

## 研究报告

# 苏云金杆菌 $\delta$ -内毒素基因在大肠杆菌中的克隆及表达

田颖川<sup>1</sup> 蔡发兴<sup>1</sup> 王 瑛<sup>2</sup> 张斌贤<sup>3</sup>  
沙槎云<sup>2</sup> 陈受宜<sup>3</sup> 莽克强<sup>1</sup>

(中国科学院微生物研究所, 北京)<sup>1</sup>

(中国科学院动物研究所, 北京)<sup>2</sup>

(中国科学院生物物理研究所, 北京)<sup>3</sup>

分离了苏云金杆菌肯尼亚亚种 7404 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* 7404) 和库斯塔克亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1) 的质粒。经凝胶原位杂交证明苏云金杆菌肯尼亚亚种 7404 的 $\delta$ -内毒素基因位于约 47Md 大小的一个质粒上。用蔗糖密度梯度离心法从 Sau 3 A1 部分酶解的上述两种苏云金杆菌质粒 DNA 酶解片段中分离出大于 4kb 的 DNA 片段, 将这些片段克隆到 pBR332 的 Bam HI 位点上并转化大肠杆菌 HB101。通过菌落原位杂交、菌落原位放射免疫试验及 Western blot 分析等方法, 选到了带有 $\delta$ -内毒素基因并能在大肠杆菌中表达此毒蛋白的转化体。初步的生物学试验表明, 在四个试验过的转化体中带有肯尼亚亚种 $\delta$ -内毒素基因的转化体 TK89 及带有库斯塔克亚种 $\delta$ -内毒素基因的转化体 TH12 和 TH48 对烟青虫 (*Heliothis assulta*) 有毒杀活性。

**关键词** 苏云金杆菌; DNA 克隆;  $\delta$ -内毒素

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是能形成孢子的革兰氏阳性菌, 在孢子形成时还产生一种伴孢晶体蛋白, 即 $\delta$ -内毒素。大部分苏云金杆菌产生的伴孢晶体蛋白对昆虫有毒杀作用。为了更好地了解和利用此晶体蛋白, 随着基因工程技术的发展, 近年来已有几个实验室对不同亚种的苏云金杆菌 $\delta$ -内毒素基因进行了克隆并在大肠杆菌中得到了表达<sup>[1-3]</sup>。

苏云金杆菌不同亚种产生的毒蛋白的毒力及杀虫范围有所不同<sup>[4, 5]</sup>。与国际上应用最广、研究得最清楚的苏云金杆菌库斯塔克亚种 HD-1 (简称 HD-1) 相比, 我国分离的肯尼亚亚种 7404 (简称 7404) 属于另一种血清型 H4a4c, 其杀虫范围及

毒力与 HD-1 相当, 有时还比 HD-1 高<sup>[4]</sup>。本文报道从 HD-1 和 7404 中分离质粒 DNA 并比较了 $\delta$ -内毒素基因在不同来源的两类质粒中的分部位置。分离并克隆了带有 $\delta$ -内毒素基因的 DNA 片段。

## 材料与 方法

### (一) 材料

#### 1. 菌种: 苏云金杆菌库斯塔克亚种

本文于 1987 年 12 月 16 日收到。

中国科学院动物研究所白成、冯喜昌、温洁提供晶体蛋白及抗血清, 张书芳、谢强江参加毒力测定, 中国科学院微生物研究所杨毛周, 中国科技大学李长公参加部分工作, 在此一并致谢。

本研究为国家科委资助的课题。

HD-1 及肯尼亚亚种7404均由中国科学院动物研究所提供,其中菌株7404为动物所采集分离。

2. 生化试剂:限制性内切酶和其他核酸修饰酶主要用 BRL 产品或购自华美公司; Staphylococcus 蛋白质 A 是 Sigma 产品;  $\text{Na}^{125}\text{I}$  及  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  为 Amersham 产品; 氯化铯购自华美公司或为本实验室回收纯化制品。

3. 苏云金杆菌晶体蛋白及其抗血清:由动物所提供。

## (二) 方法

1. 质粒 DNA 的提取及凝胶原位杂交

(1) 苏云金杆菌质粒 DNA 的提取:参照 Kronstad 等<sup>[6]</sup>提取大质粒的方法进行。重组质粒的提取按照碱法进行<sup>[7]</sup>。

