

# 发光酶基因 *luxAB* 标记硅酸盐细菌 NBT 菌株的研究\*

何琳燕\*\* 黄为一

(南京农业大学生命科学院微生物学系, 南京 210095)

**【摘要】** 外源基因标记技术为研究土壤引入细菌的生态行为提供了有效的检测手段. 通过选择不同的碳源和降低碳氮比筛选获得 0.25% 麦芽糖作为碳源的菌体制备培养基. 对硅酸盐细菌 BT 菌株进行紫外诱变和抗生素抗性驯化获得一株抗利福平  $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的 NBT-R200 菌株, 含发光酶基因 *luxAB* 的质粒 pTR102::*luxAB* 在辅助质粒 pRK2013 的帮助下转入该菌株中, 从而赋予 NBT 菌株以发光活性和利福平、卡那霉素、四环素三种抗生素抗性. 以对数生长长期的菌体制备受体细胞, 发现对数生长前期的细胞转移频率最高, 可达  $6.70 \times 10^{-5}$ , 杂交比例以 1:1:1 适宜. 标记菌株 RL85 的释钾能力没有丧失且有提高, 发光特性稳定, 连续转接 20 次后仍具有发光活性和 3 种抗生素抗性, 适用于根际微生态学研究.

**关键词** 硅酸盐细菌 发光酶基因 标记

**文章编号** 1001-9332(2004)07-1241-04 **中图分类号** Q93 **文献标识码** A

**Introduction of bioluminescence genes into silicate-dissolving bacteria strain NBT.** HE Linyan, HUANG Weiyi (Department of Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2004, 15(7): 1241~1244.

In this study, silicate-dissolving bacteria NBT strain was grown with 0.25% maltose as carbon source, and the rifampicin-resistance was generated by ultraviolet mutagenesis and streak naturalized to  $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Through triparental cross, the *luxAB* genes were introduced into NBT-R200 at the help of pRK2013. The luminescence activity of the hybrid strain was tested, which indicated that all colonies had a high luminescence activity and kanamycin-, tetracycline- and rifampicin-resistance. The NBT-R200 cells prepared from initial logarithmic growth phase were more likely to be sensitive to foreign DNA, and the maximum translocation frequency was up to  $6.70 \times 10^{-5}$ . In addition, the optimal mating ratio was 1:1:1. The potassium release ability from feldspar and the luminescence of *luxAB* genes marked silicate-dissolving bacteria RL85 strain were stable, and hence, the RL85 was available to rhizosphere microecology researches.

**Key words** Silicate-dissolving bacteria, *lux* marker genes, Triparental cross.

## 1 引言

硅酸盐细菌是土壤中特殊的植物促生根际细菌, 它能分解原始的仅仅由硅酸盐和铝硅酸盐组成的岩石矿物, 具有溶磷、释钾、保钾、分泌植物激素等能力<sup>[11, 17, 18, 20]</sup>, 是目前广泛应用的微生物肥料中的一种重要功能菌. 保证该类菌株在田间应用稳定性的关键是引入菌株在植物根际能够良好定殖, 测量引入细菌的根部定殖已成为揭示有益细菌的根圈微生态学特征、提高其根圈适应性和增产效果必不可少的研究内容<sup>[3, 8, 15, 25]</sup>. 随着分子生态学向微生物生态学的渗透, 特别是基因标记技术的建立与发展, 为植物促生根际微生物 (PGPR) 菌株的微生态学研究提供了有效手段<sup>[4~7, 10, 13, 21, 22]</sup>. 目前, 国内外有用发光酶基因标记荧光假单胞菌、根瘤菌及巨大芽胞杆菌等来研究其在作物根际的定殖规

律<sup>[2, 9, 12, 14, 23]</sup>, 但还没有应用发光酶基因标记硅酸盐细菌的报道. 本文利用发光酶基因 *luxAB* 对硅酸盐细菌 NBT 菌株进行标记, 以期为微生物肥料功能菌的根际微生态学研究提供合适材料.

