

苏云金芽胞杆菌质粒 p26 复制功能区的克隆

季思思 朱义广 彭东海 阮丽芳 孙明

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 利用特异引物从基因组 BAC 文库筛选到 1 个 35 kb 的片段, 对该片段测序比对分析发现可能含有 p26 的复制区。为了验证该片段中是否含有 p26 的复制区, 首先, 将大肠杆菌和苏云金芽胞杆菌穿梭载体 pHT304 用 *EcoR* I 酶切切掉苏云金芽胞杆菌复制子后自连, 获得复制子克隆载体 pHT304E; 随后, 将 12 kb *EcoR* I 片段亚克隆到载体 pHT304E 上电转化无晶体突变株 BMB171, 获得具有抗性的转化子, 证明该片段具有复制功能。缺失实验证明最小复制功能区包含 2 个必需的 ORF。经过 40 代无抗培养, 最小复制区复制稳定性达到 90% 以上。

关键词 苏云金芽胞杆菌; 质粒; 特异引物; 细菌人工染色体文库; 克隆; 复制子; 缺失突变

中图分类号 Q 754 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0558-05

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 中包含着极其丰富的质粒资源, 而且这些内生质粒的拷贝数、复制方式及稳定性等也不相同。质粒的克隆为研究苏云金芽胞杆菌质粒的特性、功能及进化关系等方面的基础理论研究提供了丰富的遗传信息, 也为在质粒克隆的基础上构建出有效的遗传工程载体及构建高效广谱的工程菌提供了可能。

环状质粒的复制可以被分为滚环复制 (RC) 和 θ 复制 2 大类。RC 质粒分类是依据双链复制起点和复制起始蛋白的同源性来分类的^[1]。 θ 复制是根据它们的组织结构和在复制过程对宿主复制蛋白的需要来进行分类的^[2]。在苏云金芽胞杆菌中相继有一些 θ 复制的复制子被克隆和鉴定, 例如, 从苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种 HD263 的 3 个质粒 p43、p44 和 p60 分别克隆到各自的复制子^[3], 从苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种 HD73 分离到跟结合转移相关的广宿主质粒 pAW63, 并且对该质粒 4.1 kb 的复制子进行了分析验证^[4]。

pBMB165 是苏云金芽胞杆菌拟步行亚种 YBT-1765 中检测到的最大质粒, 它的复制和稳定性相关基因都被确定^[5]。最近, 在苏云金芽胞杆菌以色列亚种克隆到一种新型的复制子^[6], 由 2 个基因 *orf156* 和 *orf157* 组成, 其中, *orf156* 编码的蛋

白是一类 FtsZ/tubulin GTP 聚合酶超家族的马达蛋白, 可以在细胞内自聚合形成多聚体^[7]; *orf157* 编码的蛋白含有 HTH 保守结构域并可以和复制起始区域 (ORI) 特异性结合, 证明这是一个新型的质粒复制分离机制^[8]。

苏云金芽胞杆菌 YBT-020 属于幕虫亚种 (*sp. finitimus*), 具有晶胞粘连现象。在之前的研究^[9] 中发现, *cry26Aa* 定位在 1 个大约 200 kb (p26) 的质粒上, 而该质粒的复制模式还未知。本研究克隆得到苏云金芽胞杆菌幕虫亚种大质粒的最小功能域, 确定其最小复制区, 并分析该复制区的稳定性。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

本研究用到的菌株和质粒见表 1。

1.2 培养基、抗生素、工具酶及主要试剂

LB 培养基, 用于常规培养。

TSB 培养基: 胰蛋白胨 1.5%, 大豆蛋白胨 0.5%, 氯化钠 0.5%, pH 7.2。

选择性培养基中, 除特殊指明外, 各种抗生素的使用终质量浓度为: 氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 红霉素 (erythromycin, Erm) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 卡那霉素 (kanamycin, Kan) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

收稿日期: 2011-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3087066)

季思思, 硕士研究生, 研究方向: 芽胞杆菌分子生物学. E-mail: jisisi2003@yahoo.com.cn

通讯作者: 孙明, 博士, 教授. 研究方向: 微生物农药、芽胞杆菌分子生物学. E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

