

苏云金杆菌 δ -内毒素基因及3'末端缺失基因在大肠杆菌和农杆菌中的亚克隆和表达

郭三堆 陈学军 杨虹 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心, 分子生物学室, 北京)

苏云金芽孢杆菌变种 *Bacillus thuringiensis aizawai* 7-29 δ -内毒素基因及其3'末端缺失基因, 亚克隆到质粒pUC19上, 构建了pUCF33和pUCK63重组质粒。进一步将 δ -内毒素基因及其3'末端缺失基因, 插入到植物表达载体pBI121.2质粒中, 构建了pGY61和pGYCK63重组质粒。用 ^{32}P 标记的 δ -内毒素3'末端缺失的Kpn I DNA片段的探针, 与重组质粒进行DNA-DNA分子杂交, 结果阳性。带有全长和3'末端缺失重组质粒, 转入大肠杆菌HB101和农杆菌LA4404受体细胞中, 其克隆子细胞抽提物, 对大菜粉蝶和玉米螟幼虫均具有杀虫生物活性。结果证明 δ -内毒素基因不仅能在大肠杆菌HB101中, 而且能在农杆菌LA4404中表达。

关键词 δ -内毒素基因; 亚克隆; 重组质粒缺失; 苏云金芽孢杆菌

自1981年Schnepf等人首次将 *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1的 δ -内毒素基因克隆以来, 目前已有十多个 δ -内毒素基因被克隆^[1-3], 并完成了近十个Bt毒素基因的全序列分析^[4,5]。1987年, 美国Monsanto公司^[6]和比利时植物遗传研究所^[7], 先后又将3'缺失后的 *B.t. kurstaki* HD-1 δ -内毒素基因通过农杆菌导入植物中, 获得了抗虫的蕃茄和烟草植株。

B.t. aizawai 7-29对海边粘虫、棉铃虫、菜青虫、小菜蛾等鳞翅目害虫有高效致杀作用。目前对该菌 δ -内毒素基因的遗传操作进行了研究, 但在农杆菌受体中表达的研究, 尚未见到报道。

本文报道将 *B.t. aizawai* 7-29 全长和3'末端缺失的 δ -内毒素基因亚克隆到植物表达载体 pBI121.2上, 构建了pGY61和pGYCK63重组质粒, 使 δ -内毒素基因在大肠杆菌HB101和农杆菌LA4404受体中表达。

材料和方 法

(一) 材料

1. 菌种和质粒: 见表1和表2。
2. 药品和试剂: 限制酶、T4 DNA连接酶等, 为西德Boehringer公司产品。SDS、ATP硝酸纤维素膜等为Sigma公司的产品。

3. 培养基:

(1) LB培养基(%): 蛋白胨1, 酵母粉0.5, NaCl 0.5, pH7.2, 15磅灭菌20min。

(2) YEB培养基(%): 蛋白胨0.5, 酵母粉0.1, 牛肉膏0.5, 蔗糖0.5, MgSO₄·7H₂O 0.05, pH7.4, 15磅灭菌20min。

(二) 方法

本文于1989年6月15日收到。

法国巴斯德研究所 M-M. Lecadet 教授和 D. Lereclus 教授对本工作给予帮助; P.B.I 研究所赠送 pHTAI、pUC19、pBI121.2质粒特此致谢。

表 1 所 用 菌 株
Table 1 Bacterial strains in this work

菌 株 Strain	遗 传 类 型 Phenotype	来 源 Source
<i>B.t. aizawai</i> 7.29	Sm ^r , Cry ⁺	M-M. Lecadet
<i>E. coli</i> HB101	F', r-B, m-B, RecA, are, ProA, Lacy glaK, Str, Xgl15, mtl, SupE.	this Lab.
<i>A. tumefaciens</i> LA4404	A36, harboring pAL4404, Rif ^r	P.B.I.
<i>E. coli</i> HB101(F33)	Ap ^r , Cry ⁺	this work
<i>E. coli</i> HB101(CK63)	Ap ^r , Cry ⁺	this work
<i>E. coli</i> HB101(GY61)	Ka ^r , Cry ⁺ , GUS ⁺	this work
<i>E. coli</i> HB101(GYCK63)	Ka ^r , Cry ⁺ , GUS ⁺	this work
<i>A. tumefaciens</i> LA4404(GY61)	Rif ^r , Ka ^r , Cry ⁺ , GUS ⁺	this work
<i>A. tumefaciens</i> LA4404(GYCK63)	Rif ^r , Ka ^r , Cry ⁺ , GUS ⁺	this work

