

用 PCR 法检测苏云金杆菌的溶原性噬菌体^{*}

廖 威^{1,2}, 宋少云¹, 陈维春¹, 薛清华¹, 孙 钊¹, 艾云灿¹, 庞 义¹

(1 中山大学生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275;
2 广西职业技术学院, 广西 南宁 530226)

摘 要: 根据苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* B. t) 溶原性噬菌体 G IL01 (GenBank Accession Number A J536703) 的同源序列设计一对引物, 用 35 株 B. t 标准菌株和生产菌株 MZ1 (血清型 H3a3b) 的过夜培养物作模板, 结果有 16 株菌株包括 MZ1 能扩增出大小约为 750 bp 的预期产物, 推测这 16 株菌为溶原菌。MZ1 菌株的过夜培养液与指示菌 ZK1 (血清型 H25) 混匀并在双层琼脂上培养 12 h 后出现了滴度为 2×10^7 pfu 的噬菌斑, 从而证明生产菌株 MZ1 确为溶原菌; 又以 G IL01 同源性较高的其它四个基因设计引物, 分别以 MZ1 的培养物及其溶原性噬菌体基因组为模板进行 PCR 扩增, 结果两者得到几乎一致的带型, 进一步证明了生产菌株 MZ1 为溶原菌, 说明利用 PCR 法检测鉴定苏云金杆菌的溶原性是可行的。比较指示菌方法、直接电镜法和 DNA 鉴定法, PCR 法快速简便, 对 B. t 生产上快速检测其溶原性噬菌体有实用意义。

关键词: 苏云金杆菌; 溶原性; 噬菌体

中图分类号: Q936 Q939 S476 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2006) 04 0079-04

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* B. t) 作为不污染环境而又高效的生物杀虫剂已经广泛地投入生产应用之中。在发酵生产中由溶原性噬菌体引起的发酵倒罐率轻者为 15% ~ 30%, 重者达 50% ~ 80%, 甚至导致工业的破产, 故溶原性噬菌体已成为 B. t 发酵工业的最大危害。溶原菌广泛分布于自然界中, 苏云金杆菌有 80% 是溶原菌^[1]。

检测细菌的溶原菌最常使用的方法是指示菌, 该方法简便可靠, 使用广泛, 但是寻找指示菌需要大量的工作, 且有一定的偶然性; 也可以将菌株诱导液直接用电镜观察噬菌体颗粒, 但此法需要一定浓度和纯度的噬菌体, 低浓度时不一定能够检测得到, 且需时较长^[2]。为了弥补以上方法的不足, 本文报道了使用 PCR 方法快捷地检测苏云金杆菌的溶原性噬菌体, 此研究既能为生产上防治溶原性噬菌体提供科学依据, 又能为研究其分子生物学和生理学准备了试验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 35 株苏云金杆菌标准菌株以及指示菌 ZK1 (血清型 H25) 为本实验室保藏, 来自巴斯德研究所; 生产菌株 MZ1 (血清型 H_{3a3b}) 由广东

梅县某公司提供。

1.1.2 培养基 LB 肉汤培养基, 按余茂效方法配制^[3]。

1.1.3 主要试剂与药品 Mitomycin C 和 Taq 酶购自 Roche 公司; DNA maker 购自 Promega 公司; 限制性内切核酸酶 *E* ω RI 和 *Hind* III 均购自 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 苏云金杆菌的纯化方法 平板划线法去除杂菌, 按诸葛健的方法进行^[4]。苏云金杆菌夹带噬菌体的去除方法: 取一环菌株斜面培养物, 悬浮到 3 mL LB 液体培养基中, 悬浮液水浴 80 $^{\circ}$ C, 20 min 后上摇床培养过夜, 作为 PCR 反应的模板。

1.2.2 引物及 PCR 反应^[5] 根据 Mahillon 发表的噬菌体 (GenBank 登录号为 A J536703) 基因序列中同源性较高的 5 个基因设计出五对引物 (表 1), 其中 P4 引物用于扩增 35 株标准菌株和生产菌株 MZ1, 所有引物用于 MZ1 及其溶原性噬菌体基因组 DNA 的扩增。PCR 的反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 48 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 生产菌株培养液的诱导 纯培养物接种 LB 肉汤, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜; 以 1% 的接种量转接到

