

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00495

阴沟肠杆菌 B8 拮抗活性基因‘*admA*’及上游调控序列的克隆与功能鉴定

朱军莉^{1,2}, 李德葆³, 余旭平¹

1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029;
2. 浙江工商大学食品与生物环境工程学院, 杭州 310035;
3. 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029

摘要: 为了阐明水稻白叶枯病拮抗菌阴沟肠杆菌 B8 的作用机理, 文章采用转座子标签法和染色体步移技术克隆到突变株 B8B 中 Tn5 插入位点周边拮抗活性相关片段, 并通过基因敲除验证了获得的拮抗相关片段‘*admA*’上游调控序列的功能。以转座子中 Kan 抗性基因为标签, 克隆了 B8B 菌株中 Tn5 插入位点左侧 2 608 bp 序列, 经两次染色体步移得到 Tn5 插入位点右侧的 2 354 bp 序列。序列拼接后获得 B8 菌株拮抗相关序列 4 611 bp 的 B contig。生物信息学分析显示该序列含有 7 个 ORF, 分别对应于 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH)基因的部分编码区、2 个 LysR 家族转录调控因子、弧菌假设蛋白 VSWAT3-20465 及成团泛菌(*Pantoea agglomerans*) andrimid 生物合成基因簇的 *admA*、*admB* 和部分 *admC* 基因序列。B8B 菌株 Tn5 插入分别位于同源于弧菌假设蛋白的 *anrP* ORF 及‘*admA*’基因上游 200 bp 和 894 bp 处。通过同源重组技术, 借助敲除质粒 pMB-BG, 获得拮抗活性消失的突变株 B-1 和 B-3。结果表明 B8B 突变株中 Tn5 的插入可能影响了 *anrP* 蛋白的转录和表达, 进而调控拮抗物质编码基因簇的生物合成。B8 菌株中拮抗物质相关基因是类似于 andrimid 生物合成基因簇的基因家族, 其上游调控区对该抗生素的生物合成具有重要的作用。

关键词: 阴沟肠杆菌 B8; 拮抗机理; Andrimid; 染色体步移

Cloning and function identification of gene ‘*admA*’ and up-stream regulatory sequence related to antagonistic activity of *Enterobacter cloacae* B8

ZHU Jun-Li^{1,2}, LI De-Bao³, YU Xu-Ping¹

1. Animal Science College, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
2. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China;
3. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

收稿日期: 2011-07-28; 修回日期: 2011-10-15

基金项目: 国家高技术研究发展规划项目(“863”计划)(编号: 104-04-01-01)资助

作者简介: 朱军莉, 博士, 讲师, 研究方向: 病原微生物学。E-mail: junlizhu0305@yahoo.com.cn

通讯作者: 余旭平, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 病原分子生物学。E-mail: xpyu@zju.edu.cn

网络出版时间: 2012-2-15 10:52:02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120215.1052.002.html>

Abstract: To reveal the antagonistic mechanism of B8 strain to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, transposon tagging method and chromosome walking were deployed to clone antagonistic related fragments around Tn5 insertion site in the mutant strain B8B. The function of up-stream regulatory sequence of gene 'admA' involved in the antagonistic activity was further identified by gene knocking out technique. An antagonistic related left fragment of Tn5 insertion site, 2 608 bp in length, was obtained by tagging with *Kan* resistance gene of Tn5. A 2 354 bp right fragment of Tn5 insertion site was amplified with 2 rounds of chromosome walking. The length of the B contig around the Tn5 insertion site was 4 611 bp, containing 7 open reading frames (ORFs). Bioinformatic analysis revealed that these ORFs corresponded to the partial coding regions of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, two LysR family transcriptional regulators, hypothetical protein VSWAT3-20465 of *Vibrionales* and *admA*, *admB*, and partial sequence of *admC* gene of *Pantoea agglomerans* biosynthetic gene cluster, respectively. Tn5 was inserted in the up-stream of 200 bp or 894 bp of the sequence corresponding to *anrP* ORF or *admA* gene on B8B, respectively. The B-1 and B-2 mutants that lost antagonistic activity were selected by homologous recombination technology in association with knocking out plasmid pMB-BG. These results suggested that the transcription and expression of *anrP* gene might be disrupted as a result of the knocking out of up-stream regulatory sequence by Tn5 in B8B strain, further causing biosynthesis regulation of the antagonistic related gene cluster. Thus, the antagonistic related genes in B8 strain is a gene family similar as andrimid biosynthetic gene cluster, and the upstream regulatory region appears to be critical for the antibiotics biosynthesis.

