

产 harpin 的成团泛菌工程菌 308R (pCPP430) 遗传稳定性的研究*

李艳琴 宁红秀 申泉 赵春贵 李新锋 赵立平**

(山西大学生物工程开放实验室 太原 030006)

摘要: 成团泛菌工程菌 308R(pCPP430)带有梨火疫欧文氏杆菌的与过敏反应和致病性有关的基因簇 (*hrp*),可以产生能诱导植物抗病性的蛋白质 harpin。该工程菌在 LB 液体培养基中生长 50 代后,带有重组质粒 pCPP430 的细胞占总菌量的 1%,带有载体 pCPP9 的细胞为 46%。工程菌喷雾到番茄叶面,保湿条件下叶面菌量维持在 10^5 cfu/cm²以上,其中带有 pCPP430 质粒的菌维持在 40% 以上,带有 pCPP9 载体的菌维持在 80% 以上。因此,携带 *hrp* 基因簇的质粒 pCPP430 在宿主菌中是不稳定的。文中讨论了改进工程菌遗传稳定性的途径。

关键词: 工程菌,质粒,遗传稳定性,诱导抗性,成团泛菌

中图分类号: Q756 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-0400-04

GENETIC STABILITY OF A RECOMBINANT *PANTOEA AGGLOMERANS* STRAIN 308R (pCPP430) CAPABLE OF PRODUCING PLANT RESISTANCE INDUCING PROTEIN HARPIN

LI Yanqin NING Hongxiu SHEN Quan ZHAO Chungui LI Xinfeng ZHAO Liping

(Shanxi University Shanxi Key Laboratory of Biotechnology Taiyuan 030006)

Abstract: The genetic stability of *Pantoea agglomerans* 308R (pCPP430), a recombinant strain capable of producing the plant resistance inducing protein harpin, was studied both in medium and in plant under antibiotic-free conditions. After successive growth in LB medium for 50 generations, only 1% of the cells still retained the plasmid pCPP430, in comparison with 46% of the vector pCPP9. After sprayed onto the leaves of tomato, the recombinant strain maintained a population density of 10^5 cfu/cm² when kept under high humidity. 40% cells of this population contained the plasmid pCPP430. It was shown that plasmid pCPP430 was unstable due to inadequate partition. Strategies for improving its genetic stability were discussed.

Key words: Recombinant bacteria, Plasmid, Genetic stability, Resistance inducing, *Pantoea agglomerans*

长期以来,人们在研究生防技术时,只注意生防菌与病菌间的拮抗、竞争等互作机制,把植

物当作一个惰性基质或被动的保护对象去研究,忽略了生防菌与植物的互动,这是影响生防效果

* 国家高技术研究发展计划项目("863"项目)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development.

山西省自然科学基金资助项目(No.971065)

** 项目负责人

收稿日期:1998-09-21,修回日期:1998-12-11

的一个重要原因。本实验室针对这一问题,构建了一株既能产生杀菌物质又能产生诱导植物抗性蛋白 harpin^[1]的菌株 308R(pCPP430)。宿主菌 308R 是一个能在植物体上定殖并能产生多种多样抗生物质的生防菌—成团泛菌(原名:草生欧文氏杆菌)^[2]的抗利福霉素自发突变株。它携带的质粒 pCPP430 是在载体 pCPP9 上插入了梨火疫欧文氏杆菌的功能完整的 *hrp* 基因簇^[3]的重组质粒,具有壮观霉素抗药性标记。这种工程菌有可能在原有的拮抗、竞争等机制之上又获得诱导植物抗性的功能,使得植物本身也主动参与病害防治过程,可以提高生防效果^[4]。

在没有抗药性筛选的情况下,质粒 pCPP430 在宿主菌中的遗传稳定性是该工程菌在田间有效发挥作用的关键,也是工程菌大规模发酵与制剂化的一个至关重要的问题。为此,我们对该工程菌的遗传稳定性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株:对照菌 308R(pCPP9)、工程菌 308R(pCPP430)由本实验室提供;重组质粒 pCPP430 及其载体 pCPP9 由美国康乃尔大学 S. V. Beer 教授提供。308R 抗利福霉素 Rm(300 μ g/ml), pCPP9(约 5.3kb)、pCPP430(约 45kb)带壮观霉素 Sp 抗性标记(40 μ g/ml)。

