

巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 1301 的转座诱变

齐勇¹, 黄玉杰², 李茹美¹, 谢晨¹, 丁爱云¹, 杨合同^{2*}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2. 山东省科学院生物技术中心, 山东 济南 250014)

摘要: 本研究通过原生质体法、电击法和转座诱导方法, 建立了携带转座子Tn917的质粒pTV1对野生巨大芽孢杆菌B1301菌株的转化体系与转座子突变技术, 获得1000多个转座插入突变子。通过细胞分裂素生物测试法对这些突变子进行测定, 筛选到2个突变子B1301-6与B1301-22。B1301-22突变子分泌的细胞分裂素比B1301有显著提高, 而B1301-6突变子分泌和细胞分裂素比B1301有显著降低。抑菌试验结果表明这2个细胞分裂素产量发生改变的突变子抑制率显著低于野生菌株, 说明转座子Tn917的插入不仅使野生B1301菌株编码控制细胞分裂素产量的基因发生了改变, 同时也改变了与编码抑菌功能相关的基因也受到了影响。

关键词: Tn917; 突变; 巨大芽孢杆菌; 拮抗实验

中图分类号: Q 432.4 + 4 文献标识码: A 文章编号: 1000-2324(2008)03-0407-06

收稿日期: 2005-10-11

基金项目: 国家“863”计划现代农业技术领域重大项目资助, 农作物重大病害多功能广谱生防菌剂研究与别(2006AA10211); 山东省教育厅科研计划项目(J98B01)

作者简介: 齐勇(1979-), 男, 硕士, 主要从事植物细菌及病害生物防治。

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail: yanght@keylab.net

THE MUTANTS OF *BACILLUS MEGATERIUM* 1301 WITH TRANSPOSON

QI Yong¹, HUANG Yu-jie², LI Ru-mei, XIE Chen¹, DING Ai-yun¹, YANG He-tong^{2*}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Shandong Academy of Science, Ji nan 250014, China)

Abstract: *Bacillus megaterium* B1301 produces cytokinin. A mutagenesis technique system of *B. megaterium* 1301 was generated by transposon Tn 917 mutagenesis, and the functional gene encoding the antipeptide was knocked off by the transposon. In this study, *B. megaterium* 1301 was transformed with plasmid pTV1 carrying transposon Tn 917 by protoplast and electrotransformation methods. Transformed B1301 strains were screened resistance against chloramphenicol, erythromycin and lincomycin. By the transposon Tn 917 mediated insertional mutagenesis technique, the transposon Tn 917 successfully inserted the genome of B 1301 and more 1000 mutants were screened that were resistant to erythromycin and lincomycin but susceptible to chloramphenicol. Two transposons were obtained through biologic method of cytokinin, which was B1301-6 and B1301-22. The production of cytokinin in B1301-22 is more than in B1301 and B 1301-6 is less than in B1301. The inhibiting effect of two transposons was obvious less than B1301 by antibiotic experiment. The result suggests that the insertion of Tn917 not only changed the functional gene encoding cytokinin but also restrained the functional gene encoding antibiosis.

Key Words: Tn917; mutagenesis; *Bacillus megaterium*; antibiotic experiment

利用转座子Tn917, 通过转座子标签法获得芽孢杆菌突变子, 进而研究功能性基因是一种比较成熟而有效的方法[1, 2]。Tn917位于温度敏感型的载体质粒如pTV1、pTV1Ts等上, 利用相应的培养条件, 将载体质粒导入到芽孢杆菌细胞中, 通过转座诱导插入方法使转座子Tn917插入到细菌基因组DNA中, 获得突变子。对突变子进行目的性选择, 可获得具有相应目标性状的突变子。利用Tn917转座不仅是获得芽孢杆菌突变子的成熟方法, 同时也在获得研究其它革兰氏染色阳性细菌[1, 3-5]的突变子方面研究上获得成功。本实验室从生姜块茎周围的土壤中筛选到一株巨大芽孢杆菌B1301(*Bacillus megaterium* 1301), 该菌株不仅对多种农作物病原真菌具有较强的拮抗作用, 而且还产生细胞分裂素, 刺激植物根系发育[6, 7]。本文通过转座子标签法, 将转座子Tn917整合到巨大芽孢杆菌B1301的基因组DNA中, 筛选细胞分裂素分泌发生变化的突变子, 初步研究了巨大芽孢杆菌B1301细胞分裂素的变化与抑菌方面的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