Keywords: *Enterobacter cloacae* B8; antagonistic mechanism; andrimid; chromosome walking

化学杀菌剂使用引起的环境污染、药物残留、食物中毒、耐药菌产生和扩散等问题,已引起公众的极大关注。探索安全有效的方法防治植物病害和动物疫病已成为农业可持续发展面临的关键问题。其中利用自然界中一些微生物拮抗病原菌的生物防治技术为植物病害和动物细菌性疫病防治开辟了一条安全环保和有效的途径^[1,2]。

水稻白叶枯病(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)是水稻生产上重要的 3 大病害之一。近年水稻白叶枯病在东北和华北稻区的发生和危害日趋严重。至目前,尚无理想的抗病品种,仍无非常有效的农药来进行控制。近年来,研究安全有效的拮抗微生物制剂已受到广泛关注。阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)B8 是从水稻叶面上分离的一株具有拮抗水稻白叶枯病菌等多种病原细菌的广谱拮抗菌^[3]。目前已较深入研究了 B8 菌株的生物学特性、拮抗活性和拮抗物质等,并进行了网室、田间定植及抗白叶枯病实验,均获得了较满意的结果^[3,4]。B8 菌株不仅对水稻白叶枯病菌、*Pseudomonas*、*Agrobacterium* 等植物病原具有高效的拮抗作用^[3],而且对临床分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)也表现良好的抑菌作用^[5]。因此,阴沟肠杆菌 B8 是一株理想

的用于植物病原生物防治的微生物菌株。

为阐明 B8 菌株的拮抗机理,已应用转座子标签法对阴沟肠杆菌 B8 中与抗水稻白叶枯病菌拮抗活性相关的 DNA 片段进行了克隆和检测^[6],筛选到 2 株拮抗活性丧失的菌株 B8B 和 B8F,通过 Southern 杂交技术证实 B8B 和 B8F 中 Tn5 转座位点分别位于 B8 菌株染色体 DNA 的 2 个不同位置。进一步应用亚克隆和染色体步移等手段,获得了突变株 B8F 中 Tn5 插入位点左右两侧与拮抗活性相关的基因序列^[7],基因互补实验验证了 Tn5 插入破坏的 Anr-F 基因与 *Enterobacter cloacae* B8 拮抗物质的形成相关^[8]。本研究在上述基础上,克隆了阴沟肠杆菌 B8 另一突变株 B8B 中 Tn5 插入位点左右两侧与拮抗活性相关的基因序列,并分析了其功能,为探讨该菌的拮抗机理及该拮抗菌的应用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 B8B 菌株 Tn5 左侧序列的标签法克隆

选择 Tn5 中间的 *Bam*H I 位点,该位点酶切后将 Tn5 切成二半,其中左边 2.7 kb 片段含有完整的 *kan* 抗性基因。将 B8B 基因组 DNA 酶切;同时用 *Bam*H I (TaKaRa 公司)单酶切质粒 pBluescript SK+ 难度

(Stratagene 公司), 并用 CIP(TaKaRa 公司)处理去磷酸化; 将载体与外源片段以 1 : 4 比例连接、转化, 用氨苄青霉素(Amp)和卡那霉素(Km)双抗性平板筛选转化子。应用 Tn5 上的 Kan 抗性基因作为标签, 将获得的克隆有 Tn5 Kan 抗性基因和一段插入位点左侧序列的质粒命名为 pTLB。

1.2 质粒 pTLB 克隆的 B 片段 GPS-1 测序

GPS-1 测序系统(NewEngland Biolabs 公司)主要由供体 DNA、TansABC 转座酶以及配套的测序引物组成。转座酶将供体的一段 DNA 随机插入到目的质粒上, 并且这种转座作用通常只出现一次。经热灭活、转化后产生的重组克隆, 随机挑取, 采用供体 DNA 上特有的引物进行测序。由于转座的随机性, 测定的序列可以覆盖除 Ori、抗性基因等质粒存活必需的功能区的整个质粒 DNA。将 pTLB 质粒提取纯化后, 整个反应体系的操作按照 GPS-1 说明进行。取 5 μ L 反应液转化, 涂布于含 Kan、Amp(pTLB 质粒上的抗性)和氯霉素(Cm)(试剂盒供体 DNA 的抗性)3 种抗生素平板上筛选。挑选菌落, 抽提质粒初步鉴定后, 应用配套的引物进行测序。

1.3 染色体步移接头和引物的设计和合成

染色体步移接头(cassette)采用 3 组, 其中 *Pst* I 接头参照文献[9]合成, 而另二组 *Sau*3A I 和 *Hinf* I 接头是模拟 TaKaRa LA PCR 的接头设计的: 设计的序

列是随机的, 但经 DNA Star 软件包中的 SelectPrimer 软件进行了自身发夹结构等参数的核对和优化。由于 *Hinf* I 识别的序列有 4 种可能性, 因此选择 4 个 *Hinf* I 接头。对应于 *Pst* I 接头的引物为 CP, 对应 *Sau*3A I 和 *Hinf* I 接头的引物命名为 CS, 有关的接头和引物序列见表 1。

