

## ERIC-PCR 鉴别苏云金芽胞杆菌与蜡状芽胞杆菌的研究\*

李 强<sup>1</sup> 金莉莉<sup>1</sup> 王 芳<sup>2</sup> 宋树森<sup>1</sup> 王秋雨<sup>1\*\*</sup>

(辽宁大学生命科学学院 沈阳 110036) (沈阳出入境检验检疫局 沈阳 110016)

**摘要** 利用 ERIC-PCR 技术对苏云金芽胞杆菌(*Bt*)、蜡状芽胞杆菌(*Bc*)和对照菌基因组 DNA 进行扩增、回收、标记 *Bt* PCR 扩增片段,分别与各菌株的基因组 DNA 进行斑点杂交和 Southern 杂交,筛选 *Bt* 标识序列。结果显示:*Bt* 各菌株均可扩增得到 250bp 的特异片段;*Bt* 和 *Bc* 均可得到 600bp 的共有扩增片段;以筛选得到的 569bp 片段为探针,可特异性地与 *Bt* 基因组 DNA 杂交,ERIC-PCR 技术可以在 DNA 指纹图谱水平上鉴别 *Bt* 与 *Bc* 菌,正确反映出两者的亲缘关系。结果表明 ERIC-PCR 技术在 *Bt* 的检测及在 *Bt* 与 *Bc* 的鉴定中具有较强的实用性。

**关键词** 苏云金芽胞杆菌,蜡状芽胞杆菌,ERIC-PCR,指纹图谱,Southern 杂交

中图分类号:Q93-3 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1184-04

Identification of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* by ERIC-PCR\*LI Qiang<sup>1</sup> JIN Li-Li<sup>1</sup> WANG Fang<sup>2</sup> SONG Shu-Sen<sup>1</sup> WANG Qiu-Yu<sup>1\*\*</sup>

(Life Science Department of Liaoning University, Shenyang 110036)

(Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenyang 110016)

**Abstract** To screen the identifier of *B. thuringiensis*, genomic DNA of *B. thuringiensis*, *B. cereus* and control strains were amplified by ERIC-PCR. Fragments amplified from *B. thuringiensis* were retrieved, cloned, marked by  $\alpha$ -<sup>32</sup>P, dot blot and southern hybridized with genomic DNA of these strains. It shows that every strains of *B. thuringiensis* can be amplified to produce a 250bp fragment, and both *B. thuringiensis* and *B. cereus* can be amplified to produce a 600bp fragment. Hybridization result between 569bp probe and genomic DNA of *B. thuringiensis* shows a high specificity. Discrimination and genetic relationship between *B. thuringiensis* and *B. cereus* can be revealed by ERIC fingerprint. This research indicates that ERIC-PCR technique is a practical method in the detection and characterization of *B. thuringiensis* and *B. cereus*.

**Key words** *B. thuringiensis*, *B. cereus*, ERIC-PCR, DNA fingerprints, Southern blotting

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 *Bt*)是一种自然界中广泛分布的革兰氏阳性菌,属于芽胞杆菌属。由于 *Bt* 在其生命周期的芽孢形成期能合成对昆虫有毒性作用的伴胞晶体,早在 1938 年就使用该菌制造了第一个商品化的生物杀虫剂。目前,*Bt* 已广泛应用于农业及卫生害虫的生物防治,*Bt* 种群不同株系的杀虫谱、毒力大小及杀虫晶体蛋白编码基因的多样性已成为 *Bt* 研究及商品化开发关注的焦点<sup>[1]</sup>。然而,随着 *Bt* 的广泛应用,*Bt* 的安全性问题越来越受到人们重视。首先 *Bt* 与同属蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*,简称 *Bc*)具有很高的同源性,它们的生理、生化特征具有高度相似性。在自然环境中两者染色体外遗传物质甚至可出现高度重

组,但 *Bc* 却是人类机会致病菌<sup>[2]</sup>。其次,近期的研究表明,绝大多数 *Bt* 菌株可产生能引起人类急性腹泻的肠毒素溶血素 BL(*HBL*)、非溶血性肠毒素(*NHE*)以及肠毒素 *T*<sup>[3]</sup>。因此,对商品化 *Bt* 的鉴定及研究 *Bt* 与 *Bc* 基因组 DNA 的区别,对于 *Bt* 的安全性评价标准,以及今后如何进一步提高其杀虫效力、降低其致病风险,具有重要的理论和实践意义。

目前,*Bt* 的鉴定主要采用血清学方法及传统的生化鉴定方法,并结合伴胞晶体蛋白分析,程序复杂。此外产生伴胞晶体的条件比较严格,给鉴定增加了一定难度。近年来,现代分子生物学方法如磷酸脂酶分析、16S rRNA 序列比较以及 RFLP 分析等分子生物学技术都已应用到 *Bt* 的筛选和鉴定中。

