

苏云金芽胞杆菌菌株 YBT-1518 的插入突变体库的构建及芽胞萌发突变株的筛选*

巫益鸣 阮丽芳 彭东海 刘国强 孙明**

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 通过携带 Mini-Tn10 转座子的温度敏感性质粒载体 pIC333 构建了苏云金芽胞杆菌 YBT-1518 菌株的插入突变体库。从突变体库中筛选得到 1 株芽胞不能在萌发剂 L-丙氨酸诱导下萌发的突变株(命名为 MA1),进一步的试验表明该突变株菌株的芽胞在其他氨基酸 L-苯丙氨酸、L-缬氨酸和 L-亮氨酸以及糖类萌发剂葡萄糖、果糖和蔗糖的诱导下也都不能萌发,表明 MA1 很可能属于新型的芽胞萌发缺陷突变株。

关键词 苏云金芽胞杆菌; 转座子; 突变体库; L-丙氨酸; 芽胞萌发

中图分类号 S 182: Q 7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0577-05

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是革兰氏阳性菌。它的形态、培养特征和生化特性与蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, Bc)群的细菌有许多相似之处^[1]。目前,作为一种对人畜安全无毒、不污染环境的高效微生物杀虫剂,在害虫防治中发挥着重要的作用,其商品制剂的销售额占整个生物杀虫剂的 90%,还具有迅速而稳定增长的趋势,而大部分商品制剂有效成分都是胞晶混合物,从本质上来讲都属于芽胞制剂^[2-3]。因此,在使用的过程中芽胞的萌发效率直接影响其杀虫的持效期,从而影响其使用效率。

芽胞是芽胞杆菌属(*Bacillus*)和梭菌属(*Clostridium*)在饥饿或贫瘠营养条件下,由营养细胞被诱导形成的,休眠状态的芽胞呈圆形或椭圆形、具厚壁、内部含水量极低,在代谢上几乎是静止的,并且对热、辐射、干燥、极端 pH 及有毒物质表现出极强的抗逆性,是生物界抗逆性最强的生命^[4]。但是休眠状态的芽胞能够监测着外界环境,当外界条件适宜其生长时,芽胞开始萌发并最终生长成为营养体细胞,芽胞由休眠状态经过一系列复杂生理生化反应成长为营养体并恢复新陈代谢作用,这个过程称为萌发(germination),而刺激芽胞萌发的营养物质或是其他的外在因素则称为萌发剂(germi-

nants)^[5]。

近年来,以枯草芽胞杆菌为模式菌株,有关芽胞萌发的研究成为了研究热点,主要包括芽胞萌发相关受体基因、营养萌发途径和芽胞萌发信号传导等^[6-8]。有关芽胞杆菌营养萌发的研究较多,然而对 Bt 芽胞萌发的报道极少,本研究利用携带有 Mini-Tn10 转座子的质粒载体 pIC333 构建苏云金芽胞杆菌的突变体库^[9],而筛选芽胞在萌发剂诱导下不萌发的突变株,为寻找与鉴定其芽胞萌发相关基因奠定基础。本试验筛选得到 1 株在芽胞萌发表型上与野生菌株有显著差异的突变株,其芽胞在氨基酸类、糖类萌发剂的诱导下都不萌发,而先前报道的突变株一般只对某种或某一类萌发剂表现不萌发的表型^[10-11],MA1 极有可能属于新的芽胞萌发缺陷型突变株。

1 材料与方 法

1.1 菌株及质粒

Bt 野生菌株 YBT-1518 为笔者所在实验室分离的对北方根结线虫具有高毒力的菌株^[12]; pIC333,携带有 Mini-Tn10 转座子,在本试验中用于构建突变体的温度敏感型的自杀性载体,具有壮观霉素和红霉素抗性^[9]。

收稿日期:2009-06-03; 修回日期:2009-12-24

* 国家重点基础研究发展规划项目(“973”计划)(2009CB118902)、国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2006AA10A212)和国家林业局“948”计划(2006-4-14)资助

** 通讯作者. E-mail: m98sun@mail. hzau. edu. cn

巫益鸣,男,1982 年生,硕士研究生. 研究方向:苏云金芽胞杆菌分子生物学. E-mail: larkin0823@webmail. hzau. edu. cn

1.2 培养基

LB培养基:蛋白胨 1%;酵母粉 0.5%;NaCl 1%;pH 7.0~7.2,固体培养基添加 1.5%~1.8%的琼脂粉。

ICPM培养基:蛋白胨 0.6%,葡萄糖 0.5%,CaCO₃ 0.1%,MgSO₄·7H₂O 0.1%,K₂HPO₄ 0.05%,pH 7.0,固体培养基添加 1.5%~1.8%的琼脂粉。