1.4 染色体步移模板文库的构建及 PCR 扩增

用 50%甘油将 *Sau*3A I 1:40 稀释, 取 1 μ L 稀释酶对 B8 基因组 DNA 部分酶切, 37 $^{\circ}$ C 反应不同时间, 电泳观察, 取部分酶切效果较佳的产物用低熔点胶回收分子量在 2~5 kb 的部分酶切片段; 同时, 另外几组分别应用 *Pst* I、*Bgl* II、*Bam*H I、*Eco*T22 I 和 *Hinf* I(TaKaRa 公司)对 B8 基因组 DNA 进行完全酶切后, 电泳观察, 并回收酶切片段。分别将酶切回收的 B8 基因组 DNA 产物与 *Sau*3A I、*Pst* I 或 *Hinf* I 接头进行连接。连接产物用对应引物进行 PCR, PCR 反应体系为 20 μ L, 包括: 2 μ L buffer, 200 μ mol/L dNTP, 10 pmol 引物, 1 μ L 的连接产物 (5 ng DNA), 0.5 U *Ex Taq*(TaKaRa 公司)。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 5 s, 30 个循环; 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μ L 电泳, 观察扩增片段大小。

1.5 DNA 序列分析

特异扩增产物经试剂盒回收后用扩增引物直接

表 1 染色体步移所使用的接头和引物序列

名称	引物序列(5'→3')	备注
<i>Pst</i> I 接头	HO-AGATTCGGTGCCTGCTTGACTGCA-OH HO-TCTAAGCCACGCACGAAGCTG-OH	染色体步移接头
<i>Sau</i> 3A I 接头	HO-CTGTGGTGGTGGTTCCGATGTATG-OH HO-ACCACCAAGGCTACATACCTAG-OH	染色体步移接头
<i>Hinf</i> I 接头	HO-CTGTGGTGGTGGTTCCGATGTATG-OH HO-ACCACCAAGGCTACATACTAA-OH HO-ACCACCAAGGCTACATACTTA-OH HO-ACCACCAAGGCTACATACTGA-OH HO-ACCACCAAGGCTACATACTCA-OH	对应 4 种不同识别位点, <i>Hinf</i> I 接头有 4 种, 正向序列与 <i>Sau</i> 3A I 接头相同, 反向序列有 4 条, 选用反向序列复性即可获得不同的 4 种接头
接头引物	CP: AGATTCGGTGCCTGCTTGAC CS: CTGTGGTGGTTCCGATGTAT	CP 引物与 <i>Pst</i> I 接头配套使用; CS 引物与 <i>Sau</i> 3A I 和 <i>Hinf</i> I 接头配套使用
特异引物	B2260-80: AGGGAGATGTTGTCTATGTAG B3570-90: TATTGTCTGAGGAAGGCTTAG B1306-28: GAAATTGATCTTCGCCATTGAC B2630-49: TGTCTGTCCGTCCTCC acc1-up: CGTGGAACGGATGAAG acc1-down: ACCTGGCGGCGTTGTGACA Qcb-up: CCTCATGTTCTGTATGTAAGT Qcb-down: CGCACCGGAATGGTTCCTACTA	根据 B8 菌株获得序列合成的染色体步移的特异引物 基因敲除的特异引物

进行测序或克隆于 pMD18-T(TaKaRa 公司)载体后用 M13 通用引物测序。DNA 序列的测定由上海生物工程公司完成。相应的序列采用 DNA Star 软件包中的 editseq 和 seqman 等程序进行编辑和分析, 进一步用 BLAST N 和 X 程序在 GenBank 中查找同源序列。

1.6 B8 菌株拮抗性基因'admA'上游调控序列的功能验证

设计 Qcb-up 和 Qcb-down 引物, 从 B8 菌株中扩增 Tn5 周围的 868 bp QCB 片段, 纯化后克隆到 pMD18-T 载体上, 构建 pMD-B。以 pFastBacTMHTA 质粒 (Stratagene 公司) 为模板, 合成 acc1-up 和 acc1-down 引物, PCR 扩增出了含启动子的 *Gen^r* 基因, 克隆到 pMD18-T 载体。用 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切产物用 Klenow 补平后, 割胶回收 *Gen^r* 片段。将重组质粒 pMD-B 经 *Bgl* II (Tn5 插入位点下游 112 bp) 酶切并用 Klenow 补平, 纯化后与酶切补平的 *Gen^r* 基因连接过夜, 并转化, 获得阳性质粒 pMD-BG。制备 B8 菌株的感受态细胞, 电转化, 在 Amp 和 Gen 双抗平板上筛选发生基因重组的 B8 突变株。

1.7 拮抗性检测

在 Wakimoto 平板上活化 *X.oryzae* pv. *oryzae* Xcom3104, 同时将 B8、B8B 和突变株点种在 Wakimoto 平板上, 在 30 °C 培养 60~72 h, 平板用 1 mL 的氯仿熏蒸 1~2 h, 使菌体灭活, 并让氯仿挥发。无菌刮取生长良好的 *X.oryzae* pv. *oryzae* 溶于 1 mL 的灭菌水中, 充分混匀, 并将混合液铺于整个平板, 倒掉多余的液体, 待平板吸干菌液后在 30 °C 培养, 过夜后观察拮抗效果。

