

含质粒复制起始区 *ori44* 的苏云金芽胞杆菌解离载体的构建

吴 岚 孙 明* 朱晨光 张 蕾 喻子牛

(华中农业大学生命科学技术学院农业微生物农业部重点实验室, 武汉 430070)

摘 要 将苏云金芽胞杆菌转座子 Tn4430 的解离酶识别位点 *res* 分别插入克隆载体 pRSET B 和 pUC19 得到质粒 pBMB1201 和 pBMB1202。这两个质粒分别经 *Bam*HI/*Hind*III 和 *Eco*RI/*Hind*III 双酶切回收含 *res* 位点的小 DNA 片段, 与穿梭载体 pHT3101 经 *Eco*RI/*Hind*III 双酶切后回收的含大肠杆菌复制起始区、氨基青霉素抗性基因和红霉素抗性基因的 3.3kb 片段连接, 获得重组质粒 pBMB1203。封闭 pBMB1203 两 *res* 位点外的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点后, 得到解离载体 pBMB1204。将来源于苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种 YBT-1520 的质粒复制起始区 *ori44* 片段插入 pBMB1204 的两 *res* 位点之间, 得到解离穿梭载体 pBMB1205。该解离载体插入壮观霉素抗性基因后电转化无晶体突变株, 在辅助质粒所提供的解离酶作用下可发生解离消除抗性基因, 解离频率为 100%, 解离后的质粒稳定性为 93%。利用解离穿梭载体 pBMB1205 可在用抗性筛选到转化子后特定消除抗性标记基因和其它非苏云金芽胞杆菌 DNA 片段。

关键词 苏云金芽胞杆菌, 解离载体, 质粒复制起始区

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0335-04

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)在芽胞形成期合成的杀虫晶体蛋白(Pesticidal crystal proteins)对多种农业害虫具有杀虫活性, 其制剂是目前研究最广泛、最深入的细菌杀虫剂, 占当前生物杀虫剂的 95%^[1]。在 Bt 基因工程菌构建中常用到质粒穿梭载体, 该载体通常包括了在研究构建过程中所必需但在终产品工程菌中并不需要的基因或 DNA 片段, 如各种抗生素标记基因和大肠杆菌复制起始区等。这些基因在工程菌中的存在不仅加大了细胞生物合成的负担, 而且还存在潜在的生态安全性问题。为此, 一个可行的策略是在载体的适当位置引入特殊元件, 在体内切掉不必要的 DNA 片段^[2]。

近年来报道了一种利用转座子 Tn4430 的位点特异性解离特性构建可体内定点重组的基因转移载体, 消除抗性筛选标记和其它非必须基因来构建 Bt 基因工程菌的方法^[3-5]。由于该系统涉及的关键元件为解离位点(Resolution sites)和解离酶(Resolase), 因此称之为解离载体。该载体为一质粒穿梭载体, 通过体内重组可形成两个质粒, 但只有一个质粒可以存活。其中含 Bt 质粒复制区的质粒只可在 Bt 中存活,

另一个含 ColE1 质粒复制区的质粒则只能在 *E. coli* 中存活^[5]。本研究利用这一思路构建了一种可普遍通用且方便插入不同基因的质粒载体。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

涉及的菌株和质粒见表 1。大肠杆菌 DH5 α 和 Bt BMB171 为 DNA 操作的受体菌。采用 LB 培养基, 分别在 37 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 培养。抗生素使用浓度分别为氨基青霉素(Amp)100 μ g/mL, 红霉素(Erm)25 μ g/mL, 四环素(Tc)20 μ g/mL 和壮观霉素(Sp)100 μ g/mL。

1.2 DNA 操作

质粒 DNA 的提取、酶切、去磷酸化、凝胶电泳、回收纯化、连接和常规转化大肠杆菌 DH5 α 菌株均按照文献 [6] 所述方法进行, 所用限制酶和修饰酶均购自华美公司。

