

苏云金芽胞杆菌杀蚊基因在鱼腥藻中 克隆和表达的初步研究*

吕颂雅 刘子铎 戴经元 喻子牛

(华中农业大学生物学院, 武汉 430070)

摘要 将苏云金芽胞杆菌以色列亚种的杀蚊晶体蛋白基因 *cry11A* 亚克隆到大肠杆菌-蓝藻的穿梭质粒载体 pRL25C, 然后用三亲本杂交的方法将重组质粒转移到一种具有固氮能力且可被蚊幼虫吞食的鱼腥藻 (*Anabaena*) PCC7120 中。Southern blot 及 Western blot 分析表明 *cry11A* 基因在鱼腥藻 PCC7120 中得以克隆和表达, 但生物测定未能检测到转基因鱼腥藻对库蚊 (*Culex*) 的毒性, 可能是因为带有苏云金芽胞杆菌自身启动子的 *cry11A* 基因在鱼腥藻 PCC7120 中表达量不够高的缘故。

关键词 苏云金芽胞杆菌, 杀蚊基因, 鱼腥藻

由苏云金芽胞杆菌以色列亚种发展的商品制剂已广泛应用于防治传播多种疾病的媒介蚊幼虫。但该制剂在水中使用时, 因下沉到水底或光失活等因素而使持效期很短^[1], 严重地限制了应有毒力的发挥, 用基因工程方法将苏云金芽胞杆菌以色列亚种的灭蚊晶体蛋白基因转移到与蚊幼虫生活在一起且可被蚊幼虫取食^[2]的固氮鱼腥藻中表达, 构建灭蚊且固氮的双效工程鱼腥藻, 是解决这一问题的有效途径。

自1987年首次报道^[3]球形芽胞杆菌的杀蚊基因转入单细胞蓝藻, 在此后的研究中, 逐渐展示了以转杀蚊基因蓝藻对水体蚊幼虫进行生物防治的美好前景。Murphy 和 Stevens 将 *cryIVD* (即 *cry11A*) 基因与蓝藻 *cpcB* 基因融合在一起表达, 首次得到了完整细胞能杀蚊幼虫的集胞藻 (*Synechococcus*) PCC7002^[4]。而徐旭东将球形芽胞杆菌的杀蚊基因受控于蓝藻自身启动子, 首次得到了完整细胞能杀蚊幼虫的丝状固氮鱼腥藻 PCC7120^[5]。作者对苏云金芽胞杆菌以色列亚种的 *cry11A* 基因在丝状固氮鱼腥藻中的克隆和表达作了初步研究, 为将苏云金芽胞杆菌的杀蚊基因转入丝状固氮鱼腥藻、构建实用性灭蚊固氮双效工程鱼腥藻的进一步工作打下了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 鱼腥藻 PCC7120 购自中国科学院水生生物研究所, 用 BG-11 培养。大肠杆菌 TG1 及质粒 pGEM1 (含 *cry11A*, *cytA* 和 20KDa 蛋白质基因, Ap^r) 为本微生物实验室

* 本项目得到世界卫生组织的资助

1997-03-27收到; 1998-05-26修回

保存, 质粒 pRL25C, pRL528 及 RP4 由美国密西根大学 Wolk 博士惠赠, BamHI, HindIII, PstI, CIP, 蛋白酶 K, T4 DNA ligase 均购自华美生物工程公司, *cry11A* 蛋白抗体由法国巴斯德研究所惠赠。

1.2 质粒的提纯 大肠杆菌的质粒 DNA 提纯采用碱解法^[6], 鱼腥藻质粒 DNA 的提纯参照脚注1) 进行。

1.3 酶解反应及电泳 酶解、去磷酸化及连接反应条件参照华美公司提供的反应体系, 水平琼脂糖凝胶电泳缓冲系统为 TAE 电泳液, 琼脂糖浓度为 0.7% (W / W), DNA 片断的回收用透析袋法^[6], 感受态细胞的制备及转化参照文献[7] 进行, 三亲本杂交参照文献[8] 进行。

1.4 DNA 同源杂交检测 用透析袋法回收的目的 DNA 片断, 用 Promega 公司的 Digoxin 标记试剂盒制备探针 DNA, Southern blot 参照文献[6] 进行。

1.5 蛋白质同源杂交检测 苏云金芽胞杆菌以色列亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) 在 28℃ 培养 4d 的 LB 斜面菌苔和经液氮快速冷冻后研成粉状的鱼腥藻收集物分别和样品缓冲液 (6.25×10^{-2} mol / L Tris, Cl, pH6.8; 10% 甘油, 2% SDS, 5% β -巯基乙醇, 0.01% 溴酚蓝) 混合, 用于制备蛋白质电泳样品, 分离胶含 10% 的丙烯酰胺, 浓缩胶含 3% 的丙烯酰胺, *cry11A* 抗体用 Boehringer Mannheim 公司 DIG 抗体标记试剂盒进行标记, Western blot 按文献[6] 进行。

1.6 生物测定 在无菌小杯中装 50ml 无菌水和足量的工程鱼腥藻, 每杯放入 20 头二龄库蚊幼虫, 做三个重复。同时, 做好空白对照和阴性对照。

2 结果

2.1 *cry11A* 从质粒 pGEM1 亚克隆到大肠杆菌-蓝藻的穿梭载体 pRL25C.