^{*} 收稿日期: 2005 09 19
基金项目: “十五” 国家科技攻关计划资助项目 (2001BA708B07 - 03)
作者简介: 廖威 (1964 年生), 男, 博士, 通讯联系人: 庞义; E-mail ls12@zsu.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 用于检测 *B.t* 溶原性的 PCR 引物
Tab. 1 List of the primers used for PCR

序号	基因位置	引物 1	引物 2
P1	ORF1	AATTGTCCAGTTTA TTTTTA TTTTCCA	ATGAG TTAAAAACGAACAAG CG TTTT
P2	ORF5	AAGAAA CTTAATTCACCTAATAG TTC TTTC	ATGATGACTACTACTAATAGAAAAAAGCGT
P3	ORF6	TAACAACTGGATGGCTCTAGGTCTTTG	ATGTTGACGCCAAGGGAACAGGATACGTTA
P4	ORF25	ACTTGCTTCAACTTGTCTGTTTAG TTTG	ATGG CTTTAGATG TTAGA CCATTTCATA
P5	ORF30	TAAATA TTCA CCTTCCACAT	ATGGG TGTAATAGCTGATTT

新鲜 LB 肉汤中，培养 8 h 至生长对数期；加入 M itmycin C 至终质量浓度为 0.5 μg mL，继续振荡培养 4 h 4 000 r/min 离心 20 min，上清液经 M illipore (0.45 μm) 滤膜除菌，滤液即可用指示菌来检测其中有无噬菌体感染性颗粒的存在。

1.2.4 用指示菌检测生产菌株溶原性噬菌体的方法 双层琼脂制作法按 Adams 方法进行^[6]；噬菌体滴度的测定法按余茂效和司樨东方法进行^[3]。

1.2.5 生产菌株溶原性噬菌体 DNA 的抽提及其酶切鉴定方法 噬菌体的分离和纯化方法按 Sambrook 的方法进行^[7]。平板冲洗液噬菌体的纯化方法按 Lazarevic 的方法进行^[8]。平板冲洗液噬菌体核酸的直接提取方法按 Mahillon 的方法进行^[9]。噬菌体核酸酶切及电泳方法按奥斯伯的方法进行^[10]。

1.2.6 检测生产菌株溶原性噬菌体的方法 结合

DNA 鉴定法，采用 5 条引物进行 PCR 扩增检测生产菌株溶原性噬菌体，即以生产菌株 MZ1 的噬菌体基因组 DNA 和 MZ1 的过夜培养物作为模板，用表 1 的 5 对引物同时作 PCR 的反应，条件和操作同方法 1.2.5。

2 结 果

2.1 P4 引物的 PCR 扩增结果

以 P4 引物扩增 35 株标准菌株和生产菌株 MZ1 所得的 PCR 反应结果见图 1。在 36 株菌株中有 16 株菌株（包括 MZ1）能扩增出 750 bp 左右的预期大小的片段，说明这些菌株的基因组中含有与所设引物的溶原性噬菌体基因相同的序列，这 16 株菌株可能是溶源菌，*B.t* 细菌染色体中可能携带有噬菌体基因组。