表1 质粒及菌株

Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株或质粒 Strain and plasmids	特征 Characteristics	来源或文献 Source or reference
YBT-020	野生型,具有晶胞粘连表型,幕虫亚种 Wild-type strain of <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>finitimus</i>	[9]
BMB171	无晶体突变株,库斯塔克亚种 AcrySTALLIFEROUS mutant of <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i>	[10]
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	基因克隆宿主菌 F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>deoR recA1 endA1</i> <i>hsdR17 (rk, mk+)</i> <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	笔者所在实验室保存 Stored in our lab
EPI300 TM	构建 BAC 文库宿主菌 Host strain for construction BAC library	Epicenter
pCC1BAC	BAC 文库构建载体, Cm ^R Plasmid for construction BAC library	Epicenter
pHT304	大肠杆菌苏云金芽胞杆菌穿梭载体, Amp ^R , Erm ^R <i>E. coli</i> and <i>B. thuringiensis</i> shuttle vector	笔者所在实验室保存 Stored in our lab
pHT304E	大肠杆菌载体 Amp ^R , Erm ^R <i>E. coli</i> vector, deletion derivative of pHT304	本研究 This work
pBAC275	pCC1BAC 插入 35 kb 片段, 该片段来源于 p26 pCC1BAC containing a 35-kb fragment of p26 containing <i>cry26Aa</i>	笔者所在实验室保存 Stored in our lab
pRep1	pHT304E 插入 12 kb <i>EcoR</i> I 片段, 该片段来源于 pBAC275 pHT304E containing a 12-kb <i>EcoR</i> I fragment of pBAC275	本研究 This work

各种限制性核酸内切酶、DNA 连接酶、碱性磷酸酶 (CIAP)、普通 *Taq*、*Ex Taq* DNA 聚合酶、dNTP 及各种 DNA 分子质量标准等均为 TaKaRa 公司产品; DNA 回收试剂盒为 Omega 公司产品, 用于从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段。

1.3 DNA 的常规体外操作与转化

DNA 的酶切、去磷酸化、连接等操作均按照供应商推荐的方法进行。大肠杆菌 CaCl₂ 感受态的制备与转化按照文献[11]的方法进行。

1.4 电转化

大肠杆菌电转感受态 EPI300 购买自 Epicenter, 转化方法按照说明书进行, 芽胞杆菌的电转感受态的制备与转化方法按照文献[12-13]的方法进行。电转化使用 GenePulserTM 电转化仪 (Bio-Rad)。

1.5 BAC 文库的构建和含有 *cry26Aa* 转化子的筛选

苏云金芽胞杆菌幕虫亚种 YBT-020 菌株 BAC 文库构建参照文献[14], 总 DNA 被包埋入低熔点琼脂糖胶中, 包埋块用 *Hind* III 不完全酶切后脉冲电泳分离。高分子质量的 DNA 用电泳洗脱仪回收, 回收得到的 DNA 片段和 *Hind* III 酶切且去磷酸化的载体 pCC1BAC 在 16 °C 连接超过 4 h, 挑取阳性克隆子保存文库。根据 *cry26Aa* 基因设计引物 p1: 5'-CAAGTGCAGGGATGAAAAC-3' 和 p2: 5'-CGCCATAACGGATCAAGTAG-3', 从文库中筛选含有 *cry26Aa* 的克隆子。

1.6 DNA 测序和分析

利用特异性引物从文库中筛选到 1 个含有 *cry26Aa* 基因的 35 kb 片段, 命名为 pBAC275, 把这个片段亚克隆到载体 pHT304 上, 用引物步移的方法测序。用 SeqMan 软件 (DNASTar) 组装序列, 序列比对分析用 NCBI 的 BLAST。

1.7 重组质粒的构建

将 pBAC275 中的 12 kb 的 *EcoR* I 片段连接到载体 pHT304E 上获得质粒 pRep1; 随后将该片段进行亚克隆构建一系列片段缺失突变体。

1.8 分离稳定性实验

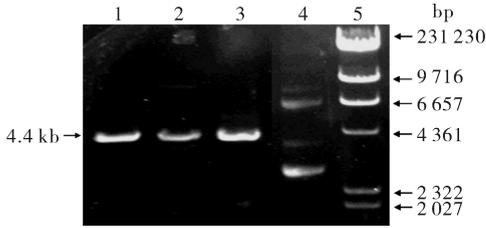
按照黄军艳等^[5]的方法, 将待测菌株接种到加入红霉素的 LB 培养液活化, 培养物每 8 h 按 1/1 000 接种量转接至新鲜 LB 液体培养基, 转接 3 次, 使传代次数达到 40 代以上。梯度稀释后取稀释度为 10⁻⁵~10⁻⁷ 的菌液涂布 LB 平板, 30 °C 培养, 待长出单菌落后, 挑取 100 个单菌落, 同时点种到抗性及无抗性 LB 平板观察其抗性是否丢失, 30 °C 培养后计算抗性菌落占总菌落的百分率。每个样品重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 复制子克隆载体 pHT304E 的构建

pHT304 为大肠杆菌和苏云金芽胞杆菌穿梭载体, 为了获得复制子克隆载体 pHT304E, 用 *EcoR* V 酶切切掉 pHT304 苏云金芽胞杆菌复制子后自连转化 DH5 α , 挑取转化子, 通过酶切进行验证 (图 1)