将质粒 pGEM1 上含苏云金芽胞杆菌以色列亚种杀蚊晶体蛋白基因 *cry11A* 的 BamHI

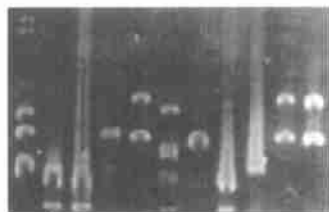


图 1 两种重组质粒的酶切检测

Fig.1 The examination of two kinds of recombinant plasmid by 0.7% agarose electrophoresis after being cut by enzymes

a. 载体质粒 pRL25C Vector plasmid pRL25C; b. 重组质粒 pSL05 Recombinant plasmid pSL05; c. 重组质粒 pSL15 Recombinant plasmid pSL15; d. λ DNA + HindIII; e. pGEM1 + BamHI; f. 载体质粒 pRL25C + BamHI Vector plasmid pRL25C + BamHI; g. 重组质粒 pSL15 + BamHI Recombinant plasmid pSL15 + BamHI; h. 重组质粒 pSL05 + BamHI Recombinant plasmid pSL05 + BamHI; i. 重组质粒 pSL05 + PstI Recombinant plasmid pSL05 + PstI; j. 重组质粒 pSL15 + PstI Recombinant plasmid pSL15 + PstI

1) 徐旭东, 鱼腥藻 (*Anabaena*) Cat 启动子探测载体的构建及质粒变异的研究, 中国科学院水生生物研究所博士学位论文, 武汉, 1991。



k j i h g f e d c b a

图2 阳性接合子鱼腥藻质粒的酶切检测

Fig.2 The examination of the plasmid of the positive conjugant *Anabaena* by 0.7%

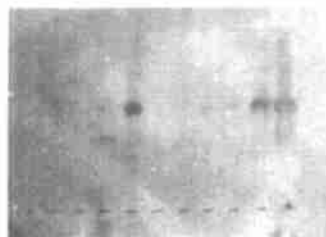
agarose electrophoresis after being cut by enzymes

a, b. 反转化子质粒 + BamHI The plasmid of the antitransformed *E. coli* + BamHI; c. AL05 的质粒 + BamHI The plasmid of AL05 + BamHI; d. AL15 的质粒 + BamHI The plasmid of AL15 + BamHI; e. 载体 pRL25C + BamHI Vector pRL25C + BamHI; f. 载体 pRL25C Vector plasmid pRL25C; g. 重组质粒 + BamHI Recombinant plasmid + BamHI; h. 重组质粒 Recombinant plasmid; i. 鱼腥藻质粒 + BamHI The plasmid of *Anabaena* + BamHI; j. 鱼腥藻质粒 The plasmid of *Anabaena*; k. λ DNA + HindIII

片段^[9]插入大肠杆菌-蓝藻的穿梭质粒载体 pRL25C^[10]的 BamHI 位点,能得到两种类型的重组质粒 pSL05 和 pSL15。两种重组质粒用 BamHI 单酶切,可得到同样的两条 DNA 带(图1, gh):小分子量带来自 pGEM1 上含 *cry11A* 基因的 BamHI 片段(图1, e),大分子量带来自 pRL25C(图1, f)。两种重组质粒的 PstI 单酶切图谱是不一致的(图1i, j),这是因为含 *cry11A* 基因的 BamHI 片断以相反的两种方向插入到 pRL25C 中。

2.2 *cry11A* 基因在鱼腥藻 PCC7120 中的克隆

重组质粒 pSL05 和 pSL15 转化到含 helper 质粒 pRL528 的大肠杆菌 HB101, pRL528 编码的甲基化酶 Aval 和 AvaII 对重组质粒进行修饰,修饰后的质粒进入鱼腥藻后就不会



k j i h g f e d c b a

图3 阳性接合子鱼腥藻质粒的 Southern blot 结果

Fig.3 The result of Southern blot of the plasmid

of the positive conjugant *Anabaena*

a—k(注解同图2)

被降解掉,同时, pRL528 上还含有 *mob* 基因,在三亲本杂交中驱动重组质粒进入到鱼腥藻 PCC7120。阳性接合子鱼腥藻 AL05 和 LA15 的总质粒 BamHI 酶切图谱(图2, c, d)及其反向转化子质粒的 BamHI 酶切图谱(图2, a, b)与重组质粒的 BamHI 酶切图谱是一致的(图2, g),而对照鱼腥藻的总质粒却无相应的反向转化子出现,其总质粒的 BamHI 酶切图谱(图2, i)也与重组质粒的(图2, h)不相同。经 Southern 杂交后,在阳性接合子鱼腥藻的总质粒及其反向转化子质粒的 BamHI 酶切图谱(图3, c, d 及 a, b)中都出现了与重组质粒相同的