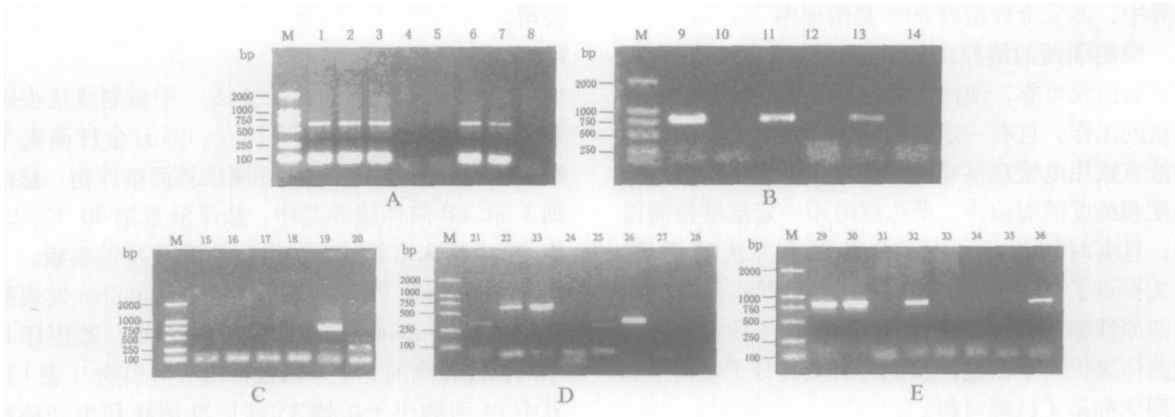


图 1 35 株 *B.t* 标准菌株和生产菌株 MZ1 的 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 1 PCR products of *B. t* standard strains and strain MZ1

No. 1 – 35 (A B C D E): standard strains No. 36 (E): strain MZ1

1. *H₂₇ finitus* 2. *H₈₈ ostrinae* 3. *HM9 toworthi* 4. *H₇ thuringiensis* 5. *H_{3a3b} kurstaki* 6. *H₁₂ thompsoni* 7. *H₁₄ israelensi* 8. *H_{4a4} kenya* 9. *H₃₂ cameroun* 10. *H₆ entomocidus* 11. *H₃₃ leesii* 12. *H₇ aizawai* 13. *H₂₅ coreanensis* 14. *H_{8a8} morrisoni* 15. *H_{10a10b} damstadensis* 16. *H_{11a11b} toumanoffi* 17. *H₁₅ dakota* 18. *H₁₆ indian* 19. *H₃₅ malaysiensis* 20. *H₁₇ thokuensis* 21. *H₂₁ colmeri* 22. *H₃₈ oswaldocruzi* 23. *H₄₉ huazhongensis* 24. *H_{24a24b} neoleonensis* 25. *H₂₇ mexicanensis* 26. *H₃₁ toguchini* 27. *H₃₅ seoulensis* 28. *H₃₇ andaluciensis* 29. *H₄₂ jinghongiensis* 30. *H₄₃ guiyangiensis* 31. *H₄₁ sooncheon* 32. *H₄₇ wntiskiviensis* 33. *H₄₄ higa* 34. *H₄₆ chanpaisi* 35. *H₄₈ bakarica*

经克隆测序，所得片段的基本序列如下：

ATGGCTTTAGATGTTAGACCATTCATAAACGAC
GCCAACGAATCCAAAAAGAAACAGGAATCCC
TGCTTCTATTA TTCTAGGTCAAA TGGTCTTTGAA
TCTAGTGGTAGCAACCCCGGTGGAATG TCCGGA
CTTGCCATAACTCGAAAAA TTTATT TGGTATCA
AAGGTGTAGGACCTGCCGGGACAACGA CTGTAT
GGTCAATGGAATACGACAAAGGTGGTGGACGTG
TTTCCGGA TTCCGGAAA TACAATTCTTA TTACGA
ATCCA TGCTTGACCA TGCACGACTCTTACAAAC
ACCGCGCTATGCTTCCCAACTACAAAACGCGAA
AACATTGAGGATTTTCGCGCGCGGATTAAGGC
GGGCGGATACGCAACTGACCCGAATTATGCGGG
GCAACTGATTCTATA TTAATAACAAAA TGGATTA
GATAAGTACGACGGCGGACGCCATACACCGGA
GAAGGAAGCGTTCTCTGCTGGTGGAGGGAGTGAT
AAACGTGGAATATTACAAGCGTCGCTAATGGTG
TCA TTCGTGCTTGCTTA TTCTA TTGGCTTTTGTGG
CTTGTTTCTCTTTTGTCCAAGGCA TTCCCGCAA
GTGGAAGCTACGGCAAAGAGTGGAGCAAAGAAA
GTTACAAAGTCTTCCCACGATCTAAGGGATATA
AAAAAGTAAACCGAAAGGCGGTGCTACGAATG
GCGGAAGTACAGGGACTCAAACTAAACGACAAG
TTGAAGCAAGTATATGA

