

# 乙酰羟酸合成酶同工酶基因 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 的表达及对除草剂抗性的比较

沈晶晶, 李永丰, 黄星, 俞欣妍, 何健, 李顺鹏

南京农业大学生命科学学院微生物学系 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095

**摘要:** 乙酰羟酸合成酶(AHAS)是磺酰脲类和咪唑啉酮类等 AHAS 抑制剂类除草剂的作用靶标。获得抗此类除草剂的 AHAS 突变基因资源具有非常重要的理论和应用价值。本研究从抗甲磺隆菌株 *Klebsiella* sp. HR11 和甲磺隆敏感菌株 *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 中分别克隆到 AHAS 三种同工酶基因 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH*。抗性菌株和敏感菌株 AHAS 三种同工酶基因在氨基酸水平上差异位点主要集中在 *ilvBN* 和 *ilvGM* 的大亚基上。将 2 株菌的 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 分别构建到表达载体 pET29a(+)中, 在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中进行表达, 测得只有含菌株 HR11 *ilvBN* 和 *ilvGM* 的转化子细胞破碎液 AHAS 对各类 AHAS 抑制剂类除草剂具有较强的抗性, 而含菌株 HR11 *ilvIH* 和菌株 MGH 78578 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 的转化子细胞破碎液 AHAS 对各类 AHAS 抑制剂类除草剂敏感。

**关键词:** AHAS 抑制剂类除草剂, 乙酰羟酸合酶同工酶, *ilvBN*, *ilvGM*, *ilvIH*, 除草剂抗性

## Expression of acetohydroxyacid synthase isozyme genes *ilvBN*, *ilvGM*, *ilvIH* and their resistance to AHAS-inhibitor herbicides

Jingjing Shen, Yongfeng Li, Xing Huang, Xinyan Yu, Jian He, and Shunpeng Li

Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Microbiology Department, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** Acetohydroxyacid synthase (AHAS) catalyses the first reaction in the pathway for synthesis of the branched-chain amino acids. AHAS is the target for sulfonylurea, imidazolinone and other AHAS-inhibitor herbicides. Herbicides-resistant AHAS genes have potential application in plant transgenic engineering and development of new generation herbicide. The AHAS isozyme genes *ilvBN*, *ilvGM* and *ilvIH* were cloned from metsulfuron-methyl resistant strain *Klebsiella* sp. HR11 and metsulfuron-methyl sensitive strain *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. Homologous sequences comparison indicated that the differences in AHAS isozyme genes at amino acid levels between strain HR11 and strain MGH 78578 were mainly on the large subunits of *ilvBN* and *ilvGM*. The three AHAS isozyme genes from HR11 and MGH 78578 were ligated into the expression vector pET29a(+) and expressed in *Escherichia coli* BL21, respectively. The results of enzyme inhibition assay showed that only *ilvBN* and *ilvGM* from strain HR11 showed strong resistance to AHAS-inhibitor herbicides, while *ilvIH* from strain HR11 and *ilvBN*, *ilvGM* and *ilvIH* from strain MGH78578 were sensitive to AHAS-inhibitor herbicides.

**Keywords:** AHAS-inhibitor herbicides, AHAS isozymes, *ilvBN*, *ilvGM*, *ilvIH*, herbicides-resistance

**Received:** February 5, 2009; **Accepted:** April 29, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30500010).

**Corresponding author:** Jian He. Tel: +86-25-84396685; E-mail: hejian@njau.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30500010)资助。

乙酰羟酸合酶(也称乙酰乳酸合酶 acetohydroxyacid synthase, AHAS)是植物、真菌和细菌细胞内支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)生物合成过程中的关键酶,该酶催化 2 分子丙酮酸缩合产生乙酰乳酸或丙酮酸与  $\alpha$ -丁酮酸缩合形成乙酰羟基丁酸<sup>[1,2]</sup>。AHAS 是磺酰脲类除草剂及其他 AHAS 抑制剂类除草剂如咪唑啉酮类、嘧啶水杨酸和磺酰氨基类除草剂的作用靶标<sup>[3,4]</sup>。AHAS 抑制剂类除草剂如磺酰脲类除草剂已经成为继有机磷、乙酰胺类除草剂后的第三大除草剂,全球年销售额达到 30 亿美元以上,我国磺酰脲类除草剂每年的应用面积已达农作物播种面积的 10%以上,并仍呈扩大的趋势。但某些使用量大的磺酰脲类除草剂如绿磺隆、甲磺隆等化学性质较稳定,在土壤中半衰期长(几个月到一年多),对下茬作物药害严重,对农业生产造成了巨大的损失<sup>[5]</sup>。构建并应用抗除草剂转基因作物是解决除草剂药害的最佳途径,因此研究磺酰脲类除草剂对靶标蛋白抑制机理、发掘针对该类除草剂的抗性基因和构建转基因抗性作物受到了广泛的关注,目前抗磺酰脲类除草剂转基因作物已有报道但还没有商业化应用。