表1 菌株与质粒

Table1 Strains and plasmid

供试菌株	特点	来源
<i>Bacillus subtilis</i> PY143	携带转座子Tn917的质粒pTV1的宿主菌	河北省农林科学院植保所 马平老师惠赠
<i>Bacillus megaterium</i> B1301	对多种农作物病原真菌具有拮抗作用, 本身产生细胞分裂素	本实验室分离
<i>Bacillus megaterium</i> B1301-6/B1301	突变子, 不能产生细胞分裂素, 具有抗红霉素(1 μg/mL), 洁霉素(25 μg/mL), Em(1 μg/mL), Lin(25 μg/mL)	本研究中获得
<i>Bacillus megaterium</i> B1301-22	B1301突变子, 细胞分裂素产量增加, 具有抗红霉素(1 μg/mL), 洁霉素(25 μg/mL), Em(1 μg/mL), Lin(25 μg/mL)	本研究中获得
Plasmid :pTV1	含有转座子Tn917, 温度敏感型复制子pE194 抗红霉素(1 μg/mL), 氯霉素(5 μg/mL), 洁霉(25 μg/mL), Em(1 μg/mL), Cm(5 μg/mL), Lin(25 μg/mL)	河北省农林科学院植保所 马平老师惠赠

1.1.2 供试病原菌株 小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、蔬菜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、棉花立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、棉花红腐病菌(*Fusarium moniliforme*)、枣叶斑病菌(*AL tenaria* sp.)均由本研究室分离, 保存。

1.1.3 酶及试剂 各种限制性内切酶、Taq DNA polymerase分别购自TaKaRa Biotech公司、北京天为时代公司；氯霉素(Cm)、红霉素(Em)和林可霉素(Lin)分别购自上海生工公司、山东鲁抗医药进出口公司

1.1.4 培养基: LB液体培养基: 蛋白胨10 g/L, 酵母膏5 g/L, NaCl 10 g/L, pH7.2。2xSMM液, 4xPAB, DM3培养基[8]。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取、纯化 质粒的提取和纯化采用PAL方法[8]

1.2.2 巨大芽孢杆菌B1301的转化与转化子的筛选 巨大芽孢杆菌B1301的转化采用原生质体转化方法[9]和电击转化法。电击条件: 电容25 μ F, 电压2.0 kV, 电阻200 Ω 。

转化子的筛选: 在加入氯霉素的LB平板 (Cm 5 μ g/mL) 上进行筛选, 提取转化子中的质粒, 利用限制性内切酶对转化子质粒进行单酶切和双酶切。

1.2.3 转座子Tn917的诱导转座和突变子的筛选 Tn917向转化子染色体的随机插入诱变采用Youngman等人的方法[4, 10]略有改进, 采用46—50 $^{\circ}$ C进行高温诱导。突变子的筛选: 用无菌牙签将含有红霉素和林可霉素的LB平板 (Em 5 μ g/mL; Lin 75 μ g/mL) 上的单菌落分别点接于加入氯霉素 (Cm 5 μ g/mL) 的LB平板, 进行原位生长比较实验, 具有Em、Lin抗性而缺失Cm抗性的菌株即为Tn917转座插入B1301菌株基因组的突变子。

1.2.4 转座子Tn917检测 Tn917上带有红霉素抗性基因序列, 根据该基因序列设计一对引物 (Primer1:5' - CCTGGAACATCTGTGGTATGGC-3', Primer2:5' - GCTACAGGGCATTAAACGACG-3')。以不同底物为模板, 进行PCR扩增。含有该抗性基因序列的底物可扩增出436 bp DNA片段[11]