(2)  $\delta$ -内毒素基因探针的制备:用 Applied Biosystems DNA 合成仪合成了位于苏云金杆菌库斯塔克亚种 HD-1-Dipel 晶体蛋白基因 EcoRI F 片段上 25 个核苷酸的寡核苷酸。经 16% 聚丙烯酰胺-尿素凝胶电泳纯化后,用 T4 多核苷酸激酶和  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  按 Maniatis 等<sup>[7]</sup>介绍的方法进行标记。此标记的寡核苷酸即为 DNA 分子杂交中所用的探针。

(3) 凝胶原位杂交:苏云金杆菌质粒 DNA 在 0.8% Agarose 凝胶上电泳后参照 Kidd<sup>[8]</sup>的方法进行凝胶原位杂交。杂交所用的探针为上述  $^{32}\text{P}$  标记的寡核苷酸片段。

2. 酶切片段的分离及克隆:约 20  $\mu\text{g}$  的苏云金杆菌质粒 DNA 与 0.15 单位的 Sau3A1 按厂商介绍的条件在 37℃ 保温 15 min 进行部分酶解。酶解后样品在 5—40% 蔗糖密度梯度上以 68000  $\times g$ , 15℃ 离心 20h 然后分部收集不同密度位置中的 DNA

片段。分别取各分部 10  $\mu\text{l}$  在 1% Agarose 胶上电泳,检查 DNA 片段的大小,收集合并含大于 4 kb DNA 片段的分部,乙醇沉淀回收 DNA 并溶于 TE 缓冲液。通过电泳检查,估计收集到的 DNA 浓度为 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

载体 pBR322 的 Bam HI 酶解及脱磷酸“分子克隆”<sup>[7]</sup>介绍的方法;大肠杆菌 HB101 感受态细胞按 Alexander 等<sup>[9]</sup>的方法制备;约 0.6  $\mu\text{g}$  蔗糖密度梯度离心回收的 DNA 片段与 0.2  $\mu\text{g}$  Bam HI 酶解脱磷酸的 pBR322 在 T4 DNA 连接酶作用下,在 4℃ 连接反应过夜。按 Alexander 等<sup>[9]</sup>的方法转化大肠杆菌 HB101,在氨苄青霉素平板上选择转化体,在四环素平板上选择可能有外源 DNA 插入的转化体。

3. 菌落原位杂交:将转化实验得到的对四环素敏感的克隆转到氨苄青霉素 LB 平板上,用一张硝酸纤维素滤膜覆盖在此平板上,37℃ 培养过夜。然后按 Southern<sup>[10]</sup>方法处理滤膜。预杂交前,先将滤膜置于 3  $\times$  SSC 中 65℃ 预洗过夜。预杂交在 42℃ 进行 5 h (预杂交液: 6  $\times$  SSC, 0.05% 焦磷酸钠, 1  $\times$  Denhardtts 溶液, 0.5% SDS, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  变性鱼精 DNA)。杂交在 42℃ 进行 20 h (杂交液与预杂交液相同,但不含 SDS,加探针至 1  $\times 10^6$  cpm/ml)。杂交后在 6  $\times$  SSC, 0.05% 焦磷酸钠中 42℃ 洗两次,在 2  $\times$  SSC, 0.1% SDS 中 42℃ 洗两次,室温干燥后进行放射自显影。

4. 菌落原位放射免疫测定及 Western blot 分析

(1) 用大肠杆菌及其溶菌液吸附过的苏云金杆菌晶体蛋白抗血清的制备: 450 ml 过夜培养的 pBR322/HB101 细胞和 0.3 ml 7404 晶体蛋白抗血清混合悬浮于 100 ml PBS (137 mmol/L NaCl, 2.7

mmol/L KCl, 4.6mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 中, 在4℃放置过夜, 经8000rpm离心后取上清。另一份450ml 过夜培养的pBR322/HB101细胞加50ml 裂解液(0.05mol/L Tris-HCl pH 7.5 12.5mg溶菌酶), 混匀放室温30min, 冰上1h, 然后冻融3次, 8000 rpm 离心20min, 取上清液。将上述两种上清液各取33ml, 再加入PBS33ml, 混匀后置4℃过夜, 经20000×g, 4℃离心1h, 收集上清液, 保存于4℃备用。经吸附处理后的血清稀释近1000倍。