1.1.2 培养基:LB 固体、液体培养基。

1.1.3 植物材料:苗龄 110d 的番茄植株,由山西龙华农产品公司提供。

1.1.4 试剂:5mmol/L 磷酸缓冲液, pH6.5, 用于悬浮细菌。

1.2 实验方法

1.2.1 人工培养基上的遗传稳定性测定:将菌株 308R(pCPP9)、308R(pCPP430)分别接种于 LBRm 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养。每 24h 传代一次, 接种量 2%, 每传 5 代分别用 LBRm 及 LBRmSp 平板进行菌落计数, 计算带有抗药性标记的菌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:生长 100 代后, 在 LBRm 平板上

生长、在 LBRmSp 平板上不长的菌和在 LBRmSp 平板上生长的菌, 用碱裂解法提取质粒, *Eco*RI 酶切验证质粒的有无及其物理结构的变化。

1.2.3 植物叶面遗传稳定性测定:将菌株 308R(pCPP9)、308R(pCPP430)分别接种于 LBRmSp 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养。当 $OD_{600nm} = 1.0$ 左右时, 离心收集菌体。然后用 pH6.5 的磷酸缓冲液悬浮菌体, 将菌悬液喷雾到番茄叶面上。喷完后立即用打孔器取直径 1cm 的叶碟进行匀浆、倍比稀释, 分别用 LBRm 和 LBRmSp 的平板进行菌落计数。然后将喷菌的叶片一部分套上透明塑料袋保湿, 另一部分自然处理作为对照, 每隔 24h 分别从套袋与自然处理的叶片上取一个叶碟进行同样方法的处理并计数。此实验持续 14d, 实验重复 3 次。

2 实验结果

2.1 人工培养基上的质粒稳定性实验

在 LBRm 液体培养基中的传代实验表明:生长 50 代后, 工程菌培养物中带有质粒的菌只有总菌量的 1%, 而对照菌中含有载体的菌仍有 46%; 生长 100 代后, 工程菌中已检测不到含有质粒的菌体, 而对照菌中仍有 1% 的菌含有载体, 这说明质粒 pCPP430 在宿主菌 308R 中人工培养基传代时是很不稳定的, 而载体 pCPP9 在相同条件下稳定性好一些(图 1)。

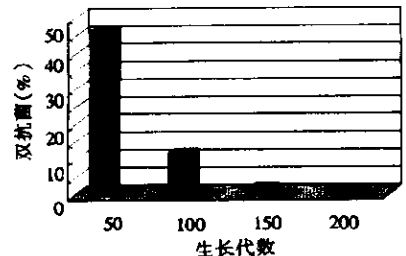


图1 工程菌与对照菌在人工培养基中的遗传稳定性

■ 308R(pCPP9), ▨ 308R(pCPP430)

2.2 质粒检测

为了证实质粒的结构是否发生变化以及传代后在 LBRmSp 平板上不长的菌是否丢掉质粒, 我们进行质粒抽提并对其用 *Eco*RI 酶切(图 2)。

生长 100 代后失去 Sp 抗性的细胞中提取不到质粒；生长 100 代后仍维持 Sp 抗性的细胞中可提取到与出发工程菌中相同大小的质粒，EcoRI 的酶切图谱也完全相同。这说明工程菌遗传不稳定是

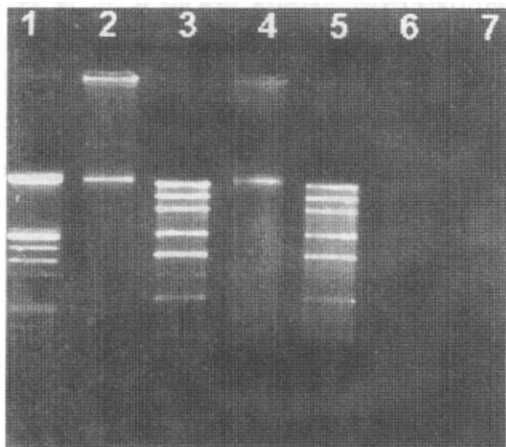


图 2 工程菌生长 100 代后质粒 pCPP430 的物理图谱
1. λDNA / HindIII + EcoRI Marker, 2. 308R(pCPP430)质粒, 3. 2 的 EcoRI 酶切, 4. 生长 100 代的 308R(pCPP430)质粒, 5. 4 的 EcoRI 酶切, 6. 生长 100 代在 Sp 平板上不长的菌提质粒, 7. 6 的 EcoRI 酶切

