

## 组成型表达 *chi* 基因的 Bt 工程菌株构建及其特性

李蓬飞<sup>1</sup> 罗洋<sup>1</sup> 谢池楚<sup>1</sup> 蔡峻<sup>1,2</sup> 边强<sup>3\*</sup> 陈月华<sup>1,2\*</sup>

(1. 南开大学 生命科学学院 微生物学系 天津 300071)

(2. 南开大学 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

(3. 南开大学 农药国家工程研究中心 天津 300071)

**摘要:**【目的】通过构建能够组成型高效表达几丁质酶的苏云金芽胞杆菌工程菌株,以提高其抑真菌活性。【方法】首先通过 PCR 扩增获得 Bti75 菌株 *chiB* 全长及系列缺失启动子片段,与本室构建的启动子探测型载体 pCB 连接,转化 Bti75 菌株,通过  $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测及  $\beta$ -半乳糖苷酶 mRNA 的 Real time-PCR 检测,确定了一段长度为 190 bp 的组成型高效表达启动子。将这一启动子分别与 Bti75 自身几丁质酶基因 *chiA* 以及地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)的几丁质酶基因 *chiMY* 连接构建了组成型高效表达的工程菌株 Bti75(pDA)和 Bti75(pDM)。应用几丁质酶酶活检测、SDS-PAGE 及酶谱分析检测了工程菌几丁质酶的表达情况。最后,通过检测工程菌发酵粗酶液对真菌孢子萌发和菌丝生长的影响,评估了工程菌对 3 种植物病原真菌的抗真菌活性。【结果】在没有诱导物存在的情况下, Bti75(pBP $\Delta$ 7)菌株表达的  $\beta$ -半乳糖苷酶酶活和  $\beta$ -半乳糖苷酶 mRNA 的转录量分别是 Bti75(pBP)菌株的 7 倍和 2.5 倍左右。在没有几丁质诱导的情况下,与野生株 Bti75 相比,工程菌株 Bti75(pDA)和 Bti75(pDM)的几丁质酶活性均提高了 3.5 倍左右。SDS-PAGE 及酶谱分析证明目的几丁质酶在非诱导条件下达到组成型高效表达,抑真菌实验显示工程菌 Bti75(pDA)和 Bti75(pDM)抑制 3 种植物病原真菌的活性明显提高。【结论】发现 190 bp 的缺失启动子能够组成型高效表达不同来源的几丁质酶,无需诱导物的诱导,工程菌株就能展现良好的抗真菌能力。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌, 几丁质酶, 缺失启动子, 组成型表达, 抑真菌活性

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA10A203); 国家自然科学基金项目(No. 31371979); 教育部博士点基金项目(No. 20120031110019); 天津市自然科学基金项目(No. 12JCYBJC198000)

\*通讯作者: Tel: 86-22-23505964

✉: 边强: bianqiang@nankai.edu.cn; 陈月华: yhchen@nankai.edu.cn

收稿日期: 2013-08-20; 接受日期: 2013-11-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-11-26

# Construction and characteristic of a constitutive expression *chi* of engineered Bt strains

LI Peng-Fei<sup>1</sup> LUO Yang<sup>1</sup> XIE Chi-Chu<sup>1</sup> CAI Jun<sup>1,2</sup> BIAN Qiang<sup>3\*</sup> CHEN Yue-Hua<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(2. Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(3. National Pesticide Engineering Research Center, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract: [Objective]** We constructed Bti engineering strains that can highly express chitinase genes constitutively, so that the strains can inhibit the growth of fungi more effectively. **[Methods]** The full length and series of deletion promoter fragments of chitinase gene *chiB* from *Bacillus thuringiensis* were cloned into a shuttle promoter-probe vector pCB, and all of the constructed plasmids were transformed into Bti75 strains. A 190 bp-length high constitutive expression promoter was identified based on the results of  $\beta$ -galactosidase activity and real time-PCR. By using this promoter, we constructed Bti75 engineering strains that express chitinase gene *chiMY* of *Bacillus licheniformis* and *chiA* gene of Bti75 itself. SDS-PAGE and zymogram analysis were used to examine chitinase expression. In order to evaluate the antifungal activity assay of engineering strains against 3 plant pathogenic fungi, mycelium growth and spore germination inhibition assay were done. **[Results]** Without induction,  $\beta$ -galactosidase activity and mRNA contents of  $\beta$ -galactosidase of Bti75(pBP $\Delta$ 7) was about 7-fold and 2.5-fold high than that in Bti75(pBP), respectively. Without chitin induction, the chitinase activity of Bti75(pDA) and Bti75(pDM) was up to 3.5-fold higher compared with the parent strain. The results of SDS-PAGE and zymogram analysis confirmed that chitinase could be highly expressed in engineered strains. The results of antifungal activity assay indicated that the two engineered strains achieved a significant improvement in inhibiting three plant pathogenic fungi species. **[Conclusion]** The 190 bp deletion mutant promoter could drive the expression of different chitinase genes constitutively and efficiently. Without induction, the two engineered strains with the deletion promoter exhibited high antifungal activity.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, Chitinase, Deletion mutant promoter, Constitutive expression, Antifungal activity

