

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/75

A01N 63/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00115955.0

[43] 公开日 2002 年 2 月 27 日

[11] 公开号 CN 1337466A

[22] 申请日 2000.8.15 [21] 申请号 00115955.0

[71] 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街

[72] 发明人 喻子牛 刘子铎 孙 明 邵宗泽

徐世瑾 江 昊 郑 嵘

[74] 专利代理机构 北京农林水专利代理有限公司

代理人 张红兵

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 一种构建苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的方法

[57] 摘要

本发明属于微生物杀虫农药技术领域,具体涉及一种构建苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的方法,其特点是,利用 PCR 技术从苏云金芽胞以色列亚种中克隆 p19, p20 两个辅助蛋白基因,通过基因工程方法构建具有特异毒力的工程菌,与已有技术相比,本发明提高了苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白的表达量,促进了晶体的形成,提高了杀虫效率,降低了生产成本。

ISSN 1008-4274

权利要求书

1、一种构建苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的方法，其过程包括 PCR，其特征在于所述的步骤包括：

1) 从苏云金芽胞杆菌以色列亚种中克隆出 p19、p20 两个与野生型菌株的基因型一致的辅助蛋白基因；

2) 将辅助基因进行限制性内切酶酶切，并连接到适当的载体上，使辅助基因能够在苏云金芽胞杆菌中正常表达；

3) 将含 p19、p20 的穿梭质粒分别电转化入野生型菌株；

4) 通过质粒图谱、PCR、DNA-DNA 杂交和聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选、鉴定转化子；

5) 通过摇瓶培养、生物测定筛选发酵性能优良、毒力高的转化子。

1、根据权利要求 1 所述的一种构建苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的方法，其特征在于步骤 3) 所述的方法包括：

以 272mM 蔗糖，15%甘油配制的溶液作为缓冲液，在 0.4cm 电脉冲杯中置 50-80 μ l 感受态细胞，加入质粒 5 μ l，采在 25 μ F, 200 Ω , 6.25-9KV/cm 的电脉冲条件下电击一次。

3、根据权利要求 1 所述的一种构建苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的方法，其特征在于步骤 4) 所述的方法包括：

以 1%D 蛋白胨，0.5%酵母粉，1%NaCl，pH7. 的培养液过夜培养活化菌种，再用活化菌液接种 (1/100) LB 培养液。待菌体生长至对数中期，收集菌体，TE(10mM Tris-Cl, 1mMEDTA, pH8.0) 洗菌一次，菌体悬于 100 μ l 溶液 I(50mM Glucose, 25mM Tris-Cl(pH8.0), 10mM EDTA)，加入 5-10 μ l 溶菌酶 (20mg/ml)，以后的操作按碱法质粒抽提进行。

4、根据权利要求 4 所述的一种构建苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的方法，其特征在于该步骤中的 PCR 的条件是：94 $^{\circ}$ C1 分钟，49 $^{\circ}$ C1 分钟，72 $^{\circ}$ C1 分钟，25 个循环。

6、根据权利要求 1 所述的种苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的构建方法，其特征在于所述步骤 5) 中的生物测定采用的培养基配方为：黄豆饼粉 4%，玉米淀粉 2%，鱼粉 1%，蛋白胨 0.1%，酵母粉 0.2%，KH₂PO₄ 0.1%，MgSO₄ · 7H₂O 0.07%，CaCO₃ 0.2%。

7、根据权利要求 1 所述的一种构建苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的方法，其特征在于所述的步骤 5) 中的发酵培养基配方为：碳源 5.0%、氮源 A 4.0%、氮源 B 2.0%、氮源 C 0.2%、生长因子 0.1%、KH₂PO₄ 0.2%、CaCO₃ 0.2%。

说明书

一种构建苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的方法

本发明属于苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的构建方法领域，与微生物农药基因工程方法有关。

苏云金芽胞杆菌是目前世界上应用范围最广泛的微生物杀虫剂。最初都是使用筛选的野生型菌株进行生产，随着分子生物学的发展，人们逐渐利用基因工程的手段对野生型菌株进行改造，如 Ecogen 公司利用结合转移的方法，将菌株 EG2158 中携带杀鞘翅目昆虫毒素基因 *cry3A* 基因的 88MDa 质粒转入 HD-263-8，所得到的新菌株 EG2421 带有含 *cry3A* 基因的 88MDa 质粒及本身带有的 60MDa 质粒上存在的 *cry1Ac* 基因。90 年代，随着电脉冲技术的成熟，人们可以直接将含有目的基因的质粒直接转入野生型菌株。1995 年，Ecogen 公司注册了以工程菌 EG7673 为生产菌株的生物杀虫剂 RAVEN，它含多拷贝重组 *cry3Ba* 基因质粒，能够产生异常高水平的 Cry3 杀虫晶体蛋白。