(2) 菌落原位放射免疫测定: 如菌落原位杂交中所述, 将菌落转印到硝酸纤维膜上, 37℃培养过夜, 然后参照 Erlich 等<sup>[11]</sup>的方法略加修改。其后进行溶菌及免疫反应。免疫反应为将带菌落的滤膜放在含1%BSA, 1:2000稀释的苏芸金杆菌晶体蛋白抗血清(经过pBR322/*E.coli* HB101吸附的)的PBS中, 室温振荡2h, 使菌落吸附抗血清。用PBS洗滤膜4次后, 将滤膜放在含1%BSA, 10<sup>6</sup>cpm/ml 用氨胺T法<sup>[11]</sup> <sup>125</sup>I 标记的蛋白质A的PBS中, 室温振荡2h。最后用PBS洗五次, 即可进行放射自显影。

(3) Western blot 分析: 克隆菌的总蛋白样品按 Thorne 等<sup>[12]</sup>的方法制备。蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Laemmli<sup>[13]</sup>的方法, 但改用10%聚丙烯酰胺-SDS连续凝胶。电泳后参照 Towbin 等<sup>[14]</sup>的方法, 将蛋白质电泳带转到Z-probe膜上。转移缓冲液为25mmol/L Tris, 192mmol/L 甘氨酸, pH8.3。转移后, 将Z-probe膜放在含10%BSA的PBS中, 48℃保温过夜。与抗血清和<sup>125</sup>I标记的蛋白质A结合反应按菌落原位放射免疫测定中所述方法进行。

5. 克隆菌毒性的生物测定: 按菌落

原位放射免疫测定中, 利用冻融法制备克隆菌及pBR322/*E.coli* 的溶菌物, 冷冻干燥后进行生物测定。称30mg溶菌物加适量蒸馏水溶解后加到人工饲料(0.5×0.5×0.1cm<sup>3</sup>), 单个饲喂二龄烟青虫(*Heliothis assulta*) 10头或涂于500mg玉米叶表面, 饲喂三龄末粘虫(*Leuca separta*) 20头。用等量的pBR322/HB101溶菌物作对照。观察72h, 记录试虫生长及死亡情况。每组试验重复两次。

## 结果与讨论

### (一) 苏云金杆菌质粒分离及凝胶原位杂交

苏云金杆菌有20多个亚种, 不同亚种所含的质粒数量有所不同, 一般在2—12个之间。其 $\delta$ -内毒素基因编码在一个或几个大质粒上<sup>[15]</sup>。我们按 Kronstad 等<sup>[6]</sup>介绍的提取大质粒的方法从苏云金杆菌HD-1及7404提取了质粒DNA。图版I-A为这两种质粒的电泳图谱。如图所示, 从HD-1提取的DNA在电泳图谱上至少有较清楚的10条质粒带(图版I-A中2), 其大小及数量与 Kronstad 等<sup>[6]</sup>的结果相似。图版I-A中3为7404的质粒电泳图谱, 至少有7条质粒带。7404与HD-1的质粒基本相似, 不同的只是在4.9Md和30Md处HD-1有两条带而7404只有一条带; 在150Md左右HD-1有一条质粒带而7404有两条质粒带。凝胶原位杂交的放射自显影照片见图版I-D, 结果表明HD-1的大质粒47Md及150Md都与<sup>32</sup>P标记的合成探针有明显杂交(图版I-D中2), 这与 Kronstad<sup>[11]</sup>等的结果相近, Kronstad 等的结果是47Md处显示出两条杂交带(约44Md和47Md), 而本文结果只有一条带, 这可能是由于这两个质粒分子量接近

而未能分开所致。7404质粒 DNA 中只有一条杂交带(47Md)(图版 I-D 中 3), 这表明7404的 $\delta$ -内毒素基因很可能是由47 Md的质粒携带的。DNA探针与pBR322无杂交(图版 I-D 中 1) 而与在电泳图谱上只显很浅染色带的HD-1 150Md大质粒有可见的杂交(图版 I-D 中 2), 这一事实表明合成的基因探针是有特异性的。图版 I-A和 I-D 为同一凝胶, 照片大小的差异是由于放大的倍数不同所致。