几丁质是含量仅次于纤维素的生物高分子物质,是真菌、甲壳类动物、昆虫等生物细胞的重要结构物质,也是昆虫中肠围食膜的重要成分<sup>[1]</sup>。因此,几丁质酶广泛用于生物防治,一直被认为是植物抗真菌病害的潜在物质<sup>[2]</sup>。更有许多文章报道几丁质酶对苏云金芽胞杆菌的杀虫活性具有增效作用<sup>[3-5]</sup>。许多微生物都能产几丁质酶,但只有部分在实际中被应用,主要原因是许多菌株的产酶能力太低,且大部分几丁质酶是诱导酶,如果环境中没有诱导物存在,细胞中的调控机制会关闭合成酶的相关基因。国内外学者为提高微生物产几丁质酶的能力和产酶水平做了多方面的尝试,采用各种方法进行诱变育种,如利用紫外线、乙基甲磺酸、亚硝基胍<sup>[6]</sup>、低能氮离子束注入<sup>[7]</sup>等手段处理,获得具

有较高活性几丁质酶变异株是最为普遍使用的方法。近年来,也有利用定向进化策略提高几丁质酶活性的报道,如 Fan 等<sup>[8]</sup>利用 DNA 改组技术构建球胞芽胞杆菌几丁质酶基因在大肠杆菌中的突变库,获得了酶活分别提高 36%和 56%的菌株; Lee 等<sup>[9]</sup>利用截断模板重组延伸技术将粘质沙雷氏菌和液化沙雷氏菌的两个同源性几丁质酶基因进行重组,筛选得到的几丁质酶,其活性分别比两个亲本菌株提高 5.2 倍和 1.3 倍。诱变育种毕竟是一个费时费力的过程,带有很大的盲目性。诱变导致酶产量提高的分子机理也并不清楚。张爱玲等<sup>[10]</sup>利用鸟枪法分离得到枯草芽胞杆菌 168 菌株的 103 个基因启动子片段,发现一个 672 bp 的启动子片段能高效表达目的基因,经测序后分析发现,该启

动子片段是随机连接构成的一个融合基因。因此, 该方法也具有一定的盲目性, 操作起来也很繁琐。本实验室对芽胞杆菌几丁质酶基因 *chiA* 表达调控的顺式作用元件的研究表明<sup>[11]</sup>, 一段长 16 bp 的操纵区序列是应答几丁质诱导的负调控位点。在不破坏核心启动子的情况下, 破坏或缺失负调控位点, *chiA* 基因会在没有诱导物存在的条件下高效表达。因此, 通过删除启动子中负调控序列即基因的操纵区域, 构建去阻遏的高效启动子的方法, 定向提高几丁质酶活性将是最为直接和有效的方法。本研究对 Bti75 菌株 *chiB* 基因启动子序列中的操纵区进

行定向缺失突变, 得到了一个 190 bp 的缺失启动子片段 *chiBpΔ7*, 利用该启动子构建的 Bt 工程菌株, 其酶活性提高了 3.5 倍左右, 使抑制真菌的能力显著提高。本文首次报道该研究结果, 有助于提高对芽胞杆菌几丁质酶基因表达调控规律的认识, 并为使用分子生物学手段有的放矢地进行芽胞杆菌分子育种提供范例。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究中所用的全部细菌、真菌菌株和质粒见表 1。

表 1 实验所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Relevant features	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i>	Lab collection
Bti75	No β-galactosidase activity	Lab collection
<i>Bacillus licheniformis</i> MY75		Lab collection
<i>Phytophthora capsici</i>		Lab collection
<i>Fusarium graminearum</i>		Lab collection
<i>Rhizoctonia solani</i>		Lab collection
Bti75(pBPΔ7)		This study
Bti75(pBP)		This study
Bti75(pDA)		This study
Bti75(pDM)		This study
Plasmids		
pMD19-T	Cloning vector, 2.7 kb, Ap <sup>R</sup>	TaKaRa
pCB	Promoter probe vector with the <i>bgaB</i> gene as reporter; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	Lab collection
pBP	pCB with the fragment <i>chiBp</i> containing the wild type promoter of <i>chiB</i> was cloned into the <i>Bam</i> H I- <i>Sal</i> I site; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study
pBPΔ1	pCB with the fragment <i>chiBp</i> truncated 130 bp from 5'-end; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study
pBPΔ2	pCB with the fragment <i>chiBp</i> truncated 180 bp from 5'-end; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study
pBPΔ3	pCB with the fragment <i>chiBp</i> truncated 251 bp from 5'-end; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study
pBPΔ4	pCB with the fragment <i>chiBp</i> truncated 222 bp from 3'-end; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study
pBPΔ5	pCB with the fragment <i>chiBp</i> truncated 229 bp from 3'-end; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study
pBPΔ6	pCB with the fragment <i>chiBp</i> truncated 236 bp from 3'-end; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study
pBPΔ7	pCB with the fragment containing the DNA sequence of the <i>chiB</i> gene from 324 bp to 135 bp upstream of the translation start site was cloned into the <i>Bam</i> H I- <i>Sal</i> I site; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study
pDA	pCB- <i>chiBp</i> Δ7 with <i>chiB</i> ORF from Bti75 in the <i>Sal</i> I- <i>Sph</i> I site; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study
pDM	pCB- <i>chiBp</i> Δ7 with <i>chiMY</i> ORF from MY75 in the <i>Sal</i> I- <i>Sph</i> I site; Ap <sup>R</sup> and Er <sup>R</sup>	This study

