

# 产过敏素 harpin 的固氮工程菌的某些特性研究\*

朱红惠<sup>1,2</sup> 李艳琴<sup>1</sup> 邱晓颖<sup>2</sup> 丘明祺<sup>2</sup> 赵立平<sup>1</sup>

(山西大学生物工程开放实验室 太原 030006)<sup>1</sup>

(广东省微生物研究所 广州 510070)<sup>2</sup>

**摘要:** 研究了产过敏素 harpin 的固氮工程菌 (*Enterobacter cloacae* E4) 在番茄、烟草叶片上的致过敏能力及该菌所携的双质粒的稳定性。试验结果表明: E4 与 DH5 (pCPP430) 致过敏能力的速度和强度基本相同。E4 与 308R (pCPP430) 相比, 烟草上它们致过敏能力的速度基本一致, 但 308R (pCPP430) 致过敏能力的强度更强, 在番茄叶片上, E4 和 308R (pCPP430) 致过敏能力的速度和强度基本一样。E4 所携的双质粒 pCPP430 和 pMC73A 在宿主细菌中是不稳定的, 在宿主细菌连续繁殖过程中, 质粒 pCPP430 和 pMC73A 随宿主细菌的繁殖而发生缺失, 当连续传代 48 代时, 双质粒的丢失率达 100%, 而且各含一种质粒的细胞产生的机率基本相同。

**关键词:** E4, *harpN* 基因, *nifA* 基因, 致过敏能力, 质粒稳定性

**中图分类号:** Q939.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0018-05

## STUDY ON THE CHARACTERS OF AN HARPIN-PRODUCING BACTERIA STRAIN TOLERANT TO AMMONIUM AND NITROGEN-FIXING

ZHU Hong-Hui<sup>1,2</sup> LI Yan-Qin<sup>1</sup> QIU Xiao-Ying<sup>2</sup> QIU Ming-Qi<sup>2</sup> ZHAO Li-Ping<sup>1</sup>

(Shanxi University Shanxi Key Laboratory of Biotechnology Taiyuan 030006)<sup>1</sup>

(Guangdong Institute of Microbiology Guangzhou 510070)<sup>2</sup>

**Abstract:** The ability to induce hypersensitivity on leaves of tomato and the stability of double-plasmid of an harpin-producing, nitrogen-fixing engineered strain E4 were tested. Hypersensitivity-inducing experiment indicated that the time and density of hypersensitivity-induction of E4 was similar to those of DH5, the positive control of pCPP430. Although E4 took the same time to induce hypersensitivity as 308R, another positive control of pCPP430, it induced weaker hypersen-

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770509)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39770509)

山西省攻关资助项目 (No. 991073)

广东省自然科学基金资助项目 (No. A990017)

收稿日期: 2001-04-20, 修回日期: 2001-05-25

sitivity on tobacco leaves. On tomato leaves, there was no difference in time and density of hypersensitivity between E4 and 308R (pCPP430). Results revealed that the two plasmids, pCPP430 and pMC73A, were unstable in host bacteria, with the losing rate of 100% at the 48<sup>th</sup> generation. The emergence probability of bacteria with either pCPP430 or pMC73A was almost the same.

**Key words:** Strain E4, *hrpN* gene, *nifA* gene, Ability of hypersensitivity-inducing, Stability of plasmid

过敏素类蛋白 harpin 是一类能诱导植物抗病性的蛋白, 康乃尔大学植病系 Steven Beer 博士领导的研究小组经过多年研究, 将梨火疫病病菌中与诱导过敏反应和有关引起植病的整套 *hrp* 基因分离并克隆出来, 对该基因的序列和功能位点进行了研究, 构建而成的大小约 40kb 的质粒 pCPP430。当质粒 pCPP430 转到大肠杆菌中, 可使大肠杆菌在烟草等植物上引起过敏反应, 进而诱导植物抗性。山西大学生物工程实验室在国内较先开展 harpin 基因表达研究工作。他们用表达 harpin 基因的大肠杆菌 DH5 进行了诱导抗病性的研究, 发现表达 harpin 的重组菌可以明显诱导烟草、番茄叶片的过敏反应, 同时也能诱导对多种植物的抗性。将过敏素基因和固氮基因结合, 得到既能生物固氮又能提高植物免疫力的基因重组菌, 这是一个独创性思路。国内外相关的研究鲜见报道。

