



技术主题

Technology Feature

脉冲场凝胶电泳分析 Bt 菌质粒谱的方法

周燕^{1,2}, 黄飞燕^{1,2}, 李莉^{1,2}, 赵从², 朱锦天²

✉ 通讯作者: Crystal.Z.Chow@gmail.com ✉ 作者

1 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学生命科学技术学院, 南宁, 广西, 中国

2 海南省热带农业资源研究所, 三亚, 海南, 中国

基因组学与生物技术, 2014 年, 第 3 卷, 第 2 篇 doi: 10.5376/gb.cn.2014.03.0002

本文首次以英文发表在 Bt Research, 2014, Vol.5, No.1 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

引用格式: Zhou, 2014, Protocol for Analyzing Plasmid Profiles of *Bacillus thuringiensis* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Bt Research, 2014, Vol.5, No.1, 1-4 (doi:10.5376/bt.2014.05.0001)

摘要 Bt 菌株一般含有 1 个到 10 多个大小不等的质粒, 分子量在 10 Kb 至 600 Kb 以上不等。Bt 菌株的质粒谱特征是鉴定 Bt 菌株的重要依据。用常规的电泳凝胶方法分离分子质量大于 25 Kb 的质粒 DNA 分子是很难的, 而脉冲场琼脂糖电泳技术(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)分离鉴定质粒谱的理想选项之一。PFGE 的原理主要是利用有规律的改变电场方向和大小, 从而使大分子 DNA 得以分离。我们通过对 10 个 Bt 菌株大质粒的分离鉴定的基础上提出了本实验方法, 利用本 PFGE 实验方法能对 Bt 菌株质粒的数量、大小以及单个大质粒的分离获得理想的实验结果。

关键词 *Bacillus thuringiensis*; 脉冲场凝胶电泳; 质粒谱

Protocol for Analyzing Plasmid Profiles of *Bacillus thuringiensis* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Yan Zhou^{1,2}, Feiyan Huang^{1,2}, Li Li^{1,2}, Cong Zhao², Jintian Zhu²

1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Life Science and Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, China

2. Hainan Tropical Agricultural Resources Institute, Sanya, Hainan, China

✉ Corresponding author, Crystal.Z.Chow@gmail.com; ✉ Authors

Abstract *Bacillus thuringiensis* commonly contains 1 to 10 plasmids with different molecular weights ranging from 10 Kb to more than 600 Kb. The characteristic plasmid profile of Bt strain is an important basis for distinguishing Bt strains. It is very hard to separate plasmid DNAs with molecular mass greater than 25 Kb by using conventional gel electrophoresis method, whereas the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) is one of the more ideal methods for separating and identifying the plasmid profiles. The principle of PFGE relies on taking advantage of regular changes in direction and size of electric field which enable the separation of high molecular weight DNAs. We proposed the experimental protocol based on the separation and identification of plasmids in 10 Bt strains. Ideal experimental results regarding the number and size of plasmids as well as the isolation of single large plasmid were achieved using PFGE protocol.

Keywords *Bacillus thuringiensis*; Pulsed field gel electrophoresis (PFGE); Plasmid profile

引言

Bacillus thuringiensis, 简称 Bt, 是革兰氏阳性、芽孢形成菌, 归属到芽孢杆菌属的 *Bacillus cereus* sensu latu 亚组。*Bacillus cereus* sensu latu

亚组包含 *B. Cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, 和 *B. weihenstephanensis* 六个成员组成, 与 *Bacillus cereus* 亚组其他成员相比, 这些菌株的显著不同之处在于质粒数量、功能的不同。Bt 菌株一般含有数个大小不等的质粒, 分子量均在 10 Kb 至 600 Kb 以上不等(Wang, 2011)。研究表明大多数 Bt 伴胞晶体蛋白的编码基因定位于大质粒上。

