



基于 *xkdB* 假基因座位的瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 超折叠 GFP 标记研究

曹贤明[#], 韦纯玥[#], 黄升泉, 樊奔^{*}

南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037

曹贤明, 韦纯玥, 黄升泉, 樊奔. 基于 *xkdB* 假基因座位的瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 超折叠 GFP 标记研究. 微生物学报, 2022, 62(2): 617–627.

Cao Xianming, Wei Chunyue, Huang Shengquan, Fan Ben. Labeling of *Bacillus velezensis* FZB42 by expressing superfolder GFP at the locus of the pseudogene *xkdB*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 617–627.

摘要: 【目的】利用一个 GFP 的超折叠变体 SfGFP (superfolder GFP)对瓦雷兹芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) FZB42 菌株进行标记, 以期确立一种瓦雷兹芽孢杆菌及近缘芽孢杆菌通用的高亮 GFP 标记手段, 同时, 为了方便后续生物膜和分子互作的相关研究, 测试 *SfGFP* 基因插入位点, 假基因 *xkdB*, 作为外源基因表达座位的可行性。【方法】利用基因工程技术构建了一系列质粒, 然后通过同源重组的方式, 分别获得 *xkdB* 敲除菌株 FBS373 和 SfGFP 标记菌株 FBS374, 分别测试这些菌株在生长速度、碳源利用、荧光亮度、生物膜形成、swarming 运动性等方面的差异。【结果】本研究成功构建了 SfGFP 标记的瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42, 其荧光亮度是 *gfp+* 变体标记菌株的 5 倍以上; *xkdB* 基因敲除对瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 生长速度、不同碳源利用、生物膜形成和运动性等方面无明显影响。【结论】通过本研究我们确认了 *xkdB* 基因位点作为瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 基因组上外源基因表达的中性位点的可行性, 同时, 通过在 *xkdB* 基因座位表达了 *SfGFP* 基因, 成功对 FZB42 进行了高亮标记, 对同类菌株的标记具有较好的借鉴价值。

关键词: 瓦雷兹芽孢杆菌; FZB42; *xkdB*; SfGFP

基金项目: 国家自然科学基金(31970097)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970097)

[#]These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.** E-mail: fanben2000@gmail.com

Received: 10 May 2021; **Revised:** 28 August 2021; **Published online:** 22 November 2021

Labeling of *Bacillus velezensis* FZB42 by expressing superfolder GFP at the locus of the pseudogene *xkdB*

CAO Xianming[#], WEI Chunyue[#], HUANG Shengquan, FAN Ben^{*}

College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] We used a super-bright variant of GFP, superfolder GFP (SfGFP), to label the *Bacillus velezensis* FZB42 strain, so as to establish a universal GFP labeling method for *B. velezensis*. This helps to develop a viable technique to study the colonization mechanism of beneficial rhizobacteria. [Methods] A mutant strain was generated by integrating *SfGFP* into a neutral locus called *xkdB* in the genome of FZB42, and then the fluorescence intensities of the mutant strains carrying different GFPs were detected to evaluate the influence of *xkdB* knockout. [Results] In this study, a marker strain labeled with SfGFP for FZB42 was constructed, whose fluorescence intensity was more than 5 times that of the *gfp+* variant marker strain. The knockout of *xkdB* did not affect the growth rate, carbon source utilization, motility or biofilm formation, which confirmed the feasibility of using *xkdB* as a neutral locus for exogenous gene expression. [Conclusion] In this study, we confirmed a new locus suitable for the expression of foreign genes in the FZB42 genome, and exogenously expressed *SfGFP* at this locus, thus labeling FZB42 with fluorescence. This study provides a reference for the labeling of similar strains.

Keywords: *Bacillus velezensis*; FZB42; *xkdB*; SfGFP

随着化学肥料所带来的环境问题日益严重, 使用生物肥料尤其是微生物肥料, 部分替代化肥和化学农药, 已经成为农业可持续发展的趋势^[1]。经过 10 余年的高速发展, 目前中国微生物肥料生产量和使用规模已处于世界领先地位。在我国不同种类的微生物肥料中, 目前占据市场份额最多的是以瓦雷兹芽孢杆菌(解淀粉芽孢杆菌植物亚种)为代表的芽孢杆菌菌剂。这些芽孢杆菌由于能够产生抗逆性极强的芽孢, 因此在生产、存储、运输和使用过程中具有明显的优势, 受到广泛认可和使用。对这些芽孢杆菌益生机制的深入研究, 是微生物肥料领域最为关切的问题。