产过敏素的耐氨固氮菌 E4 是一株以耐氨固氮工程菌 *Enterobacter cloacae* E26 (pMC73A) 为受体菌, 用三亲交配法将能产过敏素的重组粘粒 pCPP430 导入其中而构建的, 经过分子验证含有 *hrpN* 及改变了启动子的 *nifA* 基因<sup>[1]</sup>。E4 携带有两个质粒, 一个是含有 *hrpN* 基因能产生 harpin 蛋白诱导植物抗病性的重组粘粒 pCPP430, 大小约 40kb<sup>[2]</sup>。另一个是含有抗氨阻遏的 *nifA* 基因的质粒 pMC73A, 大小约 7kb<sup>[3]</sup>。把克隆有外源基因的质粒载体转化到宿主菌中之后, 会产生一系列的生理效应, 影响到自身的稳定性, 因而 pCPP430 和 pMC73A 在宿主细菌中都不太稳定<sup>[4,5]</sup>。当这两个质粒共存于一个宿主细胞时, 它们之间是相容还是不亲和, 各自的稳定性怎样, 是 E4 菌株的一个重要特性。

在测定 E4 菌株致过敏能力试验中, 我们发现 E4 引起的叶片过敏反应的速度和强度都比阳性对照 DH5 (pCPP430) 强, 这究竟是 harpin 在固氮菌中分泌表达能力强还是其他的原因造成的假象也需要探讨。

因此本文对 E4 所携的两个质粒的稳定性、致过敏能力强弱等特性进行了研究, 以期进一步完善 E4 的基础研究, 为其今后的实际应用提供充足的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

耐氨固氮工程菌 *Enterobacter cloacae* E26 (pMC73A) (广东省微生物研究所提供, 28℃培养, KmAmp<sup>r</sup>, 质粒上含有抗氨阻遏的 *nifA* 基因)。

产过敏素 harpin 的耐氨固氮工程菌 E4 (由山西大学生物工程室构建, 28℃培养, KmAmpSp<sup>r</sup>, 两个质粒上分别含有抗氨阻遏的 *nifA* 基因和引起过敏反应的 *hrpN* 基因)。

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 (pCPP430) (由山西大学生物工程室提供, 37℃培养, Sp<sup>r</sup>, 质粒上含有引起过敏反应的 *hrpN* 基因)。

成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 308R (pCPP430) (由山西大学生物工程室提供, 28℃培养, RmSp<sup>r</sup>, 质粒上含有引起过敏反应的 *hrpN* 基因)。

## 1.2 培养基与试剂

LB培养基用于菌种的传代和培养。琼脂糖购于 Promega 公司；壮观霉素、氨卞青霉素、卡那霉素的用量各为  $\rho = 40、100、25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。

## 1.3 质粒稳定性的测定方法

按 Gerlitz 等<sup>[6]</sup>方法测定和计算细胞分裂一定代数后带有质粒抗药性标记的菌数占总菌数的百分比，作为质粒稳定性的指标。在试验进行中，采用平板点样法印证菌落记数的结果；并挑取各种抗性平板上的单菌落用碱裂解法进行质粒检测<sup>[7]</sup>。

## 1.4 E4 致过敏能力强度测定

将 E26 (pMC73A)、DH5 (pCPP430)、接合子 E4、308R (pCPP430) 接种于含相应抗生素的 LB 液体培养基中，培养至  $OD_{600}$  为 1.0 左右时，测定各菌菌数；并用显微镜测微尺测定各菌菌体大小。将各菌菌液稀释成菌数为  $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^6$ ，分别注射到烟草和番茄叶片上，24h 内随时观察过敏斑出现的时间和强度<sup>[8]</sup>。

# 2 结果与分析

## 2.1 E4 质粒的稳定性研究

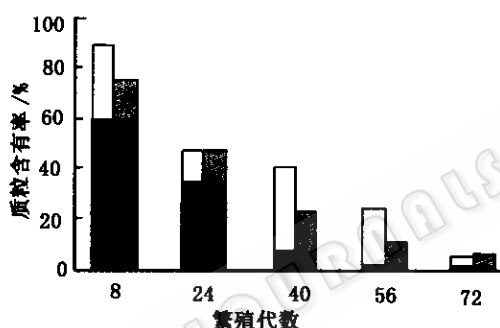


图1 E4 所携质粒的稳定性

□接合子 E4 (Sp), ■接合子 E4 (Kan, Amp),  
■接合子 E4 (Sp, Kan, Amp)