**1.1.2 培养基和培养条件:** LB 培养基用于培养 *E. coli* 及活化 Bti75 菌株。PDA 培养基用于真菌培养。基础培养基(简称 M, g/L):  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  18.27,  $KH_2PO_4$  5.99,  $(NH_4)_2SO_4$  1.98,  $Na_3C_6H_5O_2 \cdot 3H_2O$  1.00,  $MgSO_4$  0.25, 蛋白胨 10.00, pH 7.2–7.4; 几丁质诱导培养基(简称 C): 在 M 中加入 1% 几丁质粉。*E. coli* 在 37 °C 培养, Bti75 在 30 °C 培养。抗生素使用浓度: 氨苄青霉素 100 mg/L, 红霉素 50 mg/L。复性缓冲液: 50 mmol/L 乙酸钠, pH 5.0。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 所有分子生物学工具酶和实时荧光定量 PCR 试剂均购自 TaKaRa (大连) 公司; 酶谱分析用试剂均购自 Sigma 公司; 其余生化试剂为国产分析纯。

**主要仪器:** 蛋白核酸测定仪, 基因脉冲导入仪, 凝胶成像仪, Bio-Red 公司; MJ Research PCR 仪, Gene 公司; StepOne 实时荧光定量 PCR 仪, ABI 公司。

## 1.2 DNA 操作

*E. coli* 质粒提取参照上海 Sangon 公司质粒提取试剂盒说明书。*E. coli* 转化采用  $CaCl_2$  法<sup>[12]</sup>。Bti75 转化采用电穿孔转化法<sup>[13]</sup>。

## 1.3 *chiB* 野生型和缺失启动子片段的获得及其功能验证

根据 *B. thuringiensis* HD-789 *chiB* 基因上游调控序列(CP003763.1), 设计多对引物用于扩增 Bti75 *chiB* 基因野生型和缺失启动子序列。引物 *chiBp-F*、*chiBp-R* 用于扩增野生型全长启动子片段 *chiBp*。一系列缺失引物分别在 *chiB* 基因上游调控序列 3' 及 5' 端设计, 与另一端的全长启动子扩增引物匹配扩增。实验用全部引物列于表 2。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; Touchdown 小程序(94 °C 40 s, 46 °C 45 s, 72 °C 35 s, 每次循环退火温度降低 1 °C, 共 5 个循环); 94 °C 35 s, 50 °C 40 s, 72 °C 35 s, 26 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物回收并通过 TA 克隆与 pMD19-T 连接, 进行序列测定。

将扩增正确的 *chiBp* 及 7 条缺失启动子片断, 利用 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别双酶切后, 与经过同样酶

切的表达载体 pCB 连接, 构建一系列重组质粒, 随后转化 Bti75 菌株, 获得的一系列转化子分别在 M 和 C 培养基中培养后, 测定菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性, 以此确认启动子片段的功能。

## 1.4 $\beta$ -半乳糖苷酶活力测定

含有 *bgaB* 报告基因的 Bti75 转化子菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶活力测定方法参见参考文献[11]。1 个酶活单位定义为 55 °C 条件下, 1 min 变化 1 个  $OD_{420}$  值所需要的酶量。

## 1.5 RNA 的提取及 cDNA 合成

取在 M 培养基中振荡培养 7 h 的 Bti75(pBP $\Delta$ 7) 和 Bti75(pBP) 菌株, 用 RNAiso Plus 试剂盒提取其总 RNA, 具体方法参见说明书。cDNA 合成参见说明书, 反应体系为 20  $\mu$ L, 每个反应中所用的总 RNA 量保持一致为 900 ng。每个反应重复 3 次。反转录反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。所得 cDNA 储存在 -80 °C 待用。

## 1.6 实时荧光定量 PCR 及扩增效率一致性检测

应用 ABI 公司 StepOne 自动荧光定量 PCR 仪, 荧光标记选用 SYBR Green。引物设计选用软件 Primer Express 3.0 (ABI)。目的基因 *bgaB* 和内参基因 *16sRNA* 的引物序列见表 2。反应体系及条件参见说明书。由于本实验中定量 PCR 采用比较  $C_t$  法的相对定量策略, 因此必须首先证实 *bgaB* 和 *16sRNA* 基因的扩增效率一致<sup>[14]</sup>。将提取的 RNA 逆转录成的 cDNA 进行倍比稀释, 稀释倍数从  $10^0$  至  $10^4$ , 并以此为模板, 经实时定量 PCR 检测两者的扩增效率是否一致。

## 1.7 几丁质酶基因克隆及其工程菌株构建

分别提取 Bti75 和地衣芽孢杆菌 MY75 的总 DNA, 以各自总 DNA 为模板, PCR 扩增几丁质酶结构基因 *chiA* 和 *chiMY*, 引物序列见表 2。将得到的基因片段通过 *Sal* I-*Sph* I 酶切替换 pBP $\Delta$ 7 质粒上的 *bgaB* 基因。将连接产物转化进大肠杆菌, 转化子经 PCR 及酶切鉴定后, 所得到的正确重组质粒分别命名为 pDA (携带 *chiA* 基因 ORF) 和 pDM (携带 *chiMY* 基因 ORF)。然后, 将 2 个重组质粒分

