

苏云金芽胞杆菌的遗传多样性

I. 遗传标记及其应用^①

张宏宇^{1,2}, 曾晓慧², 邓望喜¹, 喻子牛²

(1. 华中农业大学植物保护系; 2. 华中农业大学农业部农业微生物重点实验室, 湖北 武汉 430070)

Genetic Diversity of *Bacillus thuringiensis*

I. Genetic Marker and Its Application

ZHANG Hong-yu^{1,2}, ZENG Xiao-hui², DENG Wang-xi¹, YU Zi-niu²

(1. Dept. of Plant Protection, Huazhong Agricultural University;

2. Key Lab. of Agri-Microbiology, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China)

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0253-9772(1999)06-0059-62

苏云金芽胞杆菌自 1901 年发现以来, 经过近一个世纪的研究, 其制剂成为目前世界上产量最大的微生物杀虫剂, 据统计, 世界苏云金芽胞杆菌制剂占微生物杀虫剂总量的 90%~95%^[1]。全世界已收集保藏的苏云金芽胞杆菌达 40 000 株^[2], 杀虫活性谱剧增, 除对鳞翅目昆虫有活性外, 相继发现对双翅目(1977 年)、鞘翅目(1983 年)、线虫(1988 年)、原生动物(1989 年)、扁形动物、蛛形纲(1990 年)及昆虫纲的膜翅目、同翅目(1993 年)敏感的苏云金芽胞杆菌菌株, 具有丰富的表型多样性, 同时也反映其存在丰富的遗传多样性。遗传多样性的测度即遗传标记是复杂的。恰当的遗传标记应当是随机选取, 既能反映生物遗传组成, 又能准确体现物种内个体间的遗传变异, 主要包括蛋白质多样性和 DNA 多样性二方面^[3]。真核生物的群体遗传学研究已有相当历史, 但细菌群体遗传学因为其属于无性繁殖, 群体数量大, 世代时间短, 个体间遗传交换, 基因重排方法包括接合、转导、转化、质粒转移和重组及转座等非常复杂, 乃是一个新的领域。早期主要集中于大肠杆菌和志贺氏菌 (*Shigella spp.*) 的群体遗传学研究而获得一些有关细菌遗传多样性的信息。随着分子生物学及其相关技术的发展, 细菌遗传多样性研究越来越多, 其遗传标志也越来越丰富, 具体包括 DNA 多态性, RNA 多态性, 蛋白质多态性三方面^[4]。本文将综述苏云金芽胞杆菌遗传标记及其应用。

1 酶多态性

生物不同个体, 同一个体不同组织或生长发育不同阶段存在一系列功能相同但结构上不同的酶即同功酶 (Allozyme 或 Isozyme), 其不同个体变异性大, 电泳图谱具有遗传稳定性, 早在 1962 年, Norris 就用淀粉凝胶电泳的方法分析了不同来源的苏云金芽胞杆菌脂酶电泳图谱, 鉴定其与其它芽胞杆菌的区别。Barjac 等(1973)^[5]、张用梅等(1983)^[6]、喻子牛(1983)^[7]等先后进行苏云金芽胞杆菌脂酶电泳图谱分析, 并将当时的 21 个苏云金芽胞杆菌 H-血清型共 30 个亚种分为 24 个酯酶型。且同一 H 血清型的不同生化亚种如猝倒亚种和松蜀亚种表现出不同的酯酶型, 反映出苏云金芽胞杆菌酯酶遗传上的多样性。80 年代后期主要集中多酶电泳 (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MEE) 分析, 根据一种基因一种酶的理论, 种间酶的种类和组成的一致性无疑揭示了它们