2 结果与分析

2.1 B8B 菌株 Tn5 侧翼序列的克隆和分析

在质粒 pZJ25 的 Tn5 中有一个 *Bam* H I 酶切位点, 经 *Bam* H I 酶切不破坏 Tn5 中的 *kan* 基因。用 *Bam* H I 对 B8B 基因组 DNA 进行完全酶切, 回收的酶切产物与经 *Bam* H I 酶切并经 CIP 脱磷的 pBS 载体进行连接, Kan 和 Amp 双抗性筛选, 得到一个克隆命名为 pTLB。对重组质粒 pTLB 的酶切图谱分析表明, 外源插入片段大小约为 6~7 kb, 明显大于 Tn5

片段(约 2.7 kb, 包括 Kan 抗性基因), pTLB 中插入的片段仅为一个 *Bam* H I 片段。结合 pTLB 质粒酶切分析结果、pBS 质粒及来源于 pZJ25 的半个 Tn5 结构, 质粒 pTLB 的图谱见图 1。

将 pTLB 质粒和 GPS-1 反应的产物转化, 涂于含有 Kan、Amp、Cm 的三抗平板上(目的是排除供体 DNA 插入在载体 pBS 的 *amp* 基因、ori 位点以及 Tn5 上的 *kan* 基因, 使序列测定范围更加集中于外源片段), 随机挑取 24 个克隆子进行测序。获得的序列去除 pBS 载体及 Tn5 上的载体序列, 拼接和编辑后获得了 2 608 bp 的 pTLB 上 B 片段全序列。

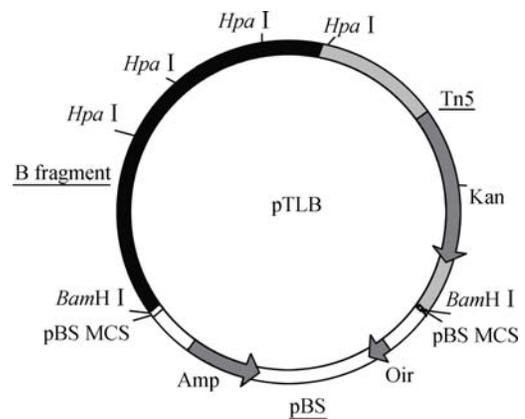


图 1 重组质粒 pTLB

2.2 B 片段染色体步移

应用 GPS-1 试剂盒获得了 pTLB 质粒上的 B 片段序列, 仅明确了 Tn5 转座子插入位点左侧片段序列。为了进一步明确转座子插入灭活的全基因序列, 研究采用了基于接头 PCR 的染色体步移技术, 设计了 *Sau*3A I、*Pst* I 和 *Hinf* I 接头, 构建了 *Sau*3A I 及同尾酶(isocaudamers)的 *Bgl* II 和 *Bam* H I 库、*Pst* I 及同尾酶的 *Eco*T22 I 库、*Hinf* I 库。配套相应的接头引物和 B 片段上的特异引物 B2260-80 进行 PCR 扩增。

经 PCR 条件优化, 在 *Sau*3A I 库获得了大小约 500 bp 的特异性条带, *Bgl* II+*Bam* H I 库则获得约 500 bp 和 700 bp 的两个片段, *Eco*T22 I 库扩增出 500 bp 和 1 000 bp 的两条带, *Hinf* I 库获得 1 500 bp 条带和非特异片段(图 2), 而 *Pst* I 库仅有一条小片段。将 *Sau*3A I、*Bgl* II+*Bam* H I 和 *Hinf* I 3 个库获得的 PCR 产物经纯化后直接测序或克隆测序, 分别获得 468

bp、662 bp 和 1 400 bp 的序列, 经 seqman 比较显示 3 条序列能形成同一个 contig, 序列相互吻合, 且获得的 1 400 bp 序列与 pTLB 质粒的 B 片段序列能完全衔接。在第一次染色体步移的基础上, 合成特异引物 B3570-90 进行了二次步移。结果显示, 在 *Sau3A*I 库中获得了约 1 000 bp 的条带, 在 *Hinf*I 库中获得约 750 bp 的特异条带(图 2), 而其他基因组文库中均未扩增出明显的片段。将上述获得的两个 PCR 产物纯化后克隆测序, 分别获得 1 000 bp 和 643 bp 的序列, 分析发现两条序列能形成同一个 contig, 并且能与第一次步移的序列衔接, 二次染色体步移共获得了 2 354 bp 的右侧序列。

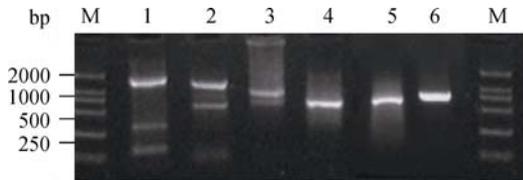


图 2 B8 染色体步移文库中两次染色体步移的 PCR 扩增产物

M: DL2000 分子量标准; 第一次染色体步移 1: *Hinf*I, 2: *EcoT22*, 3: *Bgl*II + *Bam*HI, 4: *Sau3A*I; 第二次染色体步移 5: *Hinf*I, 6: *Sau3A*I。

