

# 重组生防菌 308R (pKSH) 的遗传稳定性研究\*

李艳琴 白艳 申泉

(山西大学生物技术研究所化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

**摘要:** 工程菌 308R (pKSH) 携带有梨火疫欧文氏杆菌的 *hrpN* 基因, 能产生并分泌诱导植物抗病性蛋白-Harpin。该工程菌在无选择压培养基中生长 50 代, 带有重组质粒 pKSH 的细胞占总菌量的 23.1%, 对照菌 308R (pCPP430) 的细胞占 4.75%。将工程菌和对照菌喷雾到番茄叶面, 保湿条件下的 13d 内, 叶面菌量维持在  $10^5$  cfu/cm<sup>2</sup> 以上, 自然条件下的 5d 内, 菌量维持在  $10^4$  cfu/cm<sup>2</sup> 以上, 其间 308R (pKSH) 的稳定性一直高于对照菌。因此证明工程菌 308R (pKSH) 比对照菌 308R (pCPP430) 稳定性有所提高, 但还是不够理想。讨论了该工程菌不稳定的原因以及改进途径。

**关键词:** 308R (pKSH), 308R (pCPP430), 遗传稳定性

**中图分类号:** Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0050-04

## Genetic Stability of a Recombinant Biocontrol Bacteria 308R (pKSH)\*

LI Yan-Qin BAI Yan SHEN Quan

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan, 030006)

**Abstract:** Biocontrol bacteria 308R (pKSH) with *hrpN* of *Erwinia amylovora*. It can secrete the Harpin protein which can induce plant resistance. After successive growth in antibiotic-free LB medium for 50 generations, only 23.1% of the cell still retained the plasmid pKSH, in comparison with 4.75% of the cosmid pCPP430. Sprayed onto the leaves of tomato, the recombinant strain maintained a population density of over  $10^5$  cfu/cm<sup>2</sup> when kept under high humidity in thirteen days, but if without humidity, the strain keep  $10^4$  cfu/cm<sup>2</sup> over in five days. On the tomato leaves, the stability of the recombinant strain 308R (pKSH) was higher than the strain 308R (pCPP430). The experiment indicated that the recombinant strain 308R (pKSH) had higher stability compared with the strain 308R (pCPP430), but that was not enough. In this paper reasons for unstability and strategies for improving were discussed for the recombinant strain.

**Key words:** 308R (pKSH), 308R (pCPP430), Genetic stability

植物对病原侵染形成的过敏反应是植物本身的一种主动反应, 是自然界中植物抵抗病原侵染的最有效方式。植物病原细菌产生的 Harpin 蛋白是一类能够引起植物过敏反应、并诱导其获得系统抗性的激发子<sup>[1]</sup>。研究表明, Harpin 蛋白和产 Harpin 的工程菌均能引起烟草、辣椒、番茄、黄瓜、玉米、小麦等多种病害的抗性<sup>[2,3]</sup>, 对采摘后果实的保鲜和防腐具有一定的效果<sup>[4]</sup>。本实验室将带有梨火疫欧文氏杆菌 *hrp* 基因簇的粘粒 pCPP430 转入成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*) 308R 中, 构建了一株既能与病原菌竞争、拮抗又能产生诱导植物抗性蛋白 Harpin 的生防菌 308R (pCPP430)<sup>[5]</sup>。由于

\* 山西省自然科学基金资助项目 (No. 20021080)

山西省科技攻关计划项目 (No. 2006031047)

通讯作者 Tel: 03517016679, Fax: 03517011499, E-mail: yanqin@sxu.edu.cn

收稿日期: 2005-12-19, 修回日期: 2006-03-16

pCPP430 质粒过大(约 50kb),使其在工程菌中的遗传不稳定<sup>[6]</sup>。针对这一问题,我们构建了通过 II 型机制分泌 Harpin 的载体 pKSH (6.3 kb),首先在梨火疫欧文氏杆菌的 *hrpN* 基因前连上金黄色葡萄球菌的信号肽及 ZZ 片段序列,然后将其插入 pKK233-2 的 *trc* 启动子后,转入 308R 中,获得融合表达、分泌 Harpin 的工程菌 308R (pKSH)。试图通过缩小质粒达到稳定工程菌的目的。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒: 308R 为本实验室分离的成团泛菌抗利福霉素 (Rm) 突变株; 粘粒 pCPP430 带有梨火疫欧文氏杆菌 *hrp* 基因簇和壮观霉素 (Sp) 抗性标记, 由美国康乃尔大学 Beer 教授提供; 质粒 pKSH 由本实验室构建, 带有金黄色葡萄球菌 SZZ 片段序列和梨火疫欧文氏杆菌 *hrpN* 基因, 具有氨苄青霉素 (Amp) 抗性标记。