\* 辽宁出入境检验检疫局资助项目(No. LK-30-2002)

\*\* 通讯作者 Tel: 024-62202074, E-mail: qiu-yu-wang@lnu.edu.cn

收稿日期:2007-01-27,修回日期:2007-07-20

肠杆菌基因间重复一致序列(Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus Sequences, ERIC)是存在于原核生物基因组中一类短的重复序列。该序列在染色体上的分布和拷贝数具有种间特异性,根据 ERIC 高度保守的 44bp 核心序列设计反向引物,可扩增出反映细菌基因组结构特征的谱带。由于 ERIC-PCR 技术快速简便,图谱重复性好,近年来已被作为分子标记用于细菌的分类、鉴定与检测<sup>[4]</sup>。本研究利用 ERIC-PCR 技术对 Bt 和 Bc 全基因组 DNA 进行扩增,对获得的 Bt 和 Bc 基因组 DNA 指纹图谱进行分析,利用斑点杂交和 Southern 杂交,筛选 Bt 基因组 DNA 特异片段,探讨 ERIC-PCR 技术鉴别、鉴定 Bt 和 Bc 的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**实验供试菌株共 31 株。其中 8 株 Bt 及 6 株 Bc 标准株购于中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC);8 株 Bt 分离株来源于中科院沈阳生态所;5 株 Bc 分离株及其它对照菌株来源于沈阳出入境检验检疫局。所有分离株均经生化鉴定确认。

**1.1.2 试剂:**ExTaq 酶、IPTG、X-gal(宝生物工程大连有限公司);pGEM-T vector 连接转化试剂盒(pGEM-T vector System II)及 JM109 高效率感受态细胞(美国 Promega 公司);随机引物 DNA 标记试剂盒(Random Primer DNA Labeling System, 英国 Biolabs 公司);尼龙膜及 Whatman 3MM 滤纸(英国 Whatman 公司); $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (北京市福瑞生物工程公司)。

其它试剂为本实验室自配,均为分析纯。

ERIC 引物由宝生物工程大连有限公司合成,引物序列分别为:

Primer I 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

Primer II 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

### 1.2 方法

**1.2.1 菌株培养及其基因组 DNA 的提取:**按常规细菌培养方法培养。采用实验室常规酚/氯仿法提取各菌株基因组 DNA。所提取 DNA 经 Beckman DU-640 紫外分光光度计检测, $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.8 ~ 1.9 之间,纯度符合 PCR 扩增条件。

**1.2.2 ERIC-PCR 反应条件及结果鉴定:**反应体系的组成和反应条件依据文献的方法进行<sup>[5]</sup>。PCR 产

物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳;电压 3V/cm,时间 100min;DNA 标准分子量为 DL2000。PCR 产物经 EB 染色后在凝胶成像系统上照相。

**1.2.3 PCR 产物的克隆:**将上述扩增产物利用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。切取重复性好的 Bt 基因组 DNA 扩增产物所在的琼脂糖凝胶,使用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收、纯化。纯化产物连接 pGEM-T 载体。转化大肠杆菌 JM109 菌株。连接反应、转化操作以及克隆子的鉴定按照常规方法进行。阳性克隆子用 NaOH/SDS 碱裂解法制备质粒 DNA。进一步利用斑点杂交技术对回收的 PCR 扩增产物进行初步筛选。

**1.2.4 斑点杂交:**按照随机引物 DNA 标记试剂盒(Random Primer DNA Labeling System)中说明,标记回收产物,随机挑选菌株基因组 DNA 进行中度严谨性杂交。

**1.2.5 序列分析及 PCR 验证:**发生特异性杂交反应的克隆片段由宝生物工程大连有限公司进行测序,序列信息送至 GenBank 进行 Blast 分析。利用 Primer Premier 5.0 软件,根据特异克隆片段序列信息设计引物,序列分别为:

Bth I 5'-CGAGCAGTAGGCCGAACCATTG-3'

Bth II 5'-TGGCATGGGCTTTCGGATATT-3'。此引物对预期扩增长度为 363bp。PCR 反应条件:94℃ 预变性 2min,94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,共 30 循环;72℃ 延伸 5min。体系同 ERIC-PCR。以供试 Bt 及对照菌株的染色体 DNA 作为模板进行 PCR 反应。

**1.2.6 Southern 杂交:**用 Hind III 酶切不同 Bt 及对照菌基因组 DNA,酶切后的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳,碱变性,中和后转膜,在紫外交联仪上进行交联。用随机引物 DNA 标记试剂盒标记 Bt569 探针,与转膜后的基因组 DNA 杂交<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 ERIC-PCR 结果