AHAS 由大小 2 个亚基组成,其中大亚基是催化亚基,小亚基是调节亚基<sup>[6]</sup>。编码大小亚基的基因在植物和酵母中分别为 *ilv2* 和 *ilv6*<sup>[7,8]</sup>, *ilv2* 和 *ilv6* 分布在基因组的不同位置,并不连锁。在细菌中,乙酰羟酸合酶存在 3 个同工酶 AHAS I、AHAS II 和 AHAS III,编码基因分别为 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH*<sup>[9]</sup>。在已报道的假单胞菌的基因组中,AHAS 仅由 *ilvIH* 编码<sup>[10]</sup>,而在大肠杆菌、沙门氏菌和克雷伯氏菌等很多肠道细菌基因组中,同时存在 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 这 3 个 AHAS 同工酶基因<sup>[11]</sup>,但这 3 个同工酶在细胞中各承担何种生理功能,目前还不清楚。AHAS 敏感性下降突变是其获得除草剂抗性的主要途径,AHAS 是一种很保守的酶,1~2 个氨基酸残基的改变将导致对除草剂敏感性改变。目前国内外已经从抗性植物、酵母和细菌中获得了多个抗磺酰脲除草剂的乙酰羟酸合酶突变体,在拟南芥、酵母和大肠杆菌中已经鉴定的除草剂抗性突变位点有 G121(G116, G25)(括号外为拟南芥,括号内分别为酵母和大肠杆菌对应位置,下同)、A122(A117, A26)、M124(L119, M28)、V196(V191, V99)、

K256(K251, K159)、M570(M582, M460)和 F578(F590, F468)等,这些位点的突变导致对磺酰脲类除草剂抗性提高 10~40 倍不等。在克雷伯氏菌属中对 AHAS 各同工酶基因克隆、表达和酶学特性及对除草剂抗性方面的研究还未见报道。

本实验室从长期使用甲磺隆的土壤样品中分离筛选到 1 株广谱抗高浓度磺酰脲类除草剂的克雷伯氏菌属细菌 *Klebsiella* sp. HR11<sup>[12]</sup>。本研究通过 PCR 技术获得了菌株 *Klebsiella* sp. HR11 中 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 基因序列,在 *E. coli* BL21(DE3)中实现了这 3 个同工酶基因功能表达,并研究了表达后转化子细胞破碎液对 AHAS 抑制剂类除草剂的抗性强度。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

无机盐培养基, LB 培养基的配制见参考文献[13]。甲磺隆等除草剂溶于丙酮中配成 10%(W/V)的母液,再根据需要添加不同体积的母液到培养基中。

### 1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶等工具酶和分子试剂购自 TaKaRa 公司,化学试剂均为分析纯,紫外扫描仪(岛津 UV-PC2401),722 分光光度计(上海光学精密仪器厂)。

### 1.3 菌株

菌株 *Klebsiella* sp. HR11 为 AHAS 抑制剂类除草剂抗性菌株<sup>[12]</sup>,对甲磺隆、氯磺隆、咪唑乙烟酸、唑啶磺草胺和嘧啶肟草醚的最高耐受浓度分别为 8200、5600、5200、1600 和 800  $\mu\text{mol/L}$ ;菌株 *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 为除草剂敏感菌株,对各类 AHAS 抑制剂类除草剂耐受浓度不超过 100  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 1.4 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 基因的克隆和同源性分析

总 DNA 的提取方法参考文献[13],根据 GenBank 上已报道的 *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 全基因组序列在乙酰羟酸合酶 3 种同工酶基因序列的上下游约 100 个碱基处设计 3 对引物,以菌株 HR11 和 MGH 78578 总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,分别得到 3 个 AHAS 同工酶基因。引物序列见表 1。