### (二) 酶切片段的分离及克隆

苏云金杆菌 $\delta$ -内毒素基因一般在 4kb 左右<sup>[18, 17]</sup>, 为了得到完整的毒蛋白基因, 我们用Sau3A1分别对7404和HD-1质粒 DNA 进行了部分酶解。然后将部分酶解片段用 5—40%蔗糖密度梯度离心法进行分离。图版 I-C 为离心后分部收集的样品在 1% Agarose 胶上的电泳图谱, 酶切片段从大到小分布, 较均匀, 可见部分酶解反应的条件是适当的。合并含有大于 4 kb 的分部, 经乙醇沉淀回收 DNA (图版 I-C 中第15管)。

从蔗糖梯度回收到的大于 4kb的DNA 样品以3:1与5'端脱磷的pBR322 BamH I 酶解片段混合, 在T4 DNA连接酶作用下进行连接, 然后转化大肠杆菌HB101感受态细胞。从约5000个Amp<sup>r</sup>的HD-1  $\delta$ -内毒素基因克隆中得到了1750个对四环素敏感的克隆; 从约6000个Amp<sup>r</sup>的7404  $\delta$ -内毒素基因克隆中也选到了1750个对四环素敏感的克隆。经抽样快速质粒提取和电泳检查, 发现大部分对四环素敏感克隆都带有大于4kb的外源DNA插入的质粒。

### (三) 菌落原位杂交

用<sup>32</sup>P 标记的 $\delta$ -内毒素基因探针对四环素敏感的克隆进行了菌落原位杂交。图版 I-E 显示7404  $\delta$ -内毒素基因克隆的原

位杂交放射自显影结果。虽然非特异性杂交造成了比较深的背景, (这可能是由于带有菌落的硝酸纤维素膜预洗不够或杂交后洗得不充分所致) 但杂交阳性与非特异性杂交菌落具有明显差异。HD-1 质粒 DNA 片段的克隆也有同样明显的菌落原位杂交结果(资料未列出)。通过上述杂交, 从1750个对四环素敏感的7404克隆中选出了138个杂交阳性克隆, 从1750个四环素敏感的HD-1 克隆中选出了50个杂交阳性克隆。

### (四) 菌落原位放射免疫测定及

#### Western blot 分析

在预备试验中, 发现苏云金杆菌7404 晶体蛋白的抗血清也能与大肠杆菌HB101或带 pBR322的 HB101溶菌物发生免疫反应, 这就大大地影响了免疫反应的特异性。这种非特异性反应可能是由于用来制备抗血清的兔子本身体内有大肠杆菌抗原所致。用 pBR322/*E. coli* HB101 细胞及其细胞裂解液上清先后与7404晶体蛋白抗血清混合以吸附抗血清中的大肠杆菌抗体, 则能消除这种非特异性反应(参考图版 I-F和G)。

图版 I-F 是7404 晶体蛋白抗血清和<sup>125</sup>I 标记的蛋白质A对以上杂交阳性克隆进行菌落原位放射免疫测定的结果。从菌落原位杂交阳性的7404  $\delta$ -内毒素基因克隆中选出了74个免疫反应阳性克隆; 同样从HD-1克隆中选出了20个免疫反应阳性克隆。在放射自显影照片上各阳性克隆的斑点深浅不同可能反应了 $\delta$ -内毒素基因在各个克隆中表达水平的差异, 也可能是由于各个菌落的细胞数量差异所致, 因此只能作为定性的测定。7404晶体蛋白抗体也能与HD-1 内毒素基因的克隆菌株进行免疫反应, 表明这两种菌的毒蛋白有相似的抗原决定簇。

图版 I -B 是免疫反应阳性的部分克隆的质粒 DNA 电泳图谱, 其它免疫阳性克隆的质粒电泳分析也得到了类似结果, 表明所有免疫阳性克隆都有大于 4kb 的外源 DNA 插入。所以这些克隆很可能带有完整的 $\delta$ -内毒素基因或至少带有编码抗原的基因的有关部分。

