

苏云金芽孢杆菌菌株 YBT1535 转 *cry1C* 基因菌的构建

鲁松清* 刘子铎 喻子牛

(华中农业大学微生物科学技术系, 农业微生物农业部重点实验室, 武汉 430070)

摘 要 利用电脉冲将 *cry1C* 基因转入苏云金芽孢杆菌野生菌株 YBT1535, 筛选得到 3 个转化子。质粒电泳、PCR 扩增及 Southern 杂交结果均证明, 基因 *cry1C* 已转入菌株 YBT1535。生物测定结果表明, 3 个转化子对甜菜夜蛾的毒力比出发菌 YBT1535 均有显著的提高, 转化子 YBT1535-1 和 YBT1535-3 对小菜蛾和棉铃虫的生物活性与出发菌 YBT1535 相近, 而转化子 YBT1535-2 则有一定幅度的提高。

关键词 苏云金芽孢杆菌, 基因 *cry1C*, 电脉冲转化

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0587-04

苏云金芽孢杆菌是一类能产伴孢晶体的革兰氏阳性杆状细菌, 随着研究的广泛深入, 它的杀虫范围已从最初的鳞翅目发展到如今的双翅目、鞘翅目等八个目, 并发现它对线形动物门中的部分寄生线虫, 扁形动物门中的吸虫类等也具有生物活性^[1], 但针对某一菌株而言, 它的杀虫范围多局限于某一目中的几个科属。1996 年 Sanchis 等将带有 *cry3A* 启动子的 *cry1C* 基因转入含单一杀虫晶体蛋白基因的 Kto 菌株, 结果重组菌同时具有 *cry1C* 和 *cry1Ac* 的生物活性^[2]。本研究试图将带自身启动子的 *cry1C* 基因转入不含 *cry1C* 基因的多基因菌株 YBT1535, 以期能提高菌株对甜菜夜蛾的毒力, 扩大菌株的杀虫谱。以下是对菌株 YBT1535 和其转化子的一系列研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

苏云金芽孢杆菌菌株 YBT1535 由本室分离, 血清型为 H_{3ab}, pBMBLC 为基因 *cry1C* 克隆入穿梭载体 pHT304 而得到的重组质粒, pHT304 由法国巴斯德研究所的 A. Delecluse 博士提供。

1.2 方法

1.2.1 质粒抽提: 苏云金芽孢杆菌质粒抽提在 Birnboim 等碱法抽提^[3]基础上作了适当的改进, LB 培养液(1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 1% NaCl, pH7.2)

过夜培养活化菌种, 再用活化菌液接种(1/100) LB 培养液, 至对数中期收集菌体, (TEC 10mmol/L Tris·Cl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 洗菌 1 次, 菌体悬于 100 μ L 溶液 I (50mmol/L Glucose, 25 mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA), 加入 5~10 μ L 溶菌酶(20mg/mL), 此后的操作按 Birnboim 等的方法^[3]进行。

1.2.2 电脉冲转化苏云金芽孢杆菌: 电脉冲转化在 Masson^[4]和 Bone^[5]等的基础上作了一些改进, 采用 SG 缓冲液(272mmol/L 蔗糖, 15% 甘油), 电脉冲采用 25 μ F, 200 Ω , 6.25~9kV/cm 的条件电脉冲 1 次。电脉冲仪为 Bio-Rad 公司的 Gene PulserTM, 电脉冲杯也为 Bio-Rad 的产品。

1.2.3 PCR 扩增: PCR 扩增所用的引物见文献[6], 扩增条件参见文献[7], 扩增全部采用 25 个循环, 变性温度 94 $^{\circ}$ C, 延伸温度 72 $^{\circ}$ C。不同的扩增差异主要在复性温度, *cry2* 特异扩增复性温度为 58 $^{\circ}$ C, *cry1Aa*, *cry1Ab* 和 *cry1Ac* 混合扩增采用 55 $^{\circ}$ C, 其余均为 53 $^{\circ}$ C。PCR 所用试剂均为华美公司产品, 100bp ladder 为 Biolabs 公司产品, 引物 TY62 和 TY63 等由 Integrated DNA Tech 合成, PCR 仪为 Pekkin Elmer Cetus 的 DNA Thermal Cycler。