2.2 生产菌株培养液的诱导及指示菌检测溶原性噬菌体的结果

生产菌株 MZ1 经 Mitomycin C 诱导得到诱导液后，取 5 μL 该诱导液和 200 μL 指示菌 ZK1 的过夜培养物混匀后铺在已经有下层培养基的培养皿上，28℃ 培育 12 h 结果出现了大量的噬菌体斑：斑点透明，形状圆形，边缘整齐，直径约为 3 mm (图 2A)。经计算，滴度为 2×10^7 pfu。由此可见，生产菌株能被诱导释放出噬菌体感染颗粒，随后该颗粒感染指示菌并增殖直至裂解指示菌而成为斑点。故生产菌株 MZ1 可鉴定为溶原菌，这与 PCR 的结果相符，从而证明 PCR 检测结果的正确性。

2.3 生产菌株溶原性噬菌体 DNA 的提取及其酶切鉴定结果

诱导的离心上清液经 Millipore (0.45 μm) 滤膜除菌，滤过后加 RNA 酶和 DNA 酶分别至终质量浓度为 20 μg/mL；37℃ 水浴 30 min 加入 $w = 10\%$ PEG 6000 和 0.5 mol/L NaCl 4℃ 过夜，离心去上清，沉淀物用 pH 7.5 0.01 mol/L TE 缓冲液配成悬液，用 TE 饱和的苯酚抽提 2~3 次，再用乙醚萃取残留的苯酚，减压去除乙醚，用冷乙醇沉淀，-20℃ 过夜，离心去上清液，沉淀物溶于 TE

缓冲液中，取样进行 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切。琼脂糖电泳结果显示噬菌体的基因组，其大小约为 15 kb 左右 (图 2B)。

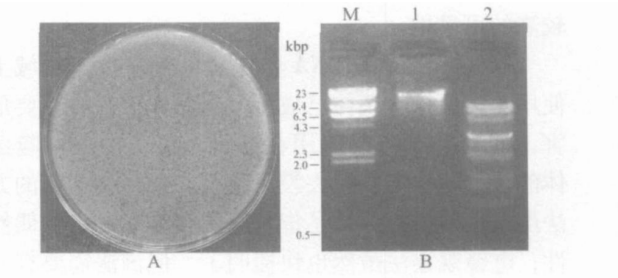


图 2 MZ1 噬菌体斑点及其基因组酶切图谱
Fig. 2 Plaque from MZ1 and its phage genomic restriction map
A: plaques from MZ1 B: phage genome and its fragments with *HindIII* *EcoRI* (M: *HindIII* - lambda DNA marker; lane 1: phage genome; lane 2: enzymosis of phage genome)

2.4 PCR 方法检测生产菌株溶原性噬菌体的结果
以 5 条引物同时扩增生产菌株 MZ1 及其噬菌体基因组 DNA 模板，结果显示两种模板的扩增带型基本一致 (图 3)，说明 MZ1 的染色体中含有与噬菌体 GIL01 某些序列相同的片段，可能是溶原性噬菌体整合在菌株的基因组中，由此既证明了生产菌株为溶原菌，又进一步说明了 PCR 检测方法的可行性。

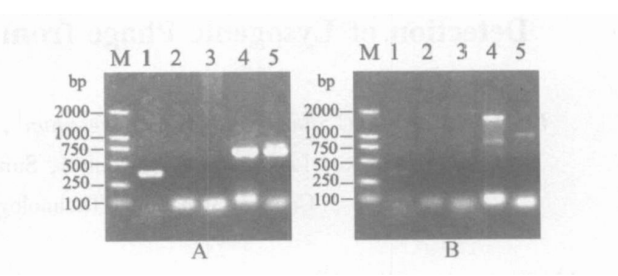


图 3 噬菌体基因组及菌株 MZ1 培养液的 PCR 扩增产物的电泳图谱
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products from phage DNA and MZ1