1.3 电转化苏云金芽胞杆菌受体菌

按照文献 [5] 所述方法进行。

1.4 质粒稳定性检测

按照文献 [5] 所述方法进行。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Character	Source or references
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Stored in our lab
<i>B. thuringiensis</i>	A plasmid-free mutant strain	Screened in our lab
BMB171		
BMB05-Sp	BMB171 (pBMB1205-Sp)	This study
BMB05-SpB	BMB171 (pBMB1205-SpB)	This study
Plasmids		
pUC19	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp ^R	Stored in our lab
pRSET B	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp ^R	Stored in our lab
pHT3101	<i>E. coli</i> -Bt shuttle vector, Erm ^R , Amp ^R	Lereclus ^[5]
pBMB827-IRS	Resolution vector containing <i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I <i>res</i> fragment, Amp ^R , Erm ^R	Stored in our lab
pDG1726	<i>E. coli</i> vector containing Sp ^R gene, Amp ^R , Sp ^R	Stored in our lab ^[7]
pBMB44	<i>E. coli</i> vector containing <i>ori44</i> gene, Amp ^R	Stored in our lab
pBMB1200	Unstable <i>E. coli</i> -Bt shuttle vector containing <i>tnpI</i> gene, Tc ^R , Amp ^R	Stored in our lab ^[5]
pBMB1201	<i>res</i> fragment from pBMB827-IRS insert into pRSETB, Amp ^R	This study
pBMB1202	<i>res</i> fragment from pBMB827-IRS insert into pUC19, Amp ^R	This study
pBMB1203	<i>E. coli</i> vector containing two copies of <i>res</i> fragment from pBMB1201 and pBMB1202 separately, Amp ^R ,	This study
pBMB1204	Derivative of pBMB1203, deleting <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI sites flanking two copies of <i>res</i> sites, Amp ^R , Erm ^R	This study
pBMB1205	Derivative of pBMB1204, <i>E. coli</i> -Bt shuttle vector containing <i>ori44</i> , Amp ^R , Erm ^R	This study
pBMB1205-Sp	Sp ^R gene insert pBMB1205, Amp ^R , Erm ^R , Sp ^R	This study
pBMB1205-SpB	pBMB1205-Sp recombinant in <i>B. thuringiensis</i> , Sp ^R	This study

2 结 果

2.1 解离载体 pBMB1204 的构建

2.1.1 解离载体 pBMB1203 的构建:质粒 pBMB827-IRS 经 *Bam*HI/*Sac*I 酶切获得 Bt 转座子 Tn4430 的解离酶识别位点 *res*, 分别插入克隆载体 pRSET B 和 pUC19 得到质粒 pBMB1201 和 pBMB1202。pBMB1201 经 *Bam*HI/*Hind*III 双酶切, pBMB1202 经 *Eco*RI/*Hind*III 双酶切分别回收含 *res* 的片段, 穿梭载体 pHT3101 经 *Eco*RI/*Hind*III 双酶切回收 3.3kb 的大肠杆菌复制区及抗性基因片段, 三者连接获得质粒 pBMB1203。该质粒的两同向 *res* 之间存在多克隆位点。

2.1.2 解离载体 pBMB1204 的构建:由于在 pBMB1203 中分别存在两个 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点, 位于解离区 *res* 两端, 而在遗传重组操作中这两个酶的酶切位点又使用较多, 为了避免被酶切切除, 本研究封闭了两同向 *res* 外的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点。封闭方法是: 质粒 pBMB1203 经 *Sac*I 酶切后自连去掉多克隆位点, *Bam*HI 酶切后经 Klenow 酶作用补平 3' 末端, 自连封闭 *Bam*HI 位点, 同法处理封闭 *Eco*RI 位点。再将 *Sac*I 片段插回原位置, 筛选两 *res* 区方向相同的重组质粒, 获得质粒 pBMB1204, 经酶切验证与预计片段大小相符(图 1)。