显示:经 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Hind* III 酶切,均可产生 4.4 kb 大小的片段,证明获得的转化子正确;进一步转化 BMB171,发现其不能在苏云金芽胞杆菌中复制,说明复制子克隆载体 pHT304E 构建成功。



1. *EcoRV* 酶切 Digested with *EcoRV*; 2. *Bam*H I 酶切 Digested with *Bam*H I; 3. *Hind* III 酶切 Digested with *Hind* III; 4. 抽提 pHT304E 质粒 Plasmid of pHT304E; 5. Marker λ (Digested with *Hind* III).

图 1 复制子克隆载体 pHT304 酶切验证
Fig. 1 The restriction analysis of replicon cloning vector pHT304

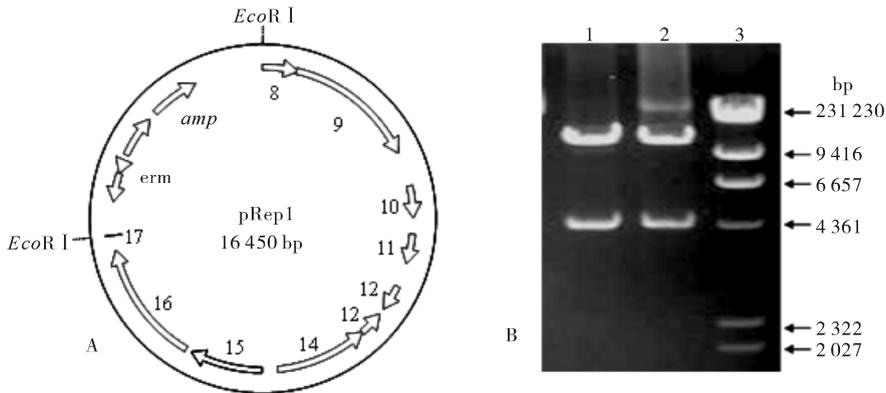
2.2 p26 复制子的克隆

pBAC275 测序拼接后大小为 35 216 bp, G+C 含量为 32.62%。生物信息学分析显示这个片段共编码 26 个大于 100 个氨基酸的 ORF, 其中 *orf* 14

编码 DNA 聚合酶的亚基, *orf* 16 编码解螺旋酶, 在前人研究^[1,15]中, 这 2 个蛋白与质粒复制相关, 为了证明这个区域是否具有复制功能, 将 12 kb 的 *EcoR* I 片段连接到克隆载体 pHT304E 上构建载体 pRep1, 物理图谱见图 2-A。pRep1 转化无质粒突变株 BMB171, 在含有红霉素的培养基筛选转化子, 对照 pHT304E 没有转化子长出, 说明这个 12 kb 的片段具有自主复制的能力。从转化子中提取 pRep1 酶切验证(图 2-B), 结果显示 pRep1 *EcoR* I 酶切产生 4.4 kb 和 12 kb 的条带, 说明转化子正确。

2.3 最小复制功能域的确定

为了确定 p26 的最小复制功能域, 选择从 12 kb 的 *EcoR* I 片段出发(基因组组成和排布见图 3), 通过截短获得一系列片段, 再将这些片段分别装载入 pHT304E 并电击转化苏云金芽胞杆菌无质粒突变株 BMB171 中检测其是否具有复制能力, 结果显示只有包含完整的 *orf* 15 和 *orf* 16 的片段才能够进行复制; 包含完整 *orf* 15 及部分 *orf* 16 的片段, 或者包含完整 *orf* 16 及部分 *orf* 15 的片段都是不能够复制的。基于以上结果, 确认质粒 p26 的最小复制区包含 2 个必需基因: *orf* 15 和 *orf* 16。



A: 质粒 pRep1 的物理图谱 Plasmid map of pRep1; B: 重组质粒 pRep1 的酶切电泳图谱 Agarose electrophoresis of digested plasmid pRep1; 1~2: 转化子 *EcoR* I 酶切验证 Digested with *EcoR* I; 3: λ DNA/*Hind* III marker.