表 1 三种同工酶基因测序和表达所需要的引物

Table 1 Primers for sequencing and expressing of AHAS genes

Primer		Sequence (5'-3')
Sequencing primer	<i>FilvBN</i>	GGTGGACATTTGCAAGCAAGCGCTGA
	<i>RilvBN</i>	GCGATTTTCATCCAGTTTCAC
	<i>FilvGM</i>	TATAGACGATAGCGAGCGACTA
	<i>RilvGM</i>	TAATCAGCTTTTTCGTCGTCAT
	<i>FilvIH</i>	AATAAGGGCGATGGTGGTCAT
	<i>RilvIH</i>	TCGTCGGCAATGCGCCGTAG
	<i>FilvBN</i>	CTACGTCATATGCGCTTACC GGCGCGCAG ( <i>Nde</i> I)
	<i>RilvBN</i>	ACTGCTCGAGCTCGAAGAACACCGCAATTTTGT ( <i>Xho</i> I)
Expressing primer	<i>FilvGM1</i>	CTACGTCATATGAATGGCGCGCAGTGGGTG ( <i>Nde</i> I)
	<i>RilvGM1</i>	CCTGGAAAGCTTCAGCAATGACCCGC ( <i>Hind</i> III)
	<i>FilvGM2</i>	TGCTGAAGCTTTCAGGTGGCAA ( <i>Hind</i> III)
	<i>RilvGM2</i>	ACTGCTCGAGGGCGCGGATTGTTGTGATGTG ( <i>Kpn</i> I)
	<i>FilvIH</i>	AGCTGGTACCATGGAGATGTTGTCAGGAGCC ( <i>Kpn</i> I)
	<i>RilvIH</i>	AGCTCTCGAGGGCGCATGATTTTATACCCGC ( <i>Xho</i> I)

扩增条件: 95°C 5 min; 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 3 min, 33 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 重组质粒交由上海博亚公司测定插入片段序列, 利用 OMIGA 软件对克隆序列进行序列的拼接和同源性分析。

### 1.5 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 基因的表达

根据测序结果设计表达引物, 因基因 *ilvGM* 中包含 *Nde* I 酶切位点, 为将 *ilvGM* 引入载体的 *Nde* I 酶切位点, 将 *ilvGM* 分成两部分先后构建入载体。这 4 对表达引物参见表 1 的 Expressing primer。

PCR 扩增获得的目的片段纯化后用相应的限制性内切酶酶切, 与同样双酶切的 pET29a(+)载体酶连, 酶连产物转化 *E. coli* BL21(DE3)中, 在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体平板上筛选转化子。将带有重组表达质粒的转化子接种到含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C、180 r/min 振荡培养至  $OD_{600}=0.5$ , 加入诱导剂 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续 37°C、250 r/min 培养, 分别在诱导 0 h、1 h 和 3 h 取样, SDS-PAGE 电泳分析转化子全细胞蛋白质。

### 1.6 重组 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 对除草剂抗性强度的测定

细胞破碎采用超声波破碎法, 蛋白含量按 Bradford 法进行<sup>[13]</sup>。细胞破碎液 AHAS 酶活的测定方法是间接比色法, 参考文献[14]进行。除草剂的抑制常数由方程式  $v_i = v_{\infty} (v_0 - v_{\infty}) / (1 + [I]/K_i^{app})$ ,  $v_i$  和

$v_0$  分别表示除草剂存在和不存在情况下酶的速率(以用相对活性表示);  $[I]$  表示除草剂的浓度;  $K_i^{app}$  为 apparent K, 即表观抑制常数, 也就是抑制了 AHAS 50%活性时所对应的除草剂浓度。如果测定结果表明在饱和除草剂浓度下酶几乎没有活性, 可以设定  $v_{\infty} = 0$ , 再通过方程(1)拟合得出  $K_i^{app}$  值<sup>[5]</sup>。

### 1.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

蛋白质电泳参照文献[15]和[16]。分离胶的浓度为 15%, 蛋白质分子量标准为 TaKaRa 公司的 Protein Molecular Weight Marker (Low)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 基因的克隆和同源性分析

根据 GenBank 上已报道的 *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 全基因组序列设计 3 对引物, 成功地从菌株 *Klebsiella* sp. HR11 和 MGH 78578 的总 DNA 中分别扩增出了包含 AHAS 3 种同工酶基因 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 的核酸片段(图 1)。菌株 *Klebsiella* sp. HR11 的 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* GenBank 登录号分别为 FJ688008(*ilvBN* 大亚基)、FJ688009(*ilvBN* 小亚基)、FJ688010(*ilvGM* 大亚基)、FJ688011(*ilvGM* 小亚基)、EU078623(*ilvIH* 大亚基)和 EU086105(*ilvIH* 小亚基)。