## 2 材料与方法

### 2.1 供试材料

**2.1.1 菌株** 硅酸盐细菌 NBT 菌株, 由本系保存, 菌体培养用培养基为有氮培养基<sup>[19]</sup>. 供体菌和辅助菌分别为大肠杆菌 (*E. coli*) WA803 (pTR102::*luxAB*, Km<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>) 和 *E. coli* HB101 (pRK2013, tra<sup>+</sup>, Km<sup>r</sup>), 由本系沈标教授提供, 采用 LB 培养基进行培养.

**2.1.2 试剂** 10% 癸醛 [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CHO}$ ], 用无水乙醇配制, 培养皿菌落检测每次用  $10 \mu\text{l}$ . 抗生素卡那霉素 Km50  $\mu\text{g}$

\* 上海市科技兴农重点攻关资助项目 (农科攻字 98 第 05-2 号).

\*\* 通讯联系人.

2003-07-28 收稿, 2004-02-12 接受.

$\cdot\text{ml}^{-1}$ 、四环素 Tc50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、利福平 Rif 按实验设计要求制备。

## 2.2 实验方法

**2.2.1 菌体制备培养基的选择** 以有氮培养基为基础, 分别以蔗糖、葡萄糖、麦芽糖和淀粉为碳源, 接种 NBT 种子液, 28℃ 振荡培养, 每隔 12 h 取样, 稀释平板计数法测定细胞数量, 乙醇沉淀法测定复合多糖含量。然后以 0.1%、0.25%、0.5%、1%、2% 的麦芽糖为碳源, 接种 NBT 种子液, 28℃ 振荡培养 24 h 后, 测定多糖含量, 以有氮培养基为对照。

**2.2.2 NBT 抗药性突变株的诱变** 接无氮平板<sup>[19]</sup>上一单菌落于 100 ml 菌体制备培养液, 150 rpm、28℃ 振荡培养, 离心收集处于对数生长期的菌体, 用无菌水洗涤, 悬浮于 10 ml 无菌水中, 制成菌悬液。各取 2 ml 菌悬液置于直径 6 cm 的灭菌皿, 分别用 UV 照射 10、30、60、90、120 s, 然后分别取 1 ml 照射后的菌液和原液作系列稀释, 涂布无氮平板, 黑暗 28℃ 恒温培养 3 d 后计数。计算细胞存活率, 确定适当的 UV 照射时间进行诱变。各取 0.1 ml 菌悬液, 分别涂布于含有 0、2、5、10、15、20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  利福平的无氮平板上, 每个浓度作 3 皿, 28℃ 培养 3 d, 观察平板上是否有菌落生长, 确定初筛的药物浓度。选择适当的 UV 照射时间照射菌悬液。各取 0.1 ml 涂布于加有不同浓度(10、20、40、80、100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )利福平的无氮平板上, 筛选突变株。将在含有 80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  利福平的无氮平板上生长的菌落划线于含有 80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  利福平的无氮培养基上, 再挑取生长于此平板上的抗性菌落进行摇瓶发酵, 涂布于含有更高浓度利福平(100、150、200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )的无氮平板上, 诱导获得抗利福平浓度为 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  的菌株。

**2.2.3 发光酶基因 luxAB 标记利福平抗性突变株** 将硅酸盐细菌抗利福平 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  突变株接种于麦芽糖培养液, 28℃ 振荡培养 12、18 和 24 h, 离心收集菌体, 无菌水洗涤两次, 制备成菌悬液。将此菌悬液和含 pTR102::luxAB、pRK2013(辅助质粒)的 *E. coli* 以一定比例(1:1:1、2:1:1、1:2:1)混合在离心管中, 用无菌水洗涤, 离心得菌体, 再加 1 ml 有氮培养液悬浮, 置 28℃ 静止培养 24 h。用无菌水将菌液稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  和  $10^{-5}$  稀释度。将  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  稀释度分别涂布有氮 + Rif + Km + Tc 平板, 28℃ 培养 3 d, 另外取  $10^{-5}$  稀释度涂布有氮 + Rif 作为受体菌对照。按下面的公式计算 pTR102 质粒的转移频率:

