

细菌冰核基因的应用研究

唐朝荣 孙福在* 赵廷昌

(中国农科院植保所植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100081)

摘 要 细菌冰核基因的应用研究已成为生物冰核领域的研究热点,研究涉及细菌细胞表面展示、促冻杀虫、报告基因、病原微生物高敏检测、作物抗寒育种等多个领域,显示良好应用前景。通过对国外在该方面的研究现状的综述和我们在冰核基因促冻杀虫研究方面重要进展的介绍,对今后我们拟开展的这一研究工作进行了展望。

关键词 冰核细菌,冰核基因,应用研究

中图分类号 Q754 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)04-0407-04

水结冰需要一种被称作冰核的物质来催化,而自然界中活性最强的冰核来自一类细菌即冰核细菌,它们在 -1°C ~ -2°C 即可催化过冷却水结冰,这种特性使冰核细菌成为一种重要的生物资源,研究和应用涉及人工造雪制冰、促冻杀虫、食品冷冻浓缩、人工调节天气等领域^[1]。冰核细菌所具有的这种独特特性是由其所携带的冰核基因(*ina* 基因)所赋予的,国外已克隆到 7 个细菌 *ina* 基因,其应用研究现已成为细菌冰核领域的研究热点,涉及细菌细胞表面展示、促冻杀虫、报告基因、病原微生物高敏检测、作物抗寒育种等^[2]。最近,我们从自行分离的冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 中分离到一个新冰核基因 *iceA*^[3],并利用该基因成功构建了促冻杀虫基因工程菌,该菌显示良好的促冻杀虫效果。本文就国内外细菌 *ina* 基因的应用研究现状作一概述。

1 细菌细胞表面展示

细菌细胞表面展示是指利用合适的外膜锚定基团来实现异源蛋白在细菌细胞表面的活性表达,这方面研究已成为应用微生物学、生物技术和免疫学上越来越重要的研究课题。目前在革兰氏阴性和阳性菌中均有一些蛋白被用作细胞表面展示的锚定基团,但这些蛋白在应用时往往存在这样或那样的不足^[4-6]。近几年,研究者开始利用细菌冰核蛋白进行细菌细胞表面展示。细菌冰核蛋白(INP)是一种外膜蛋白,其 C-端暴露在细胞外膜上,因此融合到 INP C-端的外源蛋白即位于细胞表面上^[7],此外 INP 在细菌培养物达静止生长长期时仍可稳定存在,INP 基因中部的重复区对 DNA 重排有较强的抗性,能抵抗 DNA 重排而正常表达冰核活性,这样用 INP 作细菌细胞表面展示时,可同时利用简捷、灵敏的冰核活性测定(即冰核基因活性表达的测定方法)来间接检测异

源基因的表达^[6],这些特性使 INP 成为一种理想的锚定基团在细菌细胞表面展示上应用。

1.1 抗原或抗原决定簇的细菌细胞表面展示

抗原或抗原决定簇的细胞表面展示在活体疫苗开发上显示良好应用前景,因为在细胞表面表达抗原,有可能创制出通过口服方式即可诱发人体免疫反应的新型疫苗。Kim 等^[4]将乙肝病毒(HBV)主要抗原的基因整合到 *ina* 基因的 3'端,Western blotting、免疫荧光显微术、完整细胞 ELISA 和冰核活性测定均表明重组蛋白在 *E. coli* 细胞表面实现了有效表达,研究显示,基于 *ina* 基因的细菌细胞表面展示技术有可能在一些重要活体疫苗研制上广泛应用。Kwak 等^[8]将艾滋病毒 HIV-1 抗原 gp120 的基因整合到 *ina* 基因的 3'端,并在 *E. coli* 细胞表面实现了活性表达,研究了该抗原能否保持其在 HIV-1 上原有的三维构象,以期开发出用于防治艾滋病的活体疫苗。

