电脉冲法转化苏云金芽孢杆菌 BMB171 的研究

李 林 邵宗泽 喻子牛

(华中农业大学微生物科学技术系 武汉 430070)

摘要：研究了用电脉冲法转化苏云金芽孢杆菌受体菌 BMB171 的优化条件以及由转化导入的几类 *cry* 基因在 BMB171 中的表达效果。结果表明，采用 SG 溶液作电脉冲缓冲液，用 10.0kV/cm的脉冲场强和 1 次电脉冲(4.6ms)以及采用对数前期(OD_{650nm}为 0.2～0.3)收获的受体菌，可以达到最高转化频率，其中用 pHT3101 电转化 BMB171 的最高频率达 8×10^7转化子/μg DNA。转化频率随质粒 pHT3101 浓度的增加，在 54.69pg/mL至 3.50μg/mL范围内呈线性增加，随后达到饱和。转入的几种外源质粒在 BMB171 中可分别表达其携带的 *cry*1Ac10、*cry*1Ab、*cry*1Ca 和 *cry*3Aa 基因，产生特征性的杀虫晶体蛋白，并形成典型的伴孢晶体。

关键词：苏云金芽孢杆菌，电脉冲转化法，表达

中图分类号：Q93-33 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2654(2000)05-0331-04

TRANSFORMATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* RECIPIENT BMB171 BY ELECTROPORATION

LI Lin SHAO Zong-Ze YU Zi-Niu

(*Department of Microbial Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070)

Abstract: This paper reports the optimized electro-transformation parameters of *Bacillus thuringiensis* plasmid-free mutant strain BMB171 by electroporation, and expressing effect of several *cry* genes introduced in this recipient. It showed that a highest electro-transformation frequency could be obtained, when SG solution was used as the buffer, and a 10.0kV/cm of field strength, one time of pulse as well as a growth phase of recipient cells at the exponential phase (OD_{650nm} value was 0.2～0.3) were selected. The highest of electro-transformation frequency with pHT3101 could reach at 8×10^7 transformants/μg DNA. The transformation frequencies increased at linear velocity as the concentration increase of pHT3101 from 54.69pg/ml to 3.50μg/mL, then reached saturation afterwards. All plasmids introduced in BMB171 could produce characteristic insecticidal crystal proteins through expression of relevent *cry* genes carried by them. Meanwhile, these insecticidal crystal proteins could form parasporal crystals, which have characteristic geometric shapes.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Electroporation, Expression

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是一种具有杀虫活性的土壤细菌，由该菌研制的杀虫剂已发展成为最主要的微生物杀虫剂之一[1]。近年来，国内外通过改造或修饰该菌的杀虫晶体蛋白基因(即 *cry* 基因)并导入不同受体菌中表达，已研制成功多种具有优良性能

收稿日期：1999-04-02收稿，修回日期：1999-07-05

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

的杀虫工程菌制剂,显示出良好的应用前景[2]。作为 *cry* 基因的天然宿主,不同亚种的苏云金芽孢杆菌野生菌株或突变株往往是被选择作为构建杀虫工程菌受体菌的主要对象。苏云金芽孢杆菌菌株 BMB171 是本室经连续高温培养并结合质粒消除剂处理而筛选到的一株无质粒突变株,本文报道该突变株作为电脉冲转化受体菌的优化电脉冲转化条件以及转入的几种外源 *cry* 基因在该受体菌中的表达效果。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

苏云金芽孢杆菌菌株 BMB171 为无内生质粒的突变株。供体质粒 pHT3101 为大肠杆菌-苏云金芽孢杆菌穿梭质粒,6.7kb,见文献 [3];供体质粒 pBMB121、pBMB304-1Ab、pBMB671 和 pBMB3305 是在质粒载体 pHT3101(或其衍生质粒 pHT304,见文献 [4])上分别连接 *cry*1Ac10、*cry*1Ab、*cry*1Ca 和 *cry*3Aa 基因,其大小分别为 10.5kb、10.9kb、15.0kb 和 12.6kb,均由本室构建。以上质粒在苏云金芽孢杆菌中均具有 Erm^r(Erm:红霉素)。

