

*sacB*介导的绿针假单胞菌YL-1遗传操作方法

刘邰洲, 张婷婷, 周亚秋, 乔俊卿, 刘永锋*

(江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

摘要: 绿针假单胞菌 *Pseudomonas chlororaphis* YL-1 是从大豆根围分离获得的, 对多种病原细菌和病原真菌有较强抑制作用。为了探明绿针假单胞菌 YL-1 生防相关基因的功能, 本研究以嗜铁素转录调控因子 PvdS 编码基因为对象, 建立了一套基于负选择标记基因 *sacB* 的绿针假单胞菌无标记基因敲除技术, 构建重组质粒 pEX18-*pvdS*, 通过改良的细菌接合转移技术将重组质粒导入野生型菌株 YL-1 中, 利用同源重组技术获得缺失突变株 $\Delta pvdS$ 。生防相关性研究结果表明, 与野生型菌株 YL-1 相比, 突变株 $\Delta pvdS$ 泳动能力和生长能力未发生改变, 但是群集运动能力显著下降。同时突变株 $\Delta pvdS$ 合成嗜铁素的能力也显著下降, *pvdS* 基因互补后突变株能恢复合成嗜铁素的功能。本文结果表明, 已成功建立了适用于 YL-1 的基因定向敲除技术和功能基因互补体系, 为深入研究 YL-1 的生防机制奠定了重要基础。

关键词: 绿针假单胞菌; *sacB*; *pvdS*; 嗜铁素

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2019)04-0622-08

Establishment of *sacB*-mediated Genetic Manipulation System of *Pseudomonas chlororaphis* YL-1

LIU Youzhou, ZHANG Tingting, ZHOU Yaqiu, QIAO Junqing, LIU Yongfeng*

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Strain YL-1 was isolated from soybean root tips and identified as *Pseudomonas chlororaphis*. This strain showed broad-spectrum antibacterial and antifungal activities against plant phytopathogens that are economically important in agriculture. In order to explore the function of its biocontrol-associated genes, an efficient genetic manipulation system was established in this study. The *Bacillus subtilis sacB* gene, whose product encodes levansucrase that is toxic to Gram-negative bacteria in the presence of sucrose, was considered as a counter-selection marker in the system. We selected a well-characterized *pvdS* as a representative example to generate an in-frame deletion mutant, because the product of *pvdS* encodes a sigma factor that is known to control pyoverdine biosynthesis at transcription level. A *sacB*-containing suicide-vector, pEX18 was used, in which both the upstream and downstream homolog fragment of *pvdS* was cloned, creating a recombinant plasmid, pEX18-*pvdS*. The recombinant plasmid was transformed into wild type strain YL-1 via an optimized bacterial conjugal approach. Via a double-crossover homologous recombinant approach, an in-frame deletion mutant of *pvdS*, named as $\Delta pvdS$ was generated and validated. Compared to the wild type, this mutant exhibited equal swimming motility and growth capacity, but a significant decrease in swarming motility and pyoverdine production. The function of pyoverdine production in the $\Delta pvdS$ could be rescued by introducing a plasmid-borne *pvdS* into this mutant. Together, our studies established an effective system for both in-frame gene deletion and complementation in YL-1, which facilitates to uncover the biocontrol mechanisms of YL-1 in the future.

Key words: *Pseudomonas chlororaphis*; *sacB*; *pvdS*; pyoverdine

收稿日期: 2019-01-22

基金项目: 国家自然科学基金(31672076); 江苏省重点研发计划(BE2018359); 苏州市科技计划项目(SNG2018095)

作者简介: 刘邰洲, 博士, 研究员, E-mail: shitouren88888@163.com; *通信作者, 博士, 研究员, E-mail: liuyf@jaas.ac.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.04.020

假单胞菌 *Pseudomonas* spp. 在自然界分布广泛, 种类繁多, 属内许多菌株有防治植物病害、促进植株生长的作用, 属植物根围促生细菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 类^[1]。绿针假单胞菌 YL-1 是本实验室从大豆根围分离获得的一株细菌, 室内抑菌试验结果表明, 该菌株对多种重要病原细菌 (荚壳伯克霍尔德菌 *Burkholderia glumae*、解淀粉欧文氏菌 *Erwinia amylovora* 和胡萝卜果胶杆菌 *Pectobacterium carotovora* 等) 和病原真菌 (立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 等) 有较强抑制作用^[2]。