表 2 本研究所用引物  
Table 2 Primers for gene amplification

Primers	Sequences (5'→3')	Purpose
<i>chiBp</i> -F	GACTGGATCCTTCTAAGTTCTGGAG ( <i>Bam</i> H I)	扩增 <i>chiB</i> 启动子
<i>chiBp</i> -R	TAAGGTCGACTGAATCTGCTAATGC ( <i>Sal</i> I)	
<i>chiBp<sub>up-374</sub></i> -F	TATAGGATCCACACTATTCCTCC ( <i>Bam</i> H I)	扩增系列缺失启动子
<i>chiBp<sub>up-324</sub></i> -F	GCATGGATCCCTTATCTTTCTACG ( <i>Bam</i> H I)	
<i>chiBp<sub>up-253</sub></i> -F	TTTAGGATCCTCCTCCCATACCGA ( <i>Bam</i> H I)	
<i>chiBp<sub>down-135</sub></i> -R	GTCCGTCGACTAAATCGTAAACAAAT ( <i>Sal</i> I)	
<i>chiBp<sub>down-128</sub></i> -R	GAGTGTCGACGGGTGATTAATCGT ( <i>Sal</i> I)	
<i>chiBp<sub>down-121</sub></i> -R	ATTTGTCGACGAGCTGGGGTGAT ( <i>Sal</i> I)	
<i>chiMY</i> -F	AAATGTCGACTAAGGAGGAAAAATAGATGAACATCGT ( <i>Sal</i> I)	扩增 <i>chiMY</i> 基因
<i>chiMY</i> -R	GGGTGCATGCTACTCAGACTCCTT ( <i>Sph</i> I)	
<i>chiA</i> -F	GGGGTCGACTAATTAATTAAGGAGTGTGATATG ( <i>Sal</i> I)	扩增 <i>chiA</i> 基因
<i>chiA</i> -R	GGGGCATGCTAAATCGTGGTATTGGGAC ( <i>Sph</i> I)	
<i>16sRNA</i> -F	CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAA	实时荧光定量 PCR 内参
<i>16sRNA</i> -R	AACTGAATGCTGGCAACTAAGATCA	
<i>bgaB</i> -F	TCACATGTTAACTGGCGCGATA	报告基因克隆
<i>bgaB</i> -R	ACCACGGGCAATAGTTGCATAA	

别电转化进 Bti75 菌株中。随后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 以检测克隆基因的表达。

### 1.8 工程菌株特异表达蛋白检测及酶谱分析

将构建的 Bti75(pDA)、Bti75(pDM)工程菌株在 LB 培养基中活化 12 h 后按 1%量转接培养基 M, 30 °C、200 r/min 振荡培养 72 h。取菌体培养上清液, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 具体方法参照文献[15]。同时, 为进一步证明特异表达的蛋白条带确实是几丁质酶, 分别对两种几丁质粗酶样品进行酶谱分析, 其方法与 SDS-PAGE 电泳方法相似, 在凝胶中加入 0.01%的可溶性乙二醇几丁质 (Glycol chitosan, Sigma)作为几丁质酶底物。电泳完成后, 将胶放入含有 0.1%的 Triton X-100 的复性缓冲液中复性 18 h, 复性后的酶便可以降解胶内底物形成降解条带, 然后用荧光染料 (Fluorescent Brighter 28, Sigma)染色, 紫外灯下观察结果。详细方法参照文献[16]。

### 1.9 工程菌几丁质酶活力测定

将 Bti75 工程菌参照 1.8 的方法培养。酶活力测定参照文献[17]。

### 1.10 工程菌粗蛋白的制备

将 Bti75 工程菌参照 1.8 的方法培养。离心后收集上清, 冷冻干燥制成干粉。将干粉溶于磷酸缓冲液, 制备成所需浓度的几丁质酶粗酶溶液。

### 1.11 工程菌抑制真菌菌丝生长

采用平板菌丝生长速率法检测<sup>[18]</sup>。按照 1.10 方法制备各菌株的粗酶溶液, 调整到所需浓度, 取该溶液 4 mL, 与 16 mL PDA 培养基混合均匀, 制成含菌液平板。设等体积的磷酸缓冲液作对照。用打孔器取 3 种病原真菌的菌饼, 菌丝朝下接种于含菌液 PDA 平板上, 每一平板放置两个菌饼重复。将平板置 26 °C 恒温光照培养 2 d 后观察。为确定工程菌株的抑真菌效果来自于表达量的提高, 以 Bti75 为对照, 将 Bti75(pDA)和 Bti75(pDM)的几丁

质酶粗酶液调整到酶活力一致,检测菌丝生长速率是否一致。

### 1.12 工程菌抑制真菌孢子萌发

利用杯碟法<sup>[3,19]</sup>。在 PDA 平板上放置 2 个无菌牛津杯,在牛津杯中依次加入 50  $\mu$ L 浓度分别为  $10^4$ 、 $10^3$  CFU/mL 的真菌孢子悬液和 150  $\mu$ L Bti75 工程菌粗蛋白,设磷酸缓冲液对照。将平板置于 28  $^{\circ}$ C 培养 3–5 d 后观察抑菌效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 组成型高效表达启动子缺失片段的获得及验证