上述芽孢杆菌基本上都分离于植物根际, 因此了解它们在自然环境下在植物根部定殖的行为和规律, 是开发这些菌株活性作用和益

生潜能的基础, 是根际微生物十分重要的研究方向。使用适当的分子标记跟踪这些细菌的生态行为是进行定殖研究的重要手段, 而在所有标记手段中, 使用绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)是最有效的方式之一。GFP 源于深海水母, 在陆生细菌中缺乏同源物, 因此 GFP 标记在土壤微生物生态研究中有比较好的抗干扰性^[2]。此外, 经过长期大量研究, 人们对 GFP 发光条件和发光机制等方面的理解已经非常深入, 也积累了很多适合条件的突变体材料^[3], 这些都为 GFP 标记提供坚实的理论依据和技术保障。不过, 尽管使用 GFP 进行生物标记的研究很多, 但是将其用于瓦雷兹芽孢杆菌标记研究的报道并不多。这可能跟几个因素有关: 首先, 如果简单将 GFP 置于质粒上, 由于质粒容易丢失, 尤其很多滚环型复

制的质粒在芽孢杆菌中非常不稳定^[4-5], 因此这种方式并不适合田间的定殖研究; 其次, 如果将 GFP 基因置于细菌基因组上, 虽然其表达会比较稳定, 但是由于克隆时通常只会引入单拷贝 *gfp*, 而芽孢杆菌细胞壁较厚, 导致很多情况下检测到的细菌荧光偏弱, 严重影响定殖研究的效果。

瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 是分离于德国甜菜根际土壤的一株根际细菌^[6], 该菌株早期主要在德国洪堡大学 Rainer Borriss 教授的实验室进行了大量基础研究^[7-9], 后期逐渐进入世界不同的研究组当中, 成为瓦雷兹芽孢杆菌研究的模式菌株之一。目前, 关于 FZB42 的相关研究已多达 150 余篇^[8]。对 FZB42 的 GFP 标记工作和定殖的研究始于笔者早在 2011-2012 年的工作, 我们通过构建整合质粒 pFB01, 将 GFP 基因引入 FZB42 基因组上的中性位点 *amyE* 位置, 构建了 GFP 标记菌株 FB01^[10]。但由于前述原因, FB01 的荧光并不明亮, 严重制约了对其进行的定殖研究。不过, 在随后工作中, 我们无意中得到了 1 个自发突变株 FB01mut, 该突变株受激发后的荧光强度显著高于 FB01。FB01mut 荧光强度高于 FB01 的原因并不清楚, DNA 测序表明, 2 个菌株中 *gfp+* 基因及其上下游大约 4 500 bp 的区域并无任何突变, 不过由于未知原因, FB01mut 的 mRNA 转录至少 2 倍于 FB01^[10]。利用 FB01mut, 我们对 FZB42 在不同植物根际的定殖进行了研究, 文章自发表以来, 已经被引用 140 余次; 同时, 我们向 20 多个研究组赠予了 pFB01 质粒, 用于他们菌株标记的相关研究。

为了突破上述偶然突变的不可复制性, 在本研究中我们利用 1 个 GFP 的超折叠变体 (superfolder GFP, SfGFP), 尝试对 FZB42 菌株进行标记, 以期建立一种对瓦雷兹芽孢杆菌及

近缘芽孢杆菌可通用的高亮 GFP 标记手段。同时, 为了方便后续生物膜和分子互作的相关研究, 我们没有使用芽孢杆菌中最常用的外源基因表达座位 *amyE*, 而是选择了一个新的插入位点, *xkdB* 假基因座位, 用于 SfGFP 的外源表达, 在本研究中, 我们对敲除 *xkdB* 的相关影响进行了测定评估。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本实验所用菌株、质粒和引物见表 1。

1.1.2 主要试剂

DNA 聚合酶、质粒提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 无缝克隆试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 主要仪器

PCR 仪、荧光分析仪和 Nanodrop 2000, 美国 Thermo Fisher 公司; 摇床培养箱, 伊孚森生物技术(中国)有限公司; 离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.1.4 培养条件

瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 及其突变株和大肠杆菌在 37 °C、200 r/min、LB 培养基(10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 5 g/L 氯化钠)中生长。每升 LBGM 培养基含有 10 g 氯化钠, 5 g 酵母提取物, 10 g 蛋白胨, 1%甘油和 0.1 mmol/L 硫酸锰。固体 LBGM 培养基添加 1.5%琼脂。抗生素使用浓度为: 氨苄霉素(100 μg/mL), 壮观霉素(100 μg/mL), 红霉素(100 μg/mL)。

1.2 质粒的构建

1.2.1 pFB16 的构建

以 FZB42 基因组 DNA 为模板, 利用 *Pfu*

酶和引物对 FBO-1031/FBO-1032 扩增 *xkB* 基因上下游序列, PCR 产物长度为 2 592 bp。利用 *Taq* 酶在 PCR 产物末端加上 A 尾, 并连接到商业 T 载体 pMD-19 上得到 pFB16。

1.2.2 pFB17 的构建

以质粒 pFB103 为模板, 利用 *Pfu* 酶和引物对 FBO-51/-FBO52 扩增壮观霉素抗性基因序列, PCR 产物长度为 1 204 bp。以质粒 pFB16 为模板, 利用 *Pfu* 酶和 5'端带有 18 nt 与引物对 FBO-51/FBO-52 同源序列的引物对 FBO-1293/FBO-1294 反向扩增 pFB16, 得到长度为 5 323 bp 的 pFB16 线性化克隆产物。利用无缝