为挖掘绿针假单胞杆菌 YL-1 拮抗病原细菌和真菌的活性物质、定位其合成基因簇, 对已完成测序的菌株 YL-1 基因组进行生物信息学分析, 预测了菌株 YL-1 基因组中可能负责抗菌活性物质合成的基因簇, 包括: 与吩嗪类抗菌物质 (Phenazine) 合成的相关基因簇 *phzABCDEFG* 以及 2 个调控相关基因 (*phzI-phzR*), 与硝吡咯菌素 (Pyrrolnitrin) 合成相关的基因簇 *prnABCD*, 氢氰酸 (HCN) 合成基因簇, 2 套嗜铁素 Pyoverdine (PVD) 和 Achromobactin (ACR) 合成基因簇, 参与杀虫的 Fit 毒素生物合成基因簇^[3]。这些生防相关基因及基因簇的深入研究对揭示绿针假单胞菌 YL-1 的生防机制和生产应用具有重要的科学价值, 因此需要简单和高效的遗传操作技术来实现上述基因的敲除或突变, 揭示基因功能。

细菌中应用比较多的基因突变策略有 3 种: 目的基因的插入突变体系、转座子介导的基因突变体系和无标记基因的缺失突变体系。前两种突变体系均会引入一个抗生素基因, 可能会带来极生化影响, 混淆因抗生素造成的突变表型和目的基因突变造成的表型^[4]。无标记的缺失突变体系中自杀性载体整合到细菌染色体中进行双交换, 其中需要负选择标记来筛选双交换子, 已报道的负选择标记基因, 如 *sacB*、*ccdB*、*pheS* 等^[5]。本研究构建了 *sacB* 介导的绿针假单胞菌无标记基因敲除技术, 为研究绿针假单胞菌 YL-1 生防相关基因及基因簇合成、调控、遗传改良等奠定基础, 提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株和质粒 本试验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strains or plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
绿针假单胞菌 <i>Pseudomonas chlororaphis</i>		
YL-1	Wild-type strain, Amp ^R	实验室保存
$\Delta pvdS$	<i>pvdS</i> in-frame deletion mutant of strain YL-1, Amp ^R	本研究获得
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻m_k⁺</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i>	实验室保存
S17- λ pir	res ⁻ pro ⁺ integrated copy of RP4, mob ⁺	实验室保存
EC100D <i>pir</i> ⁺	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>nupG</i> <i>pir</i> ⁺ (DHFR)	实验室保存
质粒 Plasmids		
pUCP26	Broad-host-range vector; Tc ^r	美国密西西比州立大学惠赠[6]
pEX18	Suicide plasmid Gm ^r	南京农业大学惠赠[7]
pEX18- <i>pvdS</i>	pEX18GM with two flanking fragments of <i>pvdS</i>	本研究获得

1.1.2 主要试剂、培养基和培养条件 DNA Marker、限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司; PCR 产物回收试剂盒购自 Axygen 公司; 其他试剂均为国产分析纯。LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g、酵母粉 5.0 g、NaCl 10.0 g、蒸馏水 1000 mL; 蔗糖选择培养基: LB 培养基另加 10% 蔗糖; SSA 培养基: KH₂PO₄ 3.0 g、K₂HPO₄ 6.0 g、

MgSO₄·7H₂O 0.1 g、(NH₄)₂SO₄ 1.0 g、琥珀酸 4.0 g、蒸馏水 1000 mL，用 NaOH 调节 pH 7.0；SOC 培养基：胰蛋白胨 20.0 g，酵母粉 5.0 g，NaCl 0.5 g，2.5 mmol/L KCl，10 mmol/L MgCl₂，20 mmol/L 葡萄糖，蒸馏水 1000 mL；泳动力检测培养基：胰蛋白胨 10.0 g，NaCl 5.0 g，琼脂糖 3.0 g，蒸馏水 1000 mL；群集运动能力检测培养基：胰蛋白胨 10.0 g，NaCl 5.0 g，琼脂糖 7.0 g，蒸馏水 1000 mL。抗生素用量 (μg/mL)：氨苄青霉素 (Amp) 100，庆大霉素 (Gm) 50，四环素 (Tet) 25。培养温度：大肠杆菌 *Escherichia coli* 37 °C，绿针假单胞菌 *Pseudomonas chlororaphis* 28 °C。