序列分析结果表明除草剂抗性菌株 *Klebsiella* sp. HR11 的 AHAS 三个同工酶基因 *ilvBN*、*ilvGM* 和

*ilvIH* 大小分别为 1950 bp、1901 bp 和 2219 bp，分别编码 AHAS I、II、III 的大小亚基；编码的蛋白分别有 552/96(大亚基/小亚基)、548/85 和 574/163 个氨基酸。在大小上和除草剂敏感菌株 *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 AHAS 同工酶基因是一致的。在氨基酸水平上对抗性菌株 HR11 和敏感菌株 MGH 78578 的 3 种 AHAS 同工酶分别进行比较，结果如表 2 所示，其中 *ilvBN* 有 8 个差异位点，均处于大亚基上；*ilvGM* 有 11 个差异位点，其中 8 个在大亚基上，3 个在小亚基上；*ilvIH* 仅有一个位点的差别，位于大亚基。上述结果可以看出，差异位点主要位于 *ilvBN* 和 *ilvGM* 的大亚基上。

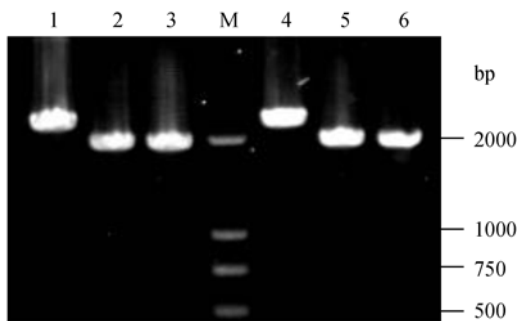


图 1 菌株 HR11 和 MGH 78578 的 AHAS 三种同工酶基因电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of three AHAS isozyme genes from strain HR11 and strain MGH 78578. M: DNA marker; 1, 2, 3: *ilvIH*, *ilvBN*, *ilvGM* from strain HR11; 4, 5, 6: *ilvIH*, *ilvBN*, *ilvGM* from strain MGH 78578.

### 2.2 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 基因的表达

分别将菌株 HR11 和 MGH 78578 的 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 克隆到表达载体 pET29a(+)的多克隆位点中，构建了含 HR11 AHAS 各同工酶的表达质粒 pET-BN(R)、pET-GM(R)和 pET-IH(R)，和含 MGH 78578 AHAS 各同工酶的表达质粒 pET-BN(S)、pET-GM(S)和 pET-IH(S)，分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)，经 IPTG 诱导后利用 SDS-PAGE 检测全蛋白图谱，结果如图 2 所示。经过 IPTG 诱导后，含有目的重组质粒的转化子 BL21(DE3)在 66 kD 附近有较强的表达条带，和 3 种同工酶大亚基大小在理论上基本一致；而 3 种同工酶小亚基的表达量均很小或没有表达，在相应位置均没有明显的条带。

### 2.3 抗性菌株和敏感菌株的 AHAS 同工酶比活力比较

测定了各转化子细胞破碎液 AHAS 比活力(表 3)，结果表明含有 AHAS 各同工酶基因的转化子表达的 AHAS 比活力均要比对照(不含重组质粒的 *E. coli* BL21)高得多，最高可达 46 倍，表明虽然小亚基没有表达(或表达量很小)，但大亚基单独存在时即有催化功能。同时本试验发现抗性菌株 HR11 的 *ilvBN*、*ilvGM* 比活力比敏感菌株 MGH 78578 的稍低，而 *ilvIH* 相差不大，这也说明了抗性产生的同时酶的结构发生了变化，一定程度上影响到底物和活性中心的结合，从而导致比活力的降低。

表 2 菌株 HR11 和 MGH 78578 的 AHAS 同工酶基因氨基酸差异位点

Table 2 Difference in AHAS isozyme genes at amino acid levels between strain HR11 and strain MGH 78578

Strain	Large subunit of <i>ilvBN</i>								Small subunit of <i>ilvBN</i>	Large subunit of <i>ilvIH</i>	Small subunit of <i>ilvIH</i>
	166	173	187	218	221	301	325	508			
HR11	A	T	T	P	D	S	I	A	/	P	/
MGH 78578	S	A	A	A	E	A	N	V	/	S	/
Strain	Large subunit of <i>ilvGM</i>								Small subunit of <i>ilvGM</i>		
	176	198	238	316	334	339	419	541	2	30	40
HR11	D	K	A	R	N	T	D	A	K	Q	S
MGH 78578	A	Q	D	C	S	A	N	S	M	H	P

166 means the 166<sup>th</sup> amino acid of large subunit of *ilvBN* from HR11 is A, while from MGH 78578 is S. / means no difference.