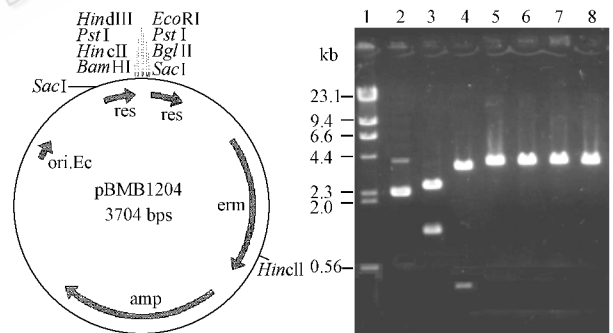


图 1 质粒 pBMB1204 及其酶切电泳图谱

Fig. 1 Plasmid pBMB1204 and its agarose electrophoresis map
Left: Plasmid pBMB1204: *amp*: Amp^R-encoding gene; *erm*: Erm^R-encoding gene; *oriEc*: origin of replication in *E. coli*; *ori. Bt*: origin of replication in *B. thuringiensis*; *res*: resolution sites

Right: Agarose electrophoresis map of pBMB1204: 1. λ DNA/*Hind* III marker; 2. pBMB1204 plasmid; 3. pBMB1204/*Hinc* II; 4. pBMB1204/*Sac*I; 5. pBMB1204/*Eco*RI; 6. pBMB1204/*Bam*HI; 7. pBMB1204/*Bgl* II; 8. pBMB1204/*Hind* III

2.2 含 Bt 质粒复制起始区 *ori44* 的解离载体

质粒 pBMB44 经 *Eco*RI 酶解得到 2.8kb 的 *ori44* 片段, 插入 pBMB1204 的 *Eco*RI 位点得到重组质粒 pBMB1205 和 pBMB1205R, 两者区别只是 *ori44* 方向相反。 *Hind*III 和 *Bgl* II 酶切验证大小正确(图 2)。

2.3 解离载体 pBMB1205 的解离特性

为了验证 pBMB1205 用作解离载体的可行性,以壮观霉素抗性基因为目的基因,将质粒 pDG1726 经 *Bam*HI/*Hind*III 酶解得到 1.2kb 的壮观霉素基因

插入 pBMB1205 的 *Bam*HI/*Hind*III 位点,得到重组质粒 pBMB1205-Sp(图 3)。

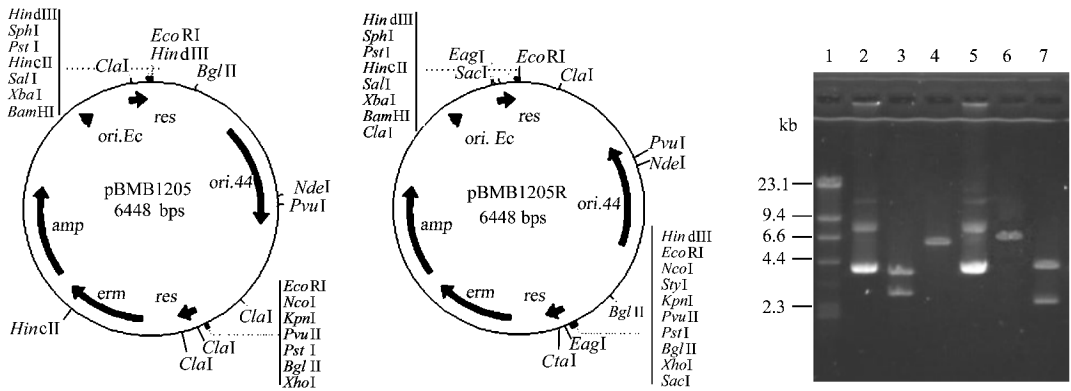


图 2 质粒 pBMB1205 和 pBMB1205R 及其酶切电泳图谱

Fig. 2 Plasmid pBMB1205, pBMB1205R and their agarose electrophoresis map

1. λ DNA/*Hind*III marker ; 2. pBMB1205R plasmid ; 3. pBMB1205R/*Hind*III ; 4. pBMB1205R/*Bgl*II ;
5. pBMB1205 plasmid ; 6. pBMB1205/*Hind*III ; 7. pBMB1205/*Bgl*II

