

我国高效杀蚊球形芽孢杆菌BS 10毒素蛋白 基因的克隆和表达

刘 阳 韦北阳 范云六

(中国科学院生物技术研究中心分子生物学研究室, 北京)

球形芽孢杆菌 BS10 (*Bacillus sphaericus* Strain 10, BS10) 是从我国分离得到的一株高毒力杀蚊幼虫菌株。BS10在芽孢形成过程中产生的伴孢晶体蛋白对蚊幼虫, 特别是库蚊幼虫具有强的毒杀作用。本文建构了BS10的重组克隆, 并通过合成18碱基的寡聚核苷酸序列为探针, 筛选出了BS10的重组阳性克隆(TG1(pFL37)和TG1(pFL36))。重组克隆TG1(pFL37)含有编码43kd毒素蛋白的4.0kb Hind III的BS10 DNA片段。Western blot 分析和生物活性测定证明BS10的43kd杀蚊毒素蛋白基因在大肠杆菌中得到表达。

关键词 球形芽孢杆菌BS10; 杀蚊毒素蛋白基因; 基因表达

杀蚊球形芽孢杆菌对传播疾病的蚊幼虫具有毒杀作用^[1]。在蚊幼虫致病菌中, 苏云金芽孢杆菌以色列变种(*B. thuringiensis* var *israelensis*, BTI)的研究最为详细^[2]。由于球形芽孢杆菌对传播大脑炎等的库蚊比 BTI 更为有效, 并且能在死蚊体内再生循环, 致使杀蚊活性持续时间长^[3], 因此杀蚊球形芽孢杆菌的研究日益受到重视。

球形芽孢杆菌 BS10 菌株是从我国江苏省下里河地区分离的一株高效杀蚊菌株, 对库蚊幼虫具有很强的毒杀活性。本实验室曾报道过球形芽孢杆菌 BS10 芽孢碱提取液中, 主要为45kd和60kd两种多肽, 其中只有45kd多肽具有杀库蚊幼虫活性^[4]; 球形芽孢杆菌 BS10中存在分子量为69.5Md的大质粒^[5]; 球形芽孢杆菌 BS10 杀蚊毒素基因与苏云金芽孢杆菌以色列变种的杀蚊毒素基因之间无同源性^[6]。在以上工作的基础上, 本文报道球形芽孢杆菌 BS10 杀蚊毒素蛋白基因的分子克隆和表达。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

球形芽孢杆菌 BS10 由江苏下里河地区农科所戴承镛先生提供, 大肠杆菌TG1和质粒pAT153由本室提供。

(二) 毒素蛋白基因的分子克隆

球形芽孢杆菌 BS10总DNA提取按文献[5]方法进行。质粒DNA提取和纯化、DNA重组连接、大肠杆菌转化和限制酶分析按文献[6]方法进行。18碱基寡聚核苷酸序列由Biosystem公司DNA合成仪合成, γ^{32} -P-ATP 标记和菌落原位分子杂交按文献[7]方法进行。

(三) Western blot 分析

细胞总蛋白 SDS-PAGE 分析按文献[8]方法进行。Western blot 分析按文献[9]方法进行, BS10 毒素蛋白的抗血清由本室提供。

本文于1989年5月29日收到。

(四) 生物活性测定

所用二龄末三龄初淡色库蚊 (*Culex pipiens*) 由军事医学科学院五所六室提供。供试菌株在LB(含Ap, 50 μ g/ml)培养基中培养, 菌体经超声破碎后取上清液, 参照文献[4]方法进行生物活性测定。

结 果

(一) BS10 杀蚊毒素蛋白基因的分子克隆

利用蛋白酶方法制备的球形芽孢杆菌 BS10 细胞总 DNA, 包括细菌染色体 DNA 和 BS10 大质粒 pFW1 DNA。BS10 总 DNA 经 Hind III 酶解为 1.0—8.0kb 的 DNA 片段。大肠杆菌载体 pAT153 DNA, 经碱法提取和氯化铯密度梯度超离心纯化。Hind III 完全酶解 pAT153 载体 DNA 后, 每 10 μ g pAT153 DNA 加入 0.1 单位小牛胸腺碱性磷酸酶脱去粘末端 5' 磷酸的基因。脱磷的 pAT153 DNA 与 BS10 的 Hind III 片段按 1:4 的比例, 经 T4 DNA 连接酶作用后, 转化大肠杆菌受体 TG1, 在含 Ap(50 μ g/ml) 的 LB 平板上得到 15000 个转化子。

参照球形芽孢杆菌 BS2362 的 41.9kd 毒素蛋白基因的核苷酸序列^[10], 合成了 ORF 中第 664 核苷酸至第 681 核苷酸之间的 18 碱基寡聚核苷酸序列 (5'-TGGCAA-GCATGTGGTCC-3') 为探针。单链探针 DNA 经 20% 变性 PAGE 电泳纯化, 在 T4 多聚核苷酸激酶作用下, 利用 γ -³²P-ATP 标记。对 500 个 Ap^R 转化子进行分子杂交, 得到二个阳性克隆 (图版 I-2), 受体菌 TGI DNA 和载体 pAT153 DNA 与探针均无阳性杂交反应。二个阳性克隆的质粒经 Hind III 完全酶切后, 电泳结果表明, 它们分别含有 4.8kb 和 4.0kb 的 BS10 的 Hind III DNA 插入片段 (图版 I-1), 重组质粒分