转移频率 = (有氮 + Rif + Km + Tc 上长出的单菌落数 / 有氮 + Rif 上长出的单菌落数) × 100%

采用发光菌落平板计数法, 或 X-射线胶片自显影检测, 在暗室中自显影的时间为 12~24 h。参考《分子克隆实验指南》进行杂交子质粒的快速检测<sup>[16]</sup>。采用摇瓶释钾试验<sup>[20]</sup>, 比较发光菌株与出发菌株解钾能力。参照文献<sup>[24]</sup>进行发光菌株稳定性试验。

## 3 结果与讨论

### 3.1 菌体制备培养基的选择

由于硅酸盐细菌 NBT 菌株在有氮培养基上能

产生丰厚的荚膜多糖, 离心不易得到菌体, 因此通过选择不同的碳源和降低碳氮比来筛选受体菌培养基。在分别以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和淀粉为碳源的有氮培养基中, 每隔 12 h 取样分别测定细胞数量和多糖含量。由图 1 可知, 多糖含量在 24 h 即可达到最高峰, 以后趋向稳定。以麦芽糖为碳源时, 细胞数量上升很快, 24 h 即可达到  $8.37 \times 10^7$  个  $\cdot\text{ml}^{-1}$ , 48 h 以后细胞衰亡而数量减少。葡萄糖和蔗糖次之, 淀粉作为缓效碳源, 细胞数量上升最慢。其中 24 h 时以麦芽糖为碳源的培养基上细胞数量最多, 复合多糖产量最少, 分别为  $8.37 \times 10^7$  个  $\cdot\text{ml}^{-1}$  和 1.85  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 与有氮培养基比较, 细胞数量增加 44 倍而多糖减少 44.1%。

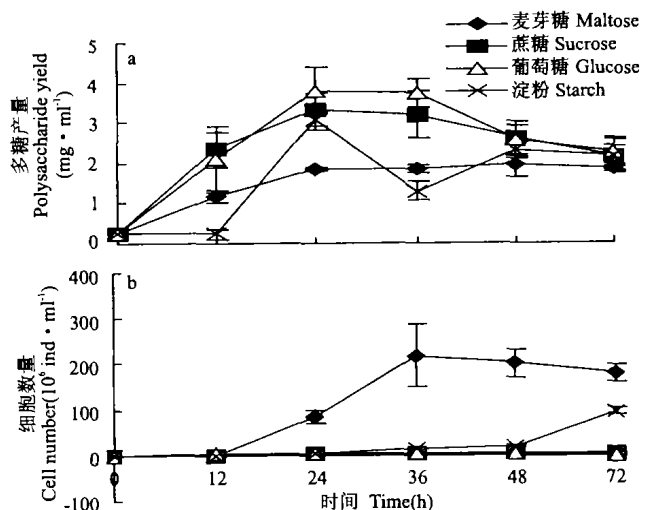


图 1 不同碳源对硅酸盐细菌 NBT 菌株多糖产量(a)和细胞数量(b)的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on complex polysaccharide yield (a) and cell number(b) of strain NBT.

表 1 不同麦芽糖浓度对硅酸盐细菌 NBT 菌体数量的影响

Table 1 Effect of different concentration of maltose on cell number of strain NBT

|   | 麦芽糖浓度<br>Concentration of maltose (%) |      |      |      |      | 有氮培养基<br>(CK) |
|---|---------------------------------------|------|------|------|------|---------------|
|   | 0.1                                   | 0.25 | 0.5  | 1    | 2    |               |
| 碳氮比 C/N ratio   | 1.9                                   | 4.7  | 9.4  | 18.9 | 37.7 | 19.8          |
| 菌体数量 Cell number<br>( $\times 10^7$ 个 $\cdot\text{ml}^{-1}$ ) | 3.09                                  | 5.21 | 5.34 | 5.97 | 3.79 | 4.56          |

由表 1 可知, 以不同浓度的麦芽糖作碳源时, 培养 24 h 后, 0.1% 麦芽糖浓度培养基上细胞数量较少, 0.25%、0.5%、1% 麦芽糖浓度培养基上细胞数量增加但无明显差异 ( $F = 3.8 < F_{0.05}$ ), 故杂交时受体菌培养基选择 0.25% 麦芽糖作为碳源的有氮培养基。