1.3 试剂

各种限制性内切酶,DNA连接酶,碱性磷酸酶,DNA聚合酶,dNTP,各种DNA等均为TaKaRa公司产品;其余常规试剂和药品为上海生工和北京原平皓等公司产品。

1.4 苏云金芽胞杆菌的感受态细胞的制备

苏云金芽胞杆菌电转化感受态的制备参照Silo-Suh的方法^[13]并加以改进。具体步骤如下:

将苏云金芽胞杆菌过夜活化,按1/100的接种量转接至50 mL新鲜的LB培养液,于28℃以200 r/min的转速振荡培养至对数生长期;5 000 r/min离心5 min收集菌体,并用预冷的EP缓冲液(272 mmol/L蔗糖,15%甘油,5 mmol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄,5 mmol/L MgCl₂)洗涤菌体4次,最后一次重悬于1/100初始培养物体积的预冷的EP缓冲液中;每管100 μL分装感受态细胞于1.5 mL离心管中,存于-80℃备用。

1.5 苏云金芽胞杆菌的电转化

取75 μL感受态细胞,加入适量脱盐后的质粒DNA(体积≤2 μL),混匀后加入到0.2 cm电转化杯中,置冰上10 min;2.0~2.5 kV电击后迅速加入1 mL预热的LB培养基;28℃、200 r/min恢复培养1~2 h;取200 μL恢复培养物涂布含有100 μg/mL壮观霉素(Spec)和25 μg/mL红霉素(Erm)的LB抗性平板,于28℃培养12~16 h后挑取转化子。

1.6 转座子插入突变

突变体的构建主要按照Gominet等^[14]的方法并作适当改进,即挑取新鲜的转化子接种于含有红霉素抗性的50 mL的LB液体培养基中;28℃、200 r/min培养6 h;1/100稀释,转接于50.0 mL、无抗性的LB液体培养基中;42℃、200 r/min培养3~5代,约1.5~2.0 h;依次再转接2~3次;最后1次1/1 000转接,42℃、200 r/min培养;培养液稀释后分别涂布壮观霉素和红霉素抗性平板,对红霉素敏

感而对壮观霉素具抗性的则为突变子。

1.7 芽胞萌发表型缺陷菌株的筛选

1)芽胞的获得。Bt菌株于LB液体培养基过夜活化,取200 μL菌液直接涂布ICPM固体培养基的平板上培养48~72 h,当镜检芽胞形成率达到99%,用无菌的玻片从培养基上刮下菌苔(即为芽胞),并用去离子水悬浮,置于振荡器上振荡混匀,离心(12 000 r/min、5 min)收集芽胞,再用去离子水离心(12 000 r/min、5 min)洗涤至少5次,再将芽胞悬液置于80℃水中处理30 min以杀死营养体细胞,然后用芽胞萌发缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L NaCl,pH7.4)悬浮^[15],最后置于4℃冰箱中保存备用,每周更换1次缓冲液。

2)芽胞在萌发剂诱导下萌发表型缺陷菌株的筛选。首先热激活芽胞(芽胞悬于去离子水中75℃、15 min);将芽胞重悬于芽胞萌发缓冲液,并置于37℃、15 min预培养,再加入一定浓度的萌发剂,置于37℃孵育;将芽胞萌发液置于80℃下热激30 min,杀死营养体,保证萌发液中都是未萌发的芽胞;然后稀释并涂布壮观霉素抗性的LB平板,得到的即是可能的突变子,可重复上述步骤1次,则可初步筛选得到芽胞萌发表型缺陷的突变株。

2 结果与分析

2.1 转座重组菌的构建

将携带有Mini-Tn10转座子的质粒载体pIC333转化目标苏云金芽胞杆菌YBT-1518,获得了具有Spec和Erm抗性的重组子YBT-1519,其形态与野生菌菌落一致。将其进行连续传代后,仍然具有抗性,PCR检测显示该重组子含有载体中的1.7 kb的片段,表明重组子YBT-1519为携带有Mini-Tn10转座子的载体pIC333的YBT-1518菌株。

2.2 YBT-1518菌株转座子随机插入突变体的构建

含pIC333质粒的YBT-1518菌株的转化子YBT-1519在42℃下培养,由于pIC333质粒是温度敏感型,高于37℃则不能完成复制功能,因此高温条件可诱导Mini-Tn10转座子插入突变的发生。将高温诱导培养的YBT-1519菌液一定稀释度涂布壮观霉素抗性平板,然后从壮观霉素抗性平板上用牙签挑取单克隆分别点在相互对应位置的壮观霉素和红霉素抗性平板上,并置于28℃培养24 h,具有