1.2 培养基

LB 培养基[5]用于菌体培养:含红霉素(25μg/mL)的 LB 培养基用于筛选转化子。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒 DNA 的提取和定量:参照文献 [5] 进行。

1.3.2 外源质粒 DNA 向受体菌 BMB171 的电脉冲转化:将受体菌 BMB171 在 LB 琼脂平板上划线,于 30℃ 培养过夜。挑单菌落接种于 50mL LB 培养液,于 30℃、210r/min 振荡培养至一定的菌龄时,离心收集菌体,并用 SG 缓冲液(272mmol/L蔗糖,15%(v/v)甘油)洗涤 4 次,再用适量 SG缓冲液悬浮菌体,使其菌液浓度约为 1×10^{10}个 / mL。取 200mL 菌悬液于一个 0.2cm 的电击杯(Bio-Rad产品)中,加入一定浓度的供体质粒 DNA,混匀后在冰浴上放置 10min,用 Genepulser™型电脉冲仪(Bio-Rad产品)进行电脉冲。电脉冲场强、脉冲次数见结果部分。其余电脉冲参数为:(C = 25μF, R = 200Ω。脉冲完毕后加入 1.0mL LB 培养液,在 30℃、180r/min 振荡培养 2h 后,将菌悬液涂布含有红霉素(25μg / mL)的 LB 平板、置 30℃ 培养,计数转化子菌落数。

1.3.3 电镜观察:将孢晶混合物滴在碎盖玻片上,离子溅射,40kV 下用 JEOL-JEM1200EX型扫描电镜观察和拍照。

2 结果与分析

2.1 苏云金芽孢杆菌受体菌 BMB171 优化电脉冲转化条件研究

2.1.1 电脉冲转化缓冲液的选定:选择 SMP 缓冲液(400mmol / L蔗糖,1mmol / L $MgCl_2$, 7mmol / L磷酸盐缓冲液,pH6.0)、SH 缓冲液(0.5mol/L蔗糖,1mmol/L HEPES[4])、GH 缓冲液(10%(v/v)甘油,1mmol/L HEPES)、SG缓冲液、40%(w/v)的 PEG6000 和 10%(v/v)的甘油共 6 种溶液用作电脉冲转化的缓冲液,用 pHT3101 作供体质粒,以 12.5kV / cm的脉冲场强和电脉冲 1 次,对电脉冲转化受体菌 BMB171 的频率进行了测定,结果 SH 缓冲液的转化频率为 4.6×10^6转化子/μg DNA;SG缓冲液次之,为 3.8×10^6转化子/μg DNA;其余缓冲液的转化频率均低于 1×10^4转化子/μg DNA。由于用 SH 缓冲液的重现性稍差,本文选定 SG 溶液作为电脉冲转化的缓冲液。

2.1.2 不同脉冲场强对电转化频率的影响:选择 5.0、6.25、7.5、8.75、10.0、11.25 和 12.5kV/cm共 7 种脉冲场强,用穿梭质粒 pHT3101 和携带 *cry*1Ac10 基因的 pBMB121 作为供体质粒,对苏云金芽孢杆菌受体菌 BMB171 进行的电脉冲转化结果见图 1。从图 1 可见,随着脉冲场强的增大,供体质粒 pHT3101 和 pBMB121 电转化 BMB171 的频率也随之增加, 但到 8.75 kV/cm 的场强后, 这种增加的趋势明显减缓, 到脉冲场强达到 10.0kV / cm 时转化频率达到最高值。继续增加场强, 转化频率并不增加, 或略有下降。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

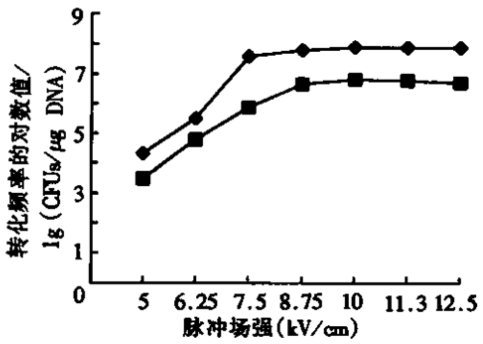

图1　不同脉冲场强对电转化频率的影响

■ pHT3101, ▣ pBMB121

2.1.3　不同脉冲次数对转化频率的影响：用pHT3101作供体质粒和10.0kV/cm的脉冲场强，对受体菌BMB171分别作1～5次电脉冲转化的结果表明，优化的脉冲次数为1次，此时脉冲时间约为4.4～4.8ms。增加脉冲次数后，转化频率逐渐下降。