图 2 重组质粒 pRep1 的物理图谱和酶切电泳图谱

Fig. 2 Plasmid map and agarose electrophoresis of digested plasmid pRep1

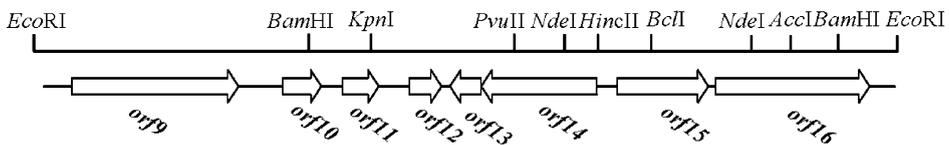


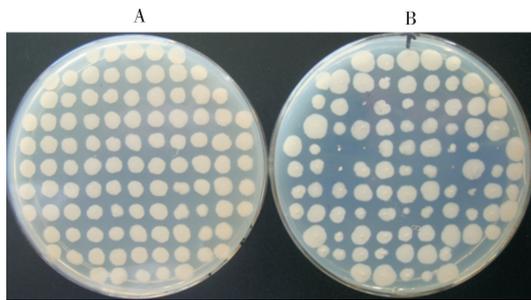
图 3 12 kb 的 *EcoR* I 基因组成和排布图

Fig. 3 Structural organization of the 12-kb *EcoR* I fragment

序列比对分析结果显示, *orf15* 编码 427 个氨基酸, 和已报道的具有复制功能的蛋白没有同源性, 但在蛋白内部含有 1 个螺旋-转角-螺旋 (HTH) DNA 结合域, 暗示 ORF15 可能是起到复制起始蛋白的功能; *orf16* 编码 719 个氨基酸和在蜡状芽胞杆菌群 (*Bacillus cereus* group) 中已报道的解螺旋酶具有 26% 的一致性, 但其 7 个保守结构域有较高的一致性, 推测 ORF16 应属于解螺旋酶超家族 I 的蛋白^[16]。

2.4 最小复制功能域的稳定性分析

用包含必需基因 *orf15* 和 *orf16* 的最小复制区验证质粒复制的稳定性 (图 4), 在无抗生素选择压力下培养 40 代后, 最小复制区表现出非常高的稳定性, 达到 90% 以上, 说明包含 ORF15 和 ORF16 组成的复制区除了具有复制功能外, 还可以维持复制的稳定性。



A: LB 平板 LB plate; B: LB+Erm 平板 LB plate added with Erm.

图 4 p26 最小复制区的稳定性检测

Fig. 4 The stability detection of minireplicon of p26

3 讨论

传统上主要是通过所携带质粒来区分苏云金芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) 和蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*), 苏云金芽胞杆菌携带的质粒编码的杀虫晶体蛋白是区别其他蜡状芽胞杆菌菌株的主要特征^[17], 随着测序技术的发展, 越来越多的蜡状芽胞杆菌群的基因组被测序, 基因组分析发现多数蜡状芽胞杆菌群大质粒上编码的基因中没有与已知的复制蛋白具有明显的序列一致性较高的基因, 比如 pBC210^[18] 和 pE33L466^[15]。

苏云金芽胞杆菌 YBT-020 含有 2 个大质粒, 以前的研究证明晶体蛋白基因 *cry26Aa* 定位在约 200 kb 的大质粒 p26 上^[9], 本研究设计特异性引物从构建的文库中筛选到 1 个 35 kb 的片段, 经测序、序列

比对分析发现在 *cry26Aa* 基因的附近区域可能存在 p26 的复制区, 通过构建的复制子克隆载体 pHT304E 从这个片段中成功克隆到 p26 的复制区, 由 *orf15* 和 *orf16* 两个基因构成。生物信息学比对发现在质粒 pBC210 和 pE33L466 都发现与 *orf15* 一致性较高的基因, 基因编码的产物与 ORF15 氨基酸序列一致性在 95% 以上, 推测在 p26 上的克隆的复制区为蜡状芽胞杆菌群大质粒采取的一种复制方式。

