

简报

杀鳞翅目及双翅目幼虫的苏芸金芽孢杆菌融合子的质粒及其高重复性检测方法

王璋瑜 范云六

(中国农业科学院分子生物学研究室, 北京)

我们已报道了通过苏芸金芽孢杆菌 *Kurstaki* HD-1 (*Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-1) 与苏芸金芽孢杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) 的原生质体融合得到了既杀鳞翅目又杀双翅目幼虫的苏芸金杆菌^[1,2]。本文报道融合子F-60B及F-12的质粒图谱, 并讨论可重复性检测苏芸金芽孢杆菌HD-1的150Md大质粒的方法。

材料与方 法

(一) 菌种和培养基

1. 菌种: 苏芸金芽孢杆菌 *Kurstaki* HD-1 及苏芸金芽孢杆菌以色列变种, 由美国俄亥俄州立大学Dean, D.H. 教授提供。苏芸金芽孢杆菌融合子F-60B及F-12由本室建构^[1]。

2. 培养基: Spizizen培养基(SPY) (g/L): (NH₄)₂SO₄ 2, K₂HPO₄·3H₂O 8.3, KH₂PO₄ 6, C₂H₄CO₂Na 1, MgSO₄·7H₂O 0.39, 葡萄糖 5, 及酵母膏 1。LB培养基按文献^[4]配制。

(二) 大质粒DNA的检测

参照Kado^[3]法, 有所修改: 接菌于5ml的SPY或LB培养基中, 28℃摇床振荡培养10—12h, 取1.5ml菌液于Eppendorf管中, 5000rpm离心3min, 去上清, 用0.5ml E-缓冲液(40mM Tris-2mMED-TA, pH8.0)洗菌, 离心去上清液, 加

40μl E-缓冲液, 均匀悬浮菌体, 置冰浴中, 加260μl Kado溶菌液(3%SDS, 50mM Tris, pH12.6), 翻转Eppendorf管使之均匀, 用灭菌牙签轻轻搅匀(不时取出于室温, 保持SDS呈溶液状态), 在溶菌液中作用20min至1.5h, 加入等体积苯酚: 氯仿(1:1), 轻轻摇匀, 7000rpm离心5min, 取30μl上清液加5μl溴酚兰, 在0.8%琼脂糖凝胶电泳70V 6h, 电泳缓冲液为TAE^[4]。电泳后用0.5μg/ml的溴化乙锭染30min, 在紫外灯上照像。

结果与讨论

(一) 苏芸金芽孢杆菌融合子F-60B及F-12的质粒图谱

从图版I-1可以看出, *B.t.kurstaki* HD-1菌株的染色体带上面有三条大质粒带, 分子量分别为150Md、50Md及30Md。*B.t.i*菌株的染色体带上面有两条大质粒带, 分子量分别为150Md及75Md。融合子F-60B及F-12的质粒图谱与*B.t.i*亲本菌株相似。

苏芸金芽孢杆菌融合子F-60B及F-12具有杀蚊及松毛虫幼虫的能力^[1,2]。据文献报道^[5-7], *B.t.i*的δ毒素基因位于75Md质粒上, *B.t.kurstaki* HD-1杀鳞翅目幼虫的δ毒素基因编码在150Md, 50Md, 30Md大质粒上^[8-10]。从图版I-1可看

本文于1986年9月19日收到。

到, 融合子 F-60B 及 F-12 中具有清晰的 75Md 的质粒带, 同时也出现了 150Md 的质粒带。由于 *B.t.i* 和 *B.t.kurstaki* HD-1 均有 150Md 质粒, F-60B 及 F-12 在电泳上出现的这个 150Md 质粒带是单独来自 *B.t.kurstaki* HD-1? 抑或除 HD-1 的 150Md 质粒外还有 *B.t.i* 的 150Md 质粒带? 有待进一步证实。我们根据在检测融合子 F-60B 及 F-12 质粒时的杀虫试验及其 δ 毒素蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果^[2], 认为这个 150Md 质粒不可能只来自 *B.t.i* 因为: (1) 在 SDS-PAGE 电泳图谱上, 融合子 F-60B 及 F-12 出现了 *B.t.kurstaki* HD-1 所特有的 δ 毒素蛋白带 (分子量为 68000)。而 *B.t.i* 的 150Md 质粒 (和其他质粒) 并不编码该蛋白质。(2) 融合子 F-60B 及 F-12 仍保持杀鳞翅目幼虫的能力。如果 150Md 质粒只是来自 *B.t.i* 的话, 是无法解释的。

(二) 苏芸金芽孢杆菌的大质粒 (150Md) 是否有时出现, 有时不出现?

Kronstad 等报道^[10], 苏芸金芽孢杆菌 *Kurstaki* HD-1 中的大质粒 (150Md 质粒), 不易重复性检测。我们在做该菌质粒基因文库时, 也曾发现类似现象^[11]。Kronstad 解释可能的原因是 150Md 质粒解离成 50Md 及 30Md 质粒, 并认为培养基对大质粒的有无是很有影响的: 在 LB 培养基上培养, 往往检测不到 150Md 质粒, 而在 Spizizen 培养基上培养, 则可得到 100—150Md 大质粒。

为了比较苏芸金芽孢杆菌融合子 F-60B 及 F-12 与亲本 *B.t.kurstaki* HD-1 与 *B.t.i* 的质粒图谱, 首先我们对大质粒提取的方法进行探讨, 以期得到重复性高的结果。工作表明, *B.t.kurstaki* HD-1 的 150Md 大质粒是可以重复性地得到, 与培养基关系不大, 重复性差或检测不到也