①收稿日期: 1998-12-03; 修订日期: 1999-04-15

基金项目: 本文得到国际科学基金(IFS, Sweden)的资助

作者简介: 张宏宇(1965-), 男, 湖南祁东人, 博士学位, 副教授, 专业方向: 杀虫微生物。

的亲缘关系^[8]。它为不同血清型或其它表型特征间的遗传变异分析提供了一个基本的群体遗传框架,反映出编码代谢酶特定遗传位点上基因的多样性,并能用直观的遗传图将其变异清晰表达出来,因此,它成为遗传多样性分析的一种很有用的分子标记^[9]。Baptist(1978)^[10]分析 88 株芽胞杆菌多酶电泳图谱,发现 5 株苏云金芽胞杆菌不同于其它芽胞杆菌。Carlson 等(1994)^[11]用 MEE 方法分析了包括 12 株苏云金芽胞杆菌 24 株蜡状芽胞杆菌共 36 株芽胞杆菌的 15 个编码酶的染色体基因的多样性,将 36 株划分为 27 个类型,这与苏云金芽胞杆菌血清型并不完全一致。Helgason 等(1997,私人通讯)通过 MEE 分析了 150 株苏云金芽胞杆菌,4 株蜡状芽胞杆菌中编码代谢酶的 13 个结构基因位点的等位基因的多样性,并将这些菌株划分为 112 个电泳类型(ETs),但不同血清型菌株常归为相同 ETs 型,表明 H-血清型与 ETs 型的不一致性。

2 基因组 DNA 及其片段多态性

DNA 及其片段多态性直接反映基因组 DNA 或 RNA 的变异,而反映生物个体间自然亲缘关系。随着技术的发展,使这类多态性研究成为可能,并得到完善和迅速发展^[4]。

2.1 G+C mol%

DNA G+C mol%是经典遗传分析方法之一,是细菌分类的重要指标之一。一般细菌种内个体间 DNA G+C mol% 的差异不超过 3%,属内种间不超过 10%;细菌群体内变化为 24%~76%^[12]。Kaneko(1978)^[13]、Baptist 等(1978)^[10]、Priest(1981)^[14]等测定了苏云金芽胞杆菌 G+C mol%,变化范围在 35.7%~37.0%,表明了苏云金芽胞杆菌群体中不同菌株 DNA G+C mol%组成仍存在一定差异,表现出基因组 DNA 碱基组成丰富的多样性。

2.2 DNA 同源性

上述所述的 G+C mol%只反应 DNA 链中不同类型的碱基的相对比例,反应其碱基组成上的差异,而不能反应碱基的排列序列。生物体则都是以特定的碱基序列来贮存其遗传信息。不同生物其碱基顺序差别越小,亲缘关系越近,反之亦然,且细菌 DNA 中碱基顺序是稳定的,不受菌龄和除突变 DNA 以外的环境因素的影响,因此通过不同来源菌株 DNA 碱基顺序同源性,即 DNA-DNA 分子杂交分析可有效识别其间的变异程序^[15]。苏云金芽胞杆菌群体遗传研究中, Priest(1981)^[14]、Somerville 等(1972)^[16]、Seki 等(1978)^[17]、Nakamura(1994)^[18]等先后测定了苏云金芽胞杆菌不同血清型,不同亚种间 DNA 的同源性。表明苏云金芽胞杆菌作为一个种 DNA 同源性 60%以上,遗传关系密切,且同时反映出血清型与 DNA 同源关系并不完全一致,和苏云金芽胞杆菌群体内个体间 DNA 碱基顺序仍存在明显差异。

2.3 低频限制性片段分析(low-frequency restriction fragment analysis)

具体方法是先用识别 6~8 个碱基序列,切点少的限制性内切酶(RFLP-般用酶则识别 4~6 碱基序列)消化基因组 DNA,以减少 DNA 片段数,然后进行脉冲凝胶电泳,染色后分析菌株间 DNA 片段图谱差异^[4]。这种方法目前被认为是鉴别 DNA 变异最灵敏的方法之一^[19,20]。由于酶切点少的限制性内切酶消化后, DNA 片段过大,一般琼脂糖电泳技术无法将之分开,因此这种方法是建立在脉冲凝胶电泳(PFGE)技术基础上。