1.2 单链抗体的细菌细胞表面展示

人类癌蛋白 c-myc 与乳房癌、鼻咽癌和肝细胞癌的发生密切相关,监测 c-myc 的表达在这些癌症的诊断治疗上具重要意义。ac-myc 单克隆抗体(ac-Myc McAb)可识别 c-myc,目前在临床上用 ac-Myc Mab 的 ELISA 技术已成为对这些癌症进行诊断和检测的常规手段,但从杂交瘤细胞制备这种抗体的常规方法费用昂贵。如将单链抗体(ScFv)的基因与 *ina* 基因整合,对 ScFv 进行细菌细胞表面展示将会减少抗体生产的下游加工步骤,大大降低抗体生产的成本。Bassi 等^[6]已用 *ina* 基因成功实现了 ac-Myc McAb 在细菌细胞表面的展示。

1.3 工业酶类的细菌细胞表面展示

将重要工业酶类在细胞表面展示得到酶包被细菌,可直

接用作活细胞生物催化剂,因而可省去工业酶类生产通常所需的繁琐和昂贵的后加工过程。此外,用该系统得到的全细胞生物催化剂在完成生物转化时,无需反应底物和产物通过细胞膜系统,因此操作也简捷。Jung^[9,10]用 *ina* 基因成功实现了果聚糖酶和羧甲基纤维素酶的细胞表面展示,同时实现了 *ina* 基因和两种工业酶类的活性表达。

1.4 多肽文库的细菌细胞表面展示

定向进化在生物催化剂改良上的运用逐渐增多,在更加有效的组合突变技术建立以后,设计快速简捷的方法进行阳性克隆筛选就成为成功应用这项技术的关键^[11]。根据显色底物或易观察的菌落表型可进行克隆筛选,而应用与改良酶活性相关的细胞存活力和生长速率的变化来筛选则更直接,但它们也仅适于某些特定的酶类,不能作为筛选酶活改良突变体的一种普遍方法。另一种方案是将突变蛋白在噬菌体或其它微生物表面进行展示,然后筛选具有所需特征的蛋白突变体, Kim 等^[5]用 DNA shuffling 技术生成羧甲基纤维素酶(CMCase)基因的系列突变体,并将它们与 *ina* 基因融合,以构建变异基因的细菌细胞表面展示系统,结果成功筛选到 CMCase 改良突变体。该研究提供了一种对工业酶类(包括一些水解酶类)进行定向进化和高效筛选的技术平台。

1.5 重金属亲合蛋白/多肽的细菌细胞表面展示

重金属中毒事件在日常生活中时有发生,研制经济有效的解毒措施是医疗工作者的一个重要课题。有能与重金属亲合的蛋白或多肽进行细菌细胞表面展示,有可能生成全细胞生物吸附剂,用于重金属中毒患者的临床治疗。Mejard^[12]用 OmpA 蛋白作锚定基团成功地实现了一种对镉具特定亲合力的六肽在 *E. coli* 细胞表面的展示。预测用 INP 蛋白作锚定蛋白的细菌表面展示技术将是重金属解毒剂研制开发的一个重要研究方向。

2 促冻杀虫

对许多农业害虫来说,其越冬死亡率高往往是决定翌年危害程度的重要因素,压低越冬虫源基数是控制害虫发生的有效措施^[13]。冰核细菌可降低虫体过冷却点、促进虫体结冰而冻杀害虫,冰核细菌的促冻杀虫理论已确凿无疑,但现在促冻杀虫研究中所用的野生型冰核细菌都难以应用冻杀田间和仓储越冬害虫,因为这些冰核菌在害虫体内不能有效定殖、易被害虫排出体外而失去冻杀效果,另外这些细菌都是植物附生菌,在植物体上附生定殖能力强,田间施用后易诱发霜冻,这些已成为阻碍促冻杀虫研究应用的国内外难题。

唐朝荣^[2]利用所克隆的 *ina* 基因 *iceA* 构建了具广泛宿主接合转移和 Tn5 转座功能的工程质粒 *mob-Tn5-iceA*,通过接合转移将工程质粒导入阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* 1.181 和 1.2022 两个菌株中,并通过 Tn5 转座作用进一步将 *iceA* 整合到宿主菌染色体 DNA 上,构建成功冰核活性稳定的促冻杀虫基因工程菌 Enc181^{ice} 和 Enc2022^{ice}。研究显示这两个工程菌能显著提高害虫的过冷却点、可在害虫肠道有

效定殖,对害虫的低温冻杀效果明显。将饲菌后 6d 的玉米螟和棉铃虫在 -5℃ 处理 6h,即有 90% 以上被冻死,而未经工程菌处理的对照虫体则全部存活下来;-7℃ 处理 6h,工程菌处理虫体 100% 被冻死,而对照玉米螟和棉铃虫中则分别仅有 7.4% 和 14.3% 被冻死。此外,两株工程菌尤其是 Enc2022^{ice} 在植物体上的附生定殖能力明显低于野生型冰核细菌,这排除了在大田应用冻杀害虫时诱发霜冻的风险。该研究结果创制出促冻杀虫新生物农药,为防除我国三北地区重要越冬农林害虫和仓储害虫指出了一条切实可行的生防新途径。

在我们进行促冻杀虫基因工程菌构建时,日本研究者 Watanabe 等^[14]也成功构建了促冻杀虫基因工程菌。但在他们所构建的工程菌中,*ina* 基因是以质粒形式存在于宿主菌 *Enterobacter cloacae* 中,而在我们的研究中,*ina* 基因 *iceA* 已整合到工程菌的染色体上,*ina* 基因稳定存在、杀虫活性更稳定。考虑到田间施放时的生物安全性,我们目前正在开展生物安全型促冻杀虫基因工程菌的构建,即借助微转座子(Mini-transposon)将 *ina* 基因整合到在虫体内可稳定定殖、在植物体上难以附生定殖的细菌菌株的染色体 DNA 上。

3 报告基因

与常规报告基因相比,用 *ina* 基因做报告基因有以下几方面优点^[1]:①活性检测所需的专用设备仅是一个低温酒精槽,费用很低,检测方法方便快捷;②检测灵敏度高:其检测灵敏度同荧光 GUS 报告基因相当;③在 6 个数量级的很宽范围内,冰核数量与 *ina* 基因产物(冰蛋白)的表达量间呈对数线性关系,因此可用冰核活性强弱来定性定量检测目标基因的表达。

不过需要指出的是,应用 *ina* 基因作报告基因也有其局限性^[1]。首先是该报告基因只能在缺少内源 *ina* 基因及其它不能产生在 -9℃ 以上具冰核活性的物质的生物体中应用,值得庆幸的是,大多数微生物中都无 *ina* 基因,也不产生在 -9℃ 以上具活性的冰核物质,在有 *ina* 基因的菌株中,也可通过基因取代来失活 *ina* 基因。该报告基因的第二个不足是:在某些细菌中,冰蛋白一旦合成,寿命较长,这对一些试验来说反而不利。此外,冰核形成的温度限制也阻碍该报告基因在 30℃ 以上生长的微生物中应用。

3.1 研究植物-微生物互作

在根际土壤中,植物根系和微生物在不同时空格局上的互作可能会影响到氮化和氮循环,因此该方面研究具有重要意义。Jaeger^[15]用 *ina* 基因作报告基因构建了两个 *Erwinia herbicola* 299R 工程菌株作生物传感器,用来监测在正常土壤微生物存在时根系周围的糖和氨基酸数量变化,研究显示用这两个菌株可在微小空间上研究根际氮循环的机制。

3.2 研究营养元素利用^[16]

Pseudomonas spp. 能利用多种细菌和真菌产生的含铁细胞 Loper 用所构建的转录融合体 *pvd-inaZ* 来监测一个 *Pseudomonas putida* 菌株对铁元素的利用情况, *pvd-inaZ* 系统是用

ina 基因 *inaZ* 作报告基因, 基因的冰核活性表达受铁离子调节启动子(*pwd*)控制。用这种报告基因系统, 研究者成功研究了根际 *Pseudomonas putida* 对铁离子的利用情况, 研究显示异源微生物分泌的含铁细胞增强了 *Pseudomonas putida* 对铁离子的利用。

3.3 其它基因的研究

ina 基因作报告基因还成功地应用于 *hrp* 基因研究^[17, 18] 以及根际和叶围上某些细菌一些基因的活性监测^[19]。

4 病原微生物的高敏检测^[20]