由于质粒的丢失而不是因为质粒结构的不稳定。

2.3 工程菌在番茄叶面的遗传稳定性

在整个 14d 实验期内, 套袋保湿条件下, 菌量一直维持在 10^5 cfu/cm² 以上, 其中对照菌中带有载体 pCPP9 的细胞一直保持在 80% 以上; 工程菌中带有质粒 pCPP430 的细胞保持在 40% 以上; 未保湿条件下, 工程菌和对照菌的菌量都下降很快, 第 3d 时残余的细菌中持有质粒的细胞比例约 90%, 4d 后已回收不到细菌(图 3、图

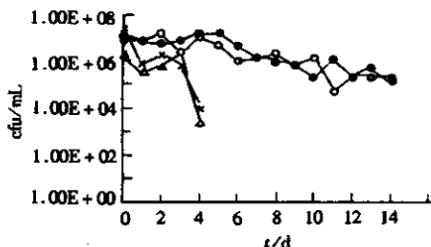


图 3 工程菌与对照菌在叶面的定殖

—●— 保湿308R(pCPP430), —■— 保湿308R(pCPP9),
—▲— 未保湿308R(pCPP430), —×— 未保湿308R(pCPP9)

4)。

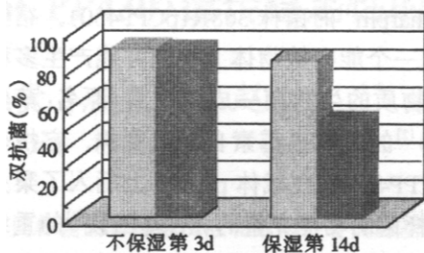


图 4 工程菌与对照菌在番茄叶面的遗传稳定性

■ 308R(pCPP9), ■ 308R(pCPP430)

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。近年来, 许多学者对大肠杆菌工程菌、酵母工程菌、固氮工程菌及棒杆菌工程菌^[5~7]的遗传稳定性从不同的角度进行了研究。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”^[8]。通过对工程菌 308R(pCPP430) 进行质粒的抽提检测和酶切物理图谱的测定, 证实多次传代后其物理结构未发生变化, 因此属于分配不稳定。pCPP430 比载体 pCPP9 多出 40kb 的 DNA 片段, 其遗传稳定性也低得多, 可能质粒大小对稳定性也有影响。

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^[9], 所以, 针对质粒在子细胞中分配不均造成的遗传不稳定, 我们可以将 *parDE* 片段重组到有关质粒上, 提高工程菌的遗传稳定性。

针对外源 DNA 片段过大这一不稳定因素, 我们可以将编码 harpin 蛋白的 *hrpN* 基因插入到分泌型载体上, 使 harpin 蛋白通过 II 型分泌机制分泌到胞外^[10], 这样可把重组质粒控制在 5kb 以下, 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, 从而提高工程菌的

遗传稳定性。

参 考 文 献

- [1] Wei Z M, R J Laby, C H Zumoff *et al.* *Science*, 1992, **257**:85~88.
- [2] Wodzinski R S, J P Paulin. *Journal of Applied Bacteriology*, 1994, **76**:603~607.
- [3] Bagnodove A, Z M Wei, L P Zhao *et al.* *Journal of Bacteriology*, 1996, **178**(6):1720~1730.
- [4] 赵立平,梁元存,刘爱新等. 高技术通讯,1997,7(9):1~4.

- [5] Imanaka T, Tsunekawa H, Aiba S. *J. Gen Microbiol*, 1980, **118**:253~261.
- [6] 施源,袁渭康,陈敏恒. 生物工程学报,1990,6(1):44~49.
- [7] 邱晓颖,朱红惠,卢秋雁等. 高技术通讯,1998,8(6):52~55.
- [8] 李永红,王二力,俞俊棠. 生物工程学报,1988,4(2):81~86.
- [9] Martin Gerlitz, Otto Hrabak, Helmut Schwab. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**(11):6194~6203.
- [10] Salmond G P C, P J Reeves, *Trends Biochem Sci*, 1993, **18**:7~12.