别命名为 pFL36 和 pFL37。

(二) BS10 杀蚊毒素蛋白基因在大肠杆菌中的表达

1. Western blot 分析: 取阳性克隆 TG1(pFL36) 和 TG1(pFL37), 以及阴性对照菌 TG1(pAT153) 的单菌落, 分别接种于 5ml LB(含 Ap, 50 μ g/ml) 培养基中培养。取 1.5ml 菌液离心收集菌体, 加 150 μ l 点样液悬浮, 煮沸 3min 后, 各取 20 μ l 溶液进行 10% SDS-PAGE 分析。结果表明, 阳性克隆的蛋白谱带中具有 BS10 的 43kd 蛋白相同的带。为进一步证明 BS10 毒素蛋白在大肠杆菌中的表达, 细胞蛋白转至硝酸纤维素滤膜, 用 BS10 毒素蛋白抗血清及羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG (军事医科院微生物流行病学研究所产品) 进行免疫检测。结果表明, 阳性克隆 TG(pFL37) 在 43kd 处的蛋白有免疫反应凝集带, 而另一克隆 TG1(pFL36) 和对照 TG(pAT153) 的细胞蛋白无免疫凝集带出现。证明了 BS10 毒素蛋白基因在大肠杆菌中得到表达 (图版 I-3, 4)。

2. 杀蚊生物活性测定: 将阳性克隆 TG1(pFL37) 及对照菌 TG1(pAT153) 在 LB(含 Ap, 50 μ g/ml) 培养基中培养。收集的菌体经超声破碎, 取上清液加入库蚊幼虫饲养液进行生物活性测定。结果表明阳性克隆细胞蛋白对三龄初的淡色库蚊幼虫具有毒杀作用。从图版 I-5, 6 可以看出, 淡色库蚊幼虫在加入阳性克隆 TGI(pFL37) 细胞裂解液, 24h 后蚊幼虫被毒杀, 死蚊幼虫虫体萎缩透明。而对照菌 TG1(pAT153) 对蚊幼虫无毒性, 加入细胞裂解液饲养后, 淡色库蚊幼虫仍然正常存活。

上述结果表明, 球形芽孢杆菌 BS10 的 43kd 杀蚊毒素蛋白基因在大肠杆菌 TGI 中得到表达; 大肠杆菌表达的 BS10 杀蚊毒素蛋白对淡色库蚊幼虫具有毒杀作用。

讨 论

比较 BS10 杀蚊毒素基因与其他已克隆的杀蚊球形芽孢杆菌 43kd 毒素蛋白基因限制酶图谱,发现 BS10 毒素蛋白基因与 BS1593^[12],以及 BS2362 和 BS2297^[13,14] 的毒素蛋白基因的 HindⅢ 酶谱不同,说明克隆的 BS10 毒素蛋白基因可能是一新的杀蚊毒素蛋白基因。

以高毒力的球形芽孢杆菌杀蚊毒素蛋白基因为探针,分子杂交球形芽孢杆菌不同的菌株,发现高毒力的球形芽孢杆菌之间具有很强的和特异的杂交,而与低毒力或无毒性的球形芽孢杆菌菌株之间几乎无杂交^[15],反映了不同球形芽孢杆菌菌株之间毒素基因的结构同源性和杀蚊毒力密切相关。本文从高效杀蚊球形芽孢杆菌 BS10 克隆毒素蛋白的基因,其实际应用价值还在于可利用它从其它球形芽孢杆菌中筛选高毒力的杀蚊幼虫致病菌。

本实验得到二个分子杂交阳性 BS10 重组克隆。其中一个克隆 TGI(pFL37)表达了杀蚊毒素蛋白,与 BS10 的 43kd 毒素蛋白抗血清起免疫反应,对淡色库蚊幼虫

有杀死毒力,另一克隆 TGI(pFL36)对淡色库蚊幼虫无毒性,与 BS10 的 43kd 毒素蛋白抗血清也无免疫反应。是否在 TGI(pFL36)中所含的 BS10 插入片段,类似于 BS2362 毒素蛋白相关基因族中无毒性的 DNA 序列^[13],有待于进一步研究。

Baumann 比较了 BS2362 芽孢中纯化的 43kd 毒素蛋白和大肠杆菌表达的毒素蛋白基因产物的氨基酸序列,发现前者比后者在 N-末端少 4 个氨基酸^[14]。BS10 重组克隆 TGI(pFL37),表达的 43kd 毒素蛋白在 SDS-PAGE 中的迁移率略小于芽孢中纯化的毒素蛋白,可能是由于大肠杆菌缺乏对毒素蛋白特异的球形芽孢杆菌蛋白酶,使在大肠杆菌中表达了完全的 43kd 毒素蛋白。