1.2.5 巨大芽孢杆菌突变体的筛选 采用萝卜子叶鉴定法对突变子进行筛选[12], 筛选细胞分裂素产生具有明显变化的突变。

1.2.6 抑菌试验 采用平板对峙法[13, 14]。在PDA平板上(直径90 mm)中间接入供试病原菌的菌丝块(直径5 mm), 将经单菌落纯化后的突变子和B1301菌株每个平板点接四点, 距病原菌菌丝块3 cm, 25 $^{\circ}$ C生化培养箱培养, 以不加细菌仅仅接种病原菌的平板作为对照。每个处理3个重复, 培养7 d后测定抑菌带宽度 (mm)。

根据下面公式计算抑制效果:

抑制率(%) = (对照菌落宽度 - 处理菌落宽度) / (对照菌落宽度 - 病原菌圆半径) \times 100

2 结果

2.1 巨大芽孢杆菌B1301转座子突变体库的构建

利用原生质体法和电击法将质粒pTV1进行巨大芽孢杆菌B1301菌体细胞转化, 获得对氯霉素具有抗性的转化细胞。图1结果表明, 利用限制性内切酶EcoRI、PstI和KpnI对转化子中的质粒分别进行单酶切和双酶切, 单酶切片段大小为12.4 kb, 双酶切片段大小分别为7.5 kb和4.9 kb, 与预期结果完全相符, 说明质粒pTV1对巨大芽孢杆菌B1301转化成功。

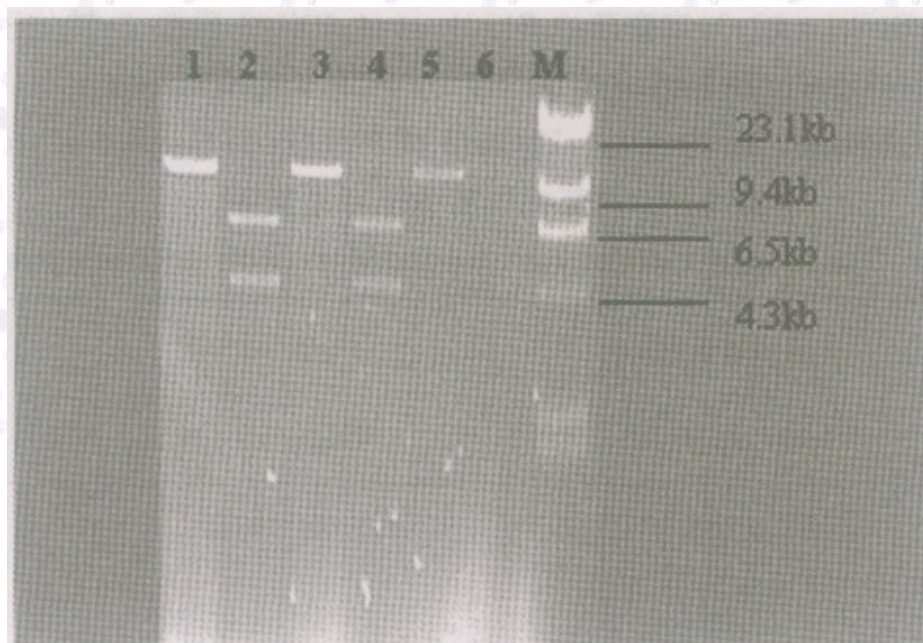


图1 B1301转化子与PY143中的质粒酶切比较

1:pTV1经EcoRI酶切; 2:pTV1经KpnI/PstI酶切; 3:B1301转化子质粒PstI酶切;
4:B1301转化子质粒KpnI/PstI酶切; 5:B1301转化子质粒kPnI酶切; 6:B1301对照; M:DNA/HindIII
Fig.1 Comparison of enzyme-digestion exacted from transformant and PY143, respectively
1:pTV1 digested by EcoRI; 2:pTV1 digested by KpnI/PstI; 3:B1301transformant digested by PstI; 4:B1301
transformant digested by KpnI/PstI; 5:B1301transformant digested by kPnI; 6:B1301control; M:DNA/HindIII