A: phage DNA; B: MZ1; lane
M: Marker DL2000 lane 1-5: P_1 P_2 P_3 P_4 P_5

3 讨 论

在本研究中，快速 PCR 方法是以 *B. t* 的培养液为模板进行扩增的，而噬菌体 DNA 的 PCR 反应是以生产菌株的溶原性噬菌体 DNA 为模板进行扩增的。前者快捷后者费时，但后者更能说明问题。指示菌法能直接证明生产菌株 MZ1 的溶原性，与用快捷 PCR 方法扩增得出来的结果相吻合，说明

快捷 PCR 扩增法对检测鉴定生产菌株以及其它 *B. t* 菌株为溶原菌是可行的; 并且从对生产菌株过夜培养液及从中提取得到的噬菌体 DNA 作为模板的 PCR 扩增电泳结果中可以看出, 快捷 PCR 方法有较高的可靠性。

PCR 作为一种 DNA 鉴定法已经在很多领域上使用。溶原性噬菌体已成为 *B. t* 发酵工业的首要危害, 将 PCR 的方法应用在苏云金杆菌溶原性噬菌体的快速鉴定上, 过去未见报道。使用指示菌的方法虽然简便灵敏, 但是指示菌的获得有一定的偶然性; 电镜观察法虽然也快捷明了, 但该方法需要有一定浓度和纯度的噬菌体, 并且受设备条件的限制; 而噬菌体完整 DNA 的检测方法则需耗费较长时间提取噬菌体的核酸。PCR 法只需通过 3 h 的扩增反应, 就能提供灵敏而可靠的信号, 并从分子水平上区分噬菌体的种类。因此, 本研究有一定的理论及实际生产意义。

参考文献:

- [1] 喻子牛. 苏云金杆菌 [M]. 北京: 科学出版社, 1990
- [2] 王家驹, 朱素娟, 戈宝秦, 等. 检测噬菌体 DNA 法鉴别细菌的溶原性 [J]. 微生物学报, 1985 25 (3):

250 - 254

- [3] 余茂效, 司樛东. 噬菌体实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [4] 诸葛健, 王正祥编著. 工业微生物实验技术手册 [M]. 北京: 中国轻工业年鉴社, 1994
- [5] 张建琼, 张雪萍, 林陵, 等. 应用 PCR 方法直接从噬菌体原液中扩增目的基因片段 [J]. 南京铁道医学院学报, 2000 19 (1): 17 - 20
- [6] ADAMS M H. Bacteriophages [M]. New York Interscience publishers Inc 1959
- [7] SAMBROOK J T, DAV D W R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] LAZAREVIC V. Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SP β c2 [J]. Microbiol 1999 145: 1055 - 1067
- [9] CELNE V, GERT J, JACQUES M. pG IL01: a linear infectious phage originating from *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis [J]. Microbiol 2003 149: 2083 - 2092
- [10] 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998 29 - 69

Detection of Lysogenic Phage from *Bacillus thuringiensis* by PCR Method

LIAO Wei^{1,2}, SONG Shao-yun¹, CHEN Wei-dun¹, XUE Qing-hua¹, SUN Fan¹, AIYun-can¹, PANG Yi¹

(1. State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

2. Guangxi Vocational Technology College, Nanning 530226, China)

Abstract According to one conserved sequences of phage G IL01 from *Bacillus thuringiensis* (*B. t*), a pair of primers was designed. With overnight cultivations of 35 *B. t* standard strains and one fermentative strain MZ1 as templates, PCR results showed that 16 strains which may be lysogenic strains produced the product with the size about 750 bp as anticipated. Among them strain MZ1 had been confirmed a lysogenic strain by indicator strain ZK1 after producing phage plaques induced by Mitomycin C. Two templates of overnight cultivation and its DNA from strain MZ1 were then amplified in the same time with five pairs of primers designed from the same phage and the same products were obtained, suggesting that strain MZ1 was also confirmed a lysogenic strain by PCR method. Compared with other methods to detect *B. t* lysogeny, PCR is simpler and less time consuming. In particular, it is a practical method for the quick detection in *B. t* fermentation.

Key words *Bacillus thuringiensis* (*B. t*); lysogeny; bacteriophage