收稿日期: 2014 年 05 月 15 日

接受日期: 2014 年 06 月 11 日

发表日期: 2014 年 06 月 18 日

由于普通的琼脂糖电泳只能分析 DNA 分子质量小于 25 kb 的 DNA 分子, 因此, 要分离分子质量大于 25 kb 的质粒 DNA 分子, 理想的选择是脉冲场凝胶电泳(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)。PFGE 是利用两个交变电场交替地开启和关闭, 使 DNA 分子泳动方向随着电场的变化而发生改变, 其独具的高分辨力使其广泛应用于生物基因组结构的研究。

我们通过对 10 个 Bt 菌株大质粒的分离鉴定的基础上提出了本实验方法, 利用本 PFGE 实验方法能对 Bt 菌株质粒的数量、大小以及单个大质粒的分离获得理想的实验结果。

1 仪器设备及操作

本研究使用的主要实验仪器是美国 BIO-RAD 公司的 CHEF Mapper® XA Pulsed Field Electro- phoresis System, 是目前脉冲场凝胶电泳中应用最广泛的 CHEF 装置, 可分离高达 7 000 kb 的 DNA 分子, 包括电泳槽、动力系统、可变速率泵和冷却系统。该装置有三对电极, 提供了一个相当均一的电场, 使凝胶中所有的条带都是直线前移, 从而为针对胶槽边缘及无效电极的扭曲提供了解决方法。

操作规程如下:

- (1)检查冷凝系统, 确认管道连接密封, 不漏气。
- (2)在电泳槽中加入约 2.2L 合适体积的电泳缓冲液。
- (3)接通主机和冷凝泵电源, 开启主机开关, 主机自检结束后开启冷凝系统开关按“set temp”键调节需要的电泳温度, 按“actual temp”显示实际温度, 调节泵的速度为“100”左右。
- (4)将加好样的凝胶连同底座一起放入电泳槽内的黑色背景处, 要保证电泳液超过胶面 1-2mm, 将冷凝泵速度调节至“50”, 以防凝胶被冲走。
- (5)在主机上设置电泳程序(最简单的办法是按“auto algorithm”键, 设置欲得到的线性范围的最大和最小 kb 值, 确认所有给出参数), 按“start”键进行电泳。此时可观察到电泳槽内电极开始出现气泡。
- (6)电泳开始, “high voltage”灯亮, 此时切不可打

开电泳槽盖进行操作, 以免发生触电危险。

(7)电泳结束, “high voltage”灯灭, 依次关掉冷凝系统、主机开关, 然后取出凝胶, 最后清除使用过的电泳液, 再用蒸馏水冲洗电泳液循环系统, 晾干。

一般情况下, 1~3 步在电泳前半小时进行。

2 培养基、化学试剂及配置

本实验使用的 Seakem Gold Agarose 由 Cambrex 公司生产, Agarose III、十二烷基肌氨酸钠(SLS)、苯甲基磺酰氟(PMSF)购于上海生工生物工程有限公司, 氯化钠、乙二胺四乙酸、异丙醇等购于国内其他生物试剂公司。

- (1) LB 培养基配方及制备参照 Zhou 等(Zhou et al., 2013)。
- (2) Solution A: 2 M NaCl 50 mL, 100 mM Tris-cl (pH 7.5)50 mL
- (3) Solution B: 10 mM EDTA(pH 8.0); 25 mM Tris-cl (pH 8.0); 2% Lysozyme; 75 µg/mL RNAase
- (4) ESP: 0.5 M EDTA (pH 8.0); 1% SLS; 1 mg/mL 蛋白酶 K
- (5) TE (含 1 mM PMSF): 10 mM Tris-cl (pH 7.5); 1 mM EDTA (pH 8.0); 1 mM PMSF
- (6) TE: 10 mM Tris-cl (pH 7.5); 1 mM EDTA (pH 8.0)
- (7) 10 mM PMSF: 1 mg PMSF 溶于 1mL 异丙醇中, 分装并放于-20℃储存(注意: PMSF, 剧毒, 小心使用)。
- (8) 10× TBE Buffer: 108 g Tris 碱; 55 g 硼酸; 40 mL 0.5M EDTA, pH 8.0
- (9) Agarose III (脉冲场电泳琼脂糖): 用电泳缓冲液配制成 1%的凝胶, 微波炉中加热使其溶解
- (10) Seakem Gold Agarose: 使用浓度为 1%, 配制方法同 9