目前，国内外大多利用通过增加某种杀虫晶体蛋白基因的拷贝数来提高蛋白产量，但试验表明，苏云金芽胞杆菌细胞中杀虫晶体蛋白基因的拷贝数有一最大阈值，超过此值，蛋白的合成不再增加，而且苏云金杆菌的高毒力原于各种不同 *cry* 基因的协同作用，某种基因过量表达将抑制其它基因的正常表达。利用辅助蛋白的作用即可提高基因的表达，又不会在转录水平影响其它基因的表达。因此，现有的方法所构建的工程菌杀虫效率和生产成本都有待进一步提高。

本发明的目的在于克服现有技术之不足，利用帮助蛋白构建一种苏云金芽胞杀虫工程菌，以提高其杀虫晶体蛋白的表达量，促进晶体形成，提高杀虫效率，降低生产成本。

本发明通过以下技术方案实施：

一种苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌的构建方法，其过程包括 PCR，其步骤包括：

- 1) 从苏云金芽胞杆菌以色列亚种中克隆出 p19、p20 两个与野生型菌株的基因型一的辅助蛋白基因；
- 2) 将辅助基因进行限制性内切酶酶切，并连接到如穿梭质粒或解离载体上，使辅助基因能够在苏云金芽胞杆菌中正常表达；
- 3) 将含 p19、p20 的穿梭质粒分别电转化入野生型菌株；
- 4) 通过质粒图谱、PCR、Southern 杂交和聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选、鉴定转化子；
- 5) 通过摇瓶培养、生物测定筛选发酵性能优良、毒力高的转化子。

所述的含 p19、p20 的穿梭质粒及 p19、p20 基因与 *cry* 基因的穿梭质粒分别电转化入野生型菌株的方法包括：

以 272mM 蔗糖，15%甘油配制的溶液作为缓冲液，在 0.4cm 电脉冲杯中置 50-80 μ l 感受态细胞，加入质粒 5 μ l (约 1 μ g)。电脉冲采用 25 μ F, 200 Ω , 6.25-9KV/cm 的条件电击一次。

所述的通过质粒图谱、PCR、Southern 杂交(DNA-DNA 杂交)及聚丙烯酰胺凝胶电泳进行转化子的筛选与鉴定步骤包括:

以 1%D 蛋白胨, 0.5%酵母粉, 1%NaCl, pH7.的培养液过夜培养活化菌种, 再用活化菌液接种 (1/100) LB 培养液。待菌体生长至对数中期, 收集菌体, TE(10mM Tris-Cl, 1mMEDTA, pH8.0)洗菌一次。菌体悬于 100 μ l 溶液 I(50mM Glucose, 25mM Tris-Cl(pH8.0), 10mM EDTA), 加入 5-10 μ l 溶菌酶 (20mg/ml), 以后的操作按碱法质粒抽提进行。

所述的大肠杆菌的质粒抽提沿用常规的方法。

所述的 PCR 的条件是: 94°C1 分钟, 49°C1 分钟, 72°C1 分钟, 25 个循环。

所述的(DNA-DNA 杂交方法包括: 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), 具体转膜步骤和杂交及显色按常规方法。

所述的聚丙烯酰胺凝胶电泳方法包括: L₈培养基发酵液 200 μ l 离心, 沉淀用 1M NaCl 和无菌水各洗两次, 沉淀物再悬于 1ml 无菌水中, 取 100 μ l 与等量上样缓冲 (2 \times) 混合, 沸水中处理 3 分钟, 取 10-20 μ l 点样电泳, 溶液配制及其它具体操作按常规方法。

所述的摇瓶培养、生物测定筛选发酵性能优良、毒力高的转化子的步骤包括: 生物测定的培养基配方为: 黄豆饼粉 4%, 玉米淀粉 2%, 鱼粉 1%, 蛋白胨 0.1%, 酵母粉 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.07%, CaCO₃ 0.2%, 此为 L₈培养基。

小菜蛾和棉铃虫的生测方法按常规方法。

甜菜夜蛾生测方法按常规方法。但在感染饲料配方上调整为, 将防腐剂由尼泊金, 甲醛等换成醋酸 (终浓度 0.005%)。观察时间改为 72 小时。

所述的菌株发酵培养基配方为: 碳源 5.0%、氮源 A 4.0%、氮源 B 2.0%、氮源 C 0.2%、生长因子 0.1%、KH₂PO₄ 0.2%、CaCO₃ 0.2%。将上述培养基装量于 20ml/500ml 三角瓶, pH 值 7.0, 接种量 1%。