### 3.2 NBT 抗药性突变株的诱变

**3.2.1 紫外线杀菌曲线** NBT 菌株菌悬液经不同时间(10、30、60、90、120 s)紫外线照射后, 细胞存活

率分别为 41.3%、32.5%、15%、11%、1.25%，因此选择 UV 最适诱变时间为 30 s。

**3.2.2 出发菌株自身耐药性浓度确定** 出发菌株在加有 2、5、10、15  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  利福平的有氮平板上能生长，但在加有 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  利福平的有氮平板上均不生长。因此，出发菌株自身耐利福平的最高浓度为 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

**3.2.3 突变株的筛选** NBT 菌株菌悬液经 UV 30 s 照射后获得突变株 10 株，7 株抗利福平浓度为 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，1 株抗利福平浓度为 80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

**3.2.4 抗高利福平水平菌株的诱导** 选择抗利福平浓度为 80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  的突变株 NBT-R80 进行诱导，通过逐步提高培养基中利福平的添加量和在无氮平板上纯化的方法，使 NBT-R80 抗利福平的浓度达到 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，记为 NBT-R200。

### 3.3 发光酶基因 *luxAB* 标记菌株的获得

由于供体菌和辅助菌不抗 Rif 而不能在含 3 种抗生素的平板上生长，受体菌不抗 Km 和 Tc 也不能在筛选平板上存活，因此经三亲本杂交，在含 3 种抗生素的有氮平板上生长并挑取 200 个杂交子，暗室中加癸醛检测均有发光活性，在有氮 + Rif + Km + Tc 平板上划线纯化后，用 X-射线胶片记录发光活性。图 2 为部分杂交子用 X-射线胶片自显影 12 h 检测的发光菌落情况。



图 2 部分发光杂交子菌落的 X-射线胶片自显影  
Fig.2 Several colonies of *luxAB* genes marked silicate-dissolving bacteria.

根据杂交子计算出相应的转移频率(表 2)。实验结果表明，受体菌 NBT-R200 培养 12 h 比培养 24 h 时杂交率高，前者为  $10^{-5}$ ，后者仅为  $10^{-7}$ ，说明处于对数生长前期的细胞较易吸收外源 DNA。随受体菌培养时间延长，转移频率降低。另外，受体菌或供体菌在杂交中的比例提高，即菌量提高，杂交率变化不大。

表 2 pTR102 质粒对 NBT-R200 菌株的转移频率

Table 2 Transfer frequency of plasmid pTR102 to antibiotic-resistant mutant strain NBT-R200

| 受体菌培养时间<br>Culture time of<br>recipient strain (h) | 转移频率 Transfer frequency |  |                       |
|--|-------------------------|--|-----------------------|
|  | 杂交比例                    | Mating rate(供体菌:辅助菌:受体菌<br>Donor: Helper: Recipient) |                       |
|  | 1:1:1                   | 2:1:1  | 1:1:2                 |
| 12   | $6.70 \times 10^{-5}$   | $7.90 \times 10^{-5}$                                | $2.23 \times 10^{-6}$ |
| 18   | $9.26 \times 10^{-5}$   | $3.89 \times 10^{-5}$                                | $8.51 \times 10^{-6}$ |
| 24   | $2.61 \times 10^{-7}$   | $2.16 \times 10^{-7}$                                | $2.02 \times 10^{-7}$ |

随机挑取生长较快、菌落粘稠的发光杂交进行质粒检测(图 3)。由于出发菌株 NBT 和 NBT-R200 均未提取检测到质粒，可能菌株不含质粒。在含 3 种抗生素的有氮平板上生长的粘稠菌落发现有质粒存在，且质粒大小与 pTR102 一致，说明 pTR102 已经转移到受体菌 NBT-R200 中，从而使杂交子具有 3 种抗生素抗性和发光特性。



图 3 部分 *luxAB* 标记菌株的质粒图谱

Fig.3 Plasmid profiles of the strains marked by *luxAB* genes.

泳道 Lines: A~G. Marked strains; H. pTR102; I.  $\lambda$  + HindIII DNA.