按照图 1A 中的缺失策略,PCR 扩增获得全长启动子及 7 个系列缺失启动子片段。将这些扩增片段连接启动子探测型载体 pCB,构建的系列重组质粒名称见图 1。pCB 上带有无启动子的  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 *bgA*B 作为报告基因,故插入任一有功能的启动子,则可以在芽胞杆菌细胞中表达出  $\beta$ -半乳糖苷酶。将一系列重组质粒转化至 Bti75 菌株,

获得的转化子分别在 M 和 C 培养基中培养后,测定各菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性,结果见图 1B。

实验中将 606 bp 的全长启动子片段 *chiBp* 作为野生型对照,见图 1B 最上方。对照菌株属于诱导型表达,诱导培养的酶活性是不诱导的 3 倍。而 7 条缺失启动子片段中有 5 条引起报告基因表达类型及表达量的明显变化。从左侧 5'端缺失的 3 个片段全部为诱导型表达,但缺失至 -253 位时明显影响了启动子活性;而从右侧 3'端缺失的 3 个片段全部为组成型表达,既无论诱导与否,酶的表达式几乎相同。由图 1 可见,缺失至 -135 位时  $\beta$ -半乳糖苷酶活性最高,在基本培养基中,酶活超过 7 U/mL,约是野生型启动子不诱导时的 7 倍,诱导时的 1.4 倍。为了验证上述缺失片段的结果,进一步分别从两端缺失获得仅为 190 bp 的片段(*chiBp* $\Delta$ 7),其酶活与缺失至 3'-135 位片段(*chiBp* $\Delta$ 4)相同。测定结果证明,从 5'缺失至 -324 位和 3'缺失至 -135 位的 *chiBp* $\Delta$ 7 片段可以作为组成型高效表达启动子。

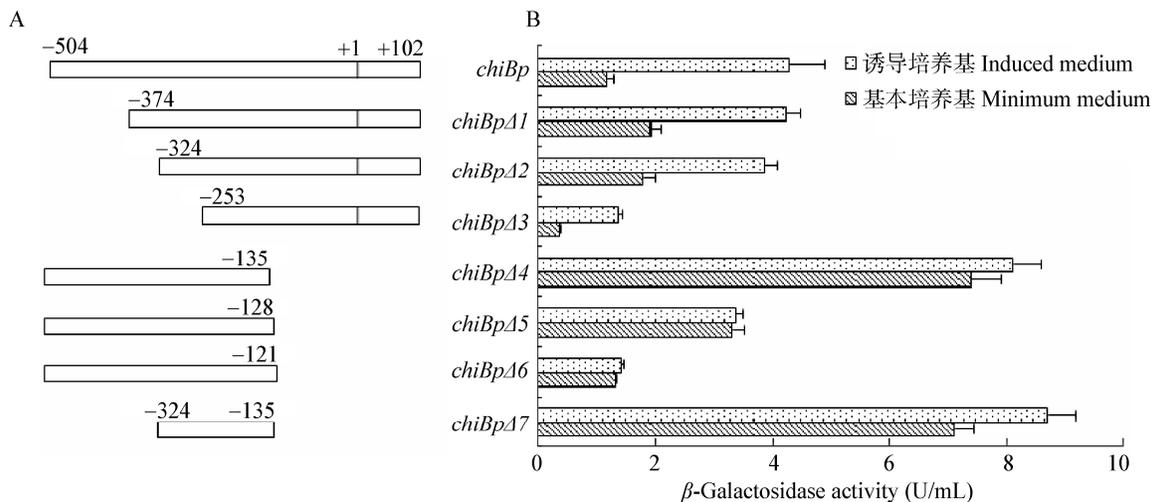


图 1 启动子缺失策略及所构建的缺失突变子的酶活性和表达类型检测

Figure 1 The strategy of deletion analysis of promoter and the enzyme activity and the type of expression of constructed plasmid in Bti75 strain

注: A: 不同启动子片段缺失策略(+1 为翻译起始位点); B: 含有图 A 中全长及缺失启动子片段的质粒在 Bt 菌株中  $\beta$ -半乳糖苷酶活性及表达类型。

Note: A: Diagrams of deletions of *chiBp* (translation start site indicated as +1); B: Histogram showing the results of quantitative  $\beta$ -galactosidase assays of Bti75 strains containing plasmids referring to the deletions shown in A.

## 2.2 报告基因 *bgaB* 的 mRNA 相对表达量

利用相对定量的比较  $C_t$  法, 测定菌株 Bti75(pBP $\Delta$ 7)和 Bti75(pBP)的  $\beta$ -半乳糖苷酶 mRNA 的相对表达量。本研究还将倍比稀释的 cDNA 的 log 值作为横坐标,  $\Delta C_t[C_t(bgaB)-C_t(16sRNA)]$  作为纵坐标绘制关系曲线(图 2)。得出目的基因 *bgaB* 与内参基因 *16sRNA* 之间的直线斜率的绝对值接近于 0, 为 0.052, 表明目的基因 *bgaB* 分别和参照基因 *16sRNA* 的扩增效率一致, 实验结果可以应用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 100\%$  进行相对定量。

利用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 100\%$  计算出  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 *bgaB* 在无诱导物存在时, 在启动子 *chiBp* 和 *chiBp $\Delta$ 7* 作用下的 mRNA 相对表达量, 结果如图 3 所示。与全长启动子相比, 缺失启动子可以更高效地启动 *bgaB* 的表达, mRNA 的表达量是全长启动子的 2.5 倍左右, 两者比较具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