由图 1、2 可见,对 16 株 Bt 和 11 株 Bc 基因组 DNA 进行 ERIC-PCR 扩增,均可产生清晰的 DNA 指纹图谱,扩增片段范围 100bp ~ 2500bp 左右,各菌株扩增图谱的多态性程度不同。另外,从图 1、2 可见所有的 Bt 经扩增均可得到 250bp 左右的片段,而 Bt 和 Bc 均可扩增得到 600bp 左右的共有片段。

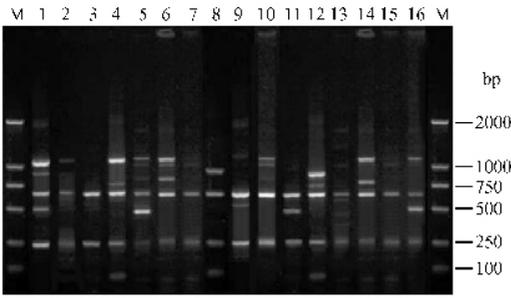


图1 Bt 基因组 DNA ERIC-PCR 结果指纹图谱

1 :CGMCC1.1014 2 :CGMCC 1.1749 3 :CGMCC 1.1754 4 :CGMCC 1.294 5 : CGMCC 1.905 6 :CGMCC 1.989 7 :CGMCC 1.959 8 : CGMCC1.792 9 ~ 16 :Bt 分离株 M :DL2000

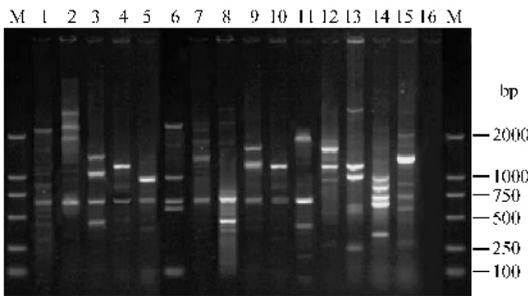


图2 Bc 及其它对照菌株基因组 DNA ERIC-PCR 结果指纹图谱

1 :CGMCC 1.126 2 :CGMCC 1.173 3 :CGMCC 1.1846 4 :CGMCC 1.895 5 :CGMCC 1.932 6 :CGMCC 1.1686 7 ~ 11 :Bc 分离株 12 :*Bacillus subtilis* 13 :*Staphylococcus aureus* 14 :*Escherichia coli* 15 :*Proteus mirabilis* 16 :negative control-no DNA M :DL2000

### 2.2 斑点杂交结果

经 DU-640 测定各回收片段标记探针的浓度约为 90ng/ $\mu$ L。用其对固定于膜上的供试菌株基因组 DNA 进行斑点杂交。结果表明 500bp 左右的 DNA 回收片段与 Bt 杂交结果为阳性 ,Bc、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* 简称 Bs)及属外的各菌株杂交结果均为阴性 ,具有较好的特异性(图 3)。

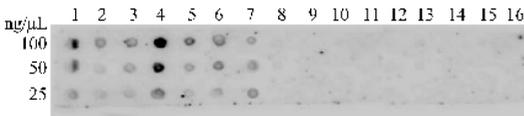


图3 500bp 左右 DNA 片段标记的探针对各菌株杂交放射自显影 1.5d 照片

1 ~ 7 :Bt strains 8 ~ 12 :Bc strains 13 :*Bacillus subtilis* 14 :*Escherichia coli* 15 :*Staphylococcus aureus* 16 :*Proteus mirabilis*

### 2.3 序列分析与 PCR 验证结果

发生特异性杂交反应的 500bp 左右片段由宝生物生物工程大连有限公司进行测序 ,测序结果表明

此片段长度为 569bp ,并命名为 Bt569 ,将此序列信息送至 GenBank 进行 Blast 分析 ,显示此 569bp 序列与 Bt 菌基因组 DNA 序列的同源性为 90%。根据特异克隆片段 Bt569 序列设计的一对 Bth I 和 Bth II 引物可以从 16 株 Bt 菌的模板中扩增出约 360bp 的片段 ,符合预期结果 ,而所有对照菌株均没有扩增条带(图 4) ,表明此克隆特异片段来源于 Bt 菌基因组 DNA。

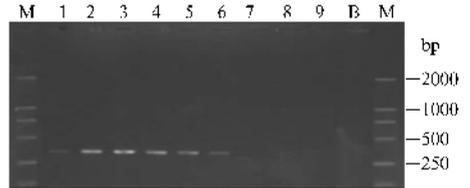


图4 引物 BthI和 BthII对 Bt 菌及对照菌 DNA 的扩增结果

1 ~ 6 :strains from Bt 7 8 :strains from Bc 9 :*Escherichia coli*

### 2.4 Southern 杂交结果

Southern 杂交结果显示(图 5) 酶切后的 Bt 基因组 DNA 均可以与 Bt569 探针杂交 ,但不同 Bt 菌杂交带的数量和位置不同 ,是由于 569 bp 序列在 Bt 菌基因组 DNA 中存在不同的拷贝数 ,或者是由于该序列上下游 *Hind* III 酶切位点数量与位置不同造成。而对照菌基因组 DNA 中无杂交带。

