

球形芽孢杆菌 Mtx1 杀蚊毒素在苏云金芽孢杆菌以色列亚种中的表达*

张蓓华 刘海洲 刘 铭 闫建平 袁志明**

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要: 将来源于球形芽孢杆菌 SSII-1 的 *mtx1* 毒素基因克隆至穿梭载体 pBU4 上, 得到 *mtx1* 插入方向相反的重组质粒 pMT9 和 pMT4。含有 pMT9 和 pMT4 的大肠杆菌转化子能表达产生 Mtx1 毒素, 发酵液对敏感和抗性致倦库蚊幼虫具有中度毒杀作用; 含有 pMT9 和 pMT4 的苏云金芽孢杆菌转化子 B-pMT9 和 B-pMT4 在营养体生长阶段对敏感蚊幼和抗性幼虫也具有毒性, 毒力与野生型 SSII-1 相当, 而不同转化子在芽孢形成期的毒力因插入的 *mtx1* 基因转录方向不同而表现出差异, 其中 B-pMT4 对目标蚊幼毒力极低 ($LC_{50} > 100\text{mg/mL}$), 而 B-pMT9 对蚊幼虫具有毒性 ($LC_{50} = 2.49\text{mg/mL}$)。

关键词: 球形芽孢杆菌 SSII-1, Mtx1 毒素, 苏云金芽孢杆菌以色列亚种, 杀蚊毒素

中图分类号: Q939.124 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0049-05

EXPRESSION OF MOSQUITOCIDAL MTX1 TOXIN GENE FROM *BACILLUS SPHAERICUS* IN CRYSTAL-MINUS *B. THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENSIS*

ZHANG Bei-Hua LIU Hai-Zhou LIU Ming YAN Jian-Ping YUAN Zhi-Ming

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

Abstract: The *mtx1* gene originated from *Bacillus sphaericus* SSII-1 was cloned to shuttle vector pBU4. Two recombinant plasmids pMT9 and B-pMT4 were obtained, with the inserted fragments in the opposite orientations. The two *E. coli* transformants have the same toxicity against both the resistant and susceptible *Culex. quinquefasciatus* larvae. Two *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* recombinants, which contain recombinants plasmid pMT4 and pMT9 respectively, were constructed by electroporation. The bioassay results showed that the recombinants B-pMT9 and B-pMT4 have toxicity to resistant and susceptible mosquito larvae during vegetative growth stage, having the LC_{50} values similar to that of SSII-1. However, the toxic levels of the final sporulated cultures of recombinants B-pMT4 and B-pMT9 differ, with a LC_{50} value of 2.49mg/ml. for B-pMT9 and no toxicity for B-pMT4.

Key words: *Bacillus sphaericus* SSII-1, Mtx1 toxin, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, Mosquitocidal toxin

球形芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus*, 简称 *B.s*) 对目标蚊幼虫的毒杀作用主要是由其在生长过程中所产生的两类杀蚊毒素蛋白所决定。一种是高毒力菌株在芽孢形成期合成的二元毒素, 该毒素对多蚊幼虫具有很高的毒力, 对库蚊 (*Culex*) 毒力高、对按蚊 (*Anopheles*) 毒力低, 对伊蚊 (*Aedes*) 低毒或无毒。有关二元毒素蛋白的杀蚊活性、作用方式、毒素基因的克隆、序列分析及其在不同菌株中的表达已进行了深入研究^[1,2]。另一类是低毒力菌株和部分高毒力菌株在营养体时期合成的杀蚊毒素 (包括 Mtx1, Mtx2 和 Mtx3)。由于该类毒素在 *B.s* 菌株中的表达量低, 而且易受蛋白酶和其它理化因素作用而失去杀蚊活性, 因此在 *B.s* 的生长过程中难以积累, 发酵液对目标蚊虫的

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39770170)

Project Granted by Chinese National Natural Sciences Fund (No.39770170)

中国科学院生物技术特别支持项目 (No. STZ-00-27)

** 联系人

收稿日期: 2002-01-25, 修回日期: 2002-04-10

毒力低^[3,4]。Mtx1 毒素是一种 100kD 的可溶性毒素, 由 870 氨基酸组成。其 N-末端有一个具有 G⁺ 细菌信号肽特征的序列, 与 ADP-核糖基转移酶催化亚基同源。C-末端有 3 个约 90 个氨基酸的重复序列^[3]。Mtax 毒素蛋白基因在自身带有的营养体启动子的作用下能在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达, 重组大肠杆菌的毒力与野生型 SSII-1 菌株的毒力相当。而将 Mtx1 毒素基因转入 *B.s* 蛋白酶缺陷型中实验表明, Mtx1 蛋白可在营养体时期表达, 其纯化的 Mtx 毒素同晶体毒素的杀蚊活性相当 (LC₅₀ 值 15ng/mL)^[4]。