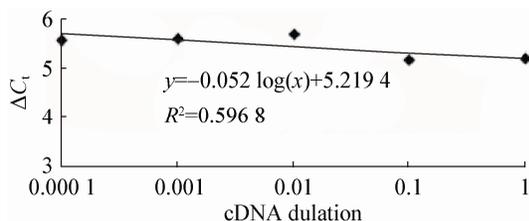


图 2 目的基因 *bgaB* 与参照基因 *16sRNA* 扩增效率比较  
Figure 2 Compare of the amplification efficiency of target gene *bgaB* and reference gene *16sRNA*

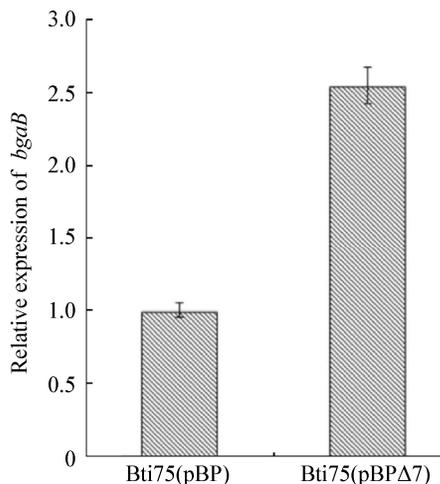


图 3 *chiBp* 和 *chiBp $\Delta$ 7* 启动 *bgaB* 基因 mRNA 转录量  
Figure 3 mRNA expression of *bgaB* gene under *chiBp* and *chiBp $\Delta$ 7*

## 2.3 工程菌株构建及特异表达蛋白检测

按照 1.8 描述的方法, 获得 2 株工程菌株: Bti75(pDA)和 Bti75(pDM)。在不诱导条件下培养工程菌, 上清液中可以明显地检测出几丁质酶活性。图 4 分别是工程菌表达 2 种特异蛋白的 SDS-PAGE 电泳(A、C)和酶谱分析(B、D)结果。图 4 结果表明, 工程菌 Bti75(pDM)特异表达的地衣芽胞杆菌几丁质酶 ChiMY 的大小约为 67 kD, 与本室前期研究时发现在 *E. coli* 中异源表达的分子量一致<sup>[5]</sup>。酶谱分析(图 4B)可以见到, 胶内乙二醇几丁质降解后的特异条带约为 67 kD。另一工程菌 Bti75(pDA)的几丁质酶在 SDS-PAGE 中的大小显示是 36 kD, 在酶谱分析(图 4D)中, 具有酶活性的蛋白条带大小与之一致。酶谱分析证明两种特异表达蛋白均为几丁质酶。

图 5 为 2 株工程菌株在非诱导条件下几丁质酶活性与亲本菌株的比较。结果证明, *chiBp $\Delta$ 7* 可以使这 2 个不同的几丁质酶基因, 在菌株 Bti75 中组成型表达, 在无诱导的基本培养基中, 酶活性都达到 7 U/mL。而原出发菌株, 酶活性仅达到 2 U/mL 左右。

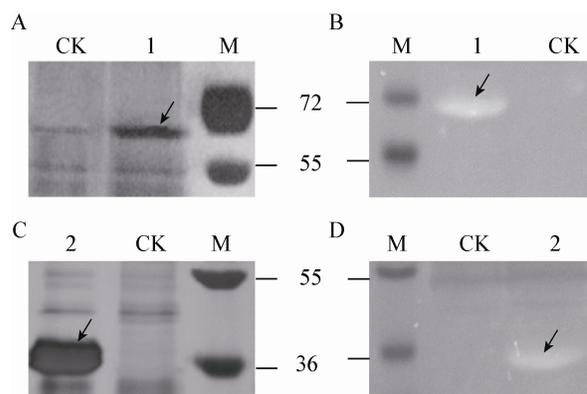


图 4 工程菌 Bti75(pDM)和 Bti75(pDA)特异表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳及酶谱分析

Figure 4 SDS-PAGE and zymogram analysis of specific expressed proteins from the strain Bti75(pDM) and Bti75(pDA)

注: A, C: SDS-PAGE 电泳图; B, D: 酶谱分析结果图。1: Bti75(pDM); 2: Bti75(pDA); CK: Bti75; M: 蛋白 Marker。  
Note: A, C: SDS-PAGE; B, D: Zymogram analysis. 1: Bti75(pDM); 2: Bti75(pDA); CK: Bti75; M: Protein marker.