### 3.4 发光菌株的释钾能力和稳定性

在本次实验中共挑取 200 个杂交子，均检测到发光活性。对其中发光较强的标记菌株 RL85 和出发菌株 NBT、NBT-R200 的释钾能力测定(图 4)，发现培养 5 d，RL85 可以从钾长石中释放出 55.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  钾，比接灭活菌对照增加 55.6%，而 NBT 和 NBT-R200 从钾长石中释放增加的钾分别为 48.4% 和 39.0%，说明标记菌株的释钾活性没有丧失反有提高。

标记于质粒上的发光系统存在的主要问题是 *lux* 的不稳定，而标记基因插入染色体上将提高其稳定性<sup>[1]</sup>。引入的发光酶基因 *luxAB* 在细胞中的稳定性试验表明，标记菌株 RL85 在不含抗生素的斜面上连续转接 20 次后仍能检测到发光活性和 3 种抗生素抗性，说明 *luxAB* 在细胞中能较稳定存在，为在田间检测根际微生物的生态行为提供了稳定的菌株。

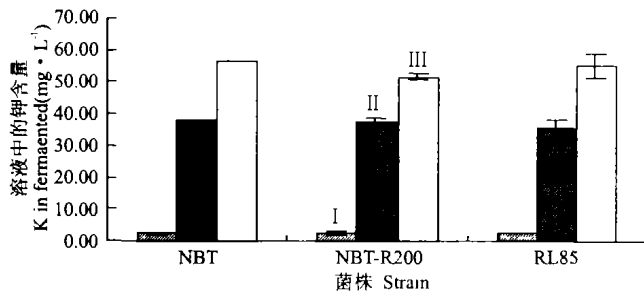


图4 发光酶基因标记菌株和出发菌株解钾作用

Fig. 4 Potassium release from feldspar by *luxAB* genes marked silicate-dissolving bacteria and starting strains.

I. 不接菌 Non-inoculated with bacteria, II. 接灭活菌 Inoculated with dead bacteria, III. 接活菌 Inoculated with bacteria.

## 4 结 论

4.1 为减少荚膜多糖对菌体收集、质粒转化的影响,筛选获得 0.25% 麦芽糖作为碳源的菌体制备培养基.

4.2 通过对硅酸盐细菌 NBT 菌株进行紫外诱变和抗生素抗性驯化获得一株抗利福平  $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的 NBT-R200 菌株,含发光酶基因 *luxAB* 的质粒 pTR102::*luxAB* 在辅助质粒 pRK2013 的帮助下转入该菌株中,从而赋予 NBT 菌株以发光活性和利福平、卡那霉素、四环素三种抗生素抗性.以对数生长长期的菌体制备受体细胞,发现对数生长前期的细胞易接受外源 DNA,转移频率最高可达  $6.70 \times 10^{-5}$ ,杂交比例以 1:1:1 适宜.

4.3 发光酶标记菌株 RL85 的释钾能力与出发菌株 NBT 相当,且转接 20 次仍保持抗生素抗性和发光特性,性质稳定,适用于硅酸盐细菌根际微生物学研究.

## 参考文献

- Amin H-S, Meikle A, Glover L-A, et al. 1993. Plasmid and chromosomally encoded luminescence marker systems for detection of *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Mol Ecol*, 2:47~54
- Beauchamp CJ, Klopper JW, Lemke PA. 1993. Luminometric analyses of plant root colonization by bioluminescent pseudomonads. *Can J Microbiol*, 39:434~441
- Benizri E, Baudoin E, Guckert A. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocon Sci Technol*, 11(5):557~574
- Cui M-X(崔明学), Zhang C-G(张成刚), Jin S-Y(靳素英), et al. 1996. Use of a *xylE* marker gene to monitor the survival of rhizobia populations in soil. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 7(3):287~292(in Chinese)
- Cui M-X(崔明学), Zhang C-G(张成刚), Jin S-Y(靳素英), et al. 1997. Effect of matric potential on the survival of *luxAB* marked *Rhizobium fredii* in soil. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 8(5):519~526(in Chinese)
- Drahos DJ. 1991. Field testing of genetically engineered microorganisms. *Biotechnol Adv*, 9:157~171