1.2.4 探针制备: *cry1C* 探针制备采用 PCR 扩增产物作为底物, 扩增引物为 GALP1 和 GALP2^[6], 具体制备过程见 Dig 杂交使用说明。引物 GALP1 和

收稿日期 2000-01-03, 修回日期 2000-04-05。

基金项目 国家高技术研究发展与计划项目(101-03-01-01)及九五攻关项目(96-C01-02-01)资助。

* 联系作者, 现工作于华中农业大学畜牧兽医学院病毒室。

GALP2 为上海 Sangon 合成, Dig 杂交试剂盒为 Boehringer Mannheim 产品。

1.2.5 Southern 杂交:质粒电泳采用 0.55% 琼脂糖凝胶, 杂交膜使用硝酸纤维素膜(Hybond), 杂交及显色按 Dig 杂交使用说明进行。

1.2.6 生物测定:生物测定均采用 L_8 培养基发酵。小菜蛾(*Plutella xylostella*)生测方法见沈鞠群等^[8]小菜蛾由本室饲养提供;棉铃虫(*Heliothis armigera*)生测方法见喻子牛等^[9]棉铃虫购自湖北省农科院;甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)生测方法见曾晓慧等^[10]甜菜夜蛾购自湖北省农科院。每个样品的生物测定至少重复 2 次。

2 结果

2.1 菌株 YBT1535 及其转化子的验证

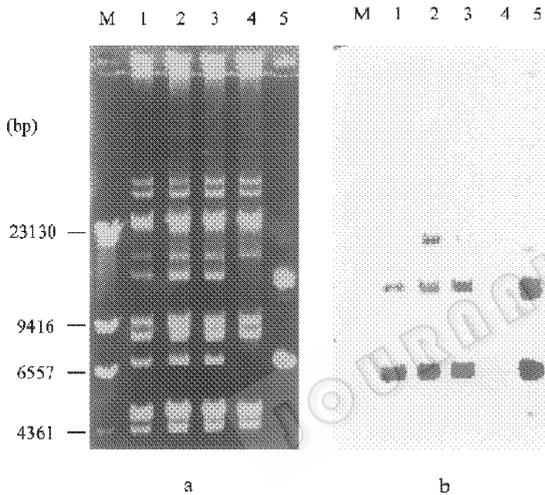


图 1 菌株 YBT1535 及其转化子的质粒电泳及 Southern 杂交结果

Fig.1 The plasmid profiles and the Southern blot of strain YBT1535 and its transformants

a. The plasmid profiles; b. The Southern blot.

M. λ /HindIII; 1. YBT1535-3; 2. YBT1535-2;

3. YBT1535-1; 4. YBT1535; 5. pBMBLC.

2.1.1 转化子的质粒检测:电脉冲将重组质粒 pBMBLC 转化菌株 YBT1535 红霉素抗性 LB 培养基平板筛选得到大量抗性菌落,经质粒电泳,PCR 分析等筛选得到 3 个转化子 YBT1535-1, YBT1535-2 和 YBT1535-3。质粒电泳结果(图 1a)显示, YBT1535-1, YBT1535-2 和 YBT1535-3 的质粒带型均与出发菌 YBT1535 一致,只是在与 pBMBLC 带相应的位置多出 1 条带,与实验预期值一致,表明重组质粒 pBMBLC 可能转入了 YBT1535,且转化子

完整地保留了菌株 YBT1535 原有的质粒。

2.1.2 cry1C 基因探针 Southern 杂交:cry1C 基因探针 Southern 杂交结果(图 1b)显示, 3 个转化子均能与特异性的 cry1C 基因探针杂交,而出发菌 YBT1535 则完全没有杂交信号。

2.1.3 转化子的 PCR 检测:对 3 个转化子及其菌株分别用 cry1C 特异引物(图 2a), cry1Aa, cry1Ab 和 cry1Ac 的混合引物(图 2b),以及 cry2 特异引物(图 2c)进行扩增,结果表明, 3 个转化子除 cry1C 特异引物的扩增结果与出发菌株 YBT1535 不一致外,其余结果完全一致,表明 3 个转化子含有转入的 cry1C 基因,同时完整地保留了菌株 YBT1535 原有的 cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac 和 cry2 基因。