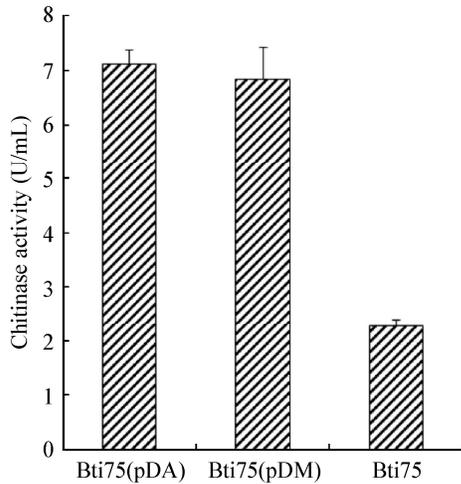


图5 无诱导培养时工程菌株与亲本菌株几丁质酶的表达量

Figure 5 Compare of the expression level of chitinase between parent strain and Bti75 engineering strain

#### 2.4 工程菌株抑制 3 种真菌菌丝生长的效果测试

将野生菌株以及工程菌株 Bti75(pDM)、Bti75(pDA)经无诱导条件下培养、浓缩各菌株上清液之后获得粗酶蛋白,首先调整一致的蛋白浓度,分别为 0.18 g/L 左右。测定酶活性:对照菌株 Bti75 为 4.1 U/mL, 2 株工程菌酶活性几乎相同: Bti75(pDM)为 14.2 U/mL、Bti75(pDA)为 13.9 U/mL。3 个样品用作抑制真菌菌丝生长效果测试,结果见图 6。纵排平板 1、2 为磷酸缓冲液及野生菌株空白对照,平板 3、4 分别为 Bti75(pDA)和 Bti75(pDM)工程菌样品。图中横排 A、B、C 分别为测试的 3 种植物病原真菌。从图 6 可明显看出,野生菌株对 C 真菌菌丝的生长有一定的抑制作用。2 株工程菌对 3 种病原真菌的抑菌效果都比野生菌株明显,其中抑制 A、C 真菌最明显。在相同的培养条件、相同的蛋白浓度下,工程菌比对照菌酶活性提高 3 倍多,因此抑菌活性相应提高。两株工程菌虽然特异表达的几丁质酶的来源及分子量都不同,但在酶活性一致的情况下,它们的抑菌效果基本相同。其抑菌效果确实是来自启动子高效表达几丁质酶的活力水平不同,而不是特定几丁质酶所致。

#### 2.5 工程菌株抑制真菌孢子萌发的效果测试

野生菌株 Bti75 以及工程菌株 Bti75(pDM)的粗蛋白浓度分别为 0.22 g/L 和 0.24 g/L,几丁质酶活力分别为 4.5 U/mL 和 18.9 U/mL。样品用作抑制真菌测试,设磷酸缓冲液作为实验对照(平板 A)。从图 7 可以看出,Bti75 菌株(平板 B)的抑菌效果与对照相同,在不同孢子浓度的牛津杯周围都可观察到茂密生长的菌丝,证明野生菌株 Bti75 虽然可以表达一定量的几丁质酶,但由于表达量低,还不足以抑制禾谷镰刀菌孢子萌发。而工程菌株中的缺

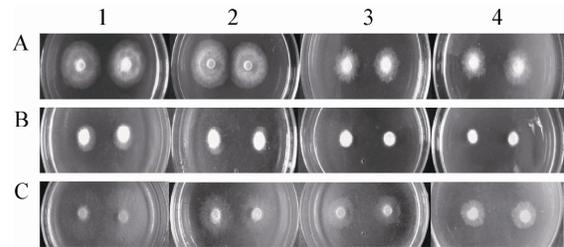


图6 野生型菌株 Bti75 及工程菌 Bti75(pDA)、Bti75(pDM)对 3 种病原真菌菌丝生长的抑制作用

Figure 6 Inhibitory effect of Bti75 and Bti75(pDA)/Bti75(pDM) against mycelial growth of three fungi

注: A: 辣椒疫霉; B: 禾谷镰刀菌; C: 立枯丝核菌。1: 空白对照; 2: 含 Bti75 粗酶液平板; 3: 含 Bti75(pDA)粗酶液平板; 4: 含 Bti75(pDM)粗酶液平板。

Note: A: *Phytophthora capsici*; B: *Fusarium graminearum*; C: *Rhizoctonia solani*. 1: Control; 2: Medicated tablet of Bti75; 3: Medicated tablet of Bti75(pDA); 4: Medicated tablet of Bti75(pDM).



图7 野生型菌株 Bti75 及工程菌株 Bti75(pDM)对禾谷镰刀菌孢子萌发的抑制作用

Figure 7 Inhibitory effect of Bti75 and Bti75(pDM) against spore germination of *Fusarium graminearum*

注: A: 孢子悬液+磷酸缓冲液; B: 孢子悬液+Bti75 粗酶液; C: 孢子悬液+Bti75(pDM)粗酶液。1、2 浓度为  $10^4$ 、 $10^3$  CFU/mL 的真菌孢子悬液。

Note: A: Control (spores and phosphate buffer); B: Spores and crude enzyme solution of Bti75; C: Spores and crude enzyme solution of Bti75(pDM). 1: Spore-containing fluid ( $10^4$  spores/mL); 2: Spore-containing fluid ( $10^3$  spores/mL).