表 3 菌株 HR11 和 MGH 78578 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 比活力比较

Table 3 Specific activities of *ilvBN*, *ilvGM* and *ilvIH* from strain HR11 and strain MGH 78578

Strain	<i>Klebsiella</i> sp. HR11			<i>Klebsiella pneumoniae</i> MGH 78578			CK
	<i>ilvBN</i>	<i>ilvGM</i>	<i>ilvIH</i>	<i>ilvBN</i>	<i>ilvGM</i>	<i>ilvIH</i>	
Specific activity [ $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ ]	13.84	12.05	15.13	15.28	16.11	15.30	0.35

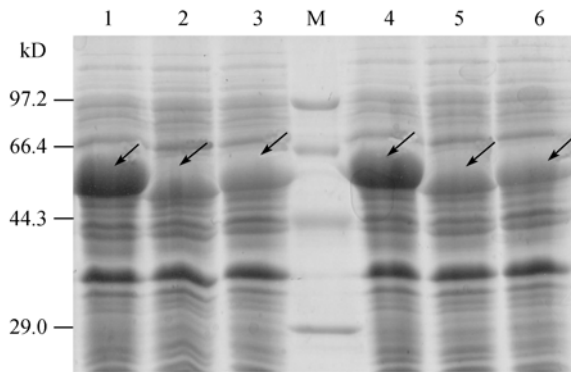


图2 AHAS 同工酶在大肠杆菌中诱导表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of AHAS isozymes expressed from pET29a(+) in *E. coli* BL21(DE3) cells. M: protein marker; 1, 2, 3: *ilvBN*, *ilvGM* and *ilvIH* from strain HR11 respectively; 4, 5, 6: *ilvBN*, *ilvGM* and *ilvIH* from strain MGH78578 respectively. The expressed products were indicated by arrowheads.

#### 2.4 菌株 HR11 和 MGH 78578 的 AHAS 同工酶对 AHAS 抑制剂类除草剂抗性强度比较

测定了各转化子细胞破碎液 AHAS 对各类除草剂的抗性强度, 以不同除草剂对酶的抑制常数  $K^{appi}$  表示(表 4),  $K^{appi}$  表示抑制了 AHAS 50%活性时所对应的除草剂浓度, 数值越大说明酶对该类除草剂抗性越强。表 4 中数据说明对照(不含重组质粒的 *E. coli* BL21)及含菌株 MGH 78578 各同工酶基因 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 的转化子细胞破碎液对各类 AHAS 类除草剂均很敏感, 各 AHAS 类除草剂对各类同工酶的  $K^{appi}$  均小于  $100 \mu\text{mol/L}$ 。而含菌株 HR11 *ilvBN*、*ilvGM* 的转化子细胞破碎液对各类 AHAS 类除草剂具有较高的抗性, 甲磺隆、氯磺隆、咪唑乙烟酸、唑啶磺草胺和嘧啶肟草醚对菌株 HR11 AHAS I 的  $K^{appi}$  要比对 MGH 78578 AHAS I 的  $K^{appi}$  分别高 20、19、29、23 和 18 倍; 对菌株 HR11 的 AHAS II 的  $K^{appi}$  要比对 MGH 78578 AHAS

II 的  $K^{appi}$  分别高 15、16、18、10 和 9 倍。这个结果同时也说明 AHAS 类除草剂的作用部位在大亚基上, 与是否有小亚基关系不大。

### 3 讨论

大多数肠道细菌如大肠杆菌、沙门氏菌和克雷伯氏菌含有 3 种 AHAS 同工酶。在大肠杆菌和沙门氏菌中只有 2 个同工酶有活性, 大肠杆菌的 *ilvGM* 和沙门氏菌 *ilvIH* 因发生移码突变或碱基改变而失活<sup>[3]</sup>, 而在克雷伯氏菌中这 3 个同工酶均有活性, 但各同工酶在细胞内执行的生理功能目前还不清楚。在 *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 全基因组中, 本试验发现 *ilvGM* 和编码 3 种支链氨基酸合成必不可少的苏氨酸脱氨酶、乙酮醇酸还原异构酶、二羧酸脱水酶和转氨酶的基因连锁成基因簇; *ilvBN* 和编码酰基转移酶的基因连锁, 而 *ilvIH* 和编码亮氨酸合成相关基因 2-异丙基苹果酸合酶、3-异丙基苹果酸脱氢酶的基因连锁成基因簇。苏氨酸脱氨酶、乙酮醇酸还原异构酶、二羧酸脱水酶、转氨酶和酰基转移酶是 3 种支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)合成途径中必不可少的, 而 2-异丙基苹果酸合酶、3-异丙基苹果酸脱氢酶只参与了亮氨酸的合成, 所以从酶诱导的角度分析, *ilvBN* 和 *ilvGM* 应该参与了 3 种支链氨基酸的合成, 而 *ilvIH* 可能主要用于亮氨酸支路的合成调节(如增加其合成量)。本试验的结果表明 *ilvBN* 和 *ilvGM* 对除草剂具有抗性就可以导致克雷伯氏菌对除草剂产生抗性, *ilvIH* 对除草剂敏感并不影响菌株除草剂抗性的产生, 此结果也说明 *ilvBN* 和 *ilvGM* 在克雷伯氏菌中的生理功能和 *ilvIH* 是不一样的, 似乎要比 *ilvIH* 重要。

表 4 AHAS 抑制剂类除草剂对菌株 HR11 和 MGH 78578 AHAS 同工酶的抑制常数

Table 4 Inhibition effects of different AHAS-inhibitors to AHAS isoenzymes from strain HR11 and strain MGH 78578

<i>E. coli</i> BL21(DE3)		Inhibition constant $K^{appi}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )				
		Metsulfuron-methyl	Chlorsulfuron	Imazethapyr	Flumetsulam	Pyribenzoxim
<i>Klebsiella</i> sp. HR11	<i>ilvBN</i>	$(2.02 \pm 0.13) \times 10^{-3}$	$(1.48 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	$(2.53 \pm 0.11) \times 10^{-3}$	$(1.18 \pm 0.05) \times 10^{-3}$	$(6.35 \pm 0.12) \times 10^{-4}$
	<i>ilvGM</i>	$(1.74 \pm 0.18) \times 10^{-3}$	$(1.34 \pm 0.01) \times 10^{-3}$	$(1.88 \pm 0.29) \times 10^{-3}$	$(7.37 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	$(5.53 \pm 0.02) \times 10^{-4}$
	<i>ilvIH</i>	$(8.03 \pm 0.09) \times 10^{-5}$	$(6.51 \pm 0.07) \times 10^{-5}$	$(1.43 \pm 0.09) \times 10^{-4}$	$(7.39 \pm 0.10) \times 10^{-5}$	$(5.92 \pm 0.02) \times 10^{-5}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> MGH 78578	<i>ilvBN</i>	$(9.44 \pm 0.12) \times 10^{-5}$	$(7.53 \pm 0.04) \times 10^{-5}$	$(8.32 \pm 0.13) \times 10^{-5}$	$(4.97 \pm 0.12) \times 10^{-5}$	$(3.31 \pm 0.02) \times 10^{-5}$
	<i>ilvGM</i>	$(1.09 \pm 0.17) \times 10^{-4}$	$(7.69 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	$(9.72 \pm 0.08) \times 10^{-5}$	$(6.82 \pm 0.03) \times 10^{-5}$	$(5.54 \pm 0.02) \times 10^{-5}$
	<i>ilvIH</i>	$(8.41 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	$(6.76 \pm 0.02) \times 10^{-5}$	$(8.98 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	$(6.34 \pm 0.01) \times 10^{-5}$	$(6.05 \pm 0.07) \times 10^{-5}$
CK		$(8.93 \pm 0.03) \times 10^{-6}$	$(4.37 \pm 0.08) \times 10^{-6}$	$(1.12 \pm 0.08) \times 10^{-5}$	$(3.82 \pm 0.05) \times 10^{-6}$	$(3.30 \pm 0.11) \times 10^{-6}$

乙酰羟酸合酶对除草剂抗性产生机制一直是一个研究热点。Duggleby 等利用 X-射线衍射对酿酒酵母 AHAS 与氯磺隆共结晶进行了解析和建模<sup>[8]</sup>, 发现 AHAS 的反应中心呈“V”构型, 催化脱羧反应的 ThDP 从一个通道进入反应中心并通过  $Mg^{2+}$  固定于“V”构型的底部, 氯磺隆分子能与通道的氨基酸残基相结合, 插入并堵塞这一通道, 使 ThDP 不能进入反应中心导致 AHAS 失去催化活性。这一通道上的氨基酸残基突变使除草剂分子与通道的亲和力下降, 不能完全阻止 ThDP 和底物的进入, 导致 AHAS 抗性产生<sup>[17-19]</sup>。因此能够得到抗性基因, 获得不同的抗性突变位点的抗性 AHAS 基因资源是深入研究 AHAS 除草剂抗性产生机制的良好材料, 为转基因抗除草剂作物构建新的除草剂分子设计提供理论上的指导。目前国内外已经从抗性植物、酵母和细菌中获得了多个抗磺酰脲除草剂的乙酰羟酸合酶抗性突变体, 在拟南芥、酵母和大肠杆菌中已经鉴定的除草剂抗性突变位点有 G121(G116, G25)、A122(A117, A26)、M124(L119, M28)、V196(V191, V99)、K256(K251, K159)、M570(M582, M460)和 F578(F590, F468)等, 这些位点的突变导致的对磺酰脲类除草剂抗性提高 10~40 倍不等。在大肠杆菌中的除草剂抗性突变位点均是在 *ilvGM* 中发现的, 到目前为止已经发现有 20 余个位点发生突变后导致除草剂抗性产生, 而对 *ilvBN* 和 *ilvIH* 除草剂抗性突变方面的研究还未见报道。本实验从抗性菌株 HR11 中获得了 AHAS 抑制剂类除草剂具有广谱抗性的 *ilvBN* 和 *ilvGM*, 并将其氨基酸序列与敏感型的模式菌株 MGH 78578 的氨基酸序列相比对, 发现突变主要发生在 *ilvBN* 和 *ilvGM* 的大亚基上, 各有 8 个氨基酸位点的改变, 其中 HR11 *ilvBN* 的中间第 173、187、218、301 位为亲水氨基酸变为疏水氨基酸, 而两端的第 166、325、508 位为疏水氨基酸转变为亲水氨基酸。而 *ilvGM* 的第 176、339 位为疏水氨基酸转变为亲水氨基酸, 第 238、541 位为亲水氨基酸转为疏水氨基酸, 其余 4 个位点为同性氨基酸互相转变, 而在大肠杆菌 *ilvGM* 中对应的突变位点均未见报道。至于 *Klebsiella* sp. HR11 *ilvBN* 和 *ilvGM* 两个 AHAS 同工酶基因中哪些具体位点的改变导致了抗性的产生, 还需要定点突变进一步地验证。

## REFERENCES

- [1] Mendel S, Elkayam T, Sella C, *et al.* Acetohydroxyacid synthase: A proposed structure for regulatory subunits supported by evidence from mutagenesis. *J Mol Biol*, 2001, **307**: 465-477.
- [2] Lee YT, Duggleby RG. Mutations in the regulatory subunit of yeast acetohydroxyacid synthase affect its activation by MgATP. *J Biochem*, 2006, **395**: 331-336.
- [3] Duggleby RG, Pang SS. Acetohydroxyacid synthase. *J Biochem Mol Biol*, 2000, **33**(1): 1-36.
- [4] Xi Z, Niu CW, Li QX, *et al.* Studies on herbicide design through mutation on herbicidal target-acetohydroxyacid synthase (I). Enzyme kinetics of wild type and mutants of *E. coli* AHAS II. *Chin J Pestic Sci*, 2005, **7**(3): 215-220. 席真, 牛聪伟, 李庆霞, 等. 除草剂靶酶—AHAS 酶及基因突变体与除草剂设计(I). 野生型和突变型 *E. coli* AHAS II 酶动力学性质的系统研究. 农药学报, 2005, **7**(3): 215-220.
- [5] Xi Z, Niu CW, Ban SR, *et al.* Studies on herbicide design through mutation on herbicidal target—acetohydroxyacid synthase (II). Effects of mutagenesis at tryptophan 464 of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase II on herbicidal molecules. *Chin J Pestic Sci*, 2005, **7**(4): 311-315. 席真, 牛聪伟, 班树荣, 等. 除草剂靶酶—AHAS 酶及基因突变体与除草剂设计(II). AHAS 及 W464 突变酶与除草活性分子的相互作用. 农药学报, 2005, **7**(4): 311-315.
- [6] Hill CM, Pang SS, Duggleby RG. Purification of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and reconstitution of active enzyme from its individual pure subunits. *J Biochem*, 1997, **327**: 891-898.
- [7] Dung TL, Moon YY, Young TK, *et al.* Roles of conserved methionine residues in tobacco acetolactate synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **306**: 1075-1082.
- [8] Pang SS, Duggleby RG. Expression, purification, characterization, and reconstitution of the large and small subunits of yeast acetohydroxyacid synthase. *Biochemistry*, 1999, **38**: 5222-5231.
- [9] Hill CM, Duggleby RG. Mutagenesis of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and characterization of three herbicide-insensitive forms. *J Biochem*, 1998, **333**: 765-770.
- [10] Sun XF, Huang X, Chen B. Isolation of a metsulfuron-methyl-resistant bacteria and cloning and expression of the acetohydroxyacid synthase genes *ilvIH*. *Acta Microbiol Sin*, 2008, **48**(11): 1493-1498. 孙笑非, 黄星, 陈博. 抗甲磺隆假单胞菌的分离及其乙酰乳酸合酶的大小亚基 *ilvIH* 基因的克隆和表达. 微生物学报, 2008, **48**(11): 1493-1498.
- [11] Yu ZH, Niu CW, Ban SR. Study on structure-activity

- relationship of mutation-dependent herbicide resistance acetohydroxyacid synthase through 3D-QSAR. *Chin Sci Bull*, 2007, **52**(14): 1929–1941.
- 余志红, 牛聪伟, 班树荣. 乙酰羟酸合成酶 AHAS 突变引起分子抗性的构效关系研究. *科学通报*, 2007, **52**(14): 1929–1941.
- [12] Shen JJ, Huang X, He J, *et al.* Isolation of two bacterial strains resistant to acetohydroxyacid synthase (AHAS) inhibitor herbicides and cloning of AHAS genes *livIH*. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14**(5): 663–667.
- 沈晶晶, 黄星, 何健, 等. 两株抗乙酰羟酸合成酶类除草剂克雷伯氏菌的分离及其 AHAS 基因 *livIH* 的克隆. *应用与环境生物学报*, 2008, **14**(5): 663–667.
- [13] Sambrook J. Translated by Huang PT. *Molecular Cloning*. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 1999: 34–38.
- 萨姆布鲁克 J 著. 黄培堂译. *分子克隆*. 第三版. 北京: 科学出版社, 1999: 34–38.
- [14] Fan ZJ, Qian CF, Yu WQ, *et al.* Study on enzymatic inhibition of acetolactate synthase from Maize (*Zea mays* L.) by chlorsulfuron and tribenuron-methyl. *Sci Agri Sin*, 2003, **36**(2): 173–178.
- 范志金, 钱传范, 于维强, 等. 氯磺隆和苯磺隆对玉米乙酰乳酸合成酶抑制作用的研究. *中国农业科学*, 2003, **36**(2): 173–178.
- [15] Xie LX, Xu PL, Nie YF, *et al.* Construction of a Vector conferring herbicide and pest resistance in tobacco plant. *Chin J Biotech*, 2003, **5**: 545–550.
- 谢龙旭, 徐培林, 聂燕芳, 等. 抗草甘膦抗虫植物表达载体的构建及其转基因烟草的分析. *生物工程学报*, 2003, **5**: 545–550.
- [16] Wang JZ, Fan M. *Manual of Protein Skill*. Beijing: Science Press, 2000.
- 汪家政, 范明. *蛋白质技术手册*. 北京: 科学出版社, 2000.
- [17] Duggleby RG, Pang SS, Yu HQ, *et al.* Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. *Eur J Biochem*, 2003, **270**: 2895–2904.
- [18] Pang SS, Duggleby RG, Guddat LW. Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: A target for herbicidal inhibitors. *J Mol Biol*, 2002, **317**: 249–262.
- [19] Pang SS, Guddat LW, Duggleby RG. Molecular basis of sulfonyleurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. *J Biochem*, 2003, **278**(9): 7639–7644.

### 中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中科院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 具有北京市工商局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学、菌物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)、Abstracts of Mycology (美国“菌物学文摘”)、Index of Fungi (英国“菌物索引”)、Review of Plant Pathology (英国“植物病理学文摘”)、Bibliography of Systematic Mycology (英国“系统菌物学文献目录”)、Bibliographie der Pflanzenschutz literature(德国“植物保护文献目录”)、《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如果您有刊登广告的需要, 欢迎与我们联系或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请通过新地址汇款(收款单位: 中国科学院微生物研究所, 开户银行: 中国工商银行北京分行海淀镇支行, 帐号: 0200004509089117425)。

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521 电子邮箱: gg@im.ac.cn 联系人: 武文 王闯

网址: <http://journals.im.ac.cn>