Carlson 等(1992; 1993; 1994)^[11,21,22]通过系统研究表明,两种酶的结合能够将所有待测菌株分开,即每个菌株都有其独特的酶切电泳图谱,即使是属于同一个 ETs 型的达姆斯塔特亚种 HD146 和莫里逊亚种 HD12 也表现出明显不同的 *NotI* 酶切图谱,说明苏云金芽胞杆菌基因组存在一个有利基因交换的不稳定区,表现出待测菌株间丰富的遗传多样性。同时,不同电泳图谱中存在许多大小一致的 DNA 片段,又说明了不同菌株间基因组 DNA 另一部分是相似的,表现出苏云金芽胞杆菌基因组 DNA 的稳定性和保守性。

2.4 限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLPs)

Grodziker(1974)用此方法首先研究了腺病毒温度敏感突变株,并把它用作遗传标记,其后得到迅速发展。其应用已渗透到遗传学研究的许多领域,如人类遗传病的基因定位、基因诊断、遗传图谱、植物遗传育种等。RFLPs 分析关键是探针的选择。一是以高变区域(hypervariable)作为探针进行 RFLP 分析,将产生复杂的

RFLP 杂交带谱, 具有个体特异性, 适宜作为个体指纹图谱分析^(23, 24)。在另一些研究中, 采用高度保守序列作探针进行苏云金芽胞杆菌 RFLP 分析, 其 RFLP 杂交带图谱相对简单, 适宜作为遗传标记, 建立遗传图谱。Miteva(1990)⁽²⁵⁾ 用 M13DNA 检测苏云金芽胞杆菌中存在高变的核苷酸序列, 随后用 M13DNA 作探针; Priest 等(1994)⁽²⁶⁾ 用来自枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 16S rRNA 基因的克隆片段作探针; Akhurst 等(1997) 用来自苏云金亚种 F1.0 菌株的 16S rRNA 的克隆片段作探针, 对不同血清型的菌株进行了 RFLP 分析。结果表明苏云金芽胞杆菌菌株间基因组 DNA 存在明显差异, 表现出苏云金芽胞杆菌群体遗传多样性, 同时证实了用菌株基因组 DNA 中重复序列, 高变区域, 如 M13DNA 作探针比用保守区域, 如 16S rRNA 作探针产生更复杂的 RFLP 图谱, 前者表现出菌株特异性, 后者虽然相同亚种内部分菌株间出现差异, 但主要表现在亚种间的特异性, 因此, 前者更适合于菌株遗传多样性分析, 后者则更适合于菌种的遗传标记。

2.5 随机扩增的 DNA 多态性(Randomly Amplified Polymorphic DNAs, RAPDs)