失启动子使几丁质酶基因在不诱导时同样大量表达, 比野生型菌株酶活性明显高, 故 Bti75(pDM) 粗酶液样品(平板 C)完全抑制了浓度为  $10^3$  CFU/mL 的真菌孢子, 没有观察到任何生长现象。

### 3 讨论

本实验室对 *chiB* 基因上游调控序列的研究表明, 负责应答几丁质诱导的操纵子区域位于核心启动子下游。因操纵子区域是阻遏蛋白应答元件, 故可以利用缺失突变的方式敲除这一负调控位点, 在无诱导物情况下, 使阻遏蛋白无法行使阻止基因转录的功能, 从而将 *chiB* 基因由诱导型表达变为组成型表达, 这是去阻遏定向分子育种的理论依据。从图 1 可以看出, *chiBpA4*、*chiBpA5* 和 *chiBpA6* 都是组成型表达, 因为它们缺失了一部分或全部操纵子区域, 但是这 3 个突变体的酶活性相差极大, 其中 *chiBpA7* 突变体的酶活性明显较高, 具体原因还有待进一步研究。Ni 等<sup>[20]</sup>研究链霉菌几丁质酶启动子时发现, 转录起始位点上游-9、-14 和-16 位 A-T 碱基对突变为 G-C 碱基对时, 启动子活性也显著提高, 推测可能有些碱基存在转录激活作用。

实时荧光定量 PCR 结果显示, 在缺失启动子 *chiBpA7* 作用下, *bgaB* 的 mRNA 转录量是全长启动子 *chiBp* 的 2.5 倍(图 3), 而酶活测定结果却是 7 倍左右(图 1)。虽然都呈现出上调的趋势, 但上升的倍数有差距, 推测可能是实验条件不同所致。测定 mRNA 转录量时, 为了便于提取芽胞杆菌的 RNA, 选取处于对数生长前期(7 h)的菌体, 而酶活性的测定则选取稳定期后期(48 h)的菌体, 培养 7 h  $\beta$ -半乳糖苷酶活性正在呈直线上升(数据未显示), 因此, 实时 mRNA 转录量与酶活测定有一定的差异。

在本实验室前期研究中, 肖亮等<sup>[5]</sup>利用表达载体 pET28a 在大肠杆菌中异源表达的地衣芽胞杆菌几丁质酶 ChiMY 显示了良好的抑真菌活性, 但需要添加 IPTG 诱导, 成本很高。本研究则利用构建的缺失启动子 *chiBpA7* 在 Bti75 中组成型异源表达

ChiMY, 对病原真菌的菌丝生长及孢子萌发同样具有很好的抑制作用, 无需添加诱导物, 具有潜在的应用价值。但是, 在 Bti75 菌株中, 同样利用缺失启动子 *chiBpA7*, 异源表达的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性和几丁质酶活性提高的倍数不一致, 其原因还有待探讨。

### 参考文献

- [1] Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(6): 773-782.
- [2] Gomaa EZ. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol[J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(1): 103-111.
- [3] Liu D, Cai J, Xie CC, et al. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(3/4): 252-256.
- [4] 刘东, 陈月华, 蔡峻, 等. 苏云金芽胞杆菌几丁质酶 B 特性及其杀虫抑真菌的作用[J]. 微生物学报, 2009, 49(2): 180-185.
- [5] 肖亮, 刘传, 谢池楚, 等. 地衣芽胞杆菌 MY75 菌株几丁质酶基因的异源表达及特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 749-754.
- [6] Reid JD, Ogrdzia DM. Chitinase-overproducing mutant of *Serratia marcescens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41(3): 664-669.
- [7] Su CX, Zhou W, Fan YH, et al. Mutation breeding of chitinase-producing strain *Bacillus* sp. S65 by low-energy ion implantation[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(12): 1037-1042.
- [8] Fan YH, Fang WG, Xiao YH, et al. Directed evolution for increased chitinase activity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(1): 135-139.
- [9] Lee SH, Ryu EJ, Kang MJ, et al. A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT)[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 26(3/6): 119-129.
- [10] 张爱玲, 张丽, 杨明明, 等. 鸟枪法筛选枯草芽胞杆菌基因强启动子及对黄牛 GHRL 基因的表达[J]. 华南农业大学学报, 2011, 32(3): 92-96.
- [11] Xie CC, Luo Y, Chen YH, et al. Construction of a promoter-probe vector for *Bacillus thuringiensis*: the identification of cis-acting elements of the *chiA* locus[J]. Current Microbiology, 2012, 64(5): 492-500.
- [12] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 55-56.
- [13] Lecadet MM, Chauvaux J, Ribier J, et al. Construction of

- novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(3): 840-849.
- [14] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] 关小红. 枯草芽孢杆菌 Tpb55抗菌物质纯化及特性的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2008: 30-31.
- [16] Trudel W, Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Analytical Biochemistry, 1989, 178: 362-366.
- [17] 谢池楚, 陈月华, 蔡峻, 等. Bt 几丁质酶的基础表达及诱导合成的多态现象[J]. 生物工程学报, 2010, 26(11): 1532-1538.
- [18] 苗建强, 李秀环, 刘峰, 等. 四种羧酸酰胺类杀菌剂对辣椒疫霉菌三个不同发育阶段的毒力比较[J]. 农药学报, 2011, 13(5): 539-542.
- [19] Xiao L, Xie CC, Chen YH, et al. Identification and characterization of a chitinase-produced *Bacillus* which showing significant antifungal activity[J]. Current Microbiology, 2009, 1(58): 528-533.
- [20] Ni XY, Westpheling J. Direct repeat sequences in the *Streptomyces* chitinase-63 promoter direct both glucose repression and chitin induction[J]. Proceedings of National Academy of Sciences, 1997, 94(24): 13116-13121.

## 编辑部公告

### 《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名，造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱，这大大影响了本刊在国际上的传播，也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论，以及主办单位批准，本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”，缩写为“Microbiol. China”，请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。