2.3 B8B 菌株 Tn5 插入位点左右序列的拼接及序列相似性分析

来源于质粒 pTLB 的 2 608 bp B 片段序列是 Tn 插入位点左侧序列, 两次染色体步移获得的 2 354 bp 是 Tn 插入位点右侧序列。将两个片段进行拼接后, 形成一个全长为 4 611 bp 的 B contig 序列, 说明染色体步移已成功地跨过了 B8B 基因组 DNA 的 Tn5 转座子插入位点, 获得了插入位点左右两侧较大范围的序列。应用转座子标签法和染色体步移克隆获得 B8B 菌株拮抗相关序列示意图见图 3A。

ORF 分析显示 4 611 bp 的 B contig 中包含 7 个 ORF。应用 BLAST 比较发现, 从左到右, 最左侧序列对应于 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH)基因的部分编码区, 其与沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans* 568)相应基因区域的一致性为 94%。紧邻的 2 个 ORF(471 bp 和 263 bp)分别与肺炎克雷伯菌亚种 *Pneumoniae* MGH78578 的 LysR 家族转录调控因子同源, 其一致性分别为 74%和 71%, Tn5 插入位点位于该调控基因

下游 1 090 bp。在 Tn5 插入位点下游 200 bp 分析到长度为 408 bp 的 ORF, 它与弧菌科细菌(*Vibrionales bacterium* SWAT-3)的假设蛋白 VSWAT3-20465 一致性为 83%, 将 B8 菌株中相对应的 ORF 命名为 *anrP*。而靠近 3'末端的 1 109 bp 序列与成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)*andrimid(adm)* 生物合成基因簇 (AY192157)中 *admA*(ORF 285 bp)、*admB*(ORF 699 bp)和 *admC*(ORF 750 bp)3 个基因和上游非编码序列的片段存在较高的序列相似性。对应地, 将 B8 菌株中相应的基因分别命名为 '*admA*'、'*admB*'和 '*admC*'。该序列覆盖了 *admA* 和 *admB* 的整个基因, 而对应于 *admC* 基因仅有 57 个碱基。序列相似性比较发现, 相应于 *admA* 和 *admB* 的两个基因在核酸水平的一致性分别为 84%和 85%, 在氨基酸水平分别为 86%和 81%。其中, Tn5 插入点在 '*admA*' 基因上游 894 bp。B contig 与 *adm* 基因簇对应的非编码区核苷酸序列比对见图 3B, 拮抗相关片段 B contig 的 ORF 及 BLASTX 序列相似性分析见表 2。

2.4 B8 和突变株中 Tn5 插入位点周边序列的 PCR 确认

根据获得的已知序列设计一对横跨 Tn5 转座子的引物 B1306-28 和 B2630-49, 分别在 B8、B8F 和 B8B 基因组 DNA 进行扩增。结果显示, 在 B8 和 B8F 中扩增出预期的约 2.6 kb 的片段, 而在 B8B 中因预期扩增片段过长而无任何条带(图略)。PCR 产物经纯化后测序, 其序列与染色体步移获得的序列一致。该结果进一步证明 B8B 突变株中 Tn5 插入在 *anrP* 和 '*admA*' 上游调控序列区域内。

2.5 B8 菌株拮抗活性基因 '*admA*' 上游调控序列的功能验证

将构建的拮抗活性基因 '*admA*' 上游调控序列的基因敲除质粒 pMB-BG(图 4)电转化到 B8 菌株, 经 Amp 和 Gen 平板多次筛选获得的 4 个突变株, 并进一步用 PCR 鉴定, 其中 B-1 和 B-3 扩增出来预期的 1.7 kb 的预期片段。将拮抗活性的阳性菌株 B8、阴性菌株 B8B 及突变株 B-1 和 B-3 同时点种到 Wakimoto 平板上, 经培养和氯仿灭活, 以 *X.oryzae* pv.*oryzae* 为指示菌, B8 菌株出现明显的拮抗圈, B8B 无拮抗活性, 而 B-1 和 B-3 点种到 Wakimoto 平板上, 拮抗圈同 B8B 菌株, 拮抗活性消失(图 4)。