为了比较各免疫阳性克隆表达 $\delta$ -内毒素蛋白的相对量及分子量。用每个克隆的细胞裂解物进行了 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blot 分析。电泳后用考马斯亮蓝染色, 可以在电泳图谱上看到某些克隆有微弱的毒蛋白染色带, 说明 $\delta$ -内毒素基因在大肠杆菌中表达得较弱。将凝胶中的蛋白质带电泳转移到 Z-probe 膜上后, 进行放射免疫测定。结果发现有四个在原位放射免疫测定中产生很深放射自显影斑点的克隆同样地在 Western blot 图谱上能形成特异的免疫反应带, 其分子量与

7404 毒蛋白同 (130k)。这 4 个克隆是 HD-1 毒蛋白基因克隆 TH12 和 TH48 及 7404 毒蛋白基因克隆 TK89 和 TK102。图版 I -G 是包括这 4 个克隆在内的 Western blot 放射自显影照片。结果可见, 7404 的一个克隆 TK118 的毒蛋白表达量太少不能在自显影图谱上检出, TK98 和 TK107 表达量少, TK89 TK102 和 TH12 TH48 都有明显的毒蛋白带。TH48 的毒蛋白还有一定的裂解, 产生约 65kd 的多肽。这些克隆表达的  $\delta$ -内毒素蛋白都在 130 Kd 左右, 与 7404 及 HD-1 的毒蛋白分子量一致。由于电泳所用样品是各克隆菌的细胞裂解物的上清, 虽所用体积都一样 (6  $\mu$ l), 但没有测定其蛋白浓度, 所以只能作相对比较。

#### (五) 克隆菌毒性的生物测定

对烟青虫、粘虫生物测定的结果 (表 1, 图 1) 表明: TH12、TH48 两个克

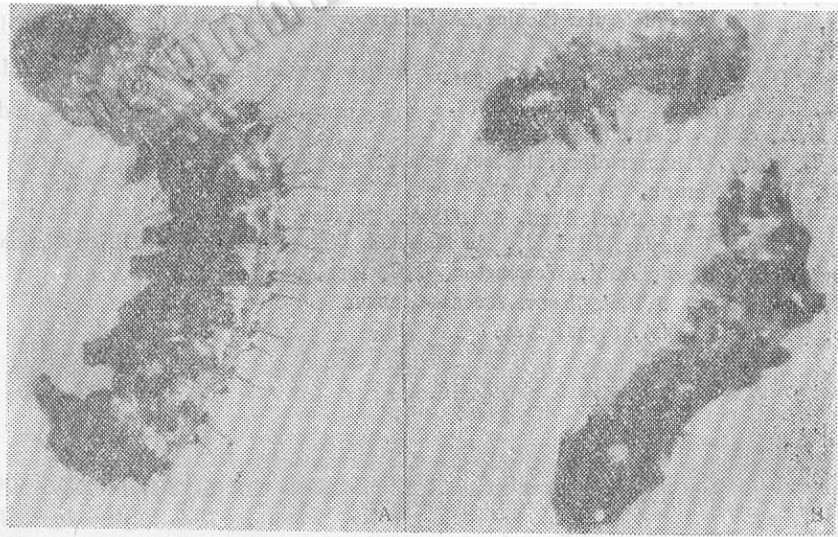


图 1 苏云金杆菌 7404  $\delta$ -内毒素基因克隆 TK89 对烟青虫的毒杀作用

Fig. 1 Toxicity assay of clone TK89 carrying  $\delta$ -endotoxin gene of *B.thuriniensis* 7404

A. 用拌有 pBR322/*E.coli* HB101 溶菌物饲喂后的正常活烟青虫

B. 用拌有克隆菌 TK89 溶菌物饲喂后致死的烟青虫 (在拌有溶菌物的饲料上饲喂 48h 后照像)

a. Larvae of *H.assulta* fed with diet containing lysate preparation of pBR322/*E.coli* HB101

B. Larvar of *H.assulta* fed with diet containing lysate preparation of clone TK89

(pictures were taken after 48h feeding on the diet)

表 1 克隆菌的毒性测定  
Toxicity assay of clones

	TH <sub>12</sub>	TH <sub>48</sub>	TK <sub>89</sub>	pBR322/HB101 (对照)
烟青虫 <i>H. assulta</i>	++++	++++	+	-
粘虫 <i>L. separata</i>	++++	++++	+	-

注: ++++ 对试虫有强毒性  
Strongly toxic to the insects tested  
对试虫无毒性  
Non-toxic to the insects tested