克隆试剂盒连接壮观霉素抗性基因克隆片段和 pFB16 线性化克隆产物得到 pFB17。

1.2.3 pFB18 的构建

以质粒 pFB16 为模板, 利用 *Pfu* 酶和 5'端带有 17 nt 与引物对 FBO-1297/FBO-1298 同源序列的引物对 FBO-1295/FBO-1296 反向扩增 pFB16, PCR 产物长度为 5 322 bp。以质粒 pFB33 为模板, 利用 *Pfu* 酶和引物对 FBO-1297/FBO-1298 扩增壮观霉素抗性基因和超亮绿色荧光蛋白 *SfGFP* 基因, 长度为 2 968 bp。利用无缝克隆试剂盒连接这两段 PCR 产物, 得到重组质粒 pFB18。

表 1 本研究中使用的菌株、质粒和引物

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

Strains/Primers	Gene type/Sequences (5'→3')	Sources
Strains		
FZB42	<i>B. velezensis</i> FZB42	Lab stock
FB01	FZB42 <i>amyE::emR</i> +GFP	[10]
FB01mut	FBS01 mutant (<i>FZB42 amyE::emR</i> +GFP)	[10]
FBS373	FZB42 <i>xkB::speR</i>	This study
FBS374	FZB42 <i>xkB::speR</i> + <i>SfGFP</i>	This study
FBS375	FZB42 <i>amyE::emR</i>	This study
Plasmids		
pMD19	T-vector <i>amp^r</i>	TaKaRa
pFB16	pMD19+ <i>xkB</i>	This study
pFB17	pMD19+ <i>xkB::speR</i>	This study
pFB18	pMD19+ <i>xkB::speR</i> + <i>SfGFP</i>	This study
pFB33	carrying <i>SfGFP spe^r amp^r</i>	Lab stock
pFB103	pMD19+ <i>speR</i>	Lab stock
pFB326	carrying <i>amyE::emR</i>	Lab stock
Primers		
FBO-51	GCATATGATCAGATCTTAAGGCC	
FBO-52	TTGAAGCATGCAAATGTCACATA	
FBO-1031	AAATCCTGCCATTGCTCTTC	
FBO-1032	TATCTCGCCCCCTCTAATC	
FBO-1293	GACATTTGCATGCTTCAATATATGGAAGACCGCTTGA	
FBO-1294	AAGATCTGATCATATGCCTTGGCGCAATAGCTGAAAG	
FBO-1295	CTAGTTCTAGAGCGGCCTATATGGAAGACCGCTTGA	
FBO-1296	CAGATCGATCCTCTAGACTTGGCGCAATAGCTGAAA	
FBO-1297	CAAGTCTAGAGGATCGATCTGTATA	
FBO-1298	TATAGGCCGCTCTAGAAGTAGGTCT	

1.3 菌株的转化

按照 Sambrook 等的方法进行大肠杆菌的转化^[11]; 按照 Burby 等的方法进行瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 的转化^[12]。

1.4 荧光强度测定

将在 LB 培养基中过夜摇培的待测菌株按 1% 转接至新鲜的 LB 培养基后继续摇培 48 h, 使用新鲜的液体 LB 培养基将培养液的 OD_{600} 调节至 4.0 后吸取 1 mL 到 24 孔板中。使用 Thermo Scientific 荧光分析仪检测菌液在 475 nm 处的荧光值。每个处理 3 个重复。

1.5 生长曲线测定

将过夜摇培的待测菌株的培养液按 1% 转接至新鲜的 LB 培养基, 在 37 °C、200 r/min 下继续培养并在各个时间点测量菌液在 600 nm 处的光密度值(OD_{600}), 并绘制生长曲线。每次测量取 3 个重复。

1.6 运动性测定

添加 10 μ L 在 LB 培养基中摇培至 $OD_{600}=1.0$ 的培养物到含有 0.5% 琼脂的 LB 平板上, 在无菌环境下晾干后置于 37 °C 培养 12 h。每个处理 3 个重复。

1.7 生物膜形成能力测定

1.7.1 固-气界面生物膜形成能力检测

添加 1 μ L 在 LB 培养基中摇培至 $OD_{600}=1.0$ 的待测菌株的培养液在 LBGM 平板上, 晾干后置于 30 °C 静置培养 120 h。

1.7.2 液-气界面生物膜形成能力检测

将在 LB 培养基中摇培至 $OD_{600}=1.0$ 的待测菌株的培养液按 1% 接种至液体 LBGM (或含有 20 μ g/mL 刚果红) 培养基中, 混匀后置于 24 °C 静置培养 48 h。