由于 Mtx1 毒素合成起始于营养体生长阶段, 不能形成晶体, 易被细菌生长过程中产生的蛋白酶降解, 在芽孢期中含量极低, 因此, 高毒力 *B.s* 对蚊幼虫的毒力主要是由二元毒素决定的。但由于二元毒素是一种单位点作用毒素, 因此长期使用也可以导致蚊幼虫产生抗性, 严重影响了 *B.s* 作为生物杀蚊剂在蚊虫综合防治中的应用^[5,6]。本文将来源于 *B.s* SSII-1 菌株中的 *mtx1* 基因克隆至穿梭载体 pBU4, 并转化到苏云金芽孢杆菌以色列亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 *B.t.i*) 无晶体型菌株中, 考察了 Mtx1 毒素的营养体期和芽孢期的表达, 为研究 Mtx1 毒素的遗传改良提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

质粒和菌株	特 性	来 源
质粒		
pXP33 ^[3]	含 <i>mtx1</i> 毒素蛋白基因	英国 Conlin Berry 教授惠赠
pBU4	<i>Amp^r</i> <i>Tet^r</i>	Dr. Deleculse A ^[7]
菌株		
<i>E. coli</i> TG-1	<i>thi⁻</i> , <i>strA⁻</i> , <i>supE⁻</i> , <i>endA⁻</i> , <i>sbcB⁻</i> , <i>his⁻</i> , <i>dR⁻</i> (<i>LacproAB</i>), <i>F⁺</i> [<i>traD36</i> , <i>proAB⁺</i> , <i>LacI^q</i> , <i>lacZ</i> , Δ M15]	本室保藏
<i>B.t.i</i> 4Q-7	无晶体突变型 (<i>cry⁻</i>)	法国巴斯德研究所惠赠
<i>B.s</i> SSII-1	野生型 (Wild type)	法国巴斯德研究所惠赠
B-pBU4	含 pBU4 质粒的 <i>B.t.i</i> 4Q-7	本室构建 ^[2]

1.1.2 培养基: LB 液体培养基参照 Maniatis 等^[8]。用于 *B.t.i* 重组菌株培养的 G-TRis 培养基: CaCl₂ · H₂O, 0.08g; (NH₄)₂SO₄, 2.0g; 葡萄糖 2.0g; 1mol/L Tris-HCl, pH7.5, 50mL; K₂HPO₄, 0.5g; G-Tris 溶液 10

mL (含 FeSO₄ · H₂O 0.0025g, CuSO₄ 0.005g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.005g, MnSO₄ · H₂O 0.05g, MgSO₄ 0.2g); 酵母粉 1.5g; pH7.4, 定容至 1L。用于 *B.s* 培养的 MBS 培养基参照 Kalfon 等^[9]。根据实验要求在不同的培养基中加入 100μg/mL 氨苄青霉素或 12.5μg/mL 四环素。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作: 大肠杆菌和 *B.t.i* 重组子质粒 DNA 提取、质粒 DNA 的酶切分析、去磷酸化处理、DNA 连接参照 Maniatis 等^[8], 目的 DNA 片段回收和纯化参照 Qiagen 凝胶回收试剂盒说明书进行。

1.2.2 重组质粒的构建及其转化: 质粒 pXP33 经 *Pst*I 酶切后, 回收纯化 3.8kb 的 DNA 片段, 同经 *Pst*I 单酶切和去磷酸化 pBU4 载体按 4:1 ~ 6:1 的摩尔比例混匀, 45℃ 温育 5min, 立即冰浴 1 ~ 2min, 加入 1/10 体积的反应缓冲液和适量的 T₄ DNA 连接酶, 16℃ 连接过夜, 次日按常规方法转化大肠杆菌, 37℃ 下培养 12 ~ 14h 后, 挑取白斑菌落进行重组质粒分析。

1.2.3 苏云金芽孢杆菌的电转化: 参照文献 [2] 进行。

1.2.4 生物测定: *B.t.i* 重组子营养体发酵液和芽孢/晶体混合物发酵液及大肠杆菌发酵液对蚊幼虫毒力的生物测定方法参照 WHO^[10]。生物测定昆虫为 3~4 龄的敏感和抗性致倦库蚊 (*C. quinquefasciatus*) 幼虫, 敏感蚊虫来源于湖北省医学科学院长期饲养的敏感品系, 抗性蚊虫是在实验室条件下筛选的对 C3-41 菌株产生抗性的抗性蚊虫品系 (RSCq1)。记录 48h 死亡的蚊幼虫数, 利用 Log-Probit (Franchon, Institut Pasteur) 计算不同发酵液的 LC_{50} 、 LC_{90} 、相关系数和及标准误 (SE)。 LC_{50} 和 LC_{90} 以 mg 发酵液/mL 表示。