2.1.4　受体菌BMB171菌龄对转化频率的影响：用pHT3101作供体质粒，以10.0kV/cm的脉冲场强和电脉冲1次，对生长至不同菌龄的受体菌BMB171的转化结果见图2。由图2可知，受体菌BMB171在对数生长前期(OD_{650nm}约为0.2～0.3)时的转化频率最高，随着菌龄的增加，转化频率逐渐下降。

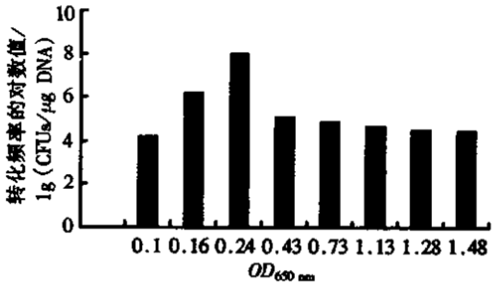

图2　受体菌BMB171的菌龄对电转化频率的影响

2.1.5　供体质粒DNA浓度对电转化频率的影响：用不同浓度的pHT3101对电转化BMB171频率的测定结果表明，在54.69pg/mL至3.50μg/mL的供体质粒浓度范围内，随着pHT3101浓度的增加，转化频率呈线性增加；但当pHT3101的浓度大于3.50μg/mL后，转化频率不再随供体质粒浓度的增加而增加。

根据上述实验结果，受体菌BMB171的优化电脉冲转化条件可选定为：脉冲场强为

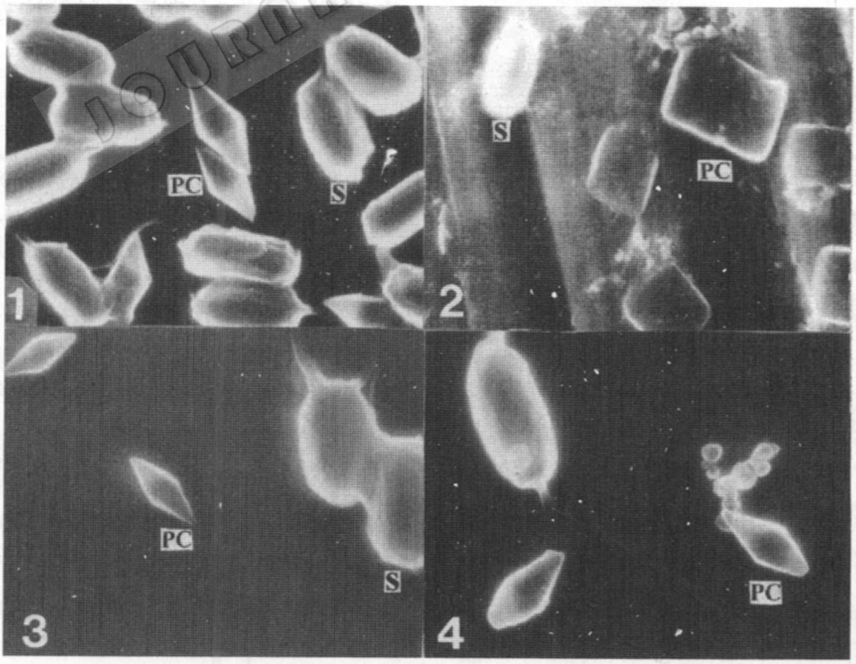

图3　扫描电镜观察的BMB171中杀虫晶体蛋白形成的伴孢晶体的形态(×8300倍)