1.2 引物设计和 PCR 反应

以绿针假单胞菌 YL-1 中 *pvdS* 基因为试验对象，构建 *pvdS* 基因的缺失突变体。根据 *Pseudomonas chlororaphis* YL-1 全基因组数据 (GenBank 登录号: GCA_000512485.1)，用 BioXM v2.6 软件设计引物：分别在 *pvdS* 基因两端序列的上下游 5'端增添 *Kpn* I、*Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点 (表 2)，利于 PCR 产物的克隆、酶切和连接。引物 *pvdS*-F1、*pvdS*-R1、*pvdS*-F2 和 *pvdS*-R2 由上海生工生物工程有限公司合成。

挑取绿针假单胞菌 YL-1 单菌落接种到 5 mL LB 液体培养基中，28 °C、200 r/min 过夜培养，采用试剂盒提取细菌基因组 DNA。目的基因 *pvdS* 两端序列的 PCR 反应体系为：10×Trans Taq-T Buffer (Mg²⁺) 2.5 μL，dNTP 2 μL，引物 *pvdS*-F1 和 *pvdS*-R1 (或引物 *pvdS*-F2 和 *pvdS*-R2) 各 0.5 μL，Trans Taq-T DNA polymerase 0.3 μL，模板 DNA 0.3 μL，ddH₂O 补足至 25 μL。目的基因 *pvdS* 两端序列的梯度 PCR 程序：95 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，55~70 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，30 个循环；72 °C 延伸 10 min；16 °C 保温。使用 PCR 清洁试剂盒对 2 个 PCR 产物分别进行回收。

表 2 试验所用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	目的片段 Purpose fragment
<i>pvdS</i> -F1	GGGGTACCCTGCTGTGGCGGGATGTTTC (<i>Kpn</i> I)	扩增 351 bp <i>pvdS</i> 片段
<i>pvdS</i> -R1	CCCAAGCTTCCGCGATTTTGACCAGGATC (<i>Hind</i> III)	
<i>pvdS</i> -F2	CCCAAGCTTACCTACGCCCGCCACTGAT (<i>Hind</i> III)	扩增 330 bp <i>pvdS</i> 片段
<i>pvdS</i> -R2	GCTCTAGAGGATGGCGTGAGGAGTGGAT (<i>Xba</i> I)	

1.3 目的基因 *pvdS* 两端序列的连接和转化

目的基因 *pvdS* 上游扩增片段采用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切，下游扩增片段采用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切，自杀载体 pEX18 采用 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切，连接，构建携带 *pvdS* 缺失片段的重组质粒 pEX18-*pvdS*^[8]，遗传转化大肠杆菌 DH5α 后进行蓝白斑筛选，在相应的 Gm 50+X-gal 100 μg/mL 的 LB 平板上挑选白色单菌落。利用引物 *pvdS*-F1/*pvdS*-R2 进行菌落 PCR 验证。

1.4 重组质粒双酶切验证、转化和细菌结合转移

质粒抽提、双酶切根据参考文献[8]进行，重组质粒 pEX18-*pvdS* 遗传转化大肠杆菌 S17-1λpir 后进行蓝白斑筛选，在相应的 Gm 50+X-gal 100 μg/mL 的 LB 平板上挑选蓝色单菌落，利用引物 *pvdS*-F1/*pvdS*-R2 进行菌落 PCR 验证。细菌接合转移根据参考文献[9]进行，绿针假单胞菌 YL-1 和大肠杆菌 pEX18-S17-1 接合转移前，pEX18-S17-1 菌液先放入 4 °C 冰箱，菌株 YL-1 菌液 30~35 °C 水浴处理，随后将 pEX18-S17-1 菌液与菌株 YL-1 菌液各取 200 μL 按 1:1 的比例混合，28 °C 在 LB 平板开展接合转移试验。因为重组质粒不能自主复制，所以重组质粒携带的 *pvdS* 基因片段与受体菌—绿针假单胞菌 YL-1 的染色体 *pvdS* 基因发生同源重组。重组质粒有 Gm 抗性，受体菌有 Amp 抗性，将上述混合菌体用无菌水洗脱，涂布在含有 Gm 50+Amp 100 μg/mL 的 LB 平板上 28 °C 培养 2 d，挑取共整合接合子 (单交换株)。

1.5 接合子的筛选和检测

用灭菌牙签挑取单交换株菌落于 10%蔗糖+Amp 100 μg/mL 的 LB 平板上划线，28 °C 培养 2 d 左右长出单菌落，利用自杀载体 pEX18 上的筛选标记基因 *sacB*，通过蔗糖的压力筛选使单交换株致死，长出的单菌落即为双交换子或野生型菌株。挑取厚实的单菌落，分别划 Gm 50+Amp 100 μg/mL 和 Amp 100 μg/mL

的 LB 平板。凡是在 Gm 50+Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 平板上不生长而在 Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 平板上生长的相应克隆表明已发生双交换, 即获得绿针假单胞菌 YL-1 的 *pvdS* 基因突变株, 命名为 $\Delta pvdS$ 。用灭菌牙签点取突变株单菌落于 5 mL LB 液体培养基中、28 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜; -70 $^{\circ}\text{C}$ 甘油保存。

接合子的检测: 采用试剂盒提取突变株基因组 DNA 作为模板, 根据目的基因 *pvdS* 的引物 *pvdS*-F1/*pvdS*-R2 进行 PCR 扩增, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段的大小。

1.6 泳动能力和群集运动能力测定

操作方法参照文献[10], 用灭菌牙签挑取野生型菌株 YL-1 和突变株 $\Delta pvdS$ 单菌落分别点接在泳动能力和群集运动能力检测培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。细菌会依赖鞭毛运动在培养基的表面以接种点为圆心向周围生长, 形成大小不一的圆环。

1.7 生长曲线测定

操作方法参照文献[11]。挑取野生型菌株 YL-1 和突变株 $\Delta pvdS$ 单菌落接种到 20 mL LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 1.0, 按照 1:100 的比例接种到 100 mL LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养, 每隔 6 h 取样, 测定 OD₆₀₀, 3 次重复, 取平均值。

1.8 嗜铁素含量测定

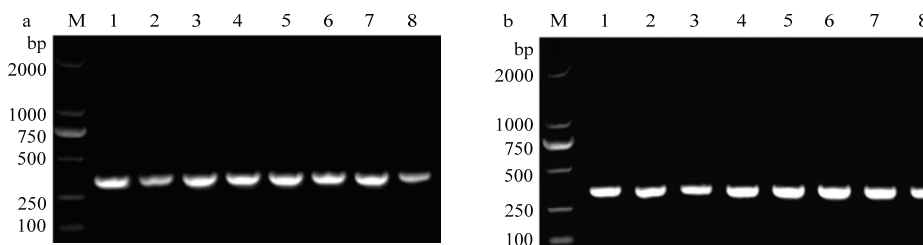
突变株 $\Delta pvdS$ 感受态细胞的制备参照文献[1]的方法。质粒 pUCP26 是大肠杆菌-假单胞菌穿梭载体, 带有多个酶切位点[6]。利用引物 *pvdS*-F1/ *pvdS*-R2 进行目的基因 *pvdS* 的 PCR 扩增, 连接质粒 pUCP26, 试验方法同 1.3, 构建携带目的基因 *pvdS* 的重组质粒 pUCP26-*pvdS*, 遗传转化大肠杆菌 EC100D *pir*⁺, 重组质粒抽提、双酶切验证同 1.4。参照文献[12]的方法, 将 50 μL 突变株 $\Delta pvdS$ 感受态细胞加入 2 μL 重组质粒 pUCP26-*pvdS* 或 pUCP26 质粒, 混合后转入 0.2 CM 的提前预冷的电极杯中。调节电压 2.5 kV, 将电极杯放入电转化仪, 电击 2 s 后, 迅速转入 5 mL 的 SOC 液体培养基试管中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 复苏 4 h。转化产物取 100 μL 涂布于含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素抗性的 LB 平板, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 获得 $\Delta pvdS$ 互补菌株和空质粒对照菌株 $\Delta pvdS$ -pUCP26。

绿针假单胞菌 YL-1 中 *pvdS* 基因是 σ 因子, 调控嗜铁素的转录。挑取野生型菌株 YL-1、 $\Delta pvdS$ 突变株、 $\Delta pvdS$ 互补菌株、空质粒对照菌株 $\Delta pvdS$ -pUCP26 的单菌落分别在 5 mL 的嗜铁素选择性 SSA 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床中培养 48 h, 肉眼观察培养液的颜色, 同时用分光光度计 (UVmini-1240, SHIMADZU) 检测 OD₄₀₅/OD₆₀₀ 值[13]。