隆菌的毒蛋白基因表达较好, 对试虫有强毒性, TK<sub>89</sub> 表达虽不如 TH<sub>12</sub>、TH<sub>48</sub>但

仍使少部分试虫死亡并明显地有抑制生长的现象, TK<sub>89</sub> 组存活粘虫的体重为对照组 pBR322/HB101 的活粘虫体重的1/3。TK<sub>89</sub> 组对烟青虫也有明显抑制生长作用(未测数据)。虽样品的量较大, 实验组幼虫取食极少就产生毒性反应, 不再取食。初步估计, 克隆菌所产生的毒蛋白毒性与原来的苏云金杆菌的晶体蛋白毒性相当。

以上结果说明HD-1 与7404的毒蛋白基因已被克隆并能表达有生物活性的蛋白。

## 参 考 文 献

- [1] Schnepf, H.E. and Whiteley, J., *Proc.natl.Acad.Sci, USA*, 78:2983, 1981.
- [2] Klier, A. et al., *The EMBO Journal*, 1: 791, 1982.
- [3] Honigman, A. et al., *Gene*, 42:69, 1986.
- [4] 中国科学院动物研究所苏云金杆菌研究组, *微生物学报*, 18:352, 1978.
- [5] Kreig, A. and Langenbruch, G.A., In *Microbial Control of pest and Plant Diseases 1970-1980*, (H.D.Burges, Ed.) pp837-896. Academic Press, London.
- [6] Kronstad, J.W. et al., *J.Bacteriology*, 154:419, 1983.
- [7] Maniatis, T. et al., in *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, CSH.
- [8] Kidd, V.J., *Focus*, 6:3, 1984.
- [9] Alexander, D.C. et al., *Gene*, 31:79, 1984.
- [10] Southern, E.M., *J.Mol.Biol.*, 98:503, 1975.
- [11] Erlich, H.A. et al., *Cell*, 13:681, 1987.
- [12] Thorne, L. et al., *J.bacteriology*, 166:801, 1986.
- [13] Laemmli, U.K., *Nature*, 227:680, 1970.
- [14] Towbin, H. et al., *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.*, 76:4350, 1979.
- [15] Carlton, B.C. and Gonzalez, JR.J.M., in *Molecular Biology of Microbial Differentiation*, Hoch, J.A. and Setlow, P. ed. ASM, Washington, D.C. 1985, pp246-251.
- [16] Schnepf, H.E. et al., *J.Biol.Chem.*, 260:6264, 1985.
- [17] Wabiko, H. et al., *DNA*, 5:305, 1988.

## CLONING AND EXPRESSION OF $\delta$ -ENDOTOXIN GENE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IN *E. COLI*

Tian Yingchuan<sup>1</sup> Cai Faxing<sup>1</sup> Wang Ying<sup>2</sup> Zhang Binxian<sup>3</sup>  
Sha Chayun<sup>2</sup> Chen Shouyi<sup>3</sup> Mang Keqiang<sup>1</sup>

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)<sup>1</sup>

(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing)<sup>2</sup>

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)<sup>3</sup>

Fragments larger than 4 kb from *Sau* 3A1 partial digested plasmid DNA of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* 7404 as well as subsp. *kurstaki* HD-1 were cloned respectively into the *Bam*H I site of pBR 322. Based on the results of in situ colony hybridization, radioimmune screening and Western blot analysis, four transformants containing the corresponding  $\delta$ -endotoxin gene and producing proteins reacted with crystal protein antibody were selected. Upon biological toxicity test, out of three transformants tested, the lysate of one transformant TK89 carrying  $\delta$ -endotoxin gene of *B.T.* 7404 and two transformants TH12 and TH48 carrying  $\delta$ -endotoxin gene of HD-1 were toxic to caterpillars of tobacco budworm (*Heliothis assulta*). This is the first time to have cloned the  $\delta$ -endotoxin gene of *B.T.* subsp. *kenyae* different in serotype with the well studied subsp. *kurstaki*.

