时作了 HD-124 和 HD-187 的质粒提取。在同样条件下, HD-124 和 HD-1 质粒图谱完全一致,而 HD-187 则比 HD-1 多一条带 (图

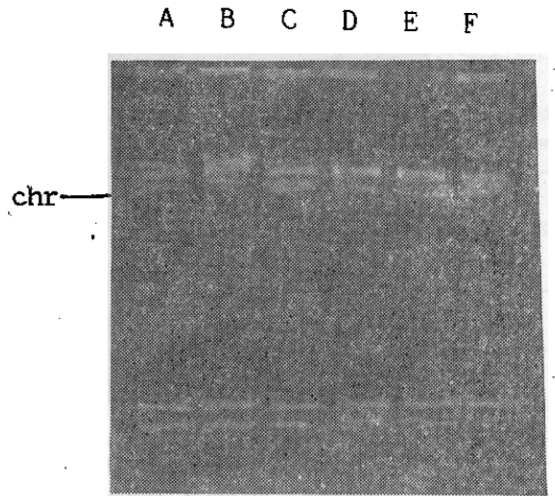


图4 苏芸金芽孢杆菌 HD-1, HD-124, HD-187 的 DNA 电泳图谱

Fig. 4 DNA Pattern of *Bacillus thuringiensis* HD-1, HD-124, HD-187

- A, D. HD-1; B, E. HD-124; C, F. HD-187

4)。150Md 的大质粒有时可在琼脂糖凝胶电泳上看到(图 4-C, D, E, F), 有时则看不到。这和 J. W. Kronstad^[7] 所观察到的现象一致。

2. 通过氯化铯-溴化乙锭的方法, 将质粒 DNA 和染色体 DNA 分离, 然后用 *Bam* HI 进行酶切。结果表明: 每微克 DNA 以 0.1 或 0.05 单位的 *Bam* HI 部分酶解时, 三个被认为可能带有编码伴孢晶体蛋白基因的大质粒被酶解成大部分集中在分子量为 15—20kb 的 DNA 片段(图 5)。利用上述条件, 部分酶解苏芸金杆菌 HD-1 的质粒 DNA, 经蔗糖密度梯度超离心后, 分部收集, 各管用电泳检测。将含 15—20 kb 的组分合并在一起, 4℃ 保存。

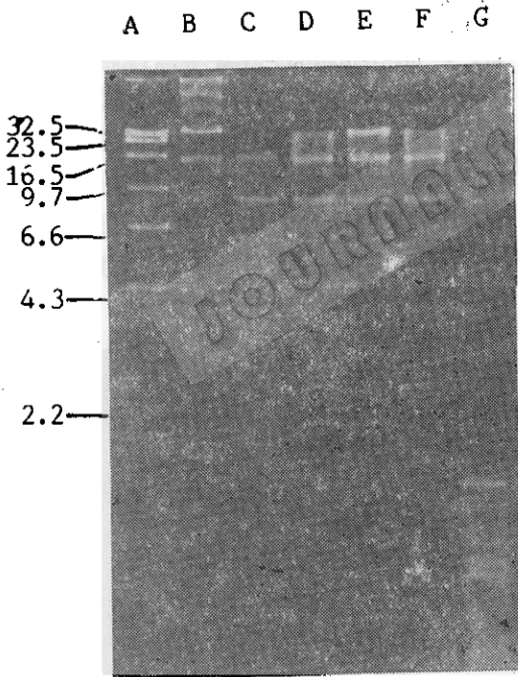


图 5 HD-1 DNA 的 *Bam* HI 部分酶解的电泳图谱
Fig. 5 Electrophoresis of plasmids DNA of *Bacillus thuringiensis* HD-1 with *Bam* HI partial digestion

A: λ /SalI + Hind III; Ratio of *Bam* HI per HD-1 DNA (units/ μ g DNA) 酶量: B. 0.2; C. 0.1; D. 0.05; E. 0.025; F. 0.0125; G. 2.0