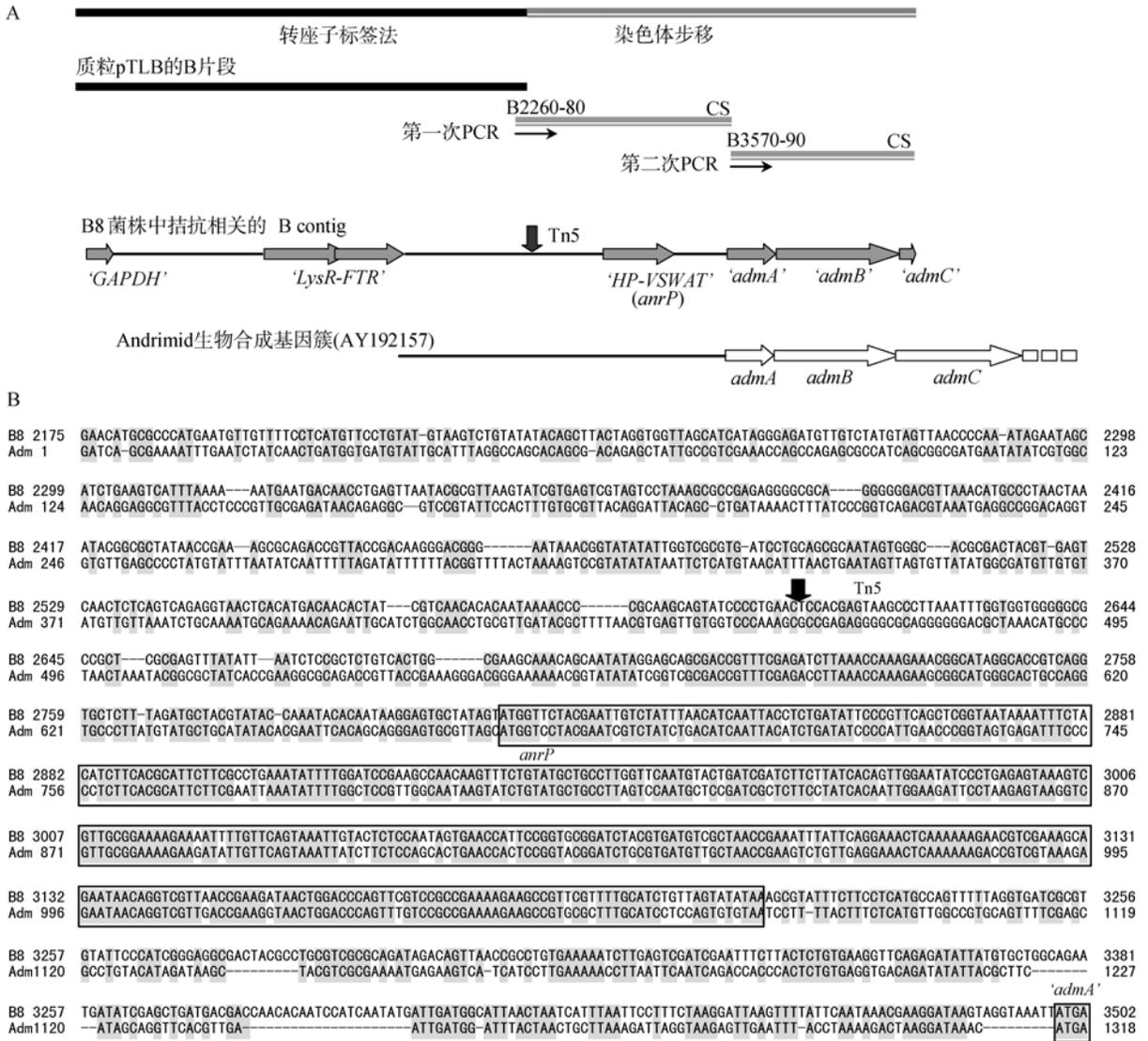


图 3 B8B 菌株拮抗相关片段 B contig 的克隆及序列分析

A : B contig 的克隆策略和结构分析; B : B contig 与 adm 基因簇对应的非编码区核苷酸序列比对。

表 2 拮抗相关片段 B contig 的 ORF 及 BLASTX 序列相似性分析

编码蛋白大小	对应基因编码序列长度(bp)	同源蛋白名称	一致性	相似性
64aa (3~197 bp)	195	3-磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH) (变形斑沙雷氏菌 568)	94%	99%
156aa (985~1455 bp)	471	LysR 家族转录调控因子 (LysR-FTR) (肺炎克雷伯菌肺炎亚种 MGH 78578)	74%	84%
120aa (1359~1721 bp)	363	LysR 家族转录调控因子(LysR-FTR) (肺炎克雷伯菌肺炎亚种 MGH 78578)	71%	83%
135aa (2809~3216 bp)	408	假设蛋白 VSWAT3-20465(HP-VSWAT) (弧菌科菌 SWAT-3)	83%	92%
94aa (3503~3787 bp)	285	AdmA (成团泛菌)	87%	93%
232aa (3864~4562 bp)	699	AdmB (成团泛菌)	81%	90%
18aa (4555~4611 bp)	56	AdmC (成团泛菌)	86%	90%