1.1.2 培养基与试剂: LB 固体、液体培养基; 5mmol/L 磷酸缓冲液 (pH6.5) 用于悬浮细菌。

1.1.3 植物材料: 苗龄约 100d 的番茄植株。

### 1.2 实验方 法

1.2.1 人工培养基中的遗传稳定性测定: 将工程菌 308R (pKSH) 和对照菌 308R (pCPP430) 分别接种于无抗性液体培养基中, 28℃ 震荡培养。每 24h 转接 1 次, 接种量 2%, 隔天分别用无抗性和抗性平板进行菌落计数, 无抗性平板计数结果为总菌量, 抗性平板计数结果为带质粒的菌量, 计算带有质粒菌占总菌量的百分数作为质粒稳定性指标。根据测定, 每 24h 约生长 10 个世代。

1.2.2 质粒检测: 无选择压培养基中生长 160 代, 用碱裂解法对仍保持抗性标记和失去抗性标记的菌分别提取质粒, 并用 *Hind* III 和 *Taq* I 限制性内切酶消化, 经琼脂糖凝胶电泳, 观察质粒的物理图谱。

1.2.3 植物叶面定殖能力及遗传稳定性: 将菌株 308R (pCPP430) 和 308R (pKSH) 分别接种于相应抗性培养基中, 28℃ 震荡培养。当  $OD_{600}$  约为 1.0 左右时, 离心收集菌体。用磷酸缓冲液重新悬浮菌体, 将菌悬液均匀喷雾到番茄叶面上。用直径 1cm 打孔器取一叶碟, 放于盛有 100mL 无菌生理盐水的三角瓶中, 将三角瓶放于超声波清洗机中, 处理 3min, 以洗下叶碟表面的工程菌, 然后倍比稀释, 分别用无抗性和抗性平板进行菌落计数。将喷菌的叶片一部分套上透明塑料袋保湿, 另一部分不套袋, 每隔 24h 分别从套袋与不套袋的叶片上取一个叶碟用同样的方法处理并计数。

## 2 实验结果

### 2.1 人工培养基上的遗传稳定性

无选择压液体培养基中的传代实验表明: 生长 50 代, 带有 pCPP430 质粒的菌占总菌量的 4.75%, 带有 pKSH 质粒的菌占总菌量的 23.1%; 生长 90 代, 308R (pCPP430) 几乎检测不到, 308R (pKSH) 仍有 4.95% (图 1)。

### 2.2 质粒检测

工程菌繁殖 160 代以后, 失去 Amp 抗性的细菌提取不到质粒, 而仍然维持 Amp 抗

性的细菌可以提取到与出发菌株相同大小的质粒，且酶切图谱与出发菌株完全相同(图2)。

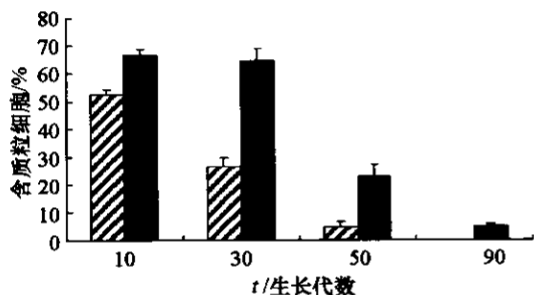


图1 工程菌在人工培养基中的遗传稳定性  
▨ 308R (pCPP430), ■ 308R (pKSH)

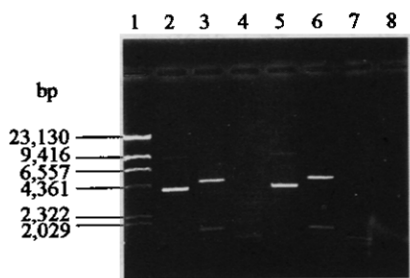


图2 工程菌生长160代后质粒的物理图谱  
1  $\lambda$ DNA/*Hind*Ⅲ, 2 出发菌的pKSH, 3-4 2的*Hind*Ⅲ和*Taq*I酶切, 5 生长160代工程菌的pKSH, 6-7 5的*Hind*Ⅲ和*Taq*I酶切, 8 生长160代失去抗性标记菌株的提取质粒

### 2.3 工程菌在番茄叶面的定殖状况

工程菌喷雾番茄叶面后, 13d的实验期内, 在套袋保湿条件下, 菌量一直维持在 $10^5$ cfu/cm<sup>2</sup>以上; 未保湿的自然条件下, 5d内, 菌量维持在 $10^4$ cfu/cm<sup>2</sup>以上, 第7d菌量急剧下降, 已基本检测不到(图3)