转化子经过转座诱导, 转座子Tn917插入B1301菌株的基因组DNA中, 突变子在含有不同抗生素的培养基上生长性状发生改变, 根据质粒pTV1和转座子Tn917的特点, 突变子在含有氯霉素的培养基上不能生长, 而在含有红霉素和林可霉素的培养基上能够生长, 筛选到1000多个突变子。图2结果显示, 经Tn917分子检测, 以突变子基因组DNA为模板, 扩增出436 bp DNA片段, 与以质粒pTV1为模板扩增的片段大小一致, 而以B1301野生菌基因组DNA为模板扩增不到该片段, 进一步说明转座子Tn917插入到B1301基因组DNA中。

2.2 分泌细胞分裂素发生改变的突变株筛选

利用萝卜子叶增重法对突变子进行测定, 从1000多个突变子中筛选到2株产细胞分裂素发生改变的突变子, B1301-22与B1301-6。表2结果表明, 萝卜子叶重量变化依次为B1301-22>B1301>B1301-6>CK。清水处理的萝卜子叶最小, 相对增重率为-10.74%, B1301-22由于产生的细胞分裂素比野生菌株B1301增加, 导致萝卜子叶明显大于野生菌株B1301处理的萝卜子叶, 相对增重率为18.34%。B1301-6由于产生的细胞分裂素比野生菌株B1301减少, 导致萝卜子叶与清水处理的差异性不显著, 相对增重率为-9.30%。由统计学分析可知B1301-6与CK在0.05和0.01水平上无差异, 但与B1301、B1301-22相比较而言, 在0.05和0.01水平上有极显著差异。研究表明B1301-22突变子分泌的细胞分裂素比B1301有明显提高, 而B1301-6突变子分泌的细胞分裂素比B1301有明显降低。

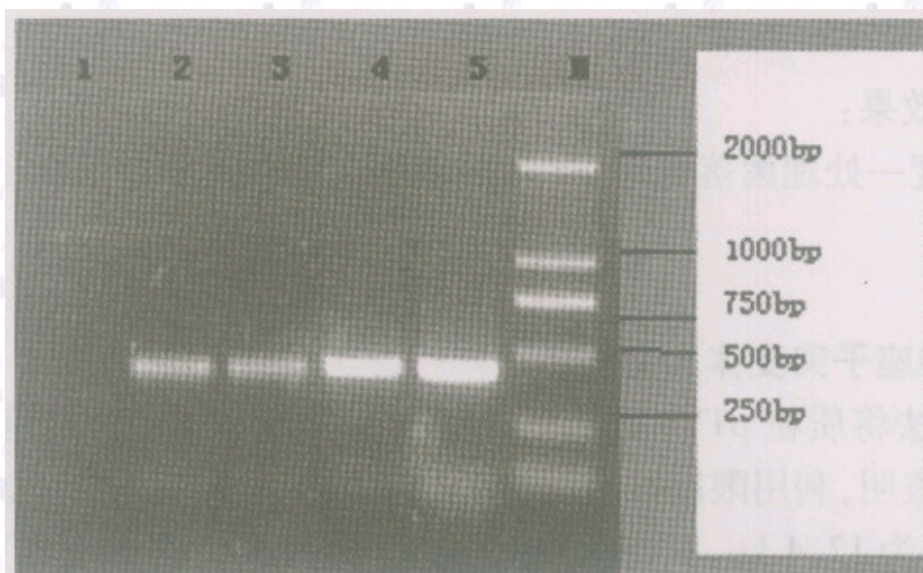


图2 转座子Tn917的PCR扩增验证

1:B1301; 2:突变菌株B1301-22; 3:突变菌株B1301-6; 4:PY143质粒; 5:转化子质粒; M:D2000

Fig.2 Detection of Tn917 by PCR amplification

1:B1301; 2:Mutant B1301-22; 3:Mutant B1301-6; 4:Plasmid of PY143; 5:Plasmid of transformant B1301; M:D2000