2 结果与分析

2.1 *xkdB* 基因位置及功能分析

xkdB 基因在瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 基因组

上位于 1 220 200–1 222 700 区域, 其上游基因是一个功能未知的基因 RBAM_012520, 下游基因为 *xkdC* (图 1A)。*xkdB* 和 *xkdC* 与模式菌株枯草芽孢杆菌 168 菌株(BS168)的 *xkdB* 和 *xkdC* 基因同源, 均编码 PBSX 前噬菌体蛋白^[13]。但是与 BS168 菌株的 *xkdB* 基因相比, FZB42 的 *xkdB* 基因在 CDS 编码区 5'端缺损了大约 180 个碱基, 也缺损了上游的 5'-UTR 区(图 1C), 因此 FZB42 的 *xkdB* 基因应该是一个缺乏功能的假基因。由于缺乏真正的功能, 因此理论上 *xkdB* 可作为外源基因表达的“中性位点”。

2.2 基因工程菌菌株构建

首先, 将 *xkdB* 基因及其上下游区域插入商业载体 pMD19, 得到质粒 pFB16, 然后将壮观霉素抗性基因 *speR* 插入 *xkdB* 基因的中间位置, 得到质粒 pFB17 (图 2A)。再将 pFB17 转化 FZB42 野生型菌株, 筛选同源重组后携带正确抗生素抗性的转化子, 经测序验证, 成功构建了 *xkdB* 敲除菌株, 命名为 FBS373 (*xkdB::speR*)。将 PCR 扩增的 *SfGFP* 基因插入 pFB17 质粒中 *speR* 的下游, 获得质粒 pFB18 (图 2B), 同上转化 FZB42 野生型菌株, 将筛选得到并经测序验证正确的转化子命名为 FBS374 (*xkdB::speR+sfgfp*)。最后, 与 pFB17 的构建程序类似, 将 *amyE* 基因及其上下游区域插入载体质粒 pUC19, 再将红霉素抗性基因 *emR* 插入 *amyE* 基因的中间位置, 得到质粒 pFB326 (图 2C)。将 pFB326 转化 FZB42 野生型菌株, 筛选同源重组后携带正确抗生素抗性的转化子, 将筛选得到并经测序验证正确的转化子命名为 FBS375 (*amyE::emR*)。

2.3 基于 *xkdB* 位点的 SfGFP 基因标记

为了检测 SfGFP 标记菌株 FBS374 的荧光强度, 将该菌株与 FZB42 野生型、携带 *gfp+* 基因的 FB01 (*amyE::gfp+*) 和 FB01 突变株 FB01mut