表 2 质粒和重组质粒
Table 2 Plasmids and recombinant plasmids

质 粒 Plasmids	遗传标记 Genetic marker	来 源 Sources
pHTA1	Ap ^r , Te ^r , Cry ⁺	M-M. Lecadet
pUC19	Ap ^r , lacZ ⁺	D. Lereclus
pBI121.2	Ka ^r , GUS ⁺	P.B.I.
pUCF33	Ap ^r , Cry ⁺	this work
pUCK63	Ap ^r , Cry ⁺	this work
pGY61	Ka ^r , Cry ⁺ , GUS ⁺	this work
pGYCK63	Ka ^r , Cry ⁺ , GUS ⁺	this work

1. 质粒DNA的分离、制备和纯化: 参照文献〔8〕的方法进行。

2. 农杆菌 LA4404 和大肠杆菌 HB101受体感受态细胞的制备和保存: 参照文献〔9〕。

3. 苏云金芽孢杆菌变种 *aizawai* 7-29 δ -内毒素基因的亚克隆及 δ -内毒素基因3'末端缺失重组质粒pUCK63的构建: 参照文献〔7〕。亚克隆过程见图2。

4. δ -内毒素全长和3'末端缺失基因

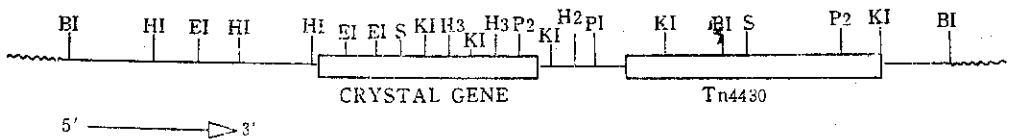


图 1 质粒pHTA1的限制酶酶切图谱

Fig. 1 Restriction map of pHTA1 plasmid DNA

BI = BamHI H1 = HpaI E1 = EcoRI S = SstI K1 = KpnI H3 = HindIII
P2 = PvuII P1 = PstI H2 = HincII

克隆到 pBI121.1 载体上的重组质粒 pGY61 和 pGYCK63 的构建: 参照文献〔10〕。

5. 重组质粒转化大肠杆菌受体细胞: 参照文献〔8〕。

6. 重组质粒转化农杆菌 LA4404 受体细胞: 参照文献〔9〕, 并有改进。将农

杆菌单菌落接种在 5ml YEB 培养基中, 30°C 过夜培养。再转接于 200ml 新鲜的 YEB 液体培养基中, 30°C 培养 5h, 4000 r/min 离心 5min 收集菌体, 将菌体悬浮在 100ml 的 Tris-HCl pH7.5 的缓冲液中, 然后再离心洗一次, 最后悬浮于 2ml YEB 中。分别取 0.1ml 感受态细胞, 分别加

0.5 μ g纯化的pGY61和pGYCK63重组质粒DNA,混匀后,液氮中2min,在37 $^{\circ}$ C水浴中30min,进行热冲击转化。然后加1ml的YEB,30 $^{\circ}$ C预表达1h,涂在含有50 μ g/ml卡那霉素、100 μ g/ml利福平的YEB固体平板上,30 $^{\circ}$ C过夜培养选择转化子。

7. 含有重组质粒转化子的生物杀虫定性试验:参照文献(11),并有改进。将200ml各菌体培养液,浓缩在3ml Tris-HCl pH8.0的缓冲液中,0 $^{\circ}$ C超声波破碎后,喂养幼虫。在拌有*E.coli* HB101F33 *E. coli* HB101GY61, *A. tumefaciens* LA4404GY61破碎细胞液的饲料中,各放30条2—3龄玉米螟幼虫。在拌有*E. coli* HB101(pUC19), *E. coli* HB101(pBI121.2)和*B.t.aizawai* 7-29破碎细胞液的饲料中,各放15条2—3龄玉米螟幼虫,作为阴性和阳性对照,在室温下喂养24—48h,观察杀虫效果。在涂有*E. coli* HB101F33, *E. coli* HB101CK63, *E. coli* HB101GY61 *E. coli* HB101GYCK63, *A.tumefaciens* LA4404GY61, *A. tumefaciens* LA4404GYCK63 和作为阴性对照的 *E. coli* HB101(pUC19), *E. coli* HB101(pBI121.2), *A. tumefaciens* LA4404 以及作为阳性对照的*B.t. aizawai* 7-29破碎细胞液的甘蓝菜叶上,各放15条2—4龄大菜粉蝶幼虫,在室温下喂养24—48h,观察杀虫效果。