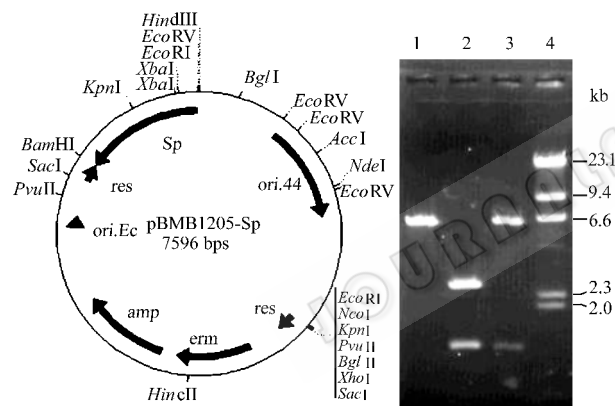


图 3 质粒 pBMB1205-Sp 及其酶切电泳图谱

Fig. 3 Plasmid pBMB1205-Sp and its agarose electrophoresis map

Left : Structure map of plasmid pBMB1205-Sp

Right : Agarose electrophoresis map

1. pBMB1205/*Bam*HI-*Hind*III ; 2. pDG1726/*Bam*HI-*Hind*III ;
3. pBMB1205-Sp/*Bam*HI-*Hind*III ; 4. λ DNA/*Hind*III Marker

质粒 pBMB1205-Sp 电转化 Bt 无晶体突变株 BMB171,再转入辅助质粒 pBMB1200,在四环素平板上筛选到转化子,点种于 Tc^r 平板培养 24h 后,再点种于 Em^r 和 Sp^r 平板,筛选得到发生了解离而丧失红霉素抗性的重组菌株,其解离频率为 100%。由于辅助质粒为不稳定质粒,在无抗性选择压力下易丢失^[5],因此将重组菌株在壮观霉素培养液中培养 24h(8h×3),分别点种于 Tc^r 和 Sp^r 平板,筛选得到了因丢失辅助质粒而丧失四环素抗性,仅保留有壮观霉素抗性的重组菌株 BMB05-SpB。抽提质粒发现

该菌株只含有一个 4.1kb 的小质粒 pBMB1205-SpB,经 *Kpn*I 酶切得到两条大小分别为 0.8kb 和 3.3kb 的 DNA 带,*Hind*III 酶切得到一条 4.1kb 大小的 DNA 带,说明该质粒只含有 Bt 复制起始区 *ori44*,一个 *res* 区和壮观霉素抗性基因(未列照片)。

2.4 解离载体的稳定性检测

将菌株 BMB05-SpB 在无抗性培养液中培养 24h(8h×3)稀释涂布于 LB 平板至长出单菌落,分别随机挑取 100 个单菌落于 Sp^r 和无抗性 LB 平板,结果显示菌株 BMB05-SpB 有 93% 的菌株保持有壮观霉素抗性,即解离后载体仍具有很高的稳定性。

3 讨论

DNA 操作中广泛使用抗生素抗性基因作为标记导致最终工程菌带有大量各类抗生素抗性基因,在环境释放时引起对环境安全性的关注。位点特异性重组能精确消除 DNA 片段,成为有效的基因操作工具。利用转座子的位点特异性解离特性构建载体,已成功地将 *cry* 基因转入 Bt 受体菌,并精确去掉抗性标记基因等非 Bt DNA 片段,以解决工程菌在环境释放时的基因安全性问题^[3-5]。本研究利用转座子 $Tn4430$ 构建了一个方便使用的解离载体 pBMB1205,为以此构建安全高效工程菌奠定了基础。