自 1985 年美国 PE-cetus 公司人类遗传研究室 Mullis 等人发明 PCR 以来, PCR 技术在基因分离、克隆、核酸序列分析、重组体构建、基因表达调控研究等多方面得到广泛应用, 并在此基础上发展用于不同目的系列方法。其中 AP-PCR (Arbitrarily primed PCR) 是 Welsh⁽²⁸⁾ 和 Williams⁽²⁹⁾ 两个研究组几乎同时(1990)建立起来的一种新的分子标记方法, 与 PCR 所不同的是使用一组较短的碱基顺序随机排列, 通常为 10 聚体的扩增引物, 这些引物扩增产物组合被 Williams 称为 RAPDs 标记。由于 RAPDs 使用的是一系列碱基序列不同的扩增引物, 结合于基因组 DNA 序列不同位点, 对整个基因组 DNA 序列进行检测, 如果基因组的结合区域发生 DNA 片段的插入, 缺失或碱基突变而导致结合位点的改变, 而引起扩增产物的增加, 减少或发生分子量的改变而形成反映生物体整个基因组的 DNA 的多态性。该方法的优点是 (1) 样品量少, 灵敏度高, 一般仅需 25ng, 而 RFLPs 要求 5 μ g DNA 量, 因此不需要大量抽提和纯化 DNA; (2) 不要特殊的基因文库作探针, 同时避免使用 RFLPs 普遍使用的同位素, 操作安全; (3) 不需要知道模板 DNA 序列任何信息; (4) 快速简便; (5) 试验费用较低。Brousseau 等(1993) 将之用于苏云金芽胞杆菌遗传多样性研究, 首先用苏云金芽胞杆菌菌株 HD-1 基因组 DNA 为模板对 G+C mol% 分别为 30、45、60、90% 的 4 组共 120 个随机引物扩增分析, 以筛选用于 RAPDs 分析的合适的引物, 然后从其中挑选 3 个引物对待测的 30 个血清型苏云金芽胞杆菌进行扩增, 结果表明, 苏云金芽胞杆菌不同血清型的菌株产生不同的 RAPDs 图谱, 即用它作为遗传标记, 不同血清型菌株表现出明显的遗传差异, 且 cry-H_{3a3b} 突变株与出发菌株有着完全相同的扩增产物电泳图谱。此外库斯塔克亚种中含多个质粒的 HD-1 与质粒数较少的 HD-73 的扩增产物少了一条 1.5kb 的弱带。因此可以认为, 苏云金芽胞杆菌质粒 DNA 对 RAPDs 分析影响不大, RAPDs 能够作为苏云金芽胞杆菌遗传多样性研究的有效手段。

2.6 PCR-RFLP 多态性分析

正如上述 PCR 技术和 DNA 限制性酶切分析方法都已广泛用于生物的遗传学研究, 并在此基础上建立了相应的群体遗传学研究的分子标记 RAPDs 和 RFLPs, 为生物群体遗传多样性研究提供了切实可行的有效手段。随着研究的不断深入, 这些指标已被有机结合用于系统分类, 成为一种新的遗传标记即所谓扩增 DNA 限制性片段分析, 被用于基因多态性分析。其原理是先进行 DNA 体外扩增, 即 PCR, 然后用一组限制性内切酶消化扩增产物, 以检测其多态性。Priest 等(1994)⁽²⁶⁾ 用 Sau 3A 消化来源不同的以色列亚种 130kDa 杀虫晶体蛋白基因扩增产物, 都产生与序列分析相一致的 5 条带, 即 717、555、432、249 和 186/180bp, 说明 cryVA 基因及其邻近 DNA 高度保守。Kuo 等(1996)⁽³¹⁾ 用 2 个 cry 通用引物分析了 320 个苏云金芽胞杆菌菌株中 cry 基因的多态性, 共获得 14 个特异的基因型, 反映出待测菌株中具有丰富的 cry 基因多态性。

参 考 文 献:

- (1) 张宏宇, 李中奎, 喻子牛. 转苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因抗虫植物的研究与商品化[J]. 生物技术通报, 1997, (3): 13~15.
- (2) Lambert B. Peferoen, Marnit Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*[J]. Bioscience, 1992, 42(2): 112~122.