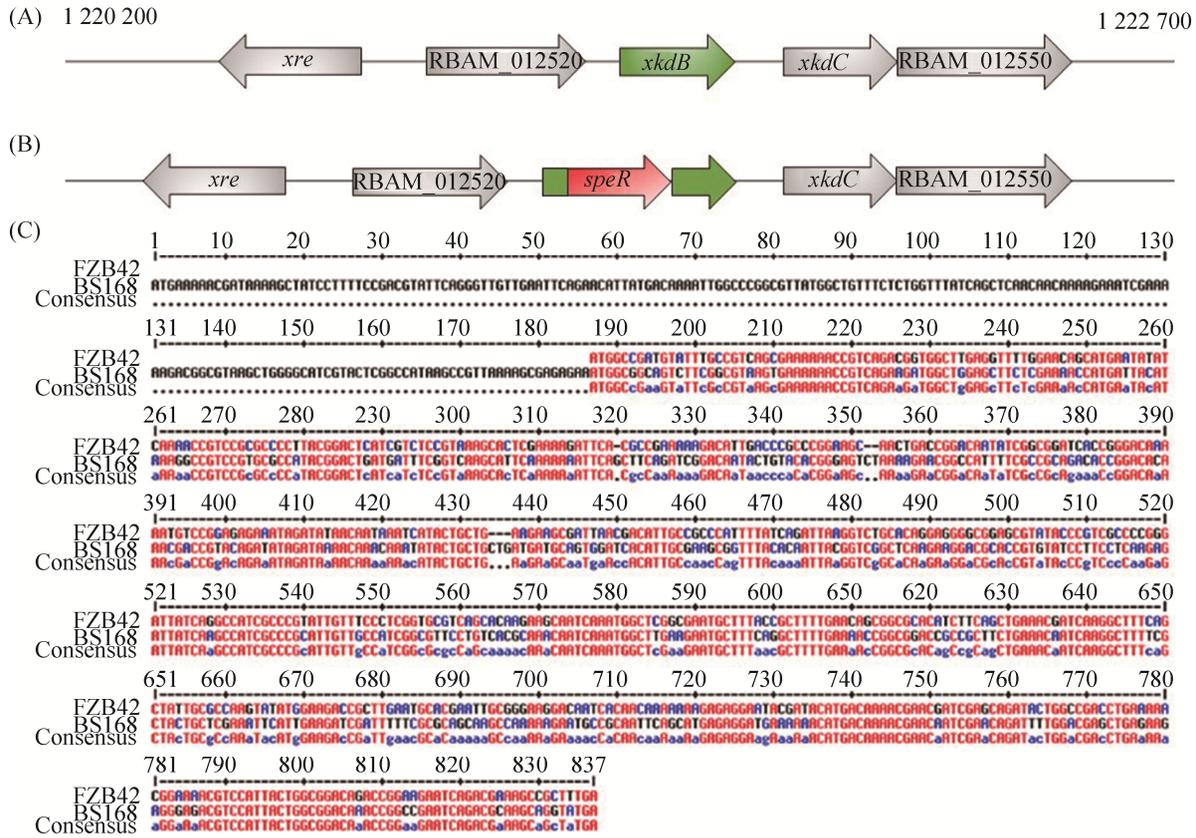


图 1 *xkB* 的基因位置和同源比对分析

Figure 1 The gene location of *xkB* and the homologous analysis of *xkB*. A: the position of *xkB* (green arrow) on FZB42 genomic DNA. B: the spectinomycin resistance gene *speR* (red arrow) was inserted to disrupt *xkB* by homologous recombination. The sizes of the genes were not to scale. C: alignment of the *xkB* CDSs of FZB42 and BS168.

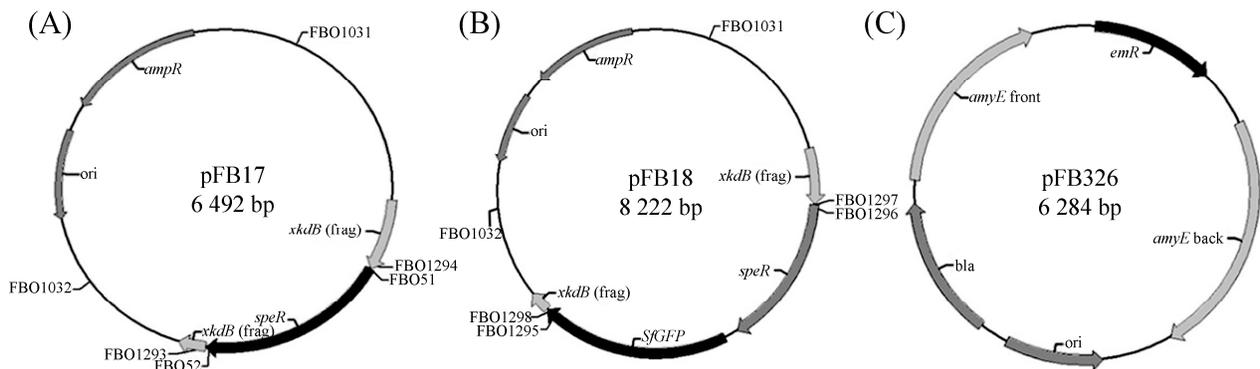


图 2 用于重组菌株构建的质粒图谱

Figure 2 Plasmid maps for strain construction. A: pFB17, *xkB* knockout plasmid; B: pFB18, *xkB* knockout plasmid carrying SfGFP marker; C: pFB326, *amyE* knockout plasmid.

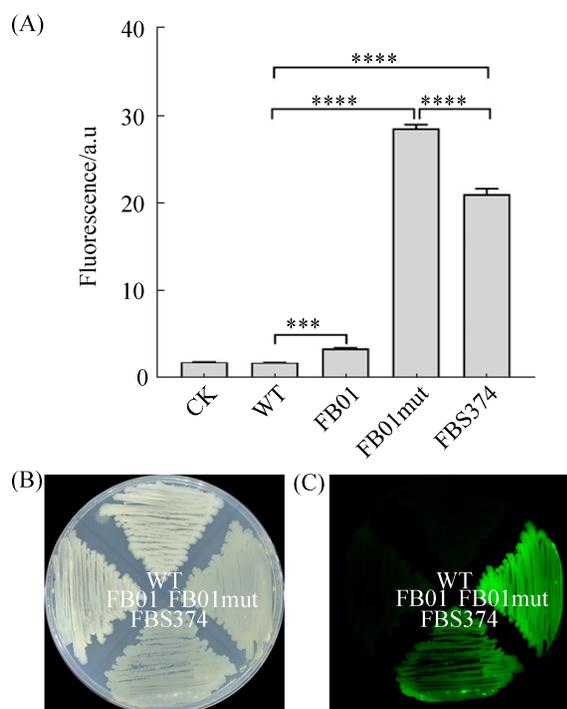


图3 各菌株表达荧光强度比较

Figure 3 Comparison of fluorescence intensity of the strains grown in LB (A) or on LB agar plates (B, C). A: The fluorescence intensity was measured at 475 nm, with three replicates for each treatment. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$. CK: sterile LB liquid medium; WT: FZB42 wild-type strain; FB01: the *gfp*-labeled FZB42 at the *amyE* locus; FB01mut: a spontaneous mutant of FB01 producing strong green fluorescence^[10]; FBS374: the *xkdB* knockout strain carrying the *SfGFP* gene. B: imaged with white light as a control. C: imaged with UV excitation at 390 nm.

的荧光表达情况进行了比较。结果表明,在液体培养基中,FB01mut的荧光亮度比FB01高大约7倍(图3A),这比文献中两者在固体平板上菌落的荧光亮度差异更大^[10]。SfGFP标记菌株FBS374的荧光亮度远高于野生型,而且也明显高于FB01,大约是后者的5倍多,这说明SfGFP确实可以在FZB42中成功表达,具备了用于定殖研究的潜力。不过,出乎意料的是,FBS374的荧光仍然不如FB01mut高。

2.4 *xkdB* 基因敲除对 FZB42 生长的影响

为了检测 *xkdB* 基因对 FZB42 生长的影响,首先对 FZB42 和 *xkdB* 敲除株 FBS373 的生长曲线进行了测定。结果显示,在同样的培养条件下,FBS373 和 FZB42 的生长曲线近乎一致(图4),无显著性差异。此外,我们对2个菌株在 Biolog 板上96种培养条件下的生长情况进行了检测,结果表明,在相同培养时间里,2株菌对这些碳源的利用情况几乎完全一致(结果未显示)。这些结果表明,*xkdB* 基因敲除对 FZB42 的生长基本没有影响。

2.5 *xkdB* 基因对生物膜形成的影响

生物膜是细菌在介质表面发展到一定程度后形成的高度结构化的膜状组织,主要包括胞外多糖(EPS)、糖蛋白和胞外DNA等物质,生物膜能够增强细菌对环境的适应性。瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 能够形成强健的生物膜,利于其在植物根部的定殖和对病原菌的抵御。本研究选择在 *xkdB* 基因座位插入 *SfGFP* 基因,是为

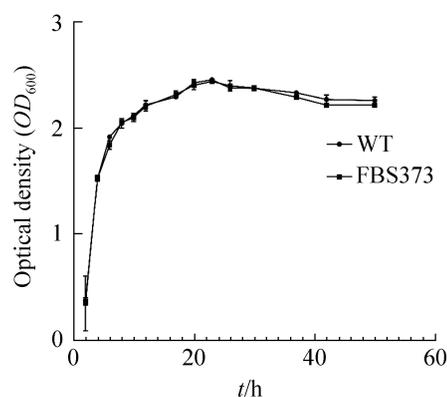


图4 FZB42 野生型和 FBS373 在 LB 培养基中的生长曲线

Figure 4 Growth curves of the FZB42 wild-type and FBS373 in LB media. WT: FZB42 wild-type; FBS373: *xkdB* knockout strain (FZB42 *xkdB*::*speR*); Optical density of three replicates value measured at 600 nm.

了在 *amyE* 基因座位之外寻找一个新的外源基因插入位置, 从而为后续生物膜形成相关分子的互作研究奠定基础。为了确定 *xkdB* 敲除对 FZB42 生物膜形成的影响, 我们分别检测了 FZB42 野生型和各突变株在固-气界面和液-气界面生物膜的形成情况。结果显示, 在固-气界面和液-气界面, 与野生型菌株 FZB42 相比, *xkdB* 敲除株 FBS373 和 *amyE* 敲除菌 FBS375 均能形成和 FZB42 类似的明显的皱褶和隆起的立体结构(图 5)。这一结果表明, *xkdB* 基因的敲除不会影响 FZB42 的生物膜形成, 因此 *xkdB* 基因与 *amyE* 基因类似, 是一个中性位点, 其缺失或者敲除不会影响 FZB42 的生物膜表型。然而, 我们发现 SfGFP 标记菌株 FBS374 的生物膜形成能力严重受损, 只能形成较为光滑且脆弱的生物膜结构, 我们分析, 这应该主要归因

于 SfGFP 蛋白表达的影响。

2.6 *xkdB* 基因对 swarming 的影响

Swarming 运动是细菌群体通过鞭毛在固体或半固体表面协调地快速迁移, 是细菌多细胞性和群体行为的一种表现形式^[14]。Swarming 与生物膜形成之间的联系非常紧密, 受到一些共同的基因调控因子调控, 因此, 我们也对 *xkdB* 基因敲除对 FZB42 的 swarming 的影响进行了检测。结果显示, 在含有 0.5% 琼脂的 LB 半固体平板上, FBS373 和 FBS375 的 swarming 能力与野生型相比, 并无明显差别(图 6)。这一结果表明, *xkdB* 基因敲除对 FZB42 的运动性无显著性影响。然而, SfGFP 标记菌株 FBS374 与野生型相比, swarming 能力受到一定程度的削弱, 我们认为这是因为 SfGFP 的表达不仅影响生物膜的形成, 也影响菌株的运动性。

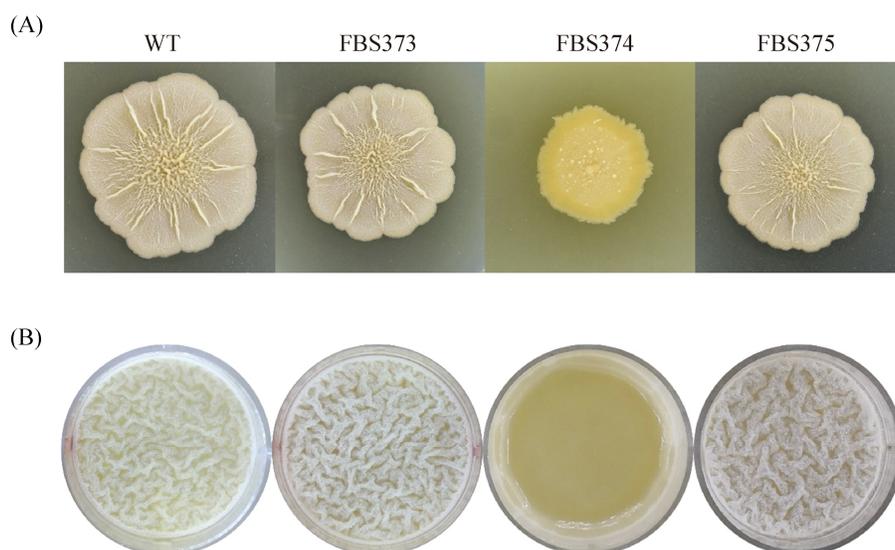


图 5 各菌株生物膜形成情况比较

Figure 5 Comparison of biofilm formation of the strains grown on LBGM agar plates for 5 days (A) and in LBGM liquid medium for 2 days (B). WT: FZB42 wild type; FBS373: *xkdB* knockout strain (FZB42 *xkdB*::*speR*); FBS374: *xkdB* knockout strain carrying *SfGFP* gene maker (FZB42 *xkdB*::*speR*+SfGFP); FBS375: *amyE* knockout strain (FZB42 *amyE*::*emR*).

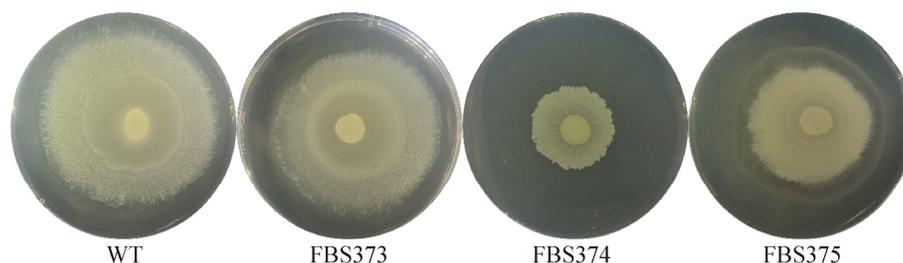


图 6 各菌株 swarming 能力比较

Figure 6 Swarming motility of the strains incubated at 37 °C for 12 h. See Figure 5 for strain annotation.

3 讨论与结论

在本研究中, 我们使用 SfGFP 成功地对瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 进行了标记, 获得了荧光亮度比 *gfp*+标记菌株(FB01)高 5 倍以上的标记菌株(FBS374), 这为使用该菌株用于定殖相关的研究提供了可行性, 也为同类菌株的标记提供了一种通用可行的策略。

作为微生物肥料的主要菌种来源, 瓦雷兹芽孢杆菌及其近缘细菌的标记研究, 对于追踪这类细菌在自然界的生态行为, 以及进一步开发其应用潜力至关重要。例如, Xu 等用 GFP 标记的瓦雷兹芽孢杆菌 SQR9, 对其在植物根部的定殖和生物膜形成, 以及对黄瓜枯萎病的控制情况进行了研究^[15-18], Beauregard 等用 GFP 标记的枯草芽孢杆菌研究了植物多糖对生物膜形成的影响^[19]。但总体上来说, 除了枯草芽孢杆菌之外, 使用 GFP 对野生菌株的定殖研究并不多, 这可能跟大多数野生菌株的难以转化以及跟前言中所述的因素有关。Fan 等在 2011 年对 FZB42 进行了 GFP 标记^[10], 虽然取得了较好的效果, 但这种成功是依赖于偶发突变株, 而并非基于一个广泛可行的标记策略。SfGFP 是 Geoffrey S Waldo 实验室开发的一种 GFP 变体^[20], 该变体有极强的正确折叠倾向性, 因此, SfGFP 蛋白的荧光亮度远超普通 GFP, 并对化学变性剂具有更好的耐受性, 因此已被用到不

少研究当中^[21-25]。在本研究中, 我们使用 SfGFP 成功地标记了 FZB42, 说明 SfGFP 可以很好地克服 GFP 及其普通变体在标记瓦雷兹芽孢杆菌时遇到的困难, 其示范性可望为同类菌株的标记和后续研究提供一种通用的方法。

不过本研究中发现, SfGFP 标记对 FZB42 的生物膜形成具有一定削弱作用。这一现象的原因并不清楚, 但是由于 *xkdB* 敲除本身并不影响生物膜形成, 因此推断这种负面影响应该来自 GFP 蛋白本身。另外, 我们观察到, 不仅仅 SfGFP, 以其他形式存在(质粒上)的 GFP 变体(*gfp*+)也有类似情况, 这说明这确实是 GFP 蛋白自身的影响, 可能跟 GFP 蛋白表达给菌株带来的负担有关。在后续研究中有必要采取适当措施, 例如更换启动子等方法, 来平衡好 GFP 表达水平与其对菌株所造成的负担。