所述的培养条件为: 在 30°C下培养

按以上培养基与对照培养基在同一条件下比较, 本发明的培养基发酵效价达 4000IU/ μ l 以上, 比对照培养基提高了 8.7%。

本发明具有以下积极的效果: (1) 由于辅助基因可以解决菌株的高表达问题, 本发明利用辅助基因构建了一系列的苏云金芽胞杆菌杀虫工程菌, 如 BMB21882、BMB15358、BMB83383、YBT803-1-19, 表明发明在构建工程菌的过程中切实可行, 重复性好。经继代培养, 辅助基因能够在工程菌中稳定存在, 表达正常, 对受体菌的生长无重大影响。

(2) 利用 p20 构建的防治棉花和蔬菜害虫高效苏云金芽胞杆菌工程菌 WG-001, 其田间防治小菜蛾效果比美国 Abbott 公司产品 Dipel 提高 2.65 倍, 比化学农药 20%速灭杀丁 E C 提高 3.1 倍, 防治效果达 85%-90%。对棉铃虫的防治效果比 Dipel 提高 20%, 与 40%的甲胺磷的 800 倍稀释液的毒力相当, 防效在 80%-91%。

(3) 上述几个不同的工程菌的 LC50 值均有大幅度地提高。。

以下结合图表和实施例对本发明作进一步地说明:

本发明中 p19 帮助蛋白对野生菌株表达的影响:

表 1 受体菌 YBT803-1 和转化子 YBT803-1-19 对小菜蛾的毒力

菌 株	回归方程 $y=a+bx$	相关系数 r	$LC_{50}/\mu g.L^{-1}$
YBT803-1-19	$Y=0.948+2.126x$	0.9786	627.713
YBT803-1	$Y=0.292+2.477x$	0.983	1648.588

本发明中 p20 帮助蛋白对野生型菌株的影响:

表 2 天然菌株及其 pBMB1808 转化子伴胞晶体的大小

菌株/stain	YBT1520	BMB21882	YBT1535	BMB15358	YBT833	BMB83383
长/Length	1.85	2.45	1.76	2.34	1.87	2.39
宽/Width	0.8	1.06	0.75	1.12	0.80	0.95
长/宽 L/W	2.31:1	2.31:1	2.35:1	2.01:1	2.34:1	2.51:1
体积/V	0.39	0.92	0.33	0.98	0.24	0.72

*每种样品随机测量 30 个晶体; 长度单位为 μm , 体积单位为 μm^3 。

*pBMB1808 是含有 p20 基因的解离载体。

*BMB21882、BMB15358、BMB83383 分别是野生型菌株 YBT1520、YBT1535、YBT833 的含有 pBMB1808 的转化子。

表 3 天然菌株及其 pBMB1808 转化子对小菜蛾的毒力

菌株/strain	回归方程	LC_{50}	R
YBT1520	$y=5.87+1.43X$	0.249	0.96
BMB21882	$y=5.60+0.84X$	0.210	0.95
YBT1535	$y=6.14+1.72X$	0.214	0.97
BMB15358	$y=5.84+1.32X$	0.229	0.99
YBT833	$y=6.80+2.50X$	0.247	0.95
BMB83383	$y=5.66+1.45X$	0.339	0.92

*供试幼虫为三龄小菜蛾，供试样品为洗涤过的 PM 培养物的胞晶混合物。感染 48h 后统计死亡率。LC₅₀ 单位为μl/ml，指每 ml 中所含发酵液的μl 数。

表 4 天然菌株及其 pBMB1808 转化子对棉铃虫的毒力

/strain	回归方程	LC ₅₀	R
YBT1520	$y=3.58+1.14X$	2.941	0.97
BMB21882	$y=4.12+0.56X$	40.000	0.94
YBT1535	$y=4.33+1.71X$	2.457	0.97
BMB15358	$y=4.03+0.57X$	52.631	0.97
YBT833	$y=4.28+1.44X$	3.086	0.94
BMB83383	$y=4.00+0.89X$	12.500	0.91

*供试幼虫为初孵棉铃虫，供试样品为洗涤过的 PM 培养物的胞晶混合物。感染 72h 后统计死亡率。三次重复；LC₅₀ 单位为μl/ml，指每 ml 中所含发酵液的μl 数。