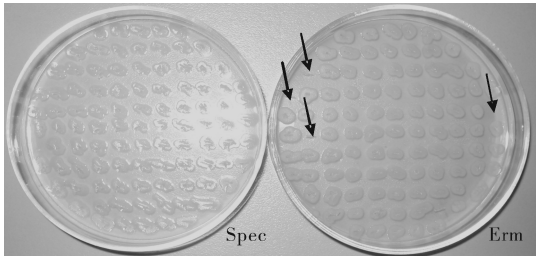


图 1 转座突变子的筛选

Fig. 1 Screen of mutants caused by transposon insertion 壮观霉素抗性、而对红霉素敏感的克隆子则为需要的突变子(图 1)。

本试验构建的突变体库的保存采用 2 种方法，一种是以单克隆形式保存，另一种是以高温突变的培养液直接保存，达到简化筛选特定表型突变株的需要，后续试验中芽胞萌发缺陷突变株的筛选则选用后一种形式保存突变体库。

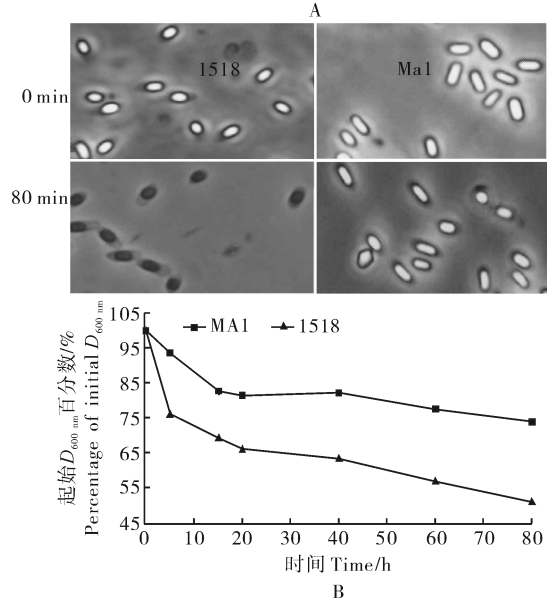
2.3 芽胞萌发表型缺陷菌株的筛选

1) 芽胞萌发试验初筛。通过在 L-丙氨酸(L-alanine, L-Ala) 诱导下的芽胞萌发实验，筛选得到 3 株在芽胞萌发表型上与野生菌株有显著差异的突变株，其表现为在 L-Ala 诱导下芽胞不萌发，而野生菌株的芽胞则能够萌发，将得到的突变株初步命名为 MA1、MA2、MA3。

2) 相差显微镜及 $D_{600\text{ nm}}$ 复筛。由于芽胞发生萌发后，其折光性发生改变(由折光性芽胞到非折光性营养体的变化过程)，故可以采用相差显微镜^[16]及 $D_{600\text{ nm}}$ 观察，通过相差显微镜的镜检观察及 $D_{600\text{ nm}}$ 的检测，对初筛得到的单克隆形式的突变株进行复筛，结果发现 MA2 和 MA3 突变株的芽胞在 L-Ala 诱导下能够萌发，而只有 MA1 的芽胞表现为萌发缺陷的表型。

由图 2 可知，野生菌株的芽胞在 L-Ala 的诱导下 80 min 后吸光值则下降了近 50%，镜检结果是芽胞大多萌发成为营养体，而突变株 MA1 的吸光值只下降了约 20%，镜检结果也表明多数芽胞仍处于芽胞状态。结果表明，突变株 MA1 的芽胞确实失去了在萌发剂 L-Ala 诱导下的萌发能力，而且在后期的观察中发现，突变株的芽胞在 37 °C 孵育时间超过 20 h 也仍然处于不萌发的状态(结果未给出)。