结 果

(一) 苏云金芽孢杆菌变种*aizawai* 7-29 δ -内毒素基因的亚克隆

带有 δ -内毒素基因的pHTA1质粒(图1)DNA用HpaI和PstI双酶切,在1%琼脂糖凝胶上电泳分离纯化4.5kb带有全长

的 δ -内毒素基因片段。插入到pUC19质粒的HincII-PstI酶切位点后,转化大肠杆菌HB101受体菌,涂在含有100 μ g/ml氨基青霉素的LB固体培养基上,37 $^{\circ}$ C培养过夜,筛选出3000多抗性转化子。挑选100个转化子进行快速凝胶电泳分析,随机选10个重组质粒DNA(图版I-B5号),用HincII酶切,发现33号、36号、37号、41号、42号转化子的重组质粒,带有相同的全长 δ -内毒素基因的片段,将33号命名为pUCF33重组质粒(图版I-A2号),用于进一步研究。

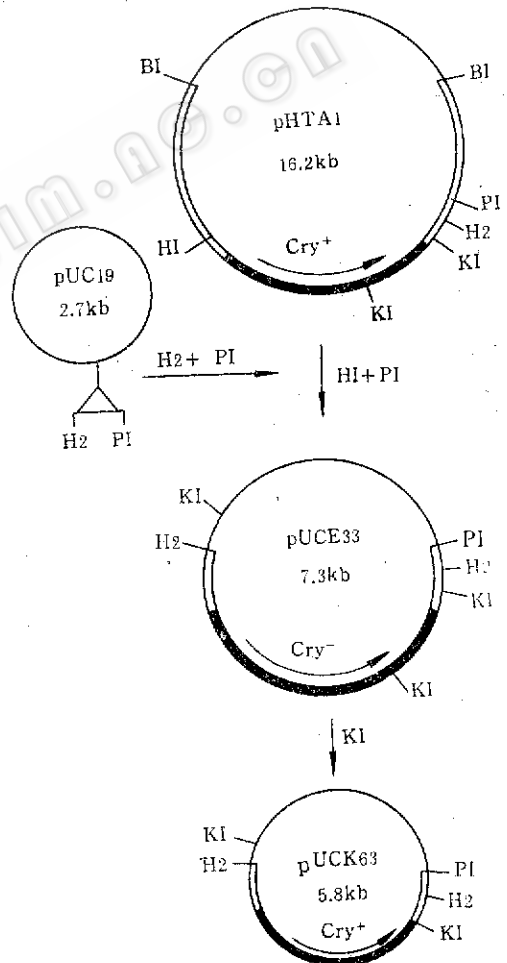


图 2 重组质粒的亚克隆过程图
Fig. 2 Subcloning map of recombinant plasmid

(二) δ -内毒素基因3'末端缺失重组质粒pUCK63的构建

用 Kpn I 酶切 pUCF33 重组质粒 DNA, 在琼脂糖凝胶上电泳, 出现三条带(图版 I -E, 5 号), 第一条DNA带为 δ -内毒素基因5'末端区段, 第二条 DNA 带为载体 pUC19 片段, 第三条DNA带为 δ -内毒素基因3'末端区段。分离纯化第一条和第二条 DNA带(图版 I -E, 4 号), 体外连接后转化至 *E. coli* HB101 受体中, 在含有50 μ g/ml氨苄青霉素LB 固体平板上, 筛选到约2000个转化子, 从中挑取 200 个转化子, 进行快速电泳分析, 有 5 个转化子含有3'末端缺失的重组质粒。经酶切分析定方位, 将所需要的63号正方向的重组

质粒命名为 pUCK63(图 2 及图版 I -E, 2 号)。

(三) pGY61和 pGYCK63 重组质粒的构建

用Hinc II 分别酶切pUCF33和pUCK 63重组质粒 DNA, 分离纯化带有全长和3'末端缺失的 δ -内毒素基因片段, 插入到植物表达载体pBI121.1 的 Sma I 位点上(图 3), 转化 *E. coli* HB101 受体细胞。在含有 50 μ g/ml 卡那霉素LB平板上, 筛选抗性转化子。电泳分析结果表明:(1) 600个转化子中, 有 6 个转化子含有全长的 δ -内毒素基因片段的重组质粒。反方向的有pGY14, pGY42和pGY62;正方向的有pGY37, pGY52 和 pGY61。在以后的

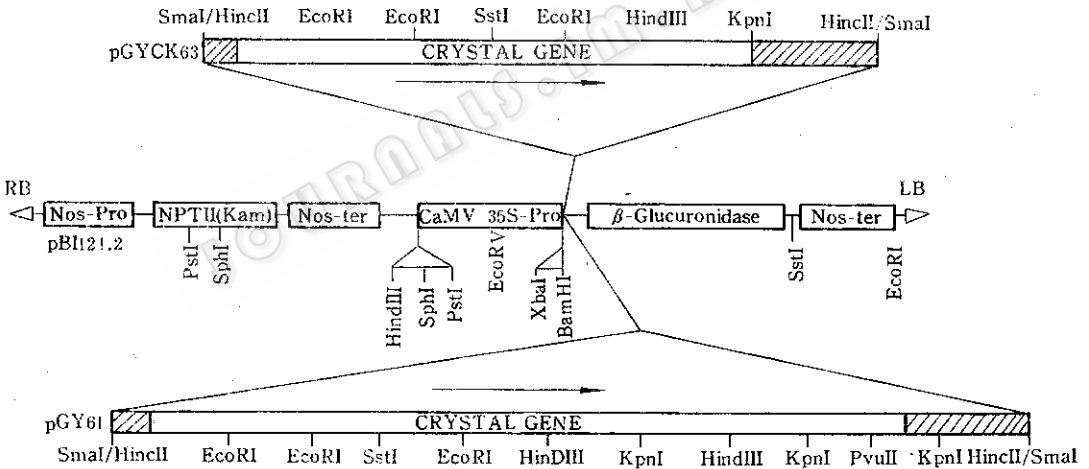


图 3 重组质粒的限制酶酶切图谱
Fig. 3 Restriction map of recombinant plasmid

工作中选用 pGY61 重组质粒(图 3), 转化农杆菌LA4404受体菌细胞。(2)从300个抗性转化子中,筛选到了3个带有 δ -内毒素基因3'末端缺失的重组质粒(pGYCK 63、pGYCK64及pGYCK65), 均为正方向。pGYCK63 重组质粒(图 3)用于进一步转化农杆菌LA4404受体细胞。

(四) 农杆菌 LA4404 受体细胞的转

化

用pGY61和pGYCK63重组质粒分别转化农杆菌 LA4404 受体细胞后, 转化子进行电泳分析, 结果表明: 转化子中含有重组质粒(图版 I -F)。

(五) 重组质粒的 DNA-DNA 分子杂交

用³²P标记的3'末端缺失的 δ -内毒素

基因片段为探针, 与pUCF33、pUCK63、pGY61、pGYCK63 重组质粒 DNA进行 DNA-DNA 分子杂交, 全为阳性 (图版 I-C、D)。

(六) 重组质粒转化子的生物杀虫定性试验

从 48h 杀虫结果可观察到重组子杀大菜粉蝶幼虫的效果可达94—100%, 杀玉米



图 4 pGYCK63重组质粒转化子的生物学杀虫试验

Fig. 4 Insecticidal-bioassay of transformant containing pGYCK63 recombinant plasmid DNA

A. 含有重组质粒pGYCK63的农杆菌LA4404对大菜粉蝶幼虫的毒杀效果
Insect bioassay of *Pieris rapae* larvae on cabbage leaves with *A. tumefaciens* LA4404 containing pGYCK63 recombinant plasmid DNA