3 实验流程

3.1 琼脂糖包埋法提取大质粒

参考Carlson方法(Cathrine and Anne-Brit,

1993), 并在样品模块制备中加入溶菌酶以利于细胞裂解这方面做了改进, 具体步骤如下:

- (1) 将菌种活化于装有 10 ml LB 培养基的指形瓶中, 30°C, 230 r/min, 摇床过夜培养。
- (2) 转接 1 ml 活化菌液于 20 ml LB 培养基(250 ml 锥形瓶装)中, 30°C, 230 r/min, 摇床继续培养至菌液 OD_{600 nm}=0.6 左右。
- (3) 将培养液冰上放置 10 min, 4°C, 5 000 g, 离心 30 min。
- (4) 弃上清, 沉淀悬浮于 10 ml Solution A 中, 洗涤 1 次, 4°C, 5 000 g, 离心 10 min, 弃去上清, 沉淀重悬于 1 ml 预冷的 Solution A 中。
- (5) 1.6%的低熔点琼脂糖(用 Solution A 配制, 加入溶菌酶至 25 μg/ml), 保存于 42°C, 与以上得到的沉淀悬液等量混合后, 将混合液转移至模具中, 模具一个孔最大的容量为 80 μL, 将模具置于 4°C 至凝固。
- (6) 把样品模块(长 1.0 cm×宽 0.5 cm×高 0.1 cm)置于 4 ml Solution B 中, 50°C, 150 r/min, 24 h。
- (7) 用移液枪移去 Solution B, 重新加入 2 ml ESP, 50°C, 150 r/min, 24 h。
- (8) 再次移去 ESP 液体, 加入 2 ml 新的 ESP, 50°C, 150 r/min, 24 h。
- (9) 移去 ESP 液体, 模块用 10 ml 含有 1 mM PMSF 的 TE 缓冲液室温处理 30 min, 重复 1 次。
- (10) 用 TE 洗涤模块 3 次(2 h/次), 将模块保存于 TE 中, 4°C 保存待用。

3.2 制胶上样

制胶按照CHEF Mapper系统的操作说明进行, 具体细节如下:

制胶: 用微波炉将100 mL 1%的Seakem_Gold琼脂糖溶解好, 冷却至45°C左右后, 倒入灌胶槽中, 凝固30 min。

上样: 取出样品块, 在已灭菌的枪头和梳子齿的辅助下, 将样品块放入相应的胶孔里, 并用少许50°C左右的1%的Seakem Gold琼脂糖固定样品块, 记录样品顺序。

3.3 电泳

- (1) 调节电泳槽平面至水平。
- (2) 倒入0.5×TBE缓冲液, 关上盖子, 设置冷凝泵参数。
- (3) 小心地把胶放入预冷的电泳槽中, 盖上盖子。
- (4) 使用Auto Algorithm程序设置电泳参数。该程序下可以检测最小分子量为30 Kb, 最大分子量为500 Kb, 1%凝胶浓度, 14°C, 夹角120°, 电压梯度6 V/cm, 电泳时间20 h。
- (5) 记录初始转变间隔2.16 s, 终止转变间隔44.69 s, 初始电流146 mA。
- (6) 电泳结束, 关机。
- (7) GelRed染色, 拍照并记录实验结果。

4 例证分析

野生 *Bt* 菌株含有数量丰富的内生质粒, 而大多数杀虫晶体蛋白大都位于质粒上。本研究利用琼脂糖包埋的方法提取 10 个 *Bt* 菌株的大质粒, 通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)方法分析大质粒的数量和分子量大小, 结果表明(图 1), 供试的 10 个菌株含有大质粒的条带数各不相同(韩丽珍等, 2009)。