(四) DNA 体外重组、体外包装和文库的构建

载体 DNA 与“目的”DNA 片段以 2:1 的比例进行重组。通过电泳鉴定, 得到大于载体 DNA “左、右臂”的 DNA 片段后, 经体外包装所得到的基因文库为 1.7×10^6 pfu。所用指示菌株是 LE392。苏芸金芽孢杆菌 HD-1 的质粒 DNA 总共有约 250Md, 相当于 375kb, 若插入片段(f)以平均 15kb 计算, 为了让构建的基因文库能以 99% 的概率(p)覆盖整个质粒 DNA, 理论上需要重组子数(N)可通过下式计算。

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f/g)} = 1.23 \times 10^2$$

本文所得基因文库的重组子数超过理论值, 达到了建库的要求。

(五) 重组子的鉴定

1. 利用 Q359(Su⁺)检测 λ Spi⁻重组子的特点, 从在 LE392 受体菌上形成的噬菌斑中, 任意挑选, 去染感 Q359, 结果 90% 以上在 Q359 上出现噬菌斑。表明 90% 以上为重组噬菌体。

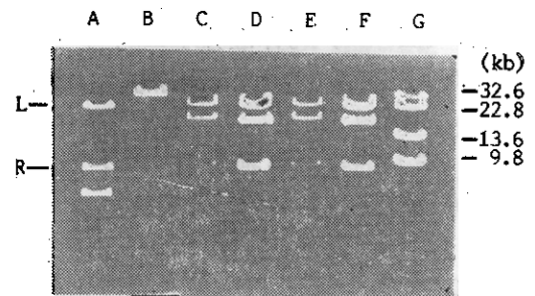


图 6 重组子 DNA 的酶解鉴定

A. Ch28 DNA/*Bam* HI; B. Ch28 DNA; C—F. 重组子 DNA/*Bam* HI; G. λ /Bgl II 作为标准分子量; L: “左臂”; R: “右臂”

Fig. 6 Analysis of recombinant DNA with restriction endonuclease *Bam* HI digestion

A. Ch28 DNA/*Bam* HI; B. Ch28 DNA; C—F. recombinant DNAs/*Bam* HI; G. λ /Bgl II as a marker DNA; L: left arm; R: right arm

2. 用限制核酸内切酶 *Bam* HI 酶解重组子 DNA 检查插入 DNA 片段表明: 载体“左、右臂”完整, 而插入片段分子量为 15—20kb (图 6)。

(六) HD-1 伴孢晶体基因探针

用全自动 DNA 合成仪合成的 30bp 的 DNA 探针, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈一条主带。用 ^{32}P 标记后, 与重组子噬菌体进行了原位杂交。其自显影结果表明质粒基因文库中含有 HD-1 伴孢晶体的 DNA 序列的噬菌斑。

讨 论

以前, 曾有人报道^[7]通过与标有 ^{32}P 的探针杂交自显影的方法, 发现苏芸金杆菌 HD-1 的晶体蛋白分布在三个分别为 150 Md、47Md 和 30Md 的大质粒上。但关于这三个大质粒上的基因是否为完全相同的基因在不同位置的分布, 或者是有一定同源性但并非同一个基因的问题尚未定论。有人提出此基因可能具有跳跃基因的性质来解释这种现象, 但同时有人认为 47 和 30Md 的两个较小的质粒来源于 150Md 的大质粒。我们在苏芸金杆菌 HD-1 等质粒提取过程中, 发现有时可以得到 150Md 的大质粒, 有时则得不到(图 4)。在本研究中, 用最适于大质粒提取的 Spizizen 抽提法^[14]提取的质粒 DNA 在 0.6% 琼脂糖凝胶电泳上至少可见 7 条带, 其中大于染色体的 3 条。150Md 的大质粒带几乎靠在加样槽边, 这和 R. Dedonder^[20] 的电泳结果基本一致。

我们发现通过 CsCl-E. B. 密度梯度将质粒和染色体分离后, 质粒部分电泳时, 仍有一部分出现在染色体位置(25Md), 但不是染色体的污染。这可通过以下两个实验证实: (1) 用核酸内切酶 *Bam* HI 酶解质粒部分时, 没有发现在酶解染色体部分