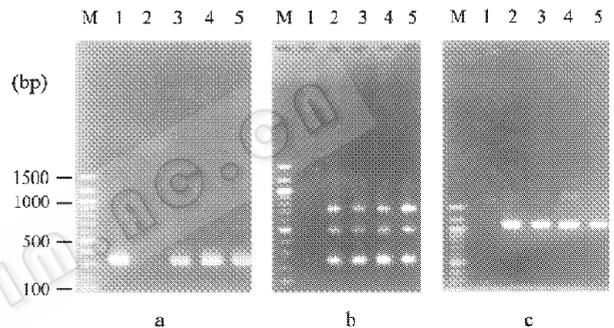


图 2 菌株 YBT1535 及其转化子的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of strain YBT1535 and its transformants

a. cry1C amplification; b. cry1Aa, cry1Ab and cry1Ac amplification; c. cry2 amplification.

M. 100bp ladder; 1. pBMBLC; 2. YBT1535;

3. YBT1535-1; 4. YBT1535-2; 5. YBT1535-3

综合 Southern 杂交,PCR 扩增及质粒电泳等的检测结果,可以确定 YBT1535-1, YBT1535-2 和 YBT1535-3 均为 YBT1535 转入含 cry1C 基因重组质粒 pBMBLC 的转化子。

2.2 菌株 YBT1535 及其转化子的生物活性

利用 L_8 培养基培养菌株 YBT1535 及其转化子,发酵液用小菜蛾、棉铃虫和甜菜夜蛾进行了生物测定,测量结果见表 1。由表 1 可知,转化子 YBT1535-1 和 YBT1535-3 对小菜蛾和棉铃虫的生物活性与出发菌株 YBT1535 的生物活性相当,而转化子 YBT1535-2 则比出发菌 YBT1535 分别提高 35% 和 59%; 3 个转化子对甜菜夜蛾的生物活性比出发菌株 YBT1535 的生物活性分别提高了 10 倍、14 倍和 8 倍。

表 1 菌株 YBT1535 及其转化子对不同昆虫的生物活性

Table 1 Activity of strain YBT1535 and its transformants against lepidopteran larvae

Strains	Regression Equation of Toxicity	Correlation coefficient	LC ₅₀ Value($\mu\text{L}/\text{mL}$)	
YBT1535	$Y = -1.390 + 2.676X$	0.92	0.244	
<i>P. xylostella</i>	YBT1535-1	$Y = 0.422 + 1.897X$	0.97	0.259
	YBT1535-2	$Y = -1.393 + 2.835X$	0.98	0.180
	YBT1535-3	$Y = -1.464 + 2.722X$	0.94	0.237
	YBT1535	$Y = -1.068 + 1.911X$	0.98	1.497
<i>H. armigera</i>	YBT1535-1	$Y = 2.160 + 0.741X$	0.95	6.802
	YBT1535-2	$Y = 2.600 + 0.807X$	0.97	0.942
	YBT1535-3	$Y = 2.696 + 0.721X$	0.97	1.569
	YBT1535	$Y = 1.384 + 0.739X$	0.98	78.181
<i>S. exigua</i>	YBT1535-1	$Y = -0.200 + 1.354X$	0.98	6.926
	YBT1535-2	$Y = -6.870 + 3.211X$	1.00	4.974
	YBT1535-3	$Y = -0.577 + 1.419X$	1.00	8.516

2.3 菌株 YBT1535 及其转化子的生物学特性

带基因 *cry1C* 的重组质粒转入菌株 YBT1535 后,菌株的生物学特性发生一些小的变化,主要表现在芽孢的形成发生一定障碍,芽孢数量减少,形成的菱形伴孢晶体变大,在 L_8 培养基中芽孢脱落时间比出发菌株 YBT1535 晚 3~5h。

2.4 转化子的遗传稳定性

将转化子 YBT1535-1, YBT1535-2 和 YBT1535-3 在无抗性压力下分别培养,每 36h 转接 1 次,经 10 次 LB 培养液中转种后,将菌液分别在无抗性培养基平板上涂布培养,各随机挑起 100 个菌落点种红霉素抗性平板,结果显示,所有菌落均保留原有抗性。对转化子 YBT1535-2 的其中 50 个菌落还进行了 PCR 检测,结果它们均有杀虫晶体蛋白基因 *cry1C*, *cry1Aa*, *cry1Ab* 和 *cry1Ac* 的特异扩增带。以上结果表明转化子的遗传性非常稳定。