连续传代培养试验结果表明：质粒 pCPP430 和 pMC73A 共存于宿主菌 *Enterobacter cloacae* E26 中是不稳定的（图1）。在解除了选择压力（Sp, Kan, Amp）后，很快出现质粒丢失，在连续传代 48 代后双质粒的丢失率就达 100%。pCPP430 和 pMC73A 质粒单独存在于宿主菌时的稳定性比共存于一个宿主时更强，E26 (pMC73A) 在连续传代 75 代后所携的质粒 pMC73A 丢失率为 100%，DH5 (pCPP430) 在连续传代 106 代后质粒 pCPP430 的丢失率为 93.2%。

为了更准确说明连续培养过程中双质粒在宿主细菌中的丢失率，验证平板记数的准确性，我们用平板点样法检验质粒的丢失率。挑取连续传代 6d 后在 LBSp 平板、LB-Kan, Amp 平板上生长的菌落各 40 个，用牙签点种到 LBSp 平板、LBKan, Amp 平板和 LBSp, Kan, Amp 平板上，计算长出的菌落数，其结果与平板稀释记数法的结果基本一致（图2）。

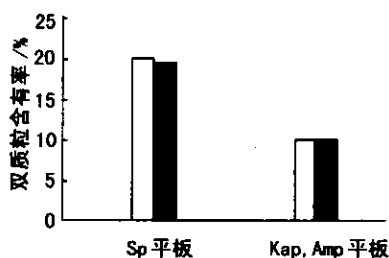


图2 点样法验证传 48 代后 E4 所携双质粒的丢失情况

□点样法, ■平板记数法

为了证实质粒的结构是否发生变化以及传代后在 LBSpKanAmp 平板上不长的菌是否丢掉质粒，我们用碱裂解法检查宿主细菌中质粒的存在情况。挑取平板点样法中只能在 LBSp 平板或 LBKanAmp 平板以及 LBSp-KanAmp 平板上生长的菌落，进行质粒抽提，电泳检测结果见图3。从图上看，只能在 LBSp 平板上生长的菌落只含有一条 pCPP430 质粒 DNA 带，只能在 LBKanAmp 平板上生长的菌落只含有一条 pMC73A 质粒 DNA

带,而在 LBSpKAnAmp 平板上可以生长的菌落中含有两条质粒 DNA 带,大小与 pCPP430、pMC73A 一致。这说明工程菌遗传不稳定是由于质粒的丢失而不是因为质粒结构的不稳定。

2.2 E4 致过敏能力测定

在带有 *hrpN* 基因的菌株中,  $OD_{600}$  为 1.0 左右时, E4 的菌数比 DH5 (pCPP430) 和 308R (pCPP430) 多, 菌体杆状, 大小与 DH5 (pCPP430) 和 308R (pCPP430) 差不多 (表 1)。在植物叶片上的过敏反应试验表明: E4 与 DH5 (pCPP430) 致过敏能力的速度和强度基本相同。在菌数为  $1 \times 10^9$  和  $5 \times 10^8$  时, 6h 左右叶片出现典型的过敏症状。而菌数为  $5 \times 10^7$  时, 8h 左右在烟草叶片上出现过敏斑, 在番茄上不出现过敏斑; E4 与 308R (pCPP430) 相比, 在烟草上它们致过敏能力的速度基本一致, 但 308R (pCPP430) 致过敏能力的强度更强, 当菌数为  $5 \times 10^7$  时, 8h 左右出现典型的过敏症状, E4 在同样的菌数下, 出现不很明显的过敏斑。在番茄叶片上, E4 和 308R (pCPP430) 致过敏能力的速度和强度基本一样。这些结果表明: 在 *harpin* 的分泌表达量中 308R (pCPP430) 较强, 而 E4 和 DH5 (pCPP430) 的水平相近。

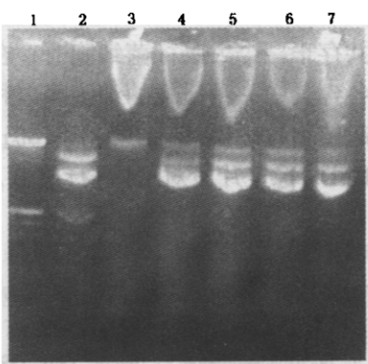


图 3 E4 传代 48 代后质粒的电泳图  
1  $\lambda$  EcoRI + HindIII, 2 E4 (Kan, Amp),  
3 E4 (Sp), 4~7 E4 (Sp, Kan, Amp)