### Key words

*Bacillus thuringiensis*; DNA cloning;  $\delta$ -endotoxin

### 图版说明

Explanation of plate

A. 氯化铯密度梯度离心提纯的苏云金杆菌质粒DNA在0.8% Agarose凝胶中的电泳图谱

Gel electrophoresis of CsCl gradient purified *Bacillus thuringiensis* plasmid DNA on 0.8% Agarose gel

Lane 1. pBR322

Lane 2. Plasmids from *B.T.* subsp. *kurstaki* HD-1

Lane 3. Plasmids from *B.T.* subsp. *kenyae* 7404

The numbers on the left indicate the sizes in Md of *B.T.* HD-1 plasmids. The white dots on the right of lane 2 and 3 indicate the plasmids hybridized with probe in D

- B. 部分放射免疫反应阳性克隆的质粒电泳分析。菌株7404毒蛋白基因克隆用“TK”表示, 菌株HD-1毒蛋白基因克隆用“TH”表示

Gel electrophoresis of some recombinant plasmids from colonies with positive reaction in radioimmune screening. “TK” designates the clones of  $\delta$ -endotoxin gene of *B.T. subsp. kenya* 7404.

“TH” designates the clones of  $\delta$ -endotoxin gene of *B.T. subsp. kurstaki* HD-1

Lanes 1—5: clones TK<sub>84</sub>, TK<sub>102</sub>, TK<sub>76</sub>, TK<sub>63</sub>, TK<sub>57</sub>

Lanes 6—12: clones TH<sub>50</sub>, TH<sub>48</sub>, TH<sub>44</sub>, TH<sub>37</sub>, TH<sub>33</sub>, TH<sub>29</sub> and TH<sub>26</sub>

Lanes 13 and 14: pPSST<sub>3425</sub>, a plasmid of 10.5 Kb in size and pBR<sub>322</sub> respectively used as MW markers

Lanes 15—18: clones TH<sub>18</sub>, TH<sub>15</sub>, TH<sub>13</sub>, TH<sub>12</sub>

Lanes 19—23: clones TH<sub>3</sub>, TK<sub>98</sub>, TK<sub>118</sub>, TH<sub>8</sub>, TK<sub>89</sub>

- C. 蔗糖密度梯度离心分离的菌株7404DNA经Sau 3A<sub>1</sub>酶解后酶解片段的凝胶电泳

Gel electrophoresis of DNA fragments of Sau<sub>3</sub>A<sub>1</sub> partial digested *B.T. subsp. kenya* 7404 plasmid DNA in different fractions of sucrose gradient

Lane 1.  $\lambda$ -Hind III marker.

Lane 2. Plasmid DNA from *B.T. subsp. 7404*

Lane 3. The same plasmid as in lane 2, but partially digested with Sau<sub>3</sub>A<sub>1</sub>

Lanes 4—14. DNA fragments in different fractions of sucrose gradient

Lane 15. DNA fragments from pooled fractions containing fragments large than 4 kb

- D. 将A中的凝胶进行原位杂交后的照片, 样品1—3同A中1—3

In situ hybridization of agarose gel from A as described in Materials and Methods

Samples in lane 1, 2 and 3 were the same with that in A. The numbers on the right indicate the size of plasmids hybridized with <sup>32</sup>P-labelled  $\delta$ -endotoxin gene probe

- E. 生长在硝酸纤维膜上的克隆菌落与<sup>32</sup>P标记的 $\delta$ -内毒素基因探针杂交后的放射自显影照片

In situ colony hybridization. Colonies on nitrocellulose membrane were hybridized with <sup>32</sup>P-labelled probe and autoradiographed

- F. 菌落原位杂交阳性克隆的放射免疫测定

In situ colony radioimmuno-assay. Colonies hybridized with

<sup>32</sup>P-probe in E were incubated with antisera against  $\delta$ -endotoxin of *B.T. 7404* and <sup>125</sup>I-protein A and autoradiographed

- G. 苏云金杆菌 $\delta$ -内毒素基因克隆的Western blot分析

Western blot analysis of proteins produced in  $\delta$ -endotoxin gene clones

1—9: lysate of clone TH<sub>12</sub>, TH<sub>48</sub>, TK<sub>89</sub>, TK<sub>118</sub>, TK<sub>102</sub>, TK<sub>107</sub>, TK<sub>98</sub>, pBR<sub>322</sub>/HB<sub>101</sub> and  $\delta$ -endotoxin of *B.T. 7404*

The numbers on the right indicate the sizes of protein molecular weight of  $\delta$ -endotoxin