细菌 *ina* 基因还可应用于对食品和水质中沙门氏菌污染的检测, Wolber 将 *ina* 基因整合到对沙门氏菌具特异性的噬菌体中, 然后将改造后的噬菌体加到待测的食品或水源样品中, 经培养后测定冰核活性。该法检测快捷、灵敏, 在 10^7 个杂菌中含 10 个沙门氏菌或 1 mL 水中含 10 个沙门氏菌时就可检测到。

5 作物抗寒育种

ina 基因在高等植物中的表达有可能为作物抗寒育种提供新途径。许多研究显示^[21, 22]: 一些对体内结冰有一定忍耐力的抗冻植物, 只有在较高的零下温度结冰时才具有较强抗寒能力, Mazur^[23] 对此作了理论解释: 作物在较高温度下结冰时, 冰晶通过细胞非原生质体(Apoplast)缓慢增长, 胞内水分也被逐渐“拉出”至胞外成冰, 导致胞内溶液浓度上升, 结冰点下降, 而深度过冷却与之不同, 当细胞在深度过冷却下自发成冰后, 冰晶增长速度太快, 使细胞来不及脱水, 冰晶穿透细胞, 最终导致膜质破裂、细胞死亡。

由于多数植物细胞中不含有有效的内源冰核, Baerthein 等^[24] 推测如 *ina* 基因能在植物细胞内有效表达并产生高活性冰核, 就会降低抗冻植物的过冷却能力, 进而增强其耐受更低温度的能力。他们在研究中成功地将 *ina* 基因 *inaZ* 导入冻害敏感型植物(烟草)和抗冻植物(*Solanum commersonis*) 中, *inaZ* 在两种转基因植物都得到表达, 其中活性最强的转基因植株的冰核浓度(-10.5°C)高达 100 冰核/mg 组织, 结冰温度从未转基因对照株的 -12°C 提高到 -4°C 。但总的看来, *inaZ* 基因在植物体内的表达效率不高, 为了避免深度过冷却而最大限度地防止霜冻, 结冰必须在 -4°C 以上发生, 因此利用 *ina* 基因培育抗寒品种的研究还需很多工作要做。为了提高转基因植物组织的冰点, 可通过多种途径如增加 *inaZ* 拷贝数, 提高转录水平及转录稳定性, 以及使 *inaZ* 蛋白有更稳定的细胞定位, 或者改造 *inaZ* 蛋白等手段使其在植物体内更稳定。

6 结 语

在国外, 细菌冰核基因的应用研究已涉及多个领域和学科, 并显示良好应用前景。在连续 7 次国家自然科学基金资助下, 中国农科院植保所生物冰核研究室最近也获得了细菌冰核基因, 在冰核基因应用促冻杀虫的研究中也取得重要进

展, 首次将细菌冰核基因整合到宿主菌 *Enterobacter cloacae* 染色体 DNA 上, 构建成冰核活性稳定、冻杀效果好的基因工程菌, 并已申请了国家专利。结合我国实际及已有研究基础, 建议今后应在以下两方面加强研究, 力争有所突破。其一, 将其它杀虫基因(如 Bt 毒蛋白基因)和细菌冰核基因结合起来构建杀虫效果更好的双价或多价杀虫基因工程菌; 在作物生长季、昆虫取食期, 利用其它杀虫基因发挥作用毒杀害虫, 待害虫进入越冬期、气温降到零下温度后, 则利用冰核基因发挥效力冻杀害虫。其二, 应开展细菌冰核基因用作报告基因的研究, 以期构建操作性强的新型报告基因系统。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lee R E, Warren G J, Gusta L V. Biological ice nucleation and its applications, APS Press, 1995
- [2] TANG C R(唐朝荣). Cloning of a new ice nucleation active gene and construction of ice nucleation active *Enterobacter cloacae* for insect pest control. Ph. D Dissertation for Graduate School, CAAAS(中国农科院博士学位论文), 2001
- [3] TANG C R(唐朝荣), SUN F Z(孙福在), ZHAO T C(赵廷昌) et al. Cloning and characterization of a new ice nucleation active gene from ice nucleation active bacterium *Erwinia ananas* 110. *Chinese Journal of Microbiology*(微生物学通报) 2002, 29(4): 48 ~ 54
- [4] Kim E J, Yoo S K. Cell surface display of hepatitis B virus surface antigen by using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, 29: 292 ~ 297
- [5] Kim Y G, Jung H C, Pan J G. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(2): 788 ~ 793
- [6] Bassi A S, Ding D N, Gloor G B et al. Expression of single chain antibodies(ScFvs) for c-myc oncoprotein in recombinant *Escherichia coli* membranes by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Biotechnol Prog*, 2000, 16: 557 ~ 563
- [7] Green R L, Corotto L V, Warren G J. Deletion mutagenesis of the ice nucleation gene from *Pseudomonas syringae* S203. *Mol Gen Genet*, 1988, 215: 165 ~ 172
- [8] Kwak Y D, Yoo S K, Kim E J. Cell surface display of human immunodeficiency virus type1 gp120 on *Escherichia coli* by using ice nucleation protein. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1999, 6: 499 ~ 503
- [9] Jung H C. Expression of carboxymethyl cellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 22(5): 348 ~ 354
- [10] Jung H C. Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 576 ~ 580
- [11] Kuchner O, Arnold F H. Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol*, 1997, 15: 523 ~ 530
- [12] Mejare M, Ljung D, Bulow L. Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as OmpA fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Engineering*, 1998, 11: 489 ~ 494