在 BTI 中,编码杀蚊毒素蛋白的基因定位于细菌染色体外的质粒上^[10]。在球形芽孢杆菌中,毒素蛋白基因定位尚不清楚。最近,本实验室报道了 BS10 的 69.5Md 大质粒(pFW1)的限制酶图谱^[6]。我们分子克隆 BS10 杀蚊毒素基因时,除用总体 DNA 外,还对 pFW DNA 进行了克隆^[17]。

参 考 文 献

- [1] Yousten, A. A.: *Adv. Biotechnol. Processes*, 3:315, 1984.
- [2] 范云六等:杀虫微生物,第一卷,北京农业出版社, p.3, 1987.
- [3] Davidson, E. W. et al.: *Appl. and Environ. Microbiol.*, 47:125, 1984.
- [4] 刘国华等:科学通报, 34:61, 1989.
- [5] 韦北阳、范云六:生物工程学报, 5:46, 1989.
- [6] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning—A Laboratory Manual Cold Spring Harbour Lab. N. Y.*, 1982.
- [7] Wallace, R. B. and Miyada, C. G.: *Method in Enzymol.*, Vol. 152, p.432, 1987.
- [8] Helfman, D. M. and Hughes, S. H.: *Method in Enzymot.*, Vol. 152, p.451, 1987.
- [9] 孙午良、范云六:中国科学, 12:1267, 1988.
- [10] Colin, B. and Hindley, J.: *Nucl. Acids. Res.*, 15:5891, 1987.
- [11] 范云六等:杀虫微生物,第一卷,北京农业出版社, p.174, 1987.
- [12] De Marsac, N. T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 209:1396, 1987.
- [13] Baumann, L. et al.: *J. Bacteriol.*, 170:2045, 1988.
- [14] Baumann, P. et al.: *J. Bacteriol.*, 169:4061, 1987.
- [15] Louis, J. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 195:23, 1984.
- [16] Kent, M. et al.: *J. Bacteriol.*, 169:1017, 1987.
- [17] 刘 阳、范云六:中国科学,印刷中, 1990.

CLONING AND EXPRESSION OF MOSQUITO LARVICIDAL PROTEIN GENE FROM A HIGHLY TOXIC LOCAL STRAIN OF *BACILLUS SPHAERICUS*

Liu Yang Wei Baiyang Fan Yunliu

(Lab. of Molecular Biology, Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing)

Bacillus sphaericus strain 10 (BS10), isolated from Jiang Su Province of China, is highly toxic to the mosquito larvae. During sporulation, BS10 produces a parasporal crystalline protein which is toxic to the larvae of a number of mosquito species, and extremely high toxic against the larvae of *Culex pipiens*. Using the *Escherichia coli* cloning vector pAT153, two clones positively hybridized with the synthesizing 18 bases oligonucleotides probe have been obtained. One of the recombinants, TG1(pFL37), contains a 4.0 kb HindIII DNA fragment from BS10, and produces the 43 kb larvicidal toxin protein. Western blotting analysis and biological assay of mosquito-larvicidal activity confirm that larvicidal toxin gene of BS10 is expressed in *E. coli*.

Key words

Bacillus sphaericus 10; mosquito larvicidal toxin gene; gene expression

图 版 说 明

Explanation of Plate I

1. 重组子质粒DNA的限制酶酶切结果
Endonuclease HindIII digested recombinant plasmids DNA
a. DNA/HindIII digested DNA molecular weight marker, b. pAT153/HindIII DNA fragment, c. pFL36/HindIII DNA fragments, d. pFL37/HindIII DNA fragments
2. BS10 重组子原位分子杂交自显影结果
In situ colony hybridization of *B. sphaericus* 10 with ³²P-labelled oligonucleotides probe
A. TG1(pFL36), B. TG1(pFL37), C. TG1, D. TG1(pAT153), E. *B. sphaericus* 10
3. BS10重组子细胞蛋白的SDS-PAGE分析结果
SDS-PAGE of cell proteins
a. Standar molecular weight, b. 43kd toxin from parasporal crystalline inclusion of BS 10, c. Cell proteins from recombinant TG1(pFL37)
4. BS10 重组子细胞蛋白 Western blotting 分析结果
Western blotting of cell proteins
a. 43kd toxin from parasporal crystalline inclusion of BS10, b. Toxin protein of recombinant TG1(pFL37)
- 5,6. 重组子(pFL37)细胞提取蛋白对淡色库蚊三龄幼虫的生物活性测定
5. 对照(活幼虫) 6. 重组 TG1(pFL37)细胞蛋白杀蚊实验(死幼虫)
Bioassays of protein extract from TG1(pFL37) with larvae of *Culex pipiens* (third-star)
5. Control (active larvae), 6. Experiment (died larvae)

Liu Yang et al.: Cloning and expression of mosquito larvicidal protein gene from a highly toxic local strain of *Bacillus sphaerius*

