



苏云金杆菌蜡螟变种晶体蛋白基因在枯 草杆菌中的克隆及表达

余学政 吴柏桦

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 武汉)

苏云金杆菌蜡螟变种的血清型为5a5b,迄今未见到有该变种晶体蛋白基因的报道。本实验是以和苏云金杆菌亲缘关系密切的枯草杆菌作为晶体蛋白基因表达的受体,以期获得蜡螟变种的毒蛋白基因克隆。

材料和方法

(一) 材料

1、主要试剂及用品:低熔点琼脂糖为Sigma公司产品。辣根过氧化酶标记羊抗兔结合物为北京生物制品所产品。T4 DNA连接酶,进口分装,购自华美公司。3,3'-二胺基联苯胺盐酸盐为北京化工厂产品。核糖核酸酶为上海东风生化试剂厂产品。硝酸-乙酸混合纤维素酯微孔滤膜,φ100mm,孔径0.3μm,为上海医药工业研究所产品。

2、菌株:苏云金杆菌蜡螟变种(*Bt. var. galleriae*)CT-162由华中农业大学俞子牛同志赠。枯草杆菌 BD393, *lys-3, thyA, thyB, trpC2*;枯草杆菌 BD466(pBD10), *Cm, Km, Em, thr-5, trpC2*均来自Bacillus Genetic Stock Center, Ohio, USA.

(二) 方法

1、伴孢晶体的提取、纯化及抗体制备:伴孢晶体的制备、纯化按照Pendleton^[1]方法进行。得到的晶体按照文献[2]用1mol/L NaOH滴定,使其pH为12,于30℃孵育15h,以9000g离心10min,取上清,用1mol/L HCl滴定

到pH7.2。

取等体积的晶体蛋白溶液与完全弗氏佐剂混合注射家兔,采血清,用双向扩散法测得两只家兔血清的效价分别为1:64和1:32。而后按赵永芬^[3]方法纯化IgG,于磷酸缓冲液中透析。

2、苏云金杆菌质粒的分离:按照Kado^[4]方法进行。

3、从枯草杆菌BD466中分离质粒pBD10:按Rodriguez^[5]方法进行。

4、重组:取40μl CT-162的质粒制备物,10μl pBD10溶液,5.5μl 10×中离子强度消化缓冲液^[6],加2μl 18u/μl的Bcl I,于50℃保温1h^[7],加入0.2mol/L EDTA(pH8.0)至终浓度为10mmol/L以终止反应。依次用等体积的酚/氯仿,氯仿各抽提一次,乙醚抽提三次,加2.5mol/L(pH5.2)NaAc至终浓度为0.25mol/L,加2倍体积-20℃95%乙醇,-20℃过夜,12000rpm离心20min,真空干燥,悬浮于30μl双蒸水中。

连接反应按照文献[8]进行。重组质粒的构建过程见图1。

5、转化:按照Chang^[9]方法进行,但各种缓冲液和培养基中均补充有50μg/ml *lys, trp*,以及200μg/ml *thy*。

6、转化子的筛选:从再生培养基^[9]上生长的菌落中,挑选出对氯霉素(*Cm*)抗性,对红

本文于1988年10月4日收到。

霉素(Em)敏感的菌落,再将这些菌落点到硝酸-乙酸混合纤维酯微孔滤膜(置于LB培养基上),37℃孵育使菌落长到直径1—2mm。

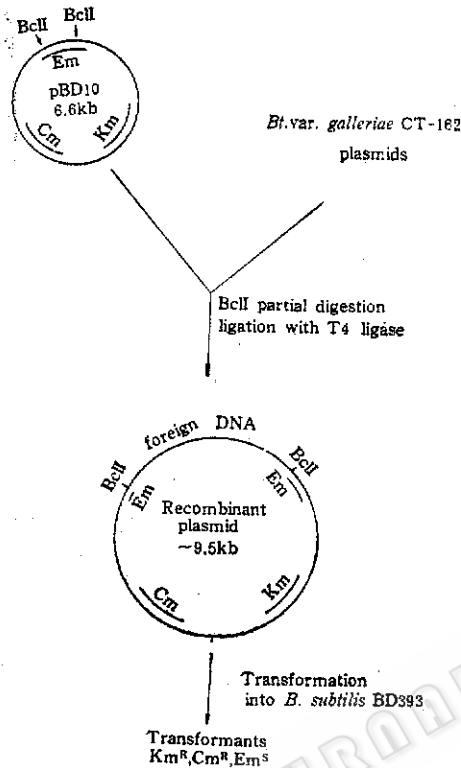


图 1 重组质粒的构建

取出滤膜,于室温先后用裂解液(5mg/ml 溶菌酶溶于10mmol/L Tris-HCl, pH7.0, 1mmol/L EDTA, 10mmol/L NaCl)处理30min;酚:氯仿:庚烷(2:5:8,v:v:v);氯仿:甲醇(2:1,v:v)^[10]分别处理10min。而后分别与伴孢晶体蛋白的抗血清孵育2h,与辣根过氧化物酶标记羊抗兔结合物孵育1h,最后放入3,3-二胺基联苯胺盐^[11]和H₂O₂中孵育30min,产生晶体蛋白的菌落便会有红褐色斑出现。

7、生物毒性试验:将上述实验中筛选出的转化子, BD393, CT-162分别于30℃在LB培养基中振荡35h,稀释10倍后,将其涂在青菜表面上,并做一个双蒸水对照,分别喂饲2龄菜青虫45头,观察72h。