2 结果与分析

2.1 *mtx1* 基因的克隆

质粒 pXP33 经 *Pst*I 酶切产生 2.7kb 的载体片段和 3.8kb 的含 *mtx1* 基因的的目的片段。将分离、纯化的 3.8kb 的目的片段连接到经 *Pst*I 酶切并去磷酸化的穿梭载体 pBU4 上。

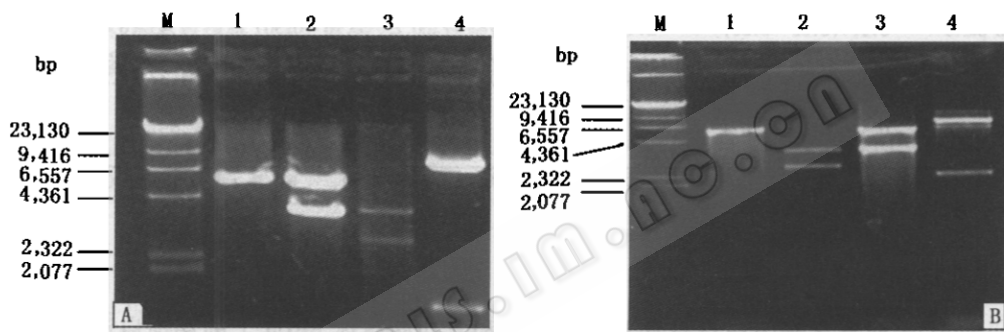


图 1 重组质粒 pMT4 和 pMT9 的酶切鉴定图谱

A: M Marker, 1. pBU4/*Pst*I, 2. pMT4/*Pst*I, 3. pXP33/*Pst*I, 4. pMT4/*Hind*III

B: M Marker, 1. pBU4/*Pst*I, 2. pXP33/*Pst*I, 3. pMT9/*Pst*I, 4. pMT9/*Hind*III

转化大肠杆菌 TG-1, 涂布到含 Amp 和 Tet 的 LB 平板, 37℃ 培养 12~16h。通过蓝白斑筛选, 挑出白色的转化子进行质粒的酶切鉴定。其中重组质粒 pMT9 经 *Pst*I 和 *Hind*III 酶切分别得到 5.6kb 和 3.8kb 及 7.2kb 和 2.7kb 的片段, 证明该重组质粒中的 *mtx1* 的转录方向与 pBU4 载体上的 *LacZ* 的方向一致; 重组质粒 pMT4 经 *Pst*I 和 *Hind*III 酶切分别得到 5.6kb 和 3.8kb 及 8.3kb 和 1.1kb 两个片段, 证明 pMT4 上的 *mtx1* 的转录方向与 pBU4 载体上的 *LacZ* 的方向相反 (图 1 和 2)。

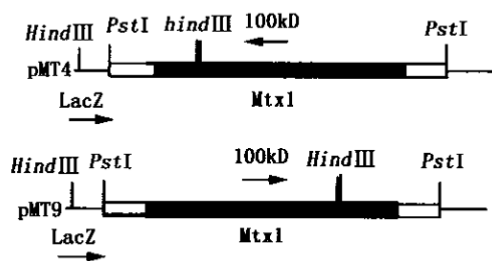


图 2 重组质粒 pMT9 和 pMT4 的酶切图谱

2.2 毒素在 *B.t.i* 中的克隆和表达

将质粒 pMT9 和 pMT4 通过电转移的方法转化 *B.t.i* 4Q-7 菌株后, 涂布在含四环素的抗性平板上, 24h 后挑出转化子。经重组 *B.t.i* 菌株的质粒酶切分析证明重组菌株 B-pMT9 和 B-pMT4 分别含有重组质粒 pMT9 和 pMT4。重组质粒的转化率为 $10^1 \sim 10^3$ 转化子/ μ g DNA。

2.3 杀蚊活性分析

从表 2 可看出, 含有 *Mtx1* 毒素基因的两种大肠杆菌转化子对敏感和抗性致倦库蚊

幼虫的毒力同野生型菌株 SSII-1 相当, 对敏感蚊幼虫其 48h 的 LC_{50} 值为 $0.39 \sim 0.57 \text{ mg/mL}$, 对抗性蚊幼虫 48h 的 LC_{50} 为 $0.19 \sim 0.67 \text{ mg/mL}$ 。含有 *Mtx1* 毒素 *B.t.i* 重组子在营养体生长阶段对两种蚊幼虫都具有相同的毒力, 其毒力水平同大肠杆菌重组子相当。但在芽孢形成期, 其毒力明显下降, 其中含反向插入 *mtx1* 重组质粒 pMT4 的 *B.t.i* 转化子 B-pMT4 的毒力同对照转化菌株 B-pBU4 一样, 对敏感和抗性蚊幼虫几乎无毒。而含顺向插入 *mtx1* 重组质粒 pMT9 的 *B.t.i* 转化子 B-pMT9 对蚊幼虫的毒力比野生型 SSII-1 菌株略低。