B. 含有对照载体pBI121.2质粒的农杆菌LA4404对大菜粉蝶幼虫无毒性
Insect bioassay of *Pieris rapae* larvae on cabbage leaves with *A. tumefaciens* LA4404 containing pBI121.2 plasmid DNA for vector control

表 3 含有重组质粒转化子生物杀虫试验

Table 3 Insect bioassay of transformants containing recombinant plasmid

转化子 Transformants	虫 Insects	大菜粉蝶(%) <i>Pieris rapae</i>			玉米螟(%), <i>Ostrinia nubilalis</i>		
		24h	36h	48h	24h	36h	48h
<i>E. coli</i> HB101F33		66.7	100	—	40	55	75
<i>E. coli</i> HB101CK63		60	86	94	—	—	—
<i>E. coli</i> HB101GY61		66.6	94	100	40	50	70
<i>E. coli</i> HB101GYCK63		53	86	94	—	—	—
<i>A. tumefaciens</i> LA4404GY61		75	86	100	45	66	65
<i>A. tumefaciens</i> LA4404GYCK63		66.7	90	94	—	—	—
对照 Control							
<i>E. coli</i> HB101(pUC19)		0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> HB101(pBI121.2)		0	0	0	0	0	0
<i>A. tumefaciens</i> LA4404		0	0	6	0	0	0
<i>B.t. aizawai</i> 7.29		100	—	—	80	85	85

表中数字为死亡率 Number indicated death rate in Table

螟幼虫的效果为65—75%，结果见表3、图4。

讨 论

法国巴斯德研究所 M-M. Lecadet 等^[11]和英国 Haider, M.Z. 等^[12]分别报道了 *B.t. aizawai* 7-29 变种和 *B.t. aizawai* 变种的杀虫情况, 本工作将 *B.t. aizawai* 7-29 的 δ -内毒素基因构建到植物表达载体上, 为获得抗虫基因植物提供了有效的基因来源。

为研究全长及3'末端缺失的 δ -内毒素基因导入植物中的表达情况, 在构建中我们选用了 pBI121.2 植物表达载体, 因为它具有以下特点: 带有两个 25bp 的重复序列、可帮助进入植物细胞后的外源基因插入到植物基因组中; 带有 NPT II 基因, 直接筛选被转化细胞; 带有在植物细胞中启动外源基因的 CaMV35S 启动子; 带有检测外源基因在植物细胞中表达的, 敏感度极高的 GUS 报告基因; 带有 Nos 终止

子。所以在我们构建的重组质粒中, δ -内毒素基因与 GUS 基因融合, 一旦导入植物细胞, 在大量被转化的抗性细胞形成愈伤组织或成植株之前, 检测 GUS 基因的瞬时表达, 可缩小获得实验中所需要的真正能表达外源基因植株的范围, 减少后期植物组织培养的大量工作。在水稻原生质体转化中, 已证明了这一点^[13]。

本文首次报道了土壤农杆菌表达 *B.t. aizawai* 7-29 δ -内毒素基因的研究工作。 δ -内毒素基因构建在 pBI121.2 质粒上, 在农杆菌 LA 4404 中能够表达, 从转录水平上考虑, 有三种可能性: (1) 革兰氏阴性菌的 RNA 聚合酶, 能够识别 CaMV35S 启动子, 具有启动功能; (2) 由于 CaMV35S 启动子下游还有 LacZ 启动子, δ -内毒素基因可利用 LacZ 启动子, 在农杆菌中得到表达; (3) 因我们克隆的 δ -内毒素基因片段中, 还带有它本身基因的启动子, 所以可能利用了 Bt 的启动子, 使之在农杆菌中表达。到底是哪个启动子在起作用, 还有待进一步的探索。

参 考 文 献

- [1] 范云六等: 杀虫微生物, 第一卷, 北京农业大学出版社, 1987.
- [2] 田颖川等: 生物工程学报, 5(1): 11—18, 1989.
- [3] Oeda, K. et al.: *Gene*, 53: 113—119, 1987.
- [4] Schnepf, H.E. et al.: *J. Biol.*, 260: 6264—6272, 1985.
- [5] Thorne, L. et al.: *J. Bacteriol.*, 166: 801—811, 1986.
- [6] Fischhoff, D.A. et al.: *Biotechnology*, 5: 807—813, 1987.
- [7] Mark, V. et al.: *Nature*, 328: 33—37, 1987.
- [8] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 249—256, 1982.
- [9] Lichtenstein, C.P. et al.: *DNA Cloning*, 2: 83—85, 1985.
- [10] Jefferson, R.A. et al.: *EMBO J.*, 6(13): 3901—3907, 1987.
- [11] Lecadet, M-M. et al.: *Invertebrate pathology*, 49: 37—48, 1987.
- [12] Haider, M.Z. et al.: *Gene*, 52: 285—290, 1987.
- [13] Hong, Y. et al.: *Rice Genetics Newsletter*, Japan p. 141, 1988.