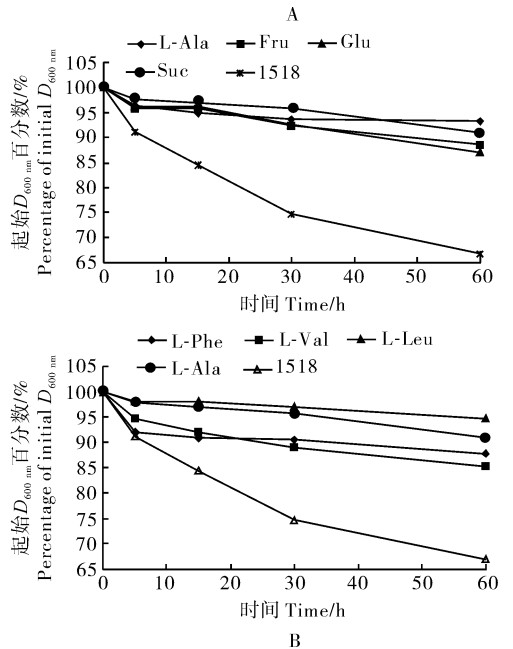
3) 突变株 MA1 在其他萌发剂诱导下的萌发情况。为了验证突变株 MA1 在其他种类萌发剂诱导下芽胞的萌发情况，选择了果糖(fructose, Fru)、蔗糖(sucrose, Suc)和葡萄糖(glucose, Glu)(图 3-A)



A. 相差显微镜观察结果 Spore germination observed under phase-contrast microscopy; B. $D_{600\text{ nm}}$ 的检测结果 $D_{600\text{ nm}}$ value of spore culture under germination induction.

图 2 突变株 MA1 芽胞在萌发剂 L-Ala 诱导下萌发情况

Fig. 2 The spore germination of mutant MA1 induced by L-Ala



A. 糖类物质诱导 Induced by sugars; B. 氨基酸类物质诱导 Induced by amino acids.

图 3 突变株 MA1 的芽胞在诱导萌发过程中 $D_{600\text{ nm}}$ 变化情况

Fig. 3 $D_{600\text{ nm}}$ values of mutant MA1 during spore germination by induction

以及除 *L-Ala* 外的其他氨基酸,本试验中选择了 *L-苯丙氨酸* (*L-phenylalanine*, *L-Phe*)、*L-缬氨酸* (*L-valine*, *L-Val*) 和 *L-亮氨酸* (*L-leucine*, *L-Leu*) (图 3-B) 诱导下芽胞仍然表现出不萌发的表型(萌发剂的浓度均为 50 mmol/L)。

试验结果显示,不能在萌发剂 *L-Ala* 诱导下突变株 MA1 的芽胞同样不能在本研究中选择的糖类物质以及其他氨基酸诱导下萌发,这说明突变株 MA1 与先前报道的突变株只对某种或某一类萌发剂表现出不萌发的表型不同,突变株 MA1 不仅对氨基酸类物质并且对糖类物质也表现出不萌发的表型,因此,该 MA1 很有可能是一类新的芽胞萌发缺陷型突变菌株。

3 讨论

pIC333 介导的 Mini-Tn10 转座子的随机插入突变技术已经在多种革兰氏阳性菌中应用:Gominet 等通过转座子 Mini-Tn10 构建苏云金芽胞杆菌突变体库的方法,鉴定参与多效调节因子 *plcR* 表达调控的基因,并得到 3 株 *plcR* 表达水平明显下降的突变株,然后通过测序鉴定出了参与 *plcR* 表达调控的基因^[14];Fedhila 等也是通过转座子 Mini-Tn10 构建苏云金芽胞杆菌突变体库的方法鉴定出了苏云金芽胞杆菌的营养细胞对家蚕幼虫感染毒力下降的相关的基因^[17]。转座子 Mini-Tn10 不仅在 *Bt* 中的功能基因的研究上体现出强大的功能,在枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*, *Bs*)、炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*, *Ba*) 和流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 等的功能基因的研究中也得到了很好的应用^[18-20]。

关于芽胞萌发的研究主要集中在 *Bs*、*Ba* 以及 *Bc* 上,而 *Bt* 芽胞萌发的报道极少,仅 Yan 和 Liang 等^[21,22] 通过 *alrA* 和 *iunH* 基因敲除的影响了芽胞的萌发表型,但芽胞萌发表型缺陷的突变株不是通过构建突变体库的方法筛选得到,更没有寻找并鉴定得到新的与芽胞萌发相关的基因。先前报道的大多数突变株只对 1 种或 1 类萌发剂表现出不萌发的表型,而本研究不仅用突变体库筛选得到了在 *L-Ala* 诱导下,芽胞不能表现出萌发表型的突变株 MA1,且 MA1 不仅仅是对 *L-Ala* 这一萌发剂表现出不萌发特性,而是对其他类型的萌发剂如 *L-Phe*、*L-Val* 和 *L-Leu* 等氨基酸,以及果糖、蔗糖和葡萄糖等糖类物质也表现出不萌发的特性,而故推测该突