- Press(上海科学技术出版社),1980
- [14] Watanabe K , Abe K , Sato M. Biological control of an insect pest by gut-colonizing *Enterobacter cloacae* transformed with ice nucleation gene. *Appl Microbiol* ,2000 **88** :90 ~ 97
- [15] Jaeger III C H , Lindow S E , Miller W *et al.* Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl Environ Microbiol* ,1999 **65** (6) :2685 ~ 2690
- [16] Loper J E , Henkels M D. Utilization of heterologous sideropheres enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* ,1999 **65** (12) :5257 ~ 5363
- [17] Lingren P B , Frederick R , Govindarajan A G *et al.* An ice nucleation reporter gene system : identification of inducible pathogenicity genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* . *EMBO J* ,1989 **8** : 2520 ~ 2527
- [18] Rahme L G , Mindrinos M N , Panopoulos N J. Plant and environmental sensory signals control the expression of hrp genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* . *J Bacteriol* ,1992 **174** :3499 ~ 3507
- [19] Loper J E , Lindow S E. A biological sensor for iron available to bacteria occupying microhabitats on plant surfaces. *Appl Environ Microbiol* ,1994 **60** :1934 ~ 1941
- [20] Wolber P K. Bacterial ice nucleation. *Adv Microb Physiol* ,1993 **34** : 203 ~ 237
- [21] Siminovitch D , Scarth G W. A study of the mechanism of frost injury to plants. *Can J Res C* ,1938 **16** :467 ~ 481
- [22] Rajashekar C , Li P H , Carter J V. Frost injury and heterogeneous ice nucleation in leaves of tuber-tearing solanum species. *Plant Physiol* ,1983 **71** :749 ~ 755
- [23] Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* ,1977 **14** :251 ~ 272
- [24] Baerthein D A , Lindow S E , Panopoulos N J *et al.* Expression of a bacterial ice nucleation gene in plants. *Plant Physiol* ,1992 **100** : 1730 ~ 1736

Advances in the Application Research of Bacterial Ice Nucleation Active (*ina*) Genes

TANG Chao-Rong SUN Fu-Zai* ZHAO Ting-Chang

(State Key Lab for the Biology of Plant Diseases and Insect Pests , Institute of Plant Protection , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China)

Abstract For recent years , the research has been focused on the *ina* gene application in the field of biological ice nucleation. This paper reviewed the application of *ina* genes in bacterial cell surface display , construction of reporter gene systems , killing insect pests through induced freezing , sensitive detection of pathogenic bacteria contaminating foods , breeding of cold resistant varieties. A brief introduction of the *ina* gene application in killing insect pests in China was also made in this review.

Key words ice nucleation active bacteria , *ina* gene , application research

Received : 11-08-2001

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China(No.30170624).

* Corresponding author. Tel : 86-10-62815933 ; Fax : 86-10-62894642 ; E-mail: zhaotingchang@caas.ac.cn ; <http://journals.im.ac.cn>