根据同源序列比对分析, FZB42 中的 *xkdB* 被注释为 5'-UTR 区和 5'-CDS 区缺失的假基因, 该基因在瓦雷兹芽孢杆菌中高度保守。因此, 这个座位理论上是一个合适的外源基因引入位点。而实验结果也表明, *xkdB* 基因的敲除不会直接对 FZB42 的生长、碳源利用、生物膜形成和运动性等方面造成影响, 这为后续研究中使用 *xkdB* 作为外源基因插入位点的可行性提供了实验证据, 为在 *amyE* 和 *xkdB* 2 个位点同时引入外源基因进行分子互作的相关研究奠定了基础。

综上所述, 本研究中确认了 FZB42 基因组

上一个新的适用于外源基因表达的中性座位，并在此座位上外源表达了 *SfGFP* 基因，对 FZB42 成功进行了高亮标记，对同类菌株的标记研究具有较好的借鉴意义。在后续研究当中，对 SfGFP 影响 FZB42 性状的不同方面进行精细评价，对其影响机制进行探究并寻找可行的规避办法，平衡好标记和负担两方面，将有助于更好地发挥该标记菌株的使用价值和应用潜力。

参考文献

- [1] Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 2009, 58(4): 921–929.
- [2] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1962, 59(3): 223–239.
- [3] Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 905–909.
- [4] Drejer E, Hakvåg S, Irla M, Brautaset T. Genetic tools and techniques for recombinant expression in thermophilic *Bacillaceae*. *Microorganisms*, 2018, 6(2): 42.
- [5] Nguyen HD, Nguyen QA, Ferreira RC, Ferreira LCS, Tran LT, Schumann W. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid*, 2005, 54(3): 241–248.
- [6] Krebs B, Höding B, Kübart S, Workie MA, Junge H, Schmiedeknecht G, Grosch R, Bochow H, Hevesi M. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1998, 105(2): 181–197.
- [7] Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O, Junge H, Voigt B, Jungblut PR, Vater J, Süssmuth R, Liesegang H, Strittmatter A, Gottschalk G, Borriss R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(9): 1007–1014.
- [8] Fan B, Wang C, Song XF, Ding XL, Wu LM, Wu HJ, Gao XW, Borriss R. Corrigendum: *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2491.
- [9] Borriss R, Chen XH, Rueckert C, Blom J, Becker A, Baumgarth B, Fan B, Pukall R, Schumann P, Spröer C, Junge H, Vater J, Pühler A, Klenk HP. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(8): 1786–1801.
- [10] Fan B, Chen XH, Budiharjo A, Bleiss W, Vater J, Borriss R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 2011, 151(4): 303–311.
- [11] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd Edition, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] Burby PE, Simmons LA. MutS2 promotes homologous recombination in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(2): JB.00682–16.
- [13] McDonnell GE, Wood H, Devine KM, McConnell DJ. Genetic control of bacterial suicide: regulation of the induction of PBSX in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(18): 5820–5830.
- [14] Harshey RM. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 249–273.
- [15] Xu ZH, Zhang HH, Sun XL, Liu Y, Yan WX, Xun WB, Shen QR, Zhang RF. *Bacillus velezensis* wall teichoic acids are required for biofilm formation and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(5): e02116–18.
- [16] Xu ZH, Zhang RF, Wang DD, Qiu MH, Feng HC, Zhang N, Shen QR. Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(9): 2941–2950.

- [17] Liu YP, Zhang N, Qiu MH, Feng HC, Vivanco JM, Shen QR, Zhang RF. Enhanced rhizosphere colonization of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by pathogen infection. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 353(1): 49–56.
- [18] Cao Y, Zhang ZH, Ling N, Yuan YJ, Zheng XY, Shen B, Shen QR. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(5): 495–506.
- [19] Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(17): E1621–E1630.
- [20] Pédélec JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(1): 79–88.
- [21] Corcoran CP, Podkaminski D, Papenfort K, Urban JH, Hinton JCD, Vogel J. Superfolder GFP reporters validate diverse new mRNA targets of the classic porin regulator, MicF RNA. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(3): 428–445.
- [22] Scott DJ, Gunn NJ, Yong KJ, Wimmer VC, Veldhuis NA, Challis LM, Haidar M, Petrou S, Bathgate RAD, Griffin MDW. A novel ultra-stable, monomeric green fluorescent protein for direct volumetric imaging of whole organs using clarity. *Scientific Reports*, 2018, 8: 667.
- [23] Balleza E, Kim JM, Cluzel P. Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nature Methods*, 2018, 15(1): 47–51.
- [24] Reddington SC, Rizkallah PJ, Watson PD, Pearson R, Tippmann EM, Jones DD. Different photochemical events of a genetically encoded phenyl azide define and modulate GFP fluorescence. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(23): 5974–5977.
- [25] Steiner T, Hess P, Bae JH, Wiltschi B, Moroder L, Budisa N. Synthetic biology of proteins: tuning GFPs folding and stability with fluoroproline. *PLoS ONE*, 2008, 3(2): e1680.

(本文责编 张晓丽)