变株被转座子 Mini-Tn10 中断的基因是新型的与芽胞萌发相关的基因。因此,突变株 MA1 值得进一步研究,如克隆转座子 Mini-Tn10 插入失活的基因并鉴定其在芽胞萌发过程中所起得的功能,为芽胞萌发机制研究提供新的理论。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛. 苏云金杆菌[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌制剂的生产和应用[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [3] 游红, 周兴苗, 徐家文, 等. 抗紫外线降解苏云金芽胞杆菌微胶囊剂的制备工艺[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(3): 281-285.
- [4] 周耘冰, 何志学. 细菌芽胞: 自然界抗性最强的生命体[J]. 陕西师范大学学报, 2006, 34(B03): 261-263.
- [5] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [6] ATLURI S, RAGKOUSI K, CORTEZZO D E, et al. Cooperativity between different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor[J]. J Bacteriol, 2006, 188: 28-36.
- [7] PAIDHUNGAT M, SETLOW P. Localization of a germinant receptor protein (GerBA) to the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores[J]. J Bacteriol, 2001, 182: 3982-3990.
- [8] IGARASHI T, SETLOW P. Interaction between individual protein components of the GerA and GerB nutrient receptors that trigger germination of *Bacillus subtilis* spores [J]. J Bacteriol, 2005, 187: 2513-2518.
- [9] STEINMETZ M, RICHTER R. Easy cloning of Mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome[J]. J Bacteriol, 1994, 176(6): 1761-1763.
- [10] GOULD G W, SALE A J. Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure[J]. J Gen Microbiol, 1970, 60: 335-336.
- [11] MOIR A, LAFFERTY E, SMITH D A. Genetics analysis of spore germination mutants of *Bacillus subtilis* 168: the correlation of phenotype with map location [J]. J Gen Microbiol, 1979, 111: 165-180.
- [12] YU Z, BAI P, SUN M, et al. A novel negative regulatory factor for nematocidal Cry protein gene expression in *Bacillus thuringiensis* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(6): 1033-1039.
- [13] SILO-SUH L A, LETHBRIDGE B J, RAFFEL S J, et al. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(6): 2023-2030.
- [14] GOMINET M, SLAMTI L, GILOIS N, et al. Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* *plcR* regulon and for virulence[J]. Mol Microbiol, 2001, 40:

963-975.

- [15] CLEMENTS M O, MOIR A. Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants[J]. J Bacteriol, 1998, 180(24): 6729-6735.
- [16] 鲁松清, 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌 CT-43 的芽胞萌发及芽胞和伴胞晶体的形成[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(1): 64-68.
- [17] FEDHILA S, GUILLEMET E, NEL P, et al. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* genes identified by *in vivo* screening of virulence factors [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 4784-4791.
- [18] CLIFTON S W, MCCARTHY D, ROE B A. Sequence of the *rec-2* locus of *Haemophilus influenzae*: homologies to comE-ORF3 of *Bacillus subtilis* and *msbA* of *Escherichia coli* [J]. Gene, 1994, 146(1): 95-100.
- [19] GOTTIG N, PEDRIDO M E. The *Bacillus subtilis* SinR and RapA developmental regulators are responsible for inhibition of spore development by alcohol[J]. J Bacteriol, 2005, 187(8): 2662-2672.
- [20] DAY W A, RASMUSSEN S L. Microarray analysis of transposon insertion mutations in *Bacillus anthracis*: global identification of genes required for sporulation and germination[J]. J Bacteriol, 2007, 189(8): 3296-3301.
- [21] YAN X, GAI Y, LIANG L, et al. A gene encoding alanine racemase is involved in spore germination in *Bacillus thuringiensis* [J]. Arch Microbiol, 2007, 187: 371-378.
- [22] LIANG L, HE X. The role of a purine-specific nucleoside hydrolase in spore germination of *Bacillus thuringiensis* [J]. Microbiology, 2008, 154: 1333-1340.

Construction of a Mutant Library of *Bacillus thuringiensis* Strain YBT-1518 and Screening of Spore Germination Mutants

WU Yi-ming RUAN Li-fang PENG Dong-hai LIU Guo-qiang SUN Ming

College of Life Science and Technology/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract An insertional mutant library of *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1518 was constructed with a thermo-sensitive plasmid pIC333 carrying Mini-Tn10. A mutant (named MA1) defective in germination response to *L*-alanine was isolated from the library by detecting with phase-contrast microscopy and $D_{600\text{ nm}}$. Further studies indicate that MA1 was defective in germination response to other amino acid (such as *L*-phenylalanine, *L*-valine and *L*-leucine) and sugars (such as glucose, sucrose and fructose), different from other reported mutants. Results indicate that MA1 is a new type defective in spore germination.

Key words *Bacillus thuringiensis*; transposon; mutant library; *L*-alanine; spore germination

(责任编辑: 张志钰)