- Green H, Jensen DF. 1995. A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*: the use of a *gus* transformant for ecological studies in the rhizosphere. *Phytopathology*, 85:1436~1440
- Klopper JW, Beauchamp CJ. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant by bacteria. *Can J Microbiol*, 38:1219~1232
- Li Y-G(李友国), Zhou J-C(周俊初). 2003. Root colonization and nodulation of *Sinorhizobium fredii* HN01DL in *Glycine max* rhizosphere. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 14(8):1283~1286 (in Chinese)
- Lin J-S(蔺继尚), Cui M-X(崔明学), Jin S-Y(靳素英), et al. 1994. Transposon Tn5 used as an identifiable ecological marker of *R. fredii* strains: Horizontal transfer frequency of transposon Tn5 and its influence on the movement of *R. fredii* Tn5 mutant. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 5(3):292~298(in Chinese)
- Lin Q-M(林启美), Rao Z-H(饶正华), Sun Y-X(孙焱鑫), et al. 2002. Identification of silicate-dissolving bacterium and its effect on tomato. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 35(1):59~62 (in Chinese)
- Liu J(刘健), Li J(李俊), Jiang X(姜昕), et al. 2001. Study on root colonization of wheat by *luxAB* genes-marked *Bacillus megaterium* ATCC14581. *Microbiology* (微生物学通报), 28(6):1~4(in Chinese)
- Meng S-D(孟颂东), Zhang Z-Z(张忠泽). 1997. Studies on nodulation and efficiency of *S. fredii* using GUS gene. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 8(6):595~598 (in Chinese)
- Molina L, Ramos C, Duque E, et al. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants. *Soil Biol Biochem*, 32:315~321
- Prosser JI. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment. *Microbiology*, 140:5~17
- Samberook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 19~21, 304~316
- Sheng X-F(盛下放), Huang W-Y(黄为一), Cao X-Y(曹晓英). 2001. Dissolution of feldspar and potassium uptake by the strain NBT of silicate bacterium. *Plant Nutr Fert Sci* (植物营养与肥料学报), 7(4):459~466(in Chinese)
- Sheng X-F(盛下放), Huang W-Y(黄为一). 2001. Physiological characteristics of strain NBT of silicate bacterium. *Acta Pedol Sin* (土壤学报), 38(4):569~574(in Chinese)
- Sheng X-F(盛下放). 2003. Colonization of silicate bacterium strain NBT in wheat roots. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 14(11):1914~1916(in Chinese)
- Sheng X-F, He L-Y, Huang W-Y. 2002. The conditions of releasing potassium by a silicate bacterial strain NBT. *Agric Sci China*, 1(6):595~604
- Steenhoudt O, Zhu P, Vande B A, et al. 2001. A spontaneous chlorate-resistant mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 displays defects in nitrate reduction and plant root colonization. *Biol Fert Soils*, 33:317~322
- Stewart GSAB, Williams P. 1992. *lux* genes and the applications of bacterial bioluminescence. *J Gen Microbiol*, 138:1289~1300
- Wang P(王平), Fen X-M(冯新梅), Li F-D(李阜棣). 2001. Colonization of *Mesorhizorium huakuii* JSSA16L marked with *luxAB* genes in the rhizosphere of *Astragalus sinicus*. *Acta Pedol Sin* (土壤学报), 38(2):265~269(in Chinese)
- Wu S-C(吴胜春), Li L-M(李良谟), Li Z-G(李振高). 1994. Obtaining streptomycin resistance strain from predominant rhizosphere bacteria and its  $^{15}\text{N}$  label. *J Microbiol* (微生物学通报), 21(4):195~198(in Chinese)
- Zhang B-X(张炳欣), Zhang P(张平), Chen X-B(陈晓斌). 2000. Factors affecting colonization of introduced microorganisms on plant roots. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 11(6):951~953(in Chinese)

作者简介 何琳燕,女,1976年生,博士,主要从事土壤微生物分类和生态学研究,发表论文2篇. E-mail: hlyan0974@yahoo.com.cn