### 2.4 工程菌在番茄叶面的遗传稳定性

在番茄叶面上, 自然条件下, 308R (pKSH) 的稳定性一直高于对照菌(图4)。

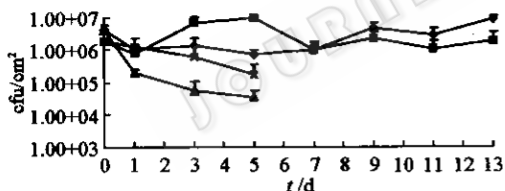


图3 工程菌在番茄叶面的定殖

◆ 保湿 308R (pCPP430), ■ 保湿 308R (pKSH),  
▲ 未保湿 308R (pCPP430), ✕ 未保湿 308R (pKSH)

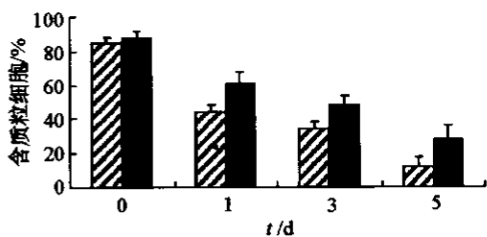


图4 自然条件下工程菌在番茄叶面的稳定性  
▨ 308R (pCPP430), ■ 308R (pKSH)

## 3 讨论

工程菌中质粒的稳定性对于有效发挥工程菌的作用及大规模发酵和产物制备至关重要, 因而受到广泛的重视。质粒大小是影响稳定性的因素之一, 质粒 pKSH 比 pCPP430 小 40kb 左右, 稳定性有所提高, 但还是不够理想。

依据重组质粒的变化本质, 可将其不稳定性分为两种类型, 一种是因质粒在细胞分裂时的缺陷分配导致整个质粒丢失而引起, 称为“分配性不稳定”; 另一种是因重组质粒 DNA 的缺失、插入或重排而引起, 称为“结构不稳定”<sup>[7]</sup>。通过对工程菌 308R (pKSH) 进行质粒的抽提检测和酶切物理图谱的验证, 证实多次传代后其物理结构未发生变化, 而失去抗性标记的菌株提不到质粒, 因此属于分配不稳定。

据报道, 广宿主质粒 RK2 上的 *parDE* 片段是通过控制质粒在子细胞中分配的途径

来保证质粒的遗传稳定性<sup>[8]</sup>，我们的工作证明 *parDE* 片段能够提高质粒的遗传稳定性<sup>[9]</sup>。我们将 *parDE* 片段重组到 pCPP430 上，构建成重组质粒 pRTnp，比较 308R (pRTnp) 与 308R (pKSH) 的稳定性。实验表明，308R (pRTnp) 在人工培养基中生长 50 代，带有质粒的菌 93.1%；生长 130 代，带有质粒的菌仍有 70%；在番茄叶面上，自然条件下，第 7d，带有质粒的菌 77.5%；套袋保湿的条件下，第 13d，带有质粒的菌 80%。由此可见，将 *parDE* 片段重组到质粒 pKSH 上或将 *hrpN* 基因通过转座方式或同源重组插入宿主菌染色体上，可进一步提高工程菌的遗传稳定性。另外，工程菌在番茄叶面的定殖能力实验提示，工程菌在湿度高或大棚内的条件下，效果会更好。

### 参 考 文 献

- [1] Wei Z M, Laby R J, Zurhoff C H. *et al.* Science, 1992, 257: 85 ~ 88.
- [2] 赵立平, 梁元存, 刘爱新, 等. 高技术通讯, 1997, 7 (9): 1 ~ 4.
- [3] 徐进平, 孟小林, 王 健, 等. 中国病毒学, 2003, 18 (6): 607 ~ 610.
- [4] 葛永红, 李 轩, 李 梅, 等. 甘肃农业大学学报, 2004, 2 (1): 22 ~ 24.
- [5] 赵立平, 申 泉, 李艳琴, 等. 植物病理学报, 1999, 29 (2): 142 ~ 146.
- [6] 李艳琴, 宁红秀, 赵立平, 等. 微生物学通报, 1999, 26 (6): 400 ~ 403.
- [7] 李永红, 王二力, 俞俊荣. 生物工程学报, 1988, 4 (2): 81 ~ 86.
- [8] Martin G, Otto H, Helmut S. Journal of Bacteriology, 1990, 172 (11): 6194 ~ 6203.
- [9] 赵立平, 张 丽, 李艳琴, 等. 中国生物防治, 1999, 15 (2): 49 ~ 53.