表 2 野生型球形芽孢杆菌及不同克隆子对敏感和抗性蚊幼虫的毒性*

菌株	对致倦库蚊的毒力 (mg/mL)			
	敏感品系		抗性品系	
	营养体期 ^a LC_{50} at 95% confidence limits	芽孢期 ^b LC_{50} at 95% confidence limits	营养体期 ^a LC_{50} at 95% confidence limits	芽孢期 ^b LC_{50} at 95% confidence limits
B-pBU4	> 10	> 10	> 10	> 10
B-pMT9	0.21 (0.06 ~ 0.26)	2.49 (2.09 ~ 2.95)	0.23 (0.16 ~ 0.30)	7.43 (6.67 ~ 8.65)
B-pMT4	0.52 (0.37 ~ 0.67)	> 10	1.54 (1.35 ~ 1.77)	> 10
SSII-1	0.20 (0.16 ~ 0.23)	1.48 (1.28 ~ 1.65)	0.30 (0.24 ~ 0.37)	1.37 (1.20 ~ 1.56)
E-pBU4	> 10	/	> 10	/
E-pMT9	0.57 (0.48 ~ 0.67)	/	0.67 (0.57 ~ 0.78)	/
E-pMT4	0.39 (0.31 ~ 0.48)	/	0.19 (0.12 ~ 0.26)	/

*48h 结果, a: *B.t.i* 重组子于 LB 液体培养基中培养 24h 的培养产物, b: *B.t.i* 重组子于 C-tris 液体培养基中培养 20% 芽孢脱落的培养产物

3 讨论

mtx1 杀蚊毒素基因在自身营养体启动子和双功能载体 pBU4 上的芽孢启动子的作用下能在大肠杆菌和 *B.t.i* 中表达形成毒素。大肠杆菌重组子和 *B.t.i* 营养体时期的发酵液对敏感和抗性蚊幼虫的毒力同野生型 SSII-1 菌株相当。但在 *B.t.i* 重组子中, *mtx1* 在其自身营养体启动子的作用下启动其在营养体阶段的表达形成毒素, 但这种毒素能被细菌在芽孢形成期分泌的大量蛋白酶降解而逐渐失去杀蚊活性。*B.t.i* 重组子在芽孢形成期的杀蚊活性可能是由于 *mtx1* 在来源于双功能载体 pBU4 的芽孢启动子的作用下合成的 *mtx1* 毒素导致的, 初步证明 *mtx1* 毒素基因可在芽孢启动子的作用下在芽孢形成期表达。生物测定表明含有顺向插入 *mtx1* 毒素基因的重组子 B-pMT9 在芽孢形成期的毒力比其营养体时期的毒力低, 而含反向插入 *mtx1* 重组质粒的 B-pMT4 的全发酵液对敏感和抗性蚊幼虫几乎无毒。这可能是由于 *mtx1* 毒素基因的转录方向的不同而影响了 *mtx1* 在营养体时期和芽孢期表达^[1,11]。

参考文献

- [1] 袁志明, 张用梅. 昆虫学报, 1999, 42 (2): 212 ~ 223.
- [2] 袁志明, Nielsen-LeRoux C, Pasteur N, 等. 微生物学报, 1999, 39 (1): 30 ~ 35.
- [3] Thanabualu T, Hindley J, Berry C, et al. Bacterial, 1991, 173 (9): 2776 ~ 2785.
- [4] Thanabualu T, Hindley J, Berry C, et al. J. Bacterial, 1992, 174 (15): 5051 ~ 5056.
- [5] 裴国风, 袁志明. 昆虫天敌, 1999, 21 (1): 28 ~ 37.
- [6] Yuan Z M, Zhang Y M, Liu E Y, et al. Biocontrol Sci Technol, 2000, 10 (1): 43 ~ 51.
- [7] Delecluse A, Charles J F, Kier A, et al. J Bacteriol, 1991, 173 (11): 3374 ~ 3381.
- [8] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J, et al. Molecular Cloning; A laboratory Manual, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Kalfon A, Thierry I, Charles J F. Eur J Microbiol Biotechnol, 1983, 18 (1): 168 ~ 173.
- [10] WHO. TDR/BCV/SPHAERICUS/1985, 85 (3): 1 ~ 24.
- [11] Bourgoin C, Delecluse R, de la Terre F. Appl Environ Microbiol, 1990, 56 (2): 340 ~ 344.