1 Cry1Ac10晶体，2 Cry3Aa晶体，3 Cry1Ab晶体，4 Cry1Ca晶体

PC伴孢晶体，S芽孢

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

10.0kV/cm,脉冲次数为 1 次,BMB171 菌龄为生长到 OD_{650nm}的值约为 0.2～0.3。

2.2 外源杀虫晶体蛋白基因 *cry*1Ac10、*cry*1Ab、*cry*1Ca 和 *cry*3Aa 基因在受体菌 BMB171 中的表达效果

按以上选定的电脉冲条件,将分别携带 *cry*1Ac10、*cry*1Ab、*cry*1Ca 和 *cry*3Aa 基因的外源质粒 pBMB121、pBMB304-1Ab、pBMB671 和 pBMB3305 分别导入受体菌 BMB171 中,得到各自的转化子。转化子产生的杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE电泳结果(图片未显示)表明,pBMB 121、pBMB304-1Ab、pBMB671 可在 BMB171 中表达相应的 *cry* 基因,分别产生分子量为 130～140kD 的 Cry1Ac10、Cry1Ab 和 Cry1Ca 蛋白;而 pBMB3305 在 BMB171 中表达其携带的 *cry*3Aa 基因产生分子量为 65～75kD 的 Cry3Aa 蛋白。这些杀虫晶体蛋白可包装形成伴孢晶体。图 3 显示 Cry1Ac10、Cry1Ab 和 Cry1Ca 蛋白均可在 BMB 171 中形成典型的菱形伴孢晶体,而 Cry3Aa 蛋白则在 BMB171 中形成典型的扁平偏菱形伴孢晶体。

3 讨论

一般认为,影响电脉冲转化频率主要有 3 种因素:受体菌的特性与生长状态、电脉冲场强和脉冲时间。Masson 等用电脉冲法转化苏云金芽孢杆菌野生菌株时,发现当脉冲场强达到 8.75～10.0kV/cm 时,转化频率达到最高值,继续升高脉冲场强则会导致转化频率的下降,推测是由于在高场强下细胞死亡率增加所致[6]。在本文实验中,当脉冲场强达到 10.0kV/cm时,也达到最高转化频率,但继续升高脉冲场强至 12.5kV/cm时,虽然转化频率不再增加,但也没有观察到明显的致死效应。不过,鉴于在增加脉冲场强的情况下,可能会对受体菌的生理生化特性带来负面影响,故本文选定 10.0kV/cm作为电脉冲转化受体菌 BMB171 的脉冲场强。

通过将具有不同杀虫谱的 *cry* 基因导入合适的受体菌中进行表达来构建具有杀多种目标害虫的工程菌,已成为苏云金芽孢杆菌杀虫剂发展的一个方向。本文结果表明,采用电脉冲法分别将几类具有不同杀虫活性谱的 *cry* 基因导入受体菌 BMB171 后,这几类 *cry* 基因均可良好表达形成典型的伴孢晶体,显示出经完全消除内生质粒的突变株 BMB171 具有作为构建杀虫工程菌受体菌的潜能。但是,鉴于大多数苏云金芽孢杆菌野生菌株都携带有 1 种以上的 *cry* 基因,且这些 *cry* 基因表达的杀虫晶体蛋白往往具有协同毒性作用[1],因此,向受体菌 BMB171 同时导入 2 种及其以上的 *cry* 基因并研究其表达性能是必要的。这可以通过将不同 *cry* 基因分别连接于具不同复制子类型的质粒载体上,然后同时导入 BMB171 中进行表达,或将这些含有各自启动子的 *cry* 基因连接于同一质粒载体上,再导入 BMB171 进行表达来实现。目前,本室正在进行这方面的研究工作。

参 考 文 献

[1] 喻子牛主编. 苏云金杆菌. 北京:科学出版社,1990.
[2] 李 扬,任改新. 微生物学通报,1996,**23**(1):37～43.
[3] Lereclus D, Arantes O, Chaufux J, *et al*. FEMS Microbiol Lett, 1989, **60**:211～218.
[4] Arantes O, Lereclus D. Gene, 1991, **108**:115～119.
[5] J萨姆布鲁克,E F弗里奇,T曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南. 第二版. 金冬雁,黎孟枫等译. 北京:科学出版社,1992
[6] Masson L, Prefontaine G, Brousseau R. FEMS Microbiol Lett, 1989, **60**:273～278.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn