

含苏云金芽孢杆菌 *aiiA* 基因的重组荧光假单胞菌的构建及对软腐病的抗病活性

张霞^{1,3}, 胡玉琴², 贾振华¹, 张杰², 马宏¹, 宋水山¹

(1. 河北省生物研究所, 河北石家庄 050051; 2. 中国农业科学院植物保护研究所
植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094; 3. 河北农业大学, 河北保定 071001)

摘要: *aiiA* 基因编码的 AiiA 蛋白能降解细菌群体感应系统中的信号分子 N-酰基高丝氨酸内酯 AHLs, 从而减弱致病菌对植物的危害。本文将 *aiiA* 基因转入到植物根际促生细菌荧光假单胞菌 P303 中, 构建成防治植物细菌和真菌病害的工程菌 P303-ss10。通过 PCR 和 RT-PCR 鉴定, 均获得 0.8 kb 的目的片段, 表明 *aiiA* 基因已经导入 P303 中。室内平板抑菌试验表明, 该工程菌保留了出发菌株对多种植物病原真菌的抑制作用; 室内离体试验表明该工程菌对马铃薯软腐病和大白菜软腐病都有一定的抑制作用。

关键词: 荧光假单胞菌工程菌; 群体感应; *aiiA* 基因; 胡萝卜软腐欧文氏杆菌; 细菌病害防治

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2006)04-0013-04

Construction of Genetic Modified *Pseudomonas fluorescens* Which Harbours *aiiA* Gene from *Bacillus thuringiensis* and Its Activity Against Soft Rot Disease

ZHANG Xia^{1,3}, HU Yiqin², JIA Zhenhua¹, ZHANG Jie², MA Hong¹, SONG Shuishan¹

(1. Biological Institute of Hebei, Shijiazhuang 050051, China; 2. State Key Lab for Biology
of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China;
3. Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: AiiA protein, encoded by *aiiA* gene, can inactivate the AHL signals which regulates in quorum sensing system in bacteria by hydrolyzing its lactone bond so that it can release the disease in plant. Engineered strain P303-ss10 which can control bacterial and fungi diseases was constructed in this paper by transforming *aiiA* gene into *Pseudomonas fluorescens* P303. DNA fragments in 0.8 kb size were obtained by PCR and RT-PCR and it indicated that the engineered strain P303-ss10 was harbouring *aiiA* gene. P303-ss10 not only remained strong antifungal activity against several kinds of plant pathogenic fungi as P303, but also could control soft rot diseases in potato and Chinese cabbage effectively in vivo.

Key words: Engineered *Pseudomonas fluorescens*; Quorum sensing; *aiiA* gene; *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*; Bacterial disease control

欧文氏杆菌 (*Erwinia*) 引起的马铃薯以及十字花科蔬菜的软腐病危害严重, 常在农业上造成重大损失。调控欧文氏杆菌致病性的因子是 N-酰基高丝氨酸内酯 (N-acylhomoserine lactones, AHLs) 介导的细菌群体感应系统, 当细菌群体密度增大, 分泌的 AHLs 信号分子达到一定阈值浓度时, 细菌就会启动致病因

子的表达^[1~4]。而 *aiiA* 基因编码的 AiiA 蛋白能降解这类 AHLs, 从而减弱致病菌对植物的危害。已有研究表明, 表达芽孢杆菌 *aiiA* 基因的重组 *E. carotovora* SCG1 分泌胞外酶的量显著降低, 用其感染茄子和马铃薯时, 植物不发病^[5]。而表达芽孢杆菌 *aiiA* 基因的转基因烟草和马铃薯时对 *E. carotovora* 侵染的抗

收稿日期: 2006-05-25

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (303610)

作者简介: 张霞 (1978-), 女, 河北高邑人, 博士, 主要从事微生物分子生物技术研究; 宋水山为通讯作者。

性也显著提高。当接种病原菌时,烟草叶子和马铃薯块茎上不出现病斑或显著推迟病斑的出现^[6]。目前,AHLs 介导的群体感应系统对病原菌发病的调控作用已成为生物技术防治细菌病害的新靶点。

荧光假单胞菌是植物根际促生细菌的重要类群之一,具有防病增产作用。荧光假单胞菌 P303 是自小麦根际分离的一株广谱抗真菌生防菌株,具有很强的定殖能力^[7]。因此,如果将可降解 AHL 信号分子的 *aiiA* 基因转入有益微生物 P303,构建能在环境中稳定存在、可以降解 AHL 信号分子的重组工程菌,从而使得致病菌表达的 AHL 信号分子浓度始终保持在临界域值以下,不表达致病基因,最终不引起植物发病,即可获得抗植物真菌和细菌病害的工程

1.1.2 抗生素 利福平(Rifampin, Rif),卡那霉素(Kanamycin Sulfate, Km),使用浓度均为 50 g/mL。

1.2 试验方法

1.2.1 常规操作 质粒提取、总 DNA 制备、酶切、大肠杆菌感受态的制备及转化,荧光假单胞菌 P303 感受态的制备和转化采用常规方法^[9]。

1.2.2 细菌培养 LB 平板活化细菌菌株,接单菌落于相应抗性的 LB 培养液,220 r/min,培养过夜。再以 1% 接种量接种于 LB 培养基。荧光假单胞菌于 28℃,培养 30 h,大肠杆菌于 37℃,培养 6~7 h。将胡萝卜欧文氏杆菌 E. cc 转接后以 1% 接种量接种于 LB 培养基,30℃过夜培养。

1.2.3 PCR 检测 引物及方法参见文献^[8],PCR 反应体系:10×PCR 缓冲液 5 μL;20 mmol/L MgCl₂ 6 μL;10 mmol/L dNTP 1 μL;10 μmol/L 引物对 2 μL;DNA 模板1 μL;Taq 酶 0.5 μL(0.25 U),用超纯水补至 50 μL,混匀离心。循环参数为:94℃ 1 min,54℃ 1

菌。此前,我们已经从苏云金芽孢杆菌山东亚种 (ACCCC10314) 中克隆出 *aiiA* 基因,命名为 SS10 (Genbank 登陆号为 AY483160)^[8]。体外表达的重组 SS 10 具有降解多种 AHL 的能力,并且与胡萝卜软腐欧文氏菌作用可显著降低病原菌的致病性(待发表)。本研究将利用现代生物技术的手段构建携带 *aiiA* 基因的荧光假单胞菌,并对其抗病性进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 本研究所用菌株和质粒列于表 1。

min, 72℃ 2 min, 30 个循环。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 细菌总 RNA 的提取 细菌总 RNA 的提取采用上海华舜生物工程有限公司小量细菌总 RNA 抽提试剂盒(W6721),方法见说明书。

1.2.5 RT-PCR 反转录和 PCR 试剂盒购自 TAKALA 公司,操作参照说明书进行。所用引物同 PCR 检测引物。采用 20 μL 反转录反应体系:11 μL 模板 RNA,5×RT 缓冲液 4 μL,10 mmol/L dNTPs 2 μL,50 μmol 下游引物,RNA 酶抑制剂及 AMV 反转录酶各 1 μL,混匀,室温放置 10 min 后转入 37℃ 恒温水浴锅保温 1 h,反应结束后,冰浴冷却 2 min。

在 80 μL 反应体系中加入 20 μL RT 反应产物作为模板,10×PCR 缓冲液 8 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,10 μmol 上、下游引物各 1 μL,Taq DNA 聚合酶1 μL,加水至 100 μL。PCR 反应条件:94℃ 2 min,94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,共 25 个循环,于 72℃延

表 1 菌株和质粒
Tab 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strain and plasmid	基因型 Genotype	来源 Source
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	<i>supE, hsd Δ5, thi, Δ(lac-proAB)/F⁺ [tuaD 36, proAB⁺, lacI^f, lacD ΔM15]</i>	中国农科院植保所
<i>Erwinia carotovora</i>		
<i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>		首都师范大学
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
P303	Wild type, nal ^r , rif ^r	中国农科院植保所
P303-ss10	P303 carried pQMV-ss10	本研究室
Plasmid		
PGEXss10	Km ^r , pGEX-2T harbouring ss10(<i>aiiA</i> gene)	本研究室
pQMV	Km ^r , P303 promoter Pp303, shuttle vector	中国农科院植保所
pBluescript SK	Amp ^r , Km ^r	中国农科院植保所
pQMV-ss10	Km ^r , P303 promoter Pp303, <i>aiiA</i> gene	本研究室

伸 10 min。PCR 结束后取 5 μ L 进行电泳鉴定。

1.2.6 马铃薯软腐病试验 将灭菌的滤纸置于培养皿中,加入 1 mL 灭菌水,将切好的马铃薯片置于其上。将培养好的胡萝卜软腐欧文氏菌稀释 100 倍,与供试菌株 P303, P303-ss10, *E. coli* TG1(pQMV-ss10) 分别以等体积混合作用 1 h, 然后接种到马铃薯片上。30 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养,观察发病情况。每处理重复 3 次。

1.2.7 大白菜软腐病试验 菌液处理同上,采用针刺接种方法接种于大白菜上。

1.2.8 室内平板抑制真菌试验^[7] 在 PDA 的固体平板培养基中央用接种环接种 1 cm^2 的植物病原真菌,在距供试真菌等距离的位置接上供试菌株,置于 28 $^{\circ}$ C 温箱中培养,3~ 7 d 观察结果。

2 结果与分析

2.1 工程菌 P303-ss10 的构建

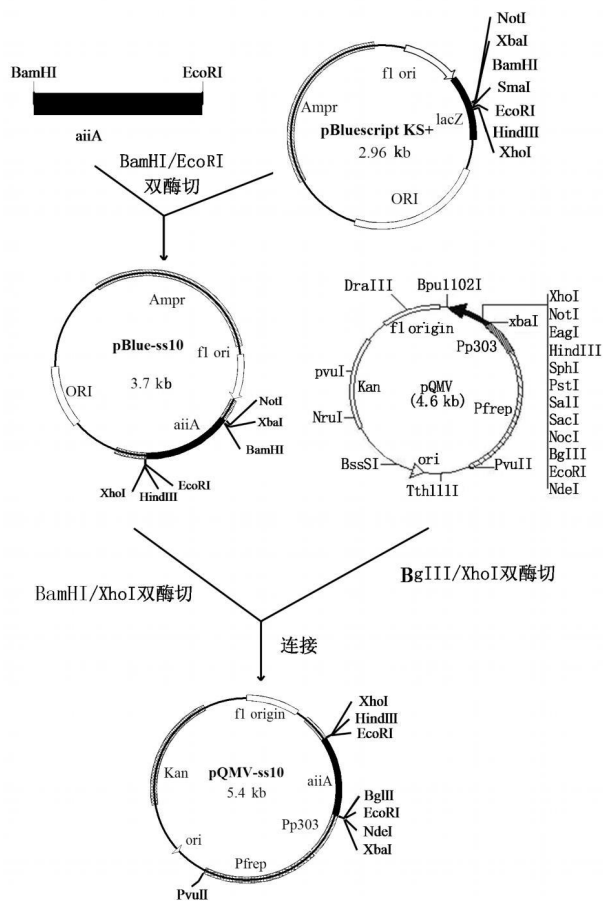


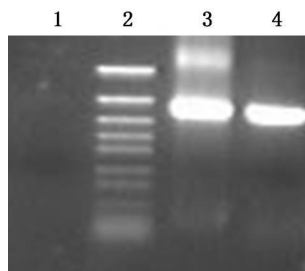
图 1 质粒 pQMV-ss10 的构建流程图

Fig 1 Construction of plasmid vector pQMV-ss10

2.1.1 质粒 pQMV-ss10 的构建 质粒 pQMV-ss10 的构建流程如图 1 所示,用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切

质粒 pGEX-ss10, 回收 0.8 kb 片段,与 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切的 pBluescript KS+ 载体进行连接,转化大肠杆菌 TG1,涂布 Amp 平板。筛选抗性菌落,提取质粒,命名为 pBlue-ss10。用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切质粒 pBlue-ss10,用 *Bgl*II 和 *Xho*I 双酶切质粒 pQMV,分别回收 0.8 kb 和 4.6 kb 的片段,进行连接,转化 TG1,涂布 Km 平板。筛选抗性菌落,提取质粒,进行酶切鉴定,命名为 pQMV-ss10。

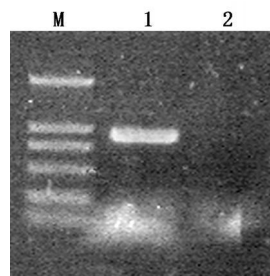
2.1.2 工程菌 P303-ss10 的构建 将质粒 pQMV-ss10 转化荧光假单胞菌 P303,涂布 Rif/ Km 双抗平板。挑取抗性菌落,培养后提取质粒 DNA,进行 PCR 扩增,获得 0.8 kb 的目的片段(图 2)。



1. P303; 2. DNA Marker: 1444, 961, 736, 585, 481 bp; 3. P303-ss10; 4. pGEXss10

图 2 PCR 产物电泳图

Fig 2 Electrophoresis analysis of PCR products



M. DL2000 Marker: 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp;

1. P303-ss10; 2. P303

图 3 RT-PCR 产物电泳图

Fig 3 Electrophoresis analysis of RT-PCR products

2.1.3 RT-PCR 鉴定 提取 P303、P303-ss10 的总 RNA,在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。以 P303、P303-ss10 的总 RNA 为模板,进行 RT-PCR,获得 0.8 kb 的目的片段(图 3)。表明工程菌 P303-ss10 中 *aiiA* 基因已在转录水平上得到表达。

2.2 工程菌株抑制细菌病害的活性

对马铃薯软腐病的离体试验表明,接种工程菌 P303-ss10 的马铃薯发病最轻,颜色稍微发黄;接种 P303 的部位颜色变褐,组织变软;而对照(水)处理的马铃薯则变褐变软,已经腐烂。大白菜软腐病的离体试验表明,工程菌 P303-ss10 处理的大白菜叶片

病斑小于 P303 和清水对照处理,具有一定的抑制胡萝卜软腐欧文氏菌的效果。本结果表明,荧光假单胞菌 P303 对软腐病有一定的抑制作用,而表达外源 *aiiA* 基因的工程菌 P303-ss10 能更有效地减轻病原菌的侵染,抑制软腐病的发生。

2.3 工程菌株对真菌病害的抑制试验

室内平板抑制真菌试验表明,工程菌株 P303-ss10 同出发菌株 P303 对植物病原真菌的抑菌效果没有差别,对冬瓜枯萎、黄瓜灰霉、萝卜褐腐、棉花黄萎、油菜立枯、苹果轮纹病等都有一定的抑制作用。

3 讨论

本研究表明表达 *aiiA* 基因的工程菌保留了出发菌株 P303 原有的抑制真菌病害的生防能力。荧光假单胞菌的抗病机理主要是通过产生抗生素等生物活性物质来抑制病原菌的生长。现已证实,它们可产生 10 多种有抗菌作用的次生代谢产物,如 2, 4- 二乙酰基藤黄酚(2, 4- diacetylphloroglucinol, 2, 4- DA PG)、吩嗪(Phenazine)、藤黄绿脓菌素(Pyoluteorin)、吡咯菌素(Pyrrolnitrin)和氢氰酸(HCN)。GacS/GacA 双因子系统对抗菌次生代谢物合成基因的表达有重要的调控作用。但是其具体的调控机制还不是很清楚。现在从苏云金芽胞杆菌中克隆到的 *aiiA* 基因主要作用于病原菌的 AHL 信号分子,使其开环而不能达到临界域值浓度,导致病原菌的致病基因不能启动表达。而工程菌对其出发菌株原有的杀真菌生防功能无影响。

近年来,AHLs 对动、植物病原菌发病的调控作用引起国际学术界的广泛关注^[10, 11],亦成为以生物技术防治细菌病害的新靶点。已有研究表明转 *aiiA* 基因的茄子、烟草和马铃薯对软腐病菌的侵染,表现出不发病或病状推迟的现象。而利用 AHL 调控系统控制细菌病害的另一途径是将可降解 AHL 信号分子的 *aiiA* 基因转入有益微生物,构建能在环境中稳定存在、可以降解 AHL 信号分子的重组工程菌。喻子牛等将 *aiiA* 基因克隆到 pET28a 表达载体中,转化大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导,获得超量表达的蛋白,致病性测定表明该蛋白对魔芋软腐病菌 CZY 具有较强的抗病活性^[12]。为了获得高效的生防菌株,本研究将 *aiiA* 基因克隆到荧光假单胞菌-大肠杆菌穿梭载体中^[13],将其置于 P303 自身强启动子的下游,并转化具有很强的定殖能力

的植物根际促生细菌 P303,获得工程菌 P303-ss10。RT-PCR 鉴定表明 *aiiA* 基因获得了很好的表达,室内离体抗病实验表明该工程菌具有一定的抑制细菌病害作用。这不仅为当前植物病害防治提供更加高效广谱的生防菌株,为今后生防制剂的商品化产业化提供更加有效的资源,也为利用现代生物技术防治细菌病害提供了新思路。

参考文献:

- [1] Andr e M L, Isabelle V, Sturgis J N. Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria[J]. Nature Rev Microbiol, 2004, 2: 581- 592.
- [2] Helen W, Swift S, Williams P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria[J]. Curr Opin Microbiol, 2001, 4: 186- 193.
- [3] Holden M T G, Chhabra S R, deNys R, et al. Quorum sensing cross talk: isolation and Chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria[J]. Mol Microbiol, 1999, 33: 1254 - 1266.
- [4] Wang L H, Weng L X, Dong Y H, et al. Specificity and Enzyme Kinetics of the Quorum-quenching N-Acyl Homoserine Lactone Lactonase (AHL-lactonase) [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 13645- 13651.
- [5] Dong Y H, Xu J L, Li X Z, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 3527.
- [6] Dong, Y H, Wang L H, Xu J L, et al. Quenching quorum sensing- dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase[J]. Nature, 2001, 411: 813 - 817.
- [7] 张 霞, 张 杰, 李国勋, 等. 用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.
- [8] 宋水山, 马 宏, 贾振华, 等. 芽孢杆菌酰基高丝氨酸内酯酶基因的克隆及表达[J]. 生物技术, 2005, 15: 7- 10.
- [9] 金冬雁, 黎孟枫, 译. J. 萨姆布鲁克著. 分子克隆试验指南(第 2 版)[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [10] More M I, Finger L D, Stryker J L, et al. Enzymatic synthesis of quorum sensing autoinducer through use of defined substrates[J]. Science, 1996, 272: 1655- 1658.
- [11] Lee S J, Park S Y, Lee J J, et al. Genes Encoding the N-Acyl Homoserine Lactone-Degrading Enzyme Are Widespread in Many Subspecies of *Bacillus thuringiensis* [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 3919- 3924.
- [12] 周 , 孙 明, 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌 AiiA 蛋白对魔芋软腐病菌的抗病活性[J]. 武汉大学学报(理学版), 2004, 50(6): 761- 764.
- [13] 胡玉琴, 张 杰, 宋福平, 等. 广宿主稳定表达载体 pQMV 和 pGMP 的构建[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(02): 202- 205.