表2 不同菌株对萝卜子叶增重率

Table 3 The weight ratio to radish cotyledons with different strains

菌株和处理	最初重量(g)	增重率(%)	相对增重率(%)
Strain and treatment	Initial weight(g)	Weight ratio(%)	Relative weight rate(%)
CK	0.053	66.79 aA	-10.74aA
B1301	0.062	74.83 bB	-----
B1301-22	0.041	88.56 cC	18.34 bB
B1301-6	0.055	67.87 aA	-9.30 aA

注: 同一小写字母表示在P=0.05水平下经Duncan检验差异不显著, 不同的字母则表示差异显著; 同一大写字母表示在P=0.01水平下经Duncan检验差异不显著, 不同的字母则表示差异显著

Note: The same small letters is not significantly different by Duncan's multiple range test, different small letters is significantly at P=0.05; The same big letters is not significantly different by Duncan's multiple

2.3 突变子对病原菌的抑制效果

采用平板对峙法（图3、图4），分别测定巨大芽孢杆菌B1301、突变子B1301-6与B1301-22对*Bipolaris sorokiniana*、*Botrytis cinerea*等9种病原真菌的抑制能力。表3结果表明，突变菌株B1301-22和B1301-6与野生生防菌相比，对这9种病原菌的抑菌能力都减弱，其中对串珠镰刀菌减弱效果最为明显。表明Tn917的插入，使得2个突变菌株的抑菌能力降低。转座子插入均显著降低了突变菌株对植物病原真菌的平板拮抗能力，突变菌株对于某些病原菌的抑菌能力完全丧失，说明B1301产生的抑菌物质可能不是一种。突变菌株的抑菌能力也不因其细胞分裂素产量的提高而增强，说明细胞分裂素本身并无直接的杀菌或抑菌能力。对病原菌*Botrytis cinerea*在0.05上差异显著，而对其它几种病原菌在0.05和0.01水平上抑制率都差异显著，抑菌效果有明显的下降。表明细胞分裂素的产量发生改变（不管是增加还是减少），突变子的抑菌效果降低了。

表3 巨大芽孢杆菌及突变子对病原真菌的抑制效果

Table 4 Inhibiting effect of *Bacillus megaterium* and transposon on pathogens

病原菌 Pathogens	抑菌率 (%) Inhabiting percent rate (%)		
	B130	1B1301-22	B1301-6
麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	61.66cC	21.09bB	17.89aA
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	51.69bB	0	0
串珠镰孢病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	42.33bB	12.31aA	11.38aA
棉枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.vasinfectum	51.10bB	16.61aA	12.54aA
立枯丝核病菌 <i>Rhizoctonia solan</i>	37.09cC	1.32aA	11.59bB
蔬菜灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	47.54bB	5.25aA	3.61aA
枣叶斑病菌 <i>Alternaria</i> sp.	66.06cC	29.50bB	24.28aA
麦纹枯病菌 <i>Rhizoctonia cerealis</i>	54.52bB	20.0aA	19.18aA
棉花炭疽病菌 <i>Colletotrichum gossypii</i>	51.35bB	27.84aA	25.41aA

3 讨论

应用携带转座子Tn917的载体pTV1对一些芽孢杆菌菌株进行转化时存在着一定的难度，甚至不能成功转化[15]。因此，巨大芽孢杆菌B1301的转化是本研究的关键之一。本文作者在研究质粒pTV1对巨大芽孢杆菌B1301转化时曾采用了三种转化方法，即电击法、原生质体法和感受态细胞法。电击法和原生质体法获得成功并得到转化子。这两种方法比较而言电击法转化率是 1.6×10^2 转化子/ μg DNA小于原生质体法转化率 3.5×10^2 转化子/ μg DNA，虽然原生质体法步骤繁琐，但转化效率较高，容易得到转化子。利用原生质体方法转化巨大芽孢杆菌国内外尚未见报道。

本研究筛选得到转化子后进行酶切，可被相应的限制性内切酶酶切。研究结查表明从转化子中提取的质粒有的不能被相应限制性内切酶酶切[11]。作者认为可能是芽孢杆菌的来源不同或质粒在转化子中被甲基化修饰等原因造成的。