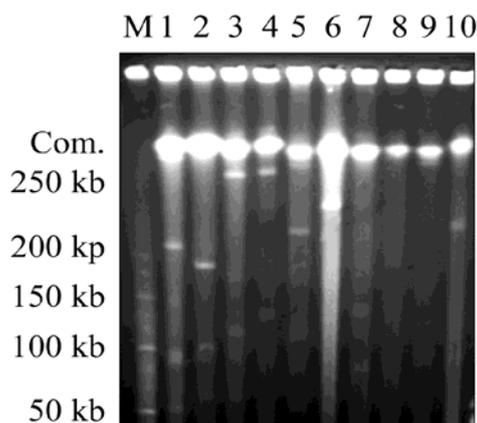


图1 10个不同*Bt*菌株的大质粒脉冲图谱

注: M: λDNA ladder; 1: HD-1; 2: 3136-1; 3: 2160-1; 4: 3173-2; 5: 1023-1; 6: 2179-1; 7: 3012-2; 8: 3031-3; 9: 2480-1; 10: Bti; Com.: DNA 压缩区域

Figure 1 PFGE banding patterns of megaplasmid from ten tested *B.thuringiensis* strains

Note: M: λDNA ladder; 1: HD-1; 2: 3136-1; 3: 2160-1; 4: 3173-2; 5: 1023-1; 6: 2179-1; 7: 3012-2; 8: 3031-3; 9: 2480-1; 10: Bti; Com.: Compression zone for DNA

5 注意事项

首先, 1.6%的低熔点琼脂糖在用微波炉溶解后要立刻放入 42~50℃的水浴锅中, 同时重悬于 Solution A 中的样品也要放入水浴锅中, 待两者的温度相同时再进行混合, 然后取样放于模具中。

其次, PMSF, 剧毒, 蛋白酶抑制剂, 对蛋白质起到保护作用, 配制时要小心。

第三, 上样时, Marker 比上样孔小, 为了防止 Marker 跑离低熔点琼脂糖胶, 故需要以未凝固的低熔点琼脂糖封好上样孔。

最后, 确保冷凝系统正常, 保证电泳槽里电泳液的温度保持在 14℃。温度过高会使样品降解, 无法得到实验结果。

致谢

这是 HITAR 实验室常用的用脉冲场凝胶电泳检测 Bt

大菌质粒谱的方法, 感谢 HITAR 允许将该方法公布。本工作是在广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室进行案例验证。在此表示感谢。

参考文献

- Cathrine Rein Carlson and Anne-Brit Kolst, 1993, A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome, Journal of Bacteriology, Feb, p1053-1060
- Han Lizhen, Wang Xi, Xie Liu, Zhang Wengfei, Li Youzhi, Fang Xuanjun, 2009. Plasmid Diversity of seventeen *Bacillus thuringiensis* Isolates Mainly Collected from Hainan Revealed by AGE and PFGE, Genomics and Applied Biology, 28(3): 486-492 (韩丽珍, 王茜, 谢柳, 张文飞, 李有志, 方宣钧, 2009, 来自海南等地的 17 个 Bt 分离株质粒多样性分析, 基因组学与应用生物学, 28(3): 486-492)
- Wang Xi, The Megaplasmid profiles of 30 Wild *Bacillus thuringiensis* Strains and their Toxic Activities of Crystalline Proteins against Hookworm (*Necator americanus*), Thesis for Master Degree, Guangxi University, Supervisor: Dr. X.J Fang
- Zhou Y., Huang F.Y., Zhao C., Zhu J.T., 2013, SDS-PAGE Analysis of Bt Parasporal Crystal Proteome, Bioscience Methods, 2013, Vol. 4, No. 1: 1-4