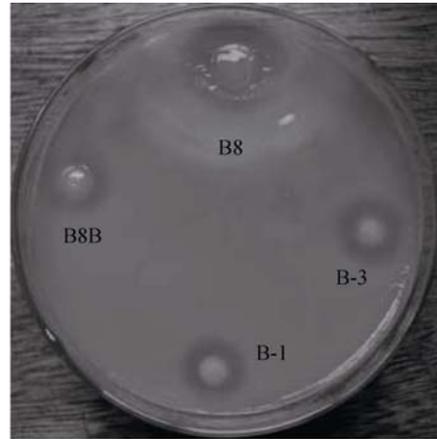
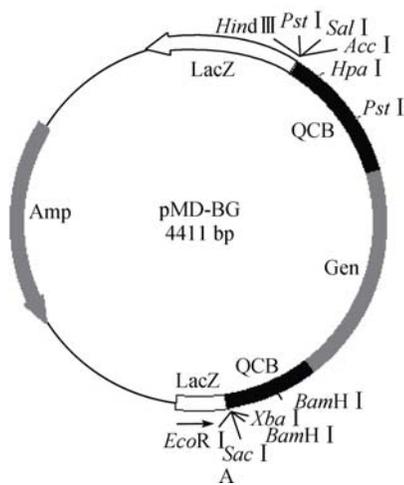


图4 拮抗活性分析

A: 基因敲除质粒 pMD-BG 图谱; B: 突变株的拮抗活性测定。

3 讨论

阴沟肠杆菌B8 最初是从水稻叶面微生物中分离的一株能有效拮抗白叶枯病菌的菌株^[3], 结果显示该菌的提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)也具有很好的抑菌作用^[10]。前期研究表明, B8 拮抗活性与其产生的拮抗物质有关, 该拮抗物既有类似多肽的特征, 又有较高的亲脂性^[4]。为了从分子水平阐明B8 菌株的拮抗机理, 我们前期应用转座子标签法筛选获得 2 株拮抗活性丧失的菌株B8B和B8F, 并应用标签法分析了两个突变株中Tn5 插入位点周边的DNA序列^[6]。对B8F菌株的进一步克隆分析研究显示, 转座子插入于阴沟肠杆菌B8 菌株的染色体位点周边的一段序列与成团泛菌(*P. agglomerans*)andrimid 生物合成基因簇的*admM*、*admN*和*admL* 3 个基因同源, 拮抗活性的消失是由于Tn5 插入到B8 菌株基因组DNA中与编码polyketide合成酶*admM*基因同源的*anr-F*基因终止密码子前 214 bp, 从而破坏了B8 菌株中*anr-F*基因完整性, 使其产物失去活性的结果^[8]。本研究进一步分析了另一个突变株B8B Tn5 转座插入位点周边的序列, 结果显示, 获得的阴沟肠杆菌B8 菌株拮抗活性相关序列B contig也与*P. agglomerans* 的andrimid生物合成基因簇有关。

近年来, Andrimid生物合成和抑菌机理已开展了深入研究^[11-14]。编码Andrimid合成的相关基因簇由Jin等报道, GenBank登录的*Pantoea agglomerans*

andrimid生物合成基因簇序列(A Y192157)全长 28 485 bp, 由*AdmA*、*AdmB*、*AdmC*……*AdmU* 21 个基因组成。Andrimid是一种杂环非核糖核体肽类-聚酮化合物抗生素, 它通过抑制乙酰辅助A羧化酶(ACC)的 β -亚单位, 使ACC催化乙酰辅酶A转化为脂肪酸生物合成的底物丙二酰辅酶A的反应受到影响, 从而阻止了细胞形成^[11]。通过体外表达和生物信息分析, 进一步阐明了Andrimid生物合成基因簇及单个基因的功能^[11-13], 发现了该基因簇具有明显功能的4 部分构成, 而谷氨酰胺酶类(TGase)同源物*admF*基因在andrimid 生物合成中催化形成了第一个肽链, 是Andrimid生物合成通道的关键成分^[12]。

B8B 菌株是水稻白叶枯病菌 B8 拮抗菌的突变株, 其拮抗功能的缺失与 Tn5 转座子的插入存在直接的关联。通过对转座子标签法获得的 pTLB 质粒的序列分析, 获得了 Tn5 插入位点上游的 2 608 bp 序列, 进一步采用染色体步移技术, 并经克隆测序, 获得 Tn5 转座子的插入位点下游 2 003 bp 序列, 经拼接获得 Tn5 插入位点上下游共计 4 611 bp 的序列。根据测定序列在对应于 Tn5 插入位点上下游位置设计引物, 从 B8 和 B8F 菌株中扩增出了连续的片段, 测序结果证明了获得序列的正确性。

生物信息学分析结果看, 阴沟肠杆菌B8 菌拮抗活性相关序列B contig与*P. agglomerans* 的andrimid生物合成基因簇上游及*admA*、*admB*、*admC*具有很高的序列相似性, 其中*admA*和*admC*基因主要参与