图3 B1301、突变菌株 B1301 -6 与 B1301 -22

对麦根腐病菌抑菌试验

Fig.3 Inhibition on *Bipolaris sorokiniana*
with B1301 and mutants

图4 B1301、突变子 B1301 -6 与 B1301 -22

对灰霉病菌抑菌试验

Fig.3 The antibiologic experiment
to *Botrytis cinerea*

根据Youngman等人的方法诱导Tn917在枯草芽孢杆菌中进行转座，关键是要进行连续的高温处理(48~52℃)，以确保转座子成功转座，转化子中质粒消失，否则诱导不能保证Tn917成功插入到细菌基因组中，导致突变子数量过少[2]。而Nicholas等人的研究认为巨大芽孢杆菌对温度敏感，应在46℃进行高温诱导。研究结果证明，处理温度在46~50℃时，都能保证转化子中质粒pTV1消失，但随着温度的升高，转化子数越来越少。

B1301为一株植病生防菌，对多种农作物病原真菌具有较强的拮抗作用。通过平板抑菌实验结果表明突变子B1301-6、B1301-22与B1301相比，抑菌效果有明显的下降。表明转座子Tn917插入到B1301基因组中，不仅改变了分泌细胞分裂素基因功能，同时也抑制了该菌抑菌基因功能，使得突变子的抑菌效果降低。

参考文献

- [1]Camilli A., Portnoy A., Youngman P.J. Insertional mutagenesis of *Listeria monocytogenes* with a novel Tn917 derivative that allows direct cloning of DNA flanking transposon insertions[J]. *J Bacteriol*, 1990, 172:3738—3744
- [2]Youngman P.J., John B.P., Richard I.L. Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917 [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1983, 80:2305—2309
- [3]Israelsen H., Madsen S.M., Vrang A, et al. Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promoter probe vector pAK80[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61:2540-2547
- [4]Babb B. I., Collett H. J., Reid S. J, et al. Isolation and characterization of solvent deficient and metronidazole resistant mutants[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 114: 343-348
- [5]Cossart P., Vicente M.F., Mengaud J, et al. Listeriolysin is essential for virulence of *Listeria monocytogenes* direct evidence obtained by gene complementation[J]. *Infect Immun*, 1989, 57:3629-3636
- [6]曹燕鲁, 吴琼, 刘矫. 巨大芽孢杆菌B1301分泌物的抑菌作用及其特性的研究[J]. *山东轻工业学院学报*, 2004, 18(2): 51-55
- [7]杨合同, 唐文华, 迟建国, 等. 植病生防菌株B1301的种类鉴定及其对生姜青枯病的作用机理和防治效果[J]. *中国生物防治*, 2002, 18(1): 21-23
- [8]Martin I., Voskvil. Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis* [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1993, 59: 1138-1142
- [9]吴鹤龄, 林锦松. 遗传学实验方法和技术[C]. 北京: 高等教育出版社, 1985. 37-40
- [10]Nicholas A., Bohall J.R., Patricia S, et al. Transposition of Tn917 in *Bacillus megaterium*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986, 167(2): 716-718
- [11]孙会刚, 蒋继志, 李社增, 等. 生防细菌NCD-2突变体构建及抑菌功能基因的防病作用[J]. *棉花学报*, 2006, 18(3): 131-134
- [12]梁伯. 细胞分裂素生物测试法评述[J]. *河北大学学报*, 1997, (4): 93-96
- [13]王光华, 周克琴, 张秋英, 等. 拮抗细菌BRF-1对几种植物病原真菌的抗生效果[J]. *中国生物防治*, 2003, 19(2): 73-77
- [14]张颖, 王刚, 王云帆. 枯草芽孢杆菌B₂₋₄₇对小麦全蚀病的防治及其病原的抑制作用[J]. *河南大学学报*, 2006, 36(1): 79-81
- [15]张霞. 枯草芽孢杆菌B931防治小麦全蚀病及促进植物生长的机理研究[D]. 北京: 中国农业大学硕士论文, 1999

[返回](#)