8、转化子质粒的核酸分析:从转化子中抽提质粒,方法同从BD466中抽提pBD10,用0.8%琼脂糖凝胶,6V/cm,硼酸电泳缓冲液电

泳。

从低熔点琼脂糖凝胶中回收转化子的3个质粒带中分子量最小的带,方法按照文献[12]。将回收的DNA用Bcl I完全消化(50℃),在0.8%琼脂糖凝胶中电泳,λ-Hind III作为标准分子量对照。

实验结果

(一) 转化子的遗传标记分析

将产生红褐色斑点的菌落分别挑到补充有thy, thy + lys, thy + trp, lys + trp, thy + lys + trp的基本培养基平板上,发现这些菌落均只能在补充有thy, lys, trp的平板上生长。在其他4种平板上均不能生长,从而证实转化子是由受体菌BD393转化而来。

(二) 转化子筛选

从再生培养基上长出的菌落,经抗性筛选,ELISA筛选得到5个阳性转化子(见图版I-C),它表明在pBD10的红霉素(Em)抗性基因的Bcl I位点上插入了来自CT-162的晶体蛋白基因。

(三) 转化子质粒的核酸分析

上述转化子之一作质粒核酸分析。有三个质粒带P1, P2和P3。其中P2与受体菌BD393的质粒带完全一致,说明它来自受体本身。质粒P3比pBD10较大,故它可能是重组质粒(见图版I-A)。

从低熔点琼脂糖中,分离质粒P3,用Bcl I完全消化后电泳(图版I-B),共产生6条带,分子量最大的一条带与pBD10用Bcl I消化后的大带完全一致;其余的5个片段为插入的外源DNA。其中含有伴孢晶体基因。这些片段的分子量在0.32—1.10kb之间,其总和约为3.5kb。

(四) 生物毒性检测

用菜青虫来检测转化子的生物毒性,发现5个转化子均有毒性。前述核酸分析的转化子的生物毒性结果见表1。

从虫子的死亡数来看,受体菌BD393与双蒸水一样无毒,CT-162毒性最高,转化子居中。试验中还发现,麻痹现象非常明显。菜青虫吃浸有BD393菌叶子的速度很快,与双蒸水对照一样;但吃浸有转化子叶片的速度很慢,20h后几乎就不再吃叶片了。该现象与吃浸有CT-162的

叶片相似。该结果表明, 转化子对菜青虫有毒 对菜青虫的杀死率约为苏云金杆菌 CT-162 的性, 能合成有生物毒性的晶体蛋白质。转化子 42%。

表 1 转化子对菜青虫的毒性试验

菌 株	死 亡 数				
	24h	36h	48h	60h	72h
转 化 子	3	4	8	12	19
CT-162	2	9	20	37	45
BD393	0	0	0	0	0
双 蒸 水	0	0	0	0	0

每组均为45条菜青虫

参 考 文 献

- [1] Pendleton, I.R. et al.: *Nature*, 212:728, 1966.
- [2] Bulla, L.A. et al.: *J. Biological Chemistry*, 256 (6) :3000, 1981.
- [3] 赵永芳编: 生化技术, p.237, 1983.
- [4] Kado, C.I. et al.: *J. Bacteriol.*, 145 (3) :1365, 1981.
- [5] Rodriguez, R.I. et al.: *Recombinant DNA Techniques*, Addison-Wesley publishing company, Inc. p.164, 1983.
- [6] Maniatis, J. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, p.104, 1982.
- [7] Gryczan, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 141, (1) :246, 1980.
- [8] Rodriguez, R. L. et al.: *Recombinant DNA Techniques*, Addison-Wesley Publishing company, Inc., p.89, 1983.
- [9] Chang, S. et al.: *MGG*, 168:111, 1979.
- [10] Henning, U. et al.: *Analytical Biochem.* 97:153, 1979.
- [11] Hawkes, R. et al.: *Analytical Biochemistry*, 119:142, 1982.
- [12] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, p.170, 1982.

CLONING AND EXPRESSION OF THE CRYSTAL PROTEIN GENE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *GALLERIAE* IN *BACILLUS SUBTILIS*

Xu Xuezheng Wu Baihua

(Department of Virology & Molecular Biology, Wuhan University, Wuhan)

Bacillus thuringiensis var. *galleriae* CT-162 produces a protein-aceous crystalline inclusion that is toxic for lepidopteran larva. DNA fragments of *B. thuringiensis* var. *galleriae* CT-162, obtained by BclI partial digestion, were ligated into the vector pBD10 obtained from *B. subtilis* BD466. Recombinants were screened by ELISA method for the production of crystal protein in *B. subtilis* BD393. They are toxic to lepidopteran larva. One of them contains 3 plasmid bands in agarose electrophoresis, 2 more than acceptor BD393. Between them, the small band is recombinant plasmid; the large band is very dark, is likely to

be the linear form or nick circle form of recombinant plasmid. The size of recombinant plasmid is about 9.5kb. There are six fragments when the plasmid is completely digested by *Bcl*I. The biggest fragment is the same as the large one of pBD10 by *Bcl*I digestion. The other five fragments are inserted foreign DNA. Their sizes are from 0.32kb to 1.10kb. The whole size of five fragments is about 3.5kb.

Key words

B. thuringiensis; crystal protein gene; cloning

图版说明

Explanation of plate

A. 质粒核酸电泳分析

a、载体宿主细菌BD466, 载体质粒 pBD10 b、受体细菌BD393 c、转化质粒P₁, P₂, P₃

B. 重组质粒*Bcl*I 酶解结果

a、 λ -Hind III 标准 b、重组质粒, pBD10a 插入片段1, 2, 3, 4, 5 c. pBD10

C、ELISA 筛选转化子, 阳性转化子呈红褐色斑点