3 讨论

基因 *cry1C* 转入野生菌株 YBT1535 后,转化子对甜菜夜蛾的毒力有明显的提高,表明 *cry1C* 基因对扩大菌株的杀虫谱,提高菌株的毒力有一定的积极作用。那么是否重组质粒 pBMBLC 转入所有野生菌株均能提高菌株对甜菜夜蛾的毒力呢?根据对其它菌株的研究结果,重组质粒 pBMBLC 对野生

菌株毒力的影响存在差异,它对菌株 YBT1520 和 YBT833 等的毒力甚至有负面影响(鲁松清未发表资料)。这可能是因不同菌株的遗传背景不同,外源重组质粒 pBMBLC 在菌株中与其它杀虫晶体蛋白基因的相互作用存在差异所致。

实验中发现含 *cry1C* 基因的野生菌株对甜菜夜蛾的毒力一般较强,具体情况如文献 7 所述。但这并非表明所有对甜菜夜蛾高毒力菌株均含有 *cry1C* 基因,某些菌株如 YBT833 等对甜菜夜蛾有较强毒力,但它不含 *cry1C* 基因。决定菌株对甜菜夜蛾毒力的因素除基因 *cry1C* 外,可能还有 *cry2*, *cry1Aa*, *cry1Ac* 等杀虫晶体蛋白基因。

由生物测定结果还可发现(表 2)3 个转化子的遗传背景尽管相同,但它们对不同目标昆虫的毒力并不完全相同,特别是对棉铃虫的毒力存在较大差异,转化子 YBT1535-2 的毒力较出发菌株 YBT1535 明显增强,但转化子 YBT1535-1 的毒力则较菌株 YBT1535 大幅下降,这说明重组质粒 pBMBLC 对同一菌株内不同个体的影响也不完全相同。至于导致菌株毒力下降的原因,可能是重组质粒 pBMBLC 的存在影响了其它杀虫晶体蛋白基因的表达,改变了原有不同杀虫晶体蛋白基因表达的相互比例,而导致菌株对不同昆虫的毒力发生改变。

参 考 文 献

- [2] Sanchis V ,Agraisse H ,Chaufaux J *et al.* *J Biotechnol* ,1996 **48** :81~96
- [3] Birnboim H C ,Doly J. *Nucleic Acids Res* ,1979 **7** :1513~1523
- [4] Masson L ,Prefontaine G ,Brousseau R. *FEMS Microbiol Lett* ,1989 **60** :273~278
- [5] Bone E J ,Ellar D J. *FEMS Microbiol Lett* ,1989 **58** :171~178
- [6] Kalman S ,Kiehne K L ,Libs J L *et al.* *Appl Environ Microbiol* ,1993 **59** :1131~1137
- [7] 鲁松清 ,刘子铎 ,曾晓慧等. 武汉大学学报 ,1999 **45** (生物专刊) :13~16
- [8] 沈鞠群 ,王锦举 ,喻子牛. 生物防治通报 ,1990(增刊) :12~16
- [9] 喻子牛主编. 苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用. 北京 :农业出版社 ,1993
- [10] 曾晓慧 ,张宏宇 ,胡 萃等. 中国生物防治 ,1998 **14** :172~175

Transfer of *cry1C* Gene into *Bacillus thuringiensis* by Electroporation to Construct Strain with Broader Insecticidal Activity

LU Song-Qing LIU Zi-Duo YU Zi-Niu

(*Department of Microbial Science and Technology ,Huazhong Agricultural University ,
Key Laboratory of Agro-microbiology ,Ministry of Agriculture ,Wuhan 430070*)

Abstract Three Transformants were selected by transferring *cry1C* into *Bacillus thuringiensis* strain YBT1535. Plasmid profiles ,PCR and Southern blot result all proved that *cry1C* had been transferred into strain YBT1535. Bioassay results showed that the transformants of strain YBT1535 displayed significantly higher toxicity against *Spodoptera exigua* than strain YBT1535 ,but the toxicities against *Heliothis armigera* and *Plutella xylostella* did not rise except transformant YBT1535-2.

Key words *Bacillus thuringiensis* , gene *cry1C* , electroporation