2 结果与分析

2.1 *pvdS* 基因两端序列的扩增

以野生型菌株 YL-1 的 DNA 为模板、两对引物 *pvdS*-F1/*pvdS*-R1 和 *pvdS*-F2/*pvdS*-R2 分别进行 PCR, 获得 *pvdS* 基因两端分别为 351 和 330 bp 的两个条带 (图 1), 回收 PCR 产物进行测序, 序列比对与野生型菌株 YL-1 的同源性为 100%。



a: 扩增 351 bp *pvdS* 片段 To amplify a 351 bp fragment of *pvdS*; b: 扩增 330 bp *pvdS* 片段 To amplify a 330 bp fragment of *pvdS*

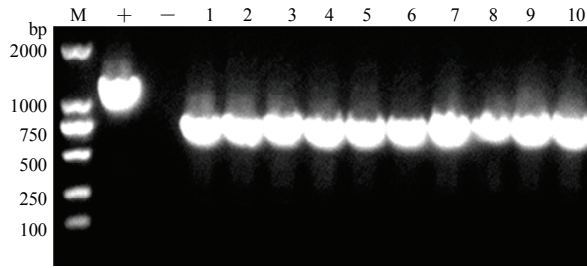
图 1 目的基因 *pvdS* 两端序列 (a 和 b) 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of two end sequences (a and b) of *pvdS* gene from YL-1

2.2 *pvdS* 基因缺失片段的克隆

所挑选的 10 个转化子经 PCR 验证均为阳性克隆, 扩增片段大小为 700 bp 左右, 野生型菌株 YL-1 中

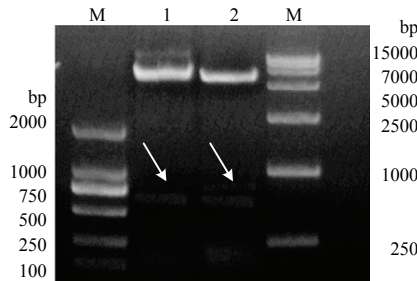
pvdS 基因为 1200 bp 左右 (图 2)。抽提重组质粒, 用 *KpnI* 和 *XbaI* 进行双酶切, 获得质粒条带和一条 700 bp 左右的条带, 表明重组质粒构建成功 (图 3)。重组质粒 pEX18-*pvdS* 转化结果表明, 挑选的 6 个转化子均为阳性克隆, 扩增片段大小为 700 bp 左右, 与重组质粒 PCR 扩增条带大小一致, 表明转化成功 (图 4)。



M: DNA marker; +: YL-1; -: *E. coli* DH5 α ; 1~10: pEX18-DH5 α

图 2 重组质粒 pEX18-*pvdS* 转化大肠杆菌 DH5 α 后菌落 PCR

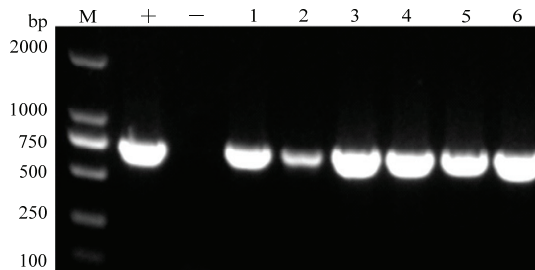
Fig. 2 Colony PCR after transforming *E. coli* DH5 α with recombinant plasmid pEX18-*pvdS*



M: DNA marker; 1~2: pEX18-*pvdS*

图 3 重组质粒 pEX18-*pvdS* 酶切图谱

Fig. 3 Restriction map of recombinant plasmid pEX18-*pvdS*



M: DNA marker; +: pEX18-*pvdS*; -: *E. coli* S17-1; 1~6: pEX18-S17-1

图 4 重组质粒 pEX18-*pvdS* 转化大肠杆菌 S17-1 后菌落 PCR

Fig. 4 Colony PCR after transforming *E. coli* S17-1 with recombinant plasmid pEX18-*pvdS*

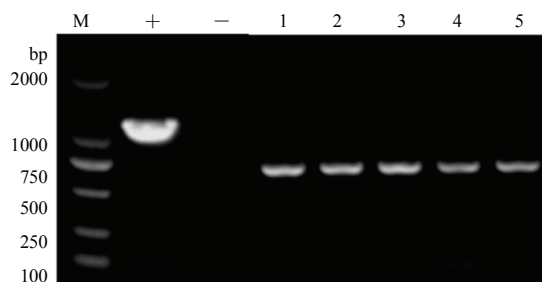
2.3 突变株 $\Delta pvdS$ 的获得和验证

以携带重组质粒的大肠杆菌 pEX18-S17-1 为供体菌, 野生型菌株 YL-1 为受体菌进行固相滤膜接合转移。

以获得的接合子基因组为模板, 用引物 *pvdS*-F1/*pvdS*-R2 进行 PCR 扩增, 挑选的 5 个接合子比野生型菌株 YL-1 少 500 bp 左右的片段 (图 5), 测序比对进行验证, 结果表明 *pvdS* 基因突变成功。

2.4 突变株泳动能力和群集运动能力

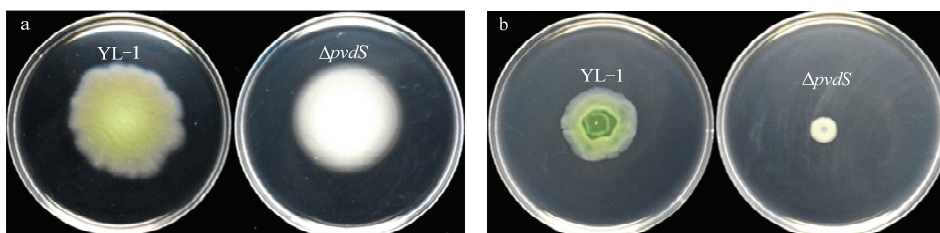
泳动能力的检测结果表明, 28 °C 培养 30 h, 野生型菌株 YL-1 和突变株 $\Delta pvdS$ 周围都能形成圆环, 两者圆环的大小几乎无差别 (图 6a)。群集运动能力的检测结果表明, 28 °C 培养 48 h, 突变株 $\Delta pvdS$ 只能形成非常有限的菌落 (图 6b), 表面扩散能力显著下降, 说明突变株的群集运动能力明显下降。



M: DNA Marker; +: YL-1; -: *E. coli* S17-1; 1~5: $\Delta pvdS$

图 5 双交换后菌落 PCR

Fig. 5 Colony PCR after double crossover



a: 泳动能力 Swimming; b: 群集运动能力 Swarming

图 6 野生型菌株 YL-1 和突变菌株 $\Delta pvdS$ 运动能力检测

Fig. 6 Cell motility assays of wild type strain YL-1 and the mutant $\Delta pvdS$

2.5 突变株的生长曲线

野生型菌株 YL-1 和突变株 $\Delta pvdS$ 在 LB 培养基生长基本一致, 0~24 h 菌株生长较快, 48 h 后生长趋于稳定, *pvdS* 基因的突变对菌株生长没有影响 (图 7)。

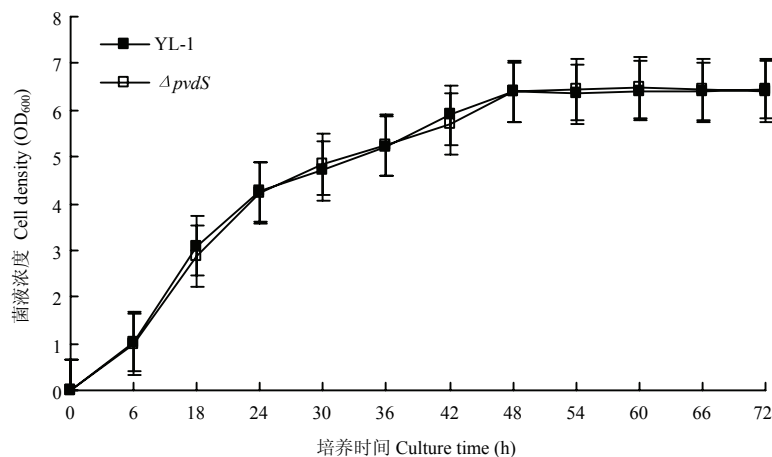
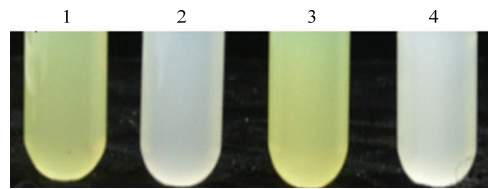


图 7 野生型菌株 YL-1 和突变菌株 $\Delta pvdS$ 生长曲线

Fig. 7 Cell growth of wild type strain YL-1 and the mutant $\Delta pvdS$ in LB medium

2.6 突变株嗜铁素的含量

与野生型菌株 YL-1 相比, 突变株 $\Delta pvdS$ 液体培养后没有出现黄绿色, 培养 48 h 后, 野生型菌株 YL-1 的 OD_{405}/OD_{600} 值为 2.41, 突变株 $\Delta pvdS$ 的 OD 值明显下降, 为 0.53。互补菌株能恢复表型, 液体培养后呈现黄绿色, 培养 48 h 后, 互补菌株的 OD_{405}/OD_{600} 值为 2.10, 与野生型菌株 YL-1 无明显差异。对照菌株 $\Delta pvdS$ -pUCP26 液体培养后没有黄绿色, 培养 48 h 的 OD_{405}/OD_{600} 值为 0.48, 与突变株 $\Delta pvdS$ 无明显差异 (图 8、表 3)。以上结果说明 *pvdS* 基因的部分缺失影响了菌株 YL-1 嗜铁素的合成。



1: 野生型菌株 Wild type strain YL-1; 2: 突变株 Mutant strain $\Delta pvdS$; 3: 互补菌株 Complementary strain; 4: 对照菌株 Mutant strain carrying empty plasmid as control $\Delta pvdS$ -pUCP26

图 8 选择性培养基中野生型菌株和突变株嗜铁素分泌情况

Fig. 8 Pyoverdine secreted by wild type and mutants in selective cultures

表 3 野生型菌株、突变体、互补菌株和对照菌株液体培养后 OD_{405}/OD_{600} 值检测

Table 3 Measurement of pyoverdine secreted by wild type and mutants in selective cultures

菌株 Strains	培养时间 Culture time		
	12 h	24 h	48 h
野生型菌 Wild type strain YL-1	1.52 ± 0.14 a	2.35 ± 0.23 a	2.41 ± 0.20 a
突变株 Mutant strain $\Delta pvdS$	0.41 ± 0.21 b	0.47 ± 0.15 b	0.53 ± 0.21 b
互补菌株 Complementary strain	1.49 ± 0.09 a	2.03 ± 0.17 a	2.10 ± 0.18 a
对照菌株 Control strain $\Delta pvdS$ -pUCP26	0.37 ± 0.13 b	0.42 ± 0.12 b	0.48 ± 0.17 b

3 讨论

一个成功突变体系的建立，外源的重质粒能否顺利导入受体细胞中是一个关键的因素。接合转移又可称为两亲交配、两亲结合等，是指通过细菌细胞之间的直接接触导致 DNA 从一个细胞转移至另一个细胞的过程，这个过程通常由接合型质粒来完成^[4]。目前在黄单胞菌、荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌、放线菌的遗传操作中均有报道，利用两亲交配体系来进行 DNA 的转移，在接合转移过程中，供体菌和受体菌一般都是直接均匀混合后，在不同温度下共培养，如于非非等^[14]报道大肠杆菌 SM10 和铜绿假单胞菌 PAO1 混合后，37 °C 静置共培养；张霞等^[15]报道大肠杆菌 S17-1 和荧光假单胞菌 P303 混合后 28 °C 共培养；邹丽芳等^[16]报道将黄单胞菌和大肠杆菌混合后 28 °C 共培养；陈鑫等^[17]报道大肠杆菌直接导入小单胞菌菌株中，30 °C 恒温共培养。但是由于不同种属细菌生化性质差别很大，遗传转化条件各异，目前绿针假单胞菌还未见两亲交配遗传操作的报道，实验室用常规的两亲交配方法也不能实现绿针假单胞菌 YL-1 的遗传转化，因此本文中绿针假单胞菌和大肠杆菌接合转移前，分别进行了温度预处理，大肠杆菌 pEX18-S17-1 菌液先放入 4 °C 冰箱，绿针假单胞菌 YL-1 菌液 30~35 °C 水浴处理，随后混合 28 °C 共培养，成功获得接合子，试验结果表明，改良后的细菌接合转移体系中供体菌和受体菌的预处理温度、处理时间等参数至关重要，直接影响转化成功与否。

绿针假单胞菌 YL-1 中荧光性嗜铁素 (Pyoverdine) 合成基因簇上 *pvdS* 基因可以调控嗜铁素的转录，因此如果 *pvdS* 基因被破坏，理论上菌株就不能合成嗜铁素。研究结果表明，在嗜铁素选择性培养液中 *pvdS* 基因突变株合成嗜铁素的能力显著下降，没有野生型菌株特有的黄绿色，基因互补后能恢复表型，与理论推测结果一致。随后对绿针假单胞菌 YL-1 的嗜铁素合成相关基因 *pvdF*、*pvdL*，吩嗪合成相关基因 *phzE*、*phzF* 等均进行了敲除和相关功能验证 (另文发表)，结果表明构建的 *sacB* 介导的绿针假单胞菌遗传操作系统稳定、高效。

本文研究结果表明，在绿针假单胞菌 YL-1 中 *pvdS* 基因与群集运动能力相关，突变株的群集运用能力显著下降。群集运动是细菌表面迁移的最快形式，它可使群集细菌迅速到达营养丰富的环境和宿主组织定殖形成菌落，同时群集运动作为一种多细胞行为与被膜群体有很多相似性。群集运动在细菌定殖到宿主组织表面、后继的被膜形成、细菌耐药性等方面发挥了关键作用^[18]。细菌群集运动的形成受多系统的调控，Gao 等^[19]报道在微囊菌剂中群体感应 (quorum sensing, QS) 能力的提高加剧了细菌的群集运动；Guo 等^[20]

报道环二核苷酸信号系统 (c-di-GMP) 对厌氧氨氧化菌 (俗称“红菌”) 的群集运动有调控作用。绿针假单胞菌 YL-1 中 *pvdS* 基因通过何种途径影响菌株的群集运动能力尚不清楚, 对嗜铁素调控的分子机制等还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Chi X Y, Wang Y H, Miao J, *et al.* Development and characterization of a fusion mutant with the truncated *lacZ* to screen regulatory genes for phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* G05[J]. *Biological Control*, 2017, 108: 70-76.
- [2] 刘邮洲, Lu S, Baird S M, 等. 绿针假单胞菌 YL-1 抗菌活性相关基因的克隆和分析[J]. *植物病理学报*, 2015, 45(3): 307-316.
- [3] Liu Y Z, Lu S E, Braid S, *et al.* Draft genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* YL-1, a biocontrol strain suppressing plant microbial pathogens[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(1): 1-2.
- [4] 张勇. 水稻白叶枯病菌和条斑病菌对噻枯唑和链霉素的抗药性机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [5] Reyret J M, Pelicic V, Gicquel B, *et al.* Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis[J]. *Infection and Immunity*, 1998, 66(9): 4011.
- [6] Lu S E, Scholz-Schroeder B K, Gross D C. Characterization of the *salA*, *syrF*, and *syrG* regulatory genes located at the right border of the syringomycin gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15: 43-53.
- [7] 刘轶儒, 徐菲菲, 钱国良, 等. 产酶溶杆菌 *rpfG* 基因的克隆与功能分析[J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36(2): 45-50.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] 张惠展. 途径工程-第三代基因工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [10] Cornelia R, Nathalie G, Laurent M, *et al.* Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Microbiology*, 2002, 148: 923-932.
- [11] 赵飞龙, 徐亚军, 常佳丽. 轮纹病菌拮抗性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性和促生作用[J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(3): 396-405.
- [12] Liu Y Z, Baird S M, Qiao J Q, *et al.* SecG is required for antibiotic activities of *Pseudomonas* sp. YL23 against *Erwinia amylovora* and *Dickeya chrysanthemi*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55: 617-624.
- [13] Visaggio D, Pasqua M, Bonchi C, *et al.* Cell aggregation promotes pyoverdine-dependent iron uptake and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1-11.
- [14] 于非非, 余祥勇, 于海英, 等. 异油酸含量对铜绿假单胞菌群集运动能力的影响[J]. *微生物学报*, 2015, 55(1): 1600-1607.
- [15] 张霞, 张杰, 李国勋, 等. 绿色荧光蛋白标记荧光假单胞菌 P303 及其生存能力检测[J]. *植物保护学报*, 2005, 32(3): 280-286.
- [16] 邹丽芳, 周丹, 刘之洋, 等. 水稻黄单胞菌致病相关基因插入突变体系的建立[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(2): 176-185.
- [17] 陈鑫, 杨振飞, 朱芮, 等. 稀有放线菌小单孢菌与大肠杆菌接合转移体系的构建[J]. *华中农业大学学报*, 2015, 34(4): 80-83.
- [18] 赵龙华, 杨维青. 细菌群集运动与生物被膜和耐药性的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(17): 1986-1988.
- [19] Gao M, Song H, Liu X, *et al.* Improved quorum sensing capacity by culturing *Vibrio harveyi* in microcapsules[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 121(4): 406-412.
- [20] Guo Y Z, Liu S T, Tang X, *et al.* Role of c-di-GMP in anammox aggregation and systematic analysis of its turnover protein in *Candidatus Jettenia caeni*[J]. *Water Research*, 2017, 113: 181-190.