- (3) 马克平. 试验生物多样性的概念[J]. 生物多样性, 1992, 1(1): 20~22.
- (4) Vandamme P, Pot B, Gillus M *et al.* Polyphasic Taxonomy a Consensus Approach to Bacterial[J]. Systematics Microbiol Rev, 1996, 60(2): 407~438.
- (5) Barjac H de et, A Bonnefoi Mise au point Sur la. Classification des *Bacillus thuringiensis*[J]. Entomphaga, 1973, 18: 5~17.
- (6) 张用梅, 陈宗胜, 库竹, 兰鹤, 王牧牧. 与苏云金杆各H-血清型相同但不产生晶体的芽胞杆菌的生化特性, 脂酶型和毒力的比较[J]. 华中农学院学报, 1983, (2): 42~47.
- (7) 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌的脂酶型[J]. 华中农学院学报, 1983, (4): 55~63.
- (8) 喻子牛主编. 苏云金杆菌[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- (9) Selander R K, A Dominique. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for Bacterial Population Genetics and Systematics[J]. Appl Environ Microbiol, 1986, 51(5): 873~884.
- (10) Baptist J N, M Mandel, R L Gherna. Comparative zone electrophoresis of enzymes in the genus *Bacillus*[J]. Int J Syst Bacteriol, 1978, 28: 229~244.
- (11) Carlson C R, D A Caugant, A-B Kolst Φ . Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains[J]. Appl Environ microbiol, 1994, 60(6): 1719~1725.
- (12) Stackebrandt E, W Liesack Nucleic Acids and classification. In M. Good fellow and A. G. O' Donnell(ed.), Handbook of new bacterial systematics[M]. Academic Press Ltd, London, 1993, p. 151~194.
- (13) Kaneko T R Nozaki, K Aizawa. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis* *Bacillus cereus*. and *Bacillus thuringiensis*[J]. Microbiol Immunol, 1978, 22: 639~641.
- (14) Priest F G. DNA homology in the genus *Bacillus* In The Aerobic Endospore forming Bacterial: classification and identification (R. C. W. Berlecey and M. Goodfellow eds)[M]. Academic Press, 1981, p. 37~57.
- (15) 林万明主编. 细菌分子遗传学分类鉴定法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989.
- (16) Somerville H J, Jones M L. DNA competition experiments within the *Bacillus cereus* group of *Bacillus*. J. Gen. Microbiol[J]. 1972, 73: 257~265.
- (17) Seki T. C-K Chang, H Midkami, Oshima Y. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*[J]. Int J Syst Bacteriol, 1978, 28: 182~189.
- (18) Nakamura L K. DNA Relatedness among *Bacillus thuringiensis* serovars[J]. Intern J Syst Bacteriol, 1994, 44(1): 125~129.
- (19) Maslow J N, M E Mulligan, Arbeit R D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganism[J]. Clin Infect Dis, 1993, 17: 153~164.
- (20) Tenovar F C, Arbeit R D, Goering R V *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33: 2233~2239.
- (21) Carlson C R, Gronstad A, A-B Kolst ϕ . Physical maps of the genomes of three *Bacillus cereus* strains[J]. J Bacteriol, 1992, 74: 3750~3756.
- (22) Carlson C R, A-B Kolst Φ . A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome[J]. J Bacteriol, 1993, 75: 1053~1060.
- (23) Jeffray A, Wilson V, Thein S. Individual specific fingerprints of human DNA[J]. Nature, 1985, 316: 76~29.
- (24) Miteva V I, Abadjieva A, Rosa Grigorova. Differentiation among strains and serotypes of *Bacillus thuringiensis* by M13 DNA fingerprinting[J]. J Gen Microbiol, 1991, 138: 593~600.
- (25) Miteva V I, Abadjieva A N, Ivanov P I, Grigorova R T. M13 bacteriophage DNA as a probe for DNA fingerprinting in Gram positive microorganisms[J]. Syst Appl Microbiol, 1990, 13: 150~353.
- (26) Priest F G, Kaji D A, Rosato Y B *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms[J]. Microbiology, 1994, 140: 1015~1022.
- (27) Akhurst R J, Wlyness E, Zhang Q Y, *et al.* A 16S rRNA Gene oligonucleotide probe for identification of *Bacillus thuringiensis* isolates from sheep fleece[J]. J Invertebr Pathol, 1997, 69: 24~31.
- (28) Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(24): 7213~7218.
- (29) Williams J G K, Ubelik A R K. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531~6535.
- (30) Brousseau R, *et al.* Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *B. thuringiensis* serovars and strains[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(1): 114~119.
- (31) Kuo W S, Chak K F. Identification of novel Cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 1369~1377.