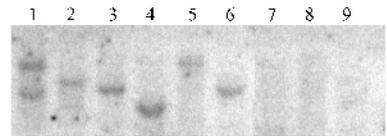


图5 Bt569 为探针的 Southern 杂交结果

1 ~ 6 :Bt strains 7 :Bc strains 8 :*Bacillus subtilis* 9 :*Escherichia coli*

### 3 讨论

Bt 与 Bc 在形态学及生理生化特征上具有广泛相似性 ,二者主要区别仅限于 Bt 在形成芽孢的同时 ,还形成对昆虫有毒性的伴胞晶体。但是 ,伴胞晶体蛋白多数由质粒编码 ,而且 Bt 菌株在昆虫体内和体外可以通过接合将杀虫质粒转移给 Bc。因此基于 Bt 菌伴胞晶体蛋白及其编码基因而建立的检测方法 ,在 Bt 的鉴定与检测的应用中有一定的误差。M .C.te Giffel 等对 Bt 和 Bc 的 16S rRNA 序列进行分析 ,结果表明两者只有个别碱基(0 ~ 9)有差异<sup>[7]</sup> ,而利用磷酸脂酶分析、RFLP 分析等方法均难以将两者完全鉴别区分<sup>[8~10]</sup>。

本研究首次利用 ERIC-PCR 技术对 Bt 和 Bc 全基因组 DNA 进行扩增 ,得到重复性良好的 DNA 指

纹图谱。各菌株扩增图谱的多态性程度有所不同,表明 ERIC 序列普遍存在于 Bt 和 Bc 的基因组 DNA 中,并且该序列在 Bt 和 Bc 不同菌株基因组 DNA 上的分布和拷贝数具有差异。研究结果显示 Bt 和 Bc 的 ERIC 指纹图谱有种群特异性,即 Bt 基因组 DNA 指纹图谱较一致,由 3 条主带构成,所有供试 Bt 菌株均有一条 250bp 左右的扩增片段,而 Bc 间 DNA 指纹图谱变异较大。值得注意的是,Bt 与 Bc 的 ERIC 指纹图谱差异,反映的是基因间串联重复序列之间由于插入、缺失等原因造成的 DNA 片段的长短变化,并不能反应出串联重复序列之间的遗传信息。此外,Bt 与 Bc 均可扩增产生 600bp 左右的共有 DNA 片段,这体现了二者在遗传上的高度同源性及表型的相似性。由此可见,利用 ERIC-PCR 技术可以在 DNA 指纹图谱水平鉴别区分 Bt 与 Bc,同时 ERIC 指纹图谱可以正确反应出 Bt 与 Bc 的亲缘关系,表明 ERIC-PCR 技术在 Bt 的检测及在 Bt 与 Bc 的鉴定中具有更强的实用性。

纯化、克隆指纹图谱中稳定出现的 Bt DNA 扩增片段,作为探针,分别与 Bt、Bc、Bs 及属外对照菌基因组 DNA 进行斑点杂交,Bt 菌的 569bp DNA 扩增片

段与 Bt 基因组 DNA 杂交结果均为阳性,与 Bt 同属的 Bc、Bs 及属外的大肠杆菌、奇异变形菌、金黄色葡萄球菌基因组 DNA 杂交结果均为阴性,Southern 杂交结果进一步验证了筛选到的 569bp 片段作为杂交探针具有显著特异性。

### 参考文献

- [1] 赵新民,夏立秋,王发祥,等. 中国生物防治,2007,23(1):77~78.
- [2] 袁志明,蔡全信,Andrup L,等. 微生物学报,2001,41(2):148~154.
- [3] Bjarne M H, Niels B H. *Applie and Environmental Microbiology*, 2001,67(1):185~189.
- [4] 金莉莉,王秋雨,侯潇. 遗传,2003,25(2):195~197.
- [5] te Giffel M C, Beumer R R, Klijn N, *et al.* *FEMS Microbiology Letters*, 1997,146(1):47~51.
- [6] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南. 北京:科学出版社,2002, pp.492~509.
- [7] Drobniowski F A. *Clin Microbiol Rev.* 1993,6(4):324~338.
- [8] Dangaard P H. *FEMS Immun Med Microbiol*, 1995,12(3-4):245~250.
- [9] Kwan Soo Ko, Jong-Wan Kim, Jong-Man Kim, *et al.* *Infection and Immunity*, 2004,72(9):5253~5261.