Buam 等^[3]首次报道了利用解离载体将 *cry* 基因转入 Bt 受体菌,该载体采用拟步行用亚种的重组

系统。该亚种对鞘翅目昆虫有特异杀虫活性,而绝大多数 Bt 产品由对鳞翅目昆虫特异性的库斯塔克亚种生产。本研究采用的重组系统来自库斯塔克亚种,适用于绝大多数 Bt 制剂的生产。Sanchis 等^[4]所采用的重组系统虽然来自库斯塔克亚种,但所使用的质粒复制区来自 10kb 的天然质粒 pHT1030,而在 Bt 中大质粒具有更高的遗传稳定性。本文采用的质粒复制起始区 *ori44* 来自库斯塔克亚种菌株 YBT-1520 的 44Md 大质粒,具有复制和分离的稳定性。因此, pBMB1205 在解离后仍具有遗传稳定性,本文检测的稳定性可达 93%(无抗性选择压力),能保证所导入的基因在受体菌中稳定遗传表达。Bt 是富含质粒的种群,构建携带不同质粒复制区的解离载体有助于克服质粒的不相容性问题,也可用来构建多价重组菌。载体 pBMB1204 在两同向 *res* 区间具有多个限制酶位点,可方便插入其它质粒复制区得到其它类型的解离载体。

REFERENCES (参考文献)

[1] SUN M(孙明), LIU Z D(刘子铎), LI L(李林) *et al.* Recent de-

velopment of engineered bacterial pesticides. *Virologica Sinica* (中国病毒学), 2000, **15**: 16 ~ 23

[2] Kilby N J, Snaith M R, Murray J A H. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet*, 1993, **9**: 413 ~ 421

[3] Baum J A, Kakefuda M, Gawron-Rurke C. Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 4367 ~ 4373

[4] Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J *et al.* A recombinase-mediated system for elimination of antibiotic resistance gene markers from genetically engineered *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 779 ~ 784

[5] WU L(吴岚), SUN M(孙明), YU Z N(喻子牛). A new resolution vector with *cry1Ac10* gene based on *Bacillus thuringiensis* transposon Tn4430. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2000, **40**(3): 31 ~ 36

[6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. In: *Molecular Cloning: a Laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989

[7] Guerout-Fleury A M, Shazand K, Frandsen N *et al.* Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, 1995, **167**: 335 ~ 336

A Novel Resolution Vector with *Bacillus thuringiensis* Plasmid Replicon *ori44*

WU Lan SUN Ming* ZHU Chen-Guang ZHANG Lei YU Zi-Niu

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China)

Abstract The resolution recognition sites of transposon Tn4430 of *Bacillus thuringiensis* was inserted into cloning vector pRSET B and pUC19, resulting recombinant plasmids pBMB1201 and pBMB1202. Both of the mini *res* fragments, *Bam*HI/*Hind*III fragment in pBMB1201 and *Eco*RI/*Hind*III fragment in pBMB1202, were ligated to the 3.3kb *Eco*RI/*Hind*III fragment of shuttle vector pHT3101, which contained the *ori*. *Ec*. *amp*^r and *em*^r antibiotic resistant genes, resulting recombinant plasmid pBMB1203. After deleted the *Bam*HI and *Eco*RI sites which located outside the two *res* sites, resolution vector pBMB1204 was resulted. There are multiple cloning sites between two copies of resolution sites which have the same direction. The plasmid replication origin *ori44*, which come from *B. thuringiensis* sub sp. *kurstaki* strain YBT-1520, was inserted into the multiple cloning sites of pBMB1204 and then resolution shuttle vector pBMB1205 was obtained. With spectinomycin resistant gene as target, it was found that the resolution rate is 100% and the stability of the resolved plasmid is 93%. Using this shuttle vector, antibiotic resistance markers and other non-*B. thuringiensis* DNA can be selectively eliminated after the selection of transformants by antibiotic resistance marker. This vector is very useful to solve the gene safety problem while has no effect on target gene expression.

Key words *Bacillus thuringiensis*, resolution vector, plasmid replication origin

Received: 10-25-2001

This work was supported by Grants from the State 863 High Technology R&D Project of China (No.2001AA214011 and 2001AA212301) and Wuhan Chengguang Plan (No.9650001037-22).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87283455; Fax: 86-27-87280670; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

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