阳性带(图3, g),而在对照鱼腥藻中没有这样的阳性带出现,以上表明, *cry11A* 基因在鱼腥藻 PCC7120 得以克隆。

2.3 *cry11A* 基因在鱼腥藻 PCC7120 中表达的检测

阳性接合子鱼腥藻总蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后作 Western blot,在与苏云金芽胞杆菌以色列亚种 *cry11A* 晶体蛋白(图4, a)相对应的位置上有阳性带出现(图4, b, c),而



d c b a

图4 阳性接合子鱼腥藻总蛋白与 *cryIIA* 蛋白抗体杂交Fig.4 The result of the hybridization of the total protein of the positive conjugant *Anabaena* and the antibody of *cryIIA* protein

a. 苏云金杆菌以色列亚种晶体蛋白 The crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; b. 阳性接合子鱼腥藻 AL05 总蛋白 The total protein of the positive conjugant *Anabaena* AL05; c. 阳性接合子鱼腥藻 AL15 总蛋白 The total protein of the positive conjugant *Anabaena* AL15; d. 鱼腥藻 PCC7120 总蛋白 The total protein of *Anabaena* PCC7120

对照鱼腥藻(图4, d)却没有这样的阳性带, 表明 *cryIIA* 基因在阳性鱼腥藻中得以表达。

2.4 生物测定

生物测定没有发现阳性接合子鱼腥藻对二龄库蚊幼虫的明显毒性。

3 讨论

3.1 将苏云金芽胞杆菌的杀蚊基因转到鱼腥藻中表达, 探索了将外源基因转入鱼腥藻的可行性技术, 为以后构建杀蚊固氮鱼腥藻的进一步工作打下了基础。

3.2 本次构建的转杀蚊基因鱼腥藻所以对蚊幼无毒, 可能有以下几个方面的原因: (1) 主要原因可能是带苏云金芽胞杆菌自身启动子的 *cryIIA* 基因在鱼腥藻中表达量不够高; (2) 也许重组质粒在鱼腥藻中的拷贝数比较低; (3) *cryIIA* 蛋白质在鱼腥藻中的稳定性问题。以后的进一步工作可在以上几个方面作改进。

参 考 文 献

- [1] Mulla M S. Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitos. In: Bacterial control of mosquitos and black flies. New Jersey: Rutgers University Press, 1990, 134—160
- [2] 孔任秋, 徐旭东, 胡玉祥. 高效灭蚊幼转基因蓝藻的研究. 中国寄生虫病防治杂志, 1992, 5: 184—186
- [3] de Marsac T, dela Torre F, Szulmaister J. Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Mol. Gen. Genet.*, 1987, 209: 396—398
- [4] Randy C M, Edward S. Stevens JR. Cloning and expression of the *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1992, 58(5): 1650—1665
- [5] Xu X D, Kong R Q, Hu Y X. High larvicidal activity of intact recombinant cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 expression gene 51 and gene 42 of *Bacillus sphaericus* sp. 2297. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, 107: 247—250
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning (2nd edition). New York: Cold press, 1980
- [7] 韩明, 喻子牛. 苏云金杆菌 *cryII* 基因的克隆和表达. 生物工程学报, 1995, 11: 167—172
- [8] Elhai J, Wolk C P. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Meth. Enzymol.*, 1988, 167: 747—754

- [9] Chang R H, Gill S, Federici B A. Nucleotide sequences of genes encoding a 72,000 molecular weight mosquitocidal protein and an associated 20,000 molecular weight protein are highly conserved in subspecies of *Bacillus thuringiensis* from *israelensis* and the *philipienes*. *Biochem, Systemat, and Ecol*, 1991, **19**(7): 599—609
- [10] Wolk C P, et al. Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. *J. Bacteriol.*, 1988, **170**(3): 1239—1244

PRELIMINARY STUDIES ON CLONING AND EXPRESSION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY11A GENE IN *ANABAENA*

Lu Songya, Liu Ziduo, Dai Jingyuan and Yu Ziniu

(Department of Microbial Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract The mosquito specific *cry11A* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* was cut out from pGEM1 with BamHI and ligated into the BamHI site of a *E. coli*-cyanobacterium shuttle vector pRL25C. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* HB101 which bears plasmid pRL528, a helper plasmid carrying *mob* and genes for Eco47II and AvaI methylase. Then three parents: *E. coli* HB101 (bearing the recombinant plasmid and helper plasmid pRL528), *E. coli* HB101 (bearing RP4) and *Anabaena* PCC7120 (a filamentous cyanobacterium which can fix nitrogen and can be fed by mosquito larvae in water) were put together to do triparent matings. Both Southern blot and Western blot demonstrated that the recombinant plasmid existed and expressed in the positive conjugant of *Anabaena* PCC7120. But the expression of the *cry11A* gene with its original promoter in transgenic *Anabaena* PCC7120 was too low to kill mosquito larvae.

Key words *Bacillus thuringiensis*, Mosquito-killing gene, *Anabaena* PCC7120