不是 150Md 质粒解离的缘故, 主要是方法学上的问题。检测的关键在于: 既要操作柔和, 尽量避免在溶菌后强烈振荡、搅拌等, 以免引起大质粒 DNA 的剪切, 但又要设法在裂解过程中使大质粒从细胞裂解碎片中解脱出来, 否则大质粒 DNA 如同染色体 DNA, 常被细胞内含物及碎片所包裹而被除去, 从而导致大质粒检测不出或重复性差的结果。图版 I-1 中 (1)、(2)、(3)、(4) 分别示出融合子 F-12、F-60B、*B.t.i* 及 *B.t.kurstaki* HD-1 的清晰的大质粒带, 包括 150Md 质粒带, 与图版 I-2 中的 (1)、(2)、(3) 形成了明显的对比。差异的主要原因在于, 在溶菌液加入菌体后, 图版 I-2 中的 (1)、(2)、(3) 只是轻轻地翻动 Eppendorf 管中的裂解物; 而图版 I-1 中的 (1)、(2)、(3)、(4) 除轻轻翻动 Eppendorf 管外, 并用灭菌牙签轻轻将裂解物搅动。这样, 使大质粒从细胞裂解物中解脱出来, 回收率大大提高。

这种使 DNA 从裂解物的碎片团中解脱出来的原理, 曾在 Womble 利用 EtBr-Cscl 方法测定质粒拷贝数的工作中得到应用^[12]。他的工作证明, 在裂解物进行 EtBr-Cscl 离心之前, 用 1ml 的吸管柔和地吸取和吹出裂解物 20—30 次, 可以 100% 地回收染色体 DNA, 并可重复性地得到高产量的 CCC 质粒 DNA, 从而大大地提高了染色体 DNA/质粒 DNA 比值的准确性。Womble 的工作对象是 *E.coli* 质粒, 我们的工作是将上述原理通过另一种形式的方法 (用牙签轻轻搅动) 在苏芸金芽孢杆菌的大质粒上的具体应用。不论 *B.t.kurstaki* HD-1 的 150Md 大质粒, 还是 *B.t.i* 等其他苏芸金芽孢杆菌及杀蚊 *Bacillus sphaericus* 的大质粒也都得到重复性高的结果。

为了了解培养基对苏芸金芽孢杆菌 *B.t.kurstaki* HD-1 的 150Md 质粒的形成有无影响,我们将 SPY 及 LB 培养基上培养的 HD-1 进行了质粒比较。结果表明,不论在 SPY 或 LB 上培养,HD-1 均形成 150Md 的质粒,没有任何区别(图版 I-3)。

在我们的实验中,加溶菌液后采用了 3 个温度: 0℃、室温(20—25℃)和 60℃;

3 个作用时间: 20、40、60min。如图版 I-4 所示结果表明,不论哪种条件下均能得到 150Md 大质粒的清晰图谱。据此我们认为,为了检测苏芸金芽孢杆菌及球形芽孢杆菌质粒的目的,可采用 0℃ 或室温(20—25℃)作用 20min, Kado 方法中的加热步骤可省去。

参 考 文 献

- [1] Wang Xian and Fan Yunliu, Proceeding of the first international symposium and workshop of the Society of Chinese Bioscientists in America, United Biotech Inc., p.118, 1986.
- [2] 王 宪, 范云六: 生物工程学报, 3 (1): 29—37, 1987.
- [3] Kado, C.I. and Liu, S.T.: *J.Bacteriol.*, 145:1365—1373, 1981.
- [4] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [5] Ward, E.S. and Ellar, D.J.: *FEBS Lett.*, 158:45—49, 1983.
- [6] Gonzalez, J.M. et al., *Plasmid*, 11:28—382, 1984.
- [7] Ward, E.S. et al., *FEBS Lett.*, 175 (2): 377—382, 1984.
- [8] Schnepf, H.E. and Whiteley, H.R.: *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.*, 78:2893—2897, 1981.
- [9] Whiteley, H.R. et al.: *Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli*, ed. A. Gausan, S. Chang J. Hoch, pp. 134—144, New York, Academic, 1982.
- [10] Kronstad, H.E. et al., *J.Bacteriol.* 154 (1): 419—428, 1983.
- [11] 陈瑞春, 范云六: 微生物学报, 27 (1): 30—36, 1987.
- [12] Wombol, D.D, et al.: *J.Bacteriol.* 130:148—153, 1977.

图 版 说 明

1. 苏芸金芽孢杆菌两个亲本及其融合子的质粒图谱
(1) 融合子 F-12 (2) 融合子 F-60B (3) 亲本菌 *B.t.i* (4) 亲本菌 *B.t.kurstaki* HD-1 (5) 分子量对照菌 *E.coli* C83912(pNK99) (6) 分子量对照菌 *E.coli* 1548 (pNK88)
2. 苏芸金芽孢杆菌两个亲本及其融合子的质粒图谱
按本文大质粒检测方法进行, 但未用牙签搅匀溶菌液
(1) 融合子 F-12 (2) 亲本 *B.t.i* (3) 亲本 *B.t.kurstaki* HD-1
3. 生长在不同培养基上的苏芸金芽孢杆菌 *Kurstaki* HD-1 的质粒图谱
A, C₁ SPY 培养基 B, D₁ LB 培养基
4. 加溶菌液后不同温度下作用不同时间的苏芸金芽孢杆菌 *B.t.kurstaki* HD-1 的质粒图谱
A. 60℃ B. 室温(20—25℃) C. 0℃
(1) 60min (2) 40min (3) 20min

王璋瑜等：杀鳞翅目及双翅目幼虫的苏芸金芽孢杆菌融合子的质粒及其高重复性检测方法

图版 I
Plata I

Wang Zhangyu et al.: Plasmids of *Bacillus thuringiensis* killing lepidopteran and dipteran larvae and the highly reproducible method for their detection