Subcloning and Expression of δ -endotoxin Gene and Its 3' End Deletion of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens*

Guo Sandui Chen Xuejuen Yang Hong Fan Yunlue

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

The δ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* 7-29 and the δ -endotoxin gene with 3' end deletion were subcloned into pUC19 plasmid, resulting recombinant plasmids pUCF33 and pUCK63, respectively. After amplification of recombinant plasmids, pGY61 and pGYCK63 were constructed by the insertion of δ -endotoxin gene and its end deletion into plant vector pBI121.2. The DNA of recombinant plasmids pGY61 and pGYCK63 were hybridized positively with α - 32 P-labelled Kpn I DNA fragment of 3' end deletion of δ -endotoxin gene. The full length δ -endotoxin gene and δ -endotoxin gene with 3' end deletion were expressed in both *E. coli* HB101 and *A. tumefaciens* LA4404. The cell extracts from transformants of *E. coli* HB101 and *A. tumefaciens* LA4404 are lethal to *Pieris rapae* larvae and *Ostrinia nubilalis* larvae.

Key words

δ -endotoxin; subcloning; recombinant; deletion; *Bacillus thuringiensis*

图 版 说 明

Explanation of Plate I

A. pUCF33的Hinc I 酶切电泳图

Agarose gel electrophoresis of Hind III digested pUCF33 recombinant plasmid DNA
lane 1: λ DNA + Hind III + EcoR I, lane 2: pUCF33 + Hinc I.

B. 质粒DNA的琼脂糖凝胶电泳图

Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA lane 1-4, b: pUC19 plasmid, lane 5:
pUCF33 plasmid DNA

C. 重组质粒琼脂糖凝胶电泳图

Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid lane 1: λ DNA + Hind III, lane 2:pUCF33
plasmid, lane 3: pGY61 plasmid, lane 4: pUCK63 plasmid, lane 5: pGYCK63
plasmid

D. 以pUCF33中 δ -内毒素基因的Kpn I 片段为探针, 与各质粒杂交后的放射自显影图谱

Autoradiogram of corresponding blots, hybridized with α -³²P-labelled Kpn I DNA,
fragment of δ -endotoxin gene of pUCF33 plasmid

lane 1: λ DNA + Hind III, lane 2: pUCF33 plasmid, lane 3. pGY61 plasmid, lane 4:
pUCK63 plasmid, lane 5: pGYCK63 plasmid

E. 重组质粒酶切后凝胶电泳图

Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids DNA were digested by restri-
ction enzyme

lane 1: λ DNA + Hind III + EcoR I, lane 2: pUCK63 + Hinc I, lane 3: pUCF33 +
Hinc I, lane 4: pUCK63 + Kpn I, lane 5: pUCF33 + Kpn I

F. 含有重组质粒转化子的琼脂糖凝胶电泳图

Agarose gel electrophoresis of transformant containing recombinant plasmid DNA
lane 1: *E. coli* HB101(pGYCK63 plasmid), lane 2: *E. coli* HB101(pGY61 plasmid),
lane 3: *A. tumefaciens* LA4404(pGYCK63 plasmid), lane 4: *A. tumefaciens* LA4404
(pGY61 plasmid), lane 5: *A. tumefaciens* LA4404

郭三堆等：苏云金杆菌 δ -内毒素基因及3'末端缺失基因在大肠杆菌和农杆菌 图版 I
菌中的亚克隆和表达

Guo Sandui et al.: Subcloning and expression of δ -endotoxin Plate I
gene and its 3' end deletion of *Bacillus thuringiensis* in
Escherichia coli and *Agrobacterium tumefaciens*