时由于酶切位点过多而造成条带不清楚的现象。(2) 在提纯另一大质粒(K99)的过程中, 发现用电泳分离纯化的 K99 大质粒(75Md) 再次电泳时, 几乎全部都在染色体位置。根据以上结果, 我们认为大质粒在纯化过程中, 可能由于机械损伤或其它原因, 剪切成大约为 25Md 的片段。这种片段称为 If 片段, 在电泳时恰好处于染色体位置。

在选择受体菌时, 我们利用受体菌 *E. coli* Q359 具有只能作为 λSpi^- 重组噬菌体(red^-) 受体的特性来除去本底, 但发现以 Q359 作为受体菌时, 再次感染 Q359 时所得到的噬菌斑几乎用肉眼难以分辨。将极小的噬菌斑收集, 大量稀释后, 感染另一受体菌(LE392) 时仍得到大量噬菌斑。证实重组噬菌体对 Q359 确有感染能力。但只形成极小的噬菌斑。

参 考 文 献

- [1] Miller, L. K. et al.: *Science*, 219: 751—761, 1983.
- [2] Whiteley, H. R. et al.: *J. B. C.*, 258: 835—838, 1983.
- [3] Schnepf, H. E. and H. R. Whiteley: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78: 2894—2897, 1981.
- [4] Whiteley, H. R. et al.: *Molecular cloning and gene regulation in Bacilli*, ed. by J. Hoch, et al., Academic Press Inc., New York, p. 131—144, 1982.
- [5] Held, G. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 79: 6065—6069, 1982.
- [6] Sekar, V. and B. C. Carlton: *Gene*, 33: 151—158, 1985.
- [7] Kronstad, J. W. et al.: *Journal of Bacteriology*, 154: 419—426, 1983.
- [8] Fan, Y. L. and W. X. Xu: *Plasmids in Bacteria*, ed. by D. R. Helinski, et al., Plenum Publishing Co., p. 835, 1985.
- [9] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A laboratory manual*, C. S. H., p. 260, 1982.
- [10] Blattner, F. R. et al.: *Science*, 196: 161—162, 1977.
- [11] Maniatis, T.: *Cell*, 15: 687—694, 1978.
- [12] Yamamoto, K. R. et al.: *Virology*, 40: 734—

- 744, 1970.
- [13] de Wer, J. R. et al.: *J. Virology*, **33**: 401—407, 1980.
- [14] Spizizen, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **44**: 1072—1078, 1958.
- [15] Gonzalez, J. M.: *Plasmid*, **3**: 92—98, 1980.
- [16] Collins, J. et al.: *Methods in Enzymology*, **68**: 281, 1979.
- [17] Barbara, H. et al.: *Methods in Enzymology*, **68**: 301, 1979.
- [18] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A laboratory manual*, C. S. H., p. 371, 1982.
- [19] Karn, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**: 5172, 1980.
- [20] Dedonder, R. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **186**: 391—398, 1980.
- [21] Wang, X. and Y. L. Fan: Proceeding of first international symposium and workshop of society of Chinese bioscientists in America, United Bio-tech. Inc., p. 118, 1986.
- [22] Priefer, U. et al.: *Advanced Molecular Genetics*, ed. by A. Pühler and K. N. Timmis, Springer-Verlag, New York, p. 191—193, 1984.
- [23] Schnepf, H. E. et al.: *J. B. C.*, **260**: 6264—6272, 1985.

THE CONSTRUCTION OF PLASMID GENOMIC LIBRARY FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* HD-1

Chen Ruichun Fan Yunliu

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

There were multiple plasmids in *Bacillus thuringiensis* HD-1. The genomic library of the plasmids from *Bacillus thuringiensis* HD-1 was constructed using cloning vector lambda Charon 28. The number of phage recombinants exceeded the number of recombinants theoretically expected. 15—20 kb DNA fragments from *Bacillus thuringiensis* HD-1 have been identified by restriction digestion of DNA isolated from several clones. A DNA

fragment containing part of the δ -endotoxin gene has been synthesized. Identification of the proper clone using the synthetic probe is performed.

Key words

Plasmid genomic library; *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1; Cloning vector of lambda Charon 28; Recombinant DNA