对于大质粒而言, 在细胞的分裂中需要一定的机制才能维持质粒的稳定遗传, 目前研究的结果表明维持质粒复制稳定的机制主要有 2 种, 毒素-抗毒素系统^[19] (自杀机制) 和质粒主动分离机制^[8]。稳定性实验表明最小复制功能域除了能够复制外, 还能维持质粒稳定遗传, 比对分析发现 ORF15 和 ORF16 并不包含自杀机制和主动分离机制的特征, 酵母双杂交实验表明 ORF15 可以自组装 (未发表资料), 推测 ORF15 在质粒分离中起主要作用。p26 最小复制区能够稳定复制并遗传, 可为开发大肠杆菌和苏云金芽胞杆菌克隆和表达载体提供材料。

参 考 文 献

- [1] KHAN S A. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research[J]. *Plasmid*, 2005, 53(2): 126-136.
- [2] KEARNEY K, FITZGERALD G F, SEEGERS J F. Identification and characterization of an active plasmid partition mechanism for the novel *Lactococcus lactis* plasmid pCI2000[J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(1): 30-37.
- [3] BAUM J A, GILBERT M P. Characterization and comparative sequence analysis of replication origins from three large *Bacillus thuringiensis* plasmids[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173 (17): 5280-5289.
- [4] WILCKS A, SMIDT L, OKSTAD O A, et al. Replication mechanism and sequence analysis of the replicon of pAW 63, a conjugative plasmid from *Bacillus thuringiensis* [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181 (10): 3193-3200.
- [5] HUANG J, GUO S, MAHILLON J, et al. Molecular characterization of a DNA fragment harboring the replicon of pBMB165 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 270.
- [6] TANG M, BIDESHI D K, PARK H W, et al. Minireplicon from pBtoxis of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(11): 6948-6954.
- [7] LARSEN R A, CUSUMANO C, FUJIOKA A, et al. Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis* [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(11):

- 1340-1352.
- [8] SCHUMACHER M A. Structural biology of plasmid partition: uncovering the molecular mechanisms of DNA segregation [J]. *Biochem J*, 2008, 412(1): 1-18.
- [9] JI F, ZHU Y, ZHANG R, et al. Promoters of crystal protein genes do not control crystal formation inside exosporium of *Bacillus thuringiensis* ssp. *finitimus* strain YBT-020 [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 300(1): 1-7.
- [10] HE J, SHAO X, ZHENG H, et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171 [J]. *J Bacteriol*, 2010, 192(15): 4074-4075.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] PENG D, LUO Y, GUO S, et al. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis* [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(6): 1849-1858.
- [13] 巫益鸣, 阮丽芳, 彭东海, 等. 苏云金芽胞杆菌菌株 YBT-1518 的插入突变文库的构建及芽胞萌发突变株的筛选 [J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(5): 577-581.
- [14] LIU X, PENG D, LUO Y, et al. Construction of an *Escherichia coli* to *Bacillus thuringiensis* shuttle vector for large DNA fragments [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(4): 765-772.
- [15] HAN C S, XIE G, CHALLACOMBE J F, et al. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis* [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(9): 3382-3390.
- [16] RUIZ-MASO J A, ANAND S P, ESPINOSA M, et al. Genetic and biochemical characterization of the *Streptococcus pneumoniae* PerA helicase and its role in plasmid rolling circle replication [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(21): 7416-7425.
- [17] SCHNEPF E, CRICKMORE N, VAN-RIE J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(3): 775-806.
- [18] RASKO D A, RAVEL J, OKSTAD O A, et al. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(3): 977-988.
- [19] VAN-MELDEREN L, SAAVEDRA D E, BAST M. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities [J]. *PLOS Genet*, 2009, 5(3): 4205-4211.

Cloning of a replicon of plasmid p26 from *Bacillus thuringiensis* strain

JI Si-si ZHU Yi-guang PENG Dong-hai RUAN Li-fang SUN Ming

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China

Abstract In this study, a 35-kb fragment was screened from the genome BAC library of a *Bacillus thuringiensis* strain with special primers. Sequence comparison of this fragment indicated that it contained a replicon of the plasmid p26. To test whether this fragment contain a replicon or not, a vector pHT304E that does not replicate in *B. thuringiensis* was constructed through deleting a 2.1-kb *EcoRV* fragment of pHT304 which containing the replication protein of *B. thuringiensis*. A 12-kb *EcoRI* fragment cloned with the probe of replication vector pHT304E revealed that it was capable of supporting the replication in *Bacillus* strain. The replication region of p26 was still stable after 40 generations under the nonselective condition.

Key words *Bacillus thuringiensis*; plasmid; special primers; BAC library; cloning; replicon; deletion mutation

(责任编辑: 张志钰)