了Andrimid抗生素生物合成通道中多不饱和脂肪酸的形成^[11]。Tn5 插入位点位于 2 个LysR-FTR基因的下游 1 090 bp和‘*admA*’基因上游 894 bp, 由此分析Tn5 的插入对这些基因无直接影响。而Tn5 插入位点位于*anrP*基因上游 200 bp, 尽管andrimid 生物合成基因簇上游的非编码序列中也存在该ORF, 未分析和标注, 但是经BLAST比较后发现其与弧菌科菌(Vibrionales bacterium SWAT-3) 假设蛋白VSWAT3-20465 具有较高的一致性。

研究通过基因重组缺失的技术, 分析了Tn5 周边上游调控序列的功能。扩增Tn5 周边 868 bp的一个片段, 在该片段上选择了相应于Tn5 插入位点下游 112 bp的*Bgl* II位点插入*Gen*’基因, 构建了基因敲除质粒pMD-BG。利用敲除质粒两臂端同源的 520 bp和 343 bp片段, 电转化到B8 菌株中进行同源重组。结果发现, 在获得的转化子中共筛选到两个拮抗活性消失的阳性克隆。基因功能缺失结果也进一步说明‘*admA*’基因上游直至 800~900 bp处的序列依然与B8 拮抗活性有关。因此, 推测*anrP*可能也是一个与B8 拮抗活性有关的基因, Tn5 插入区域可能影响了该蛋白的转录和表达, 并进一步调控了B8B突变株中拮抗物质编码的基因簇的生物合成, 使其产物失去活性。

由此可见, 阴沟肠杆菌 B8 菌株产生的拮抗物质很可能是一类 Andrimid 抗生素, B8 菌株中拮抗物质相关基因也可能是类似于 *andrimid* 生物合成基因簇的基因家族, 其上游调控区对该抗生素的生物合成具有重要的作用。本研究为进一步获得完整的 B8 菌株拮抗基因簇, 完全解开 B8 菌株的拮抗机理奠定坚实的基础。

参考文献(References):

- [1] 马冠华, 周常勇, 肖崇刚, 陈国康, 易龙. 烟草内生细菌Itb57 的鉴定及其对烟草黑胫病的防治效果. 植物保护学报, 2010, 37(2): 148–152. DOI
- [2] Azevedo JL, Maccheroni W Jr, Pereira JO, de Araújo WL. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electr J Biotechnol*, 2000, 3(1): 40–65. DOI
- [3] 陈卫良, 徐平, 龚鸿飞, 李德葆. *Enterobacter cloacae* B8x在水稻叶部定殖及防治水稻白叶枯病的研究. 农业生物技术学报, 1994, 2(2): 61–66. DOI
- [4] 陈卫良. 抗水稻白叶枯病细菌拮抗物质的研究[学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2001. DOI
- [5] 张嵘, 陈卫良, 朱百荣. 阴沟肠杆菌B8 提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(3): 172–172. DOI
- [6] 黄海宁, 余旭平, 陈卫良, 龚鸿飞, 李德葆. 转座子标签法对阴沟肠杆菌B8 拮抗水稻白叶枯病菌相关基因片段的克隆与检测. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2006, 32(3): 265–269. DOI
- [7] Yu XP, Zhu JL, Yao XP, He SC, Huang HN, Chen WL, Li DB. Cloning and analysis of the antagonistic related genes of *Enterobacter cloacae* B8. *Chin Sci Bull*, 2004, 49(13): 1370–1375. DOI
- [8] Yu XP, Zhu JL, Yao XP, He SC, Huang HN, Huang HN, Chen WL, Hu YH, Li DB. Identification of *anrF* gene, a homology of *admM* of andrimid biosynthetic gene cluster related to the antagonistic activity of *Enterobacter cloacae* B8. *World J Gastroentero*, 2005, 11(39): 6125–6158. DOI
- [9] Mogens K, Klaus NK. Rapid genome walking: a simplified oligo-cassette mediated polymerase chain reaction using a single genome-specific primer. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(11): 55–58. DOI
- [10] 张嵘, 陈卫良, 朱百荣. 阴沟肠杆菌B8 提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(3): 172–172. DOI
- [11] Jin M, Fischbach MA, Clardy J. A biosynthetic gene cluster for the acetyl-CoA carboxylase inhibitor andrimid. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(33): 10660–10661. DOI
- [12] Fortin PD, Walsh CT, Magarvey NA. A transglutaminase homologue as a condensation catalyst in antibiotic assembly lines. *Nature*, 2007, 448(7155): 824–827. DOI
- [13] Liu XY, Fortin PD, Walsh CT. Andrimid producers encode an acetyl-CoA carboxyltransferase subunit resistant to the action of the antibiotic. *Proc Nalt Acad Sci USA*, 2008, 105(36): 13321–13326. DOI
- [14] Magarvey NA, Fortin PD, Thomas PM, Kelleher NL, Walsh CT. Gatekeeping versus promiscuity in the early stages of the andrimid biosynthetic assembly line. *ACS Chem Biol*, 2008, 3(9): 542–554. DOI