表 1 带有 *hrpN* 基因的  
各菌株在  $OD_{600} = 1.0$  时的菌数

| 菌 株            | $OD_{600}$ | 菌数 ( $10^8$ ) |
|----------------|------------|---------------|
| DH5 (pCPP430)  | 1.226      | 12.7          |
| 308R (pCPP430) | 1.295      | 11.25         |
| E26 (pCPP430)  | 1.103      | 23.90         |
| 接合子 E4         | 1.002      | 25.05         |

3 讨论

E4 致过敏能力的试验表明: 用含相同菌数的磷酸缓冲液注射烟草和番茄叶片, E4 与 DH5 (pCPP430) 致过敏能力的速度和强度基本相同。而 E4 与 308R (pCPP430) 相比, 在烟草上它们致过敏能力的速度基本一致, 但 308R (pCPP430) 致过敏能力的强度更强, 在番茄叶片上, E4 和 308R (pCPP430) 致过敏能力的速度和强度基本一样。这说明 *harpin* 蛋白在这几种菌中的分泌表达量是没有显著差异的, E4 在  $OD = 1.0$  时致过敏反应比 DH5 (pCPP430) 和 308R (pCPP430) 明显是因为 E4 的菌数多的缘故。

HR 本身即被认为是植物的抗病防卫反应<sup>[8]</sup>。利用非亲和病菌或非病菌引发局部组织的 HR 来诱导整个植株的抗病反应也是一种常见的现象, 已有大量的文献报道<sup>[9]</sup>。从现有结果看, 能诱发 HR 的菌即可诱导出植物的抗性。E4 能在番茄和烟草叶片上引起 HR, 从前人的研究理论和研究结果推测, 它也能有效诱发多种植物对不同病害的抗性, 这有待下一步研究。

由于 E4 所携的质粒是人工构建的外来质粒, 给宿主细胞带来额外负担, 因此在没有选择压力的情况下, 质粒 pCPP430 和 pMC73A 在宿主细菌中是不稳定的<sup>[4,5]</sup>。在宿主细菌连续繁殖过程中, 质粒 pCPP430 和 pMC73A 随宿主细菌的繁殖而发生缺失, 每繁殖一代, 都会有一定比例的后代细胞失去质粒, 当连续传代 48 代时, 双质粒的丢失率达 100%。质粒的不稳定可以分两种情况, 一是质粒在细胞分裂时向子代细胞分配不均匀造成的, 叫做“分配不稳定”; 另一种是因 DNA 的缺失、插入或重排引起“结构不稳定”<sup>[10]</sup>。通过对产过敏素 *harpin* 的固氮工程菌 E4 进行质粒抽提检测, 证实多次传代后

其物理结构未发生变化,因此 E4 所携质粒的丢失属于分配不稳定。pCPP430 和 pMC73A 共存于一个大肠杆菌细胞时,在宿主细胞中的拷贝数相当,不稳定性的反应是均等的,各含其中一种质粒的细胞系以相同的机率产生。虽然 E4 所携的质粒不稳定,但它能引起植物过敏反应,在应用上仍具有实际意义。而且也可以采用 Tn5 转座诱变和插入 ParDE 稳定片段对 E4 进行改造,以提高其稳定性。现在正在做这一步的研究。

### 参考文献

- [1] 朱红惠,李艳琴,邱晓颖,等. 农业生物技术学报, 2001, 9 (1): 89~91.
- [2] Wei Z M, Beer S V. Acta Horticulturae, 1996, 411: 223~225.
- [3] Buchanan-wollaston V. Nature, 1981, 294: 776~778.
- [4] 李艳琴,宁秀红,申 泉. 微生物学通讯, 2001, 26 (6): 400~403.
- [5] 邱晓颖,朱红惠,卢秋雁,等. 高技术通讯, 1998, 6: 52~55.
- [6] Gerlitz M, Hrabak O, Schwab H. Journal of Bacteriology, 1990, 172 (11): 6194~6203.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 908.
- [8] Klement Z, Farkas G L, Lorrekovich L. Phytopathology, 1964, 54: 474~477.
- [9] 董汉松. 植物诱导抗病性: 原理和研究. 北京: 科学出版社, 1995.
- [10] 李永红,王二力,余俊棠. 生物工程学报, 1988, 4 (2): 81~86.