

利用 mini-Tn10 转座系统研究芽孢杆菌生物被膜形成相关基因

高卫华^{1,2} 郝建安¹ 夏思源¹ 徐海津¹ 白艳玲¹ 张秀明¹ 乔明强^{1,2*}

(1. 南开大学生命科学学院 天津 300071)

(2. 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

摘要: 生物被膜对于细菌抵御外界环境的侵害具有重要的意义, 其形成和发展过程受到很多基因的调控和影响。本文利用 mini-Tn10 转座系统对野生型解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT 进行突变库的构建并随机选择 400 个转化子进行验证, 突变效率达到 90% 以上。从突变库中筛选到 4 株生物被膜缺陷株。经过鉴定, 上述突变株 *citB*、*citG*、*gpsA* 和 *yvfB* 基因发生插入突变。其中 *citB*、*citG* 和 *gpsA* 均与能量代谢相关, *yvfB* 功能未知。本实验证明 mini-Tn10 转座系统对于芽孢杆菌突变库的构建具有高效和稳定的优点, 是研究基因功能的有利工具。

关键词: 生物被膜, 解淀粉芽孢杆菌, mini-Tn10 转座系统

Using Mini-Tn10 Transposon System to Research the Genes Involved in Biofilm Formation in *Bacillus*

GAO Wei-Hua^{1,2} HAO Jian-An¹ XIA Si-Yuan¹ XU Hai-Jin¹ BAI Yan-Ling¹
ZHANG Xiu-Ming¹ QIAO Ming-Qiang^{1,2*}

(1. Institute for Molecular Biology, College of Life Science, NanKai University, Tianjin 300071, China)

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

Abstract: Biofilm has great influence for bacteria to resist the harm from outer environment. Its forming and development are controlled by many different genes. In this research, an insertional mutagenesis library of a wide type *Bacillus amyloliquefaciens* NK10.BAhjaWT was built via mini-Tn10 transposon system to find out genes involved in biofilm formation. Four such genes have been screened, in which, *citB*, *citG*, *gpsA* are all related to the energy metabolism. The function of another gene of *yvfB* is unknown. In a word, mini-Tn10 transposon system was proved to be efficient and stable in *Bacillus*.

Keywords: Biofilm, *Bacillus amyloliquefaciens*, Mini-Tn10 transposon system

细菌生物被膜(bacterial biofilm)通常定义为细菌黏附于惰性或者活性固体表面, 繁殖、分化并分泌大量胞外多聚基质(exopolymeric matrix)包被其

外形成的微菌落(microcolony)聚集体^[1,2]。生物被膜的主要成份包括胞外多糖、蛋白以及一些核酸等。生物被膜的存在有助于细菌抵御不良的外界环境以

及有害物质的侵蚀,维持其生存环境的相对稳定。细菌生物被膜的形成是个复杂的过程,受到多种基因的调控以及细菌所处外界环境的影响。在生物被膜内部所含有的微生物落中亦包含有不同类型的基因型和表型,其代谢路径和生理活性都不尽相同^[3]。通过对生物被膜表达和相关调控基因的研究,可以从更深层了解细菌个体之间的信息交流方式,及其对细胞生理状态的调节机理。

芽孢杆菌是与人类关系最为密切的细菌之一,在工业、农业以及医疗卫生等领域都有着重要的应用价值。而几乎所有的芽孢杆菌都能生成生物被膜,所以关于芽孢杆菌的生物被膜生成机制的研究对于现实生活具有重要的意义。目前,芽孢杆菌已经成为革兰氏阳性细菌生物被膜研究的模式菌株之一^[4,5]。

转座质粒 pIC333 是针对芽孢杆菌而构建的转座插入载体,其中含有来自于鼠伤寒沙门氏菌 mini-Tn10 转座子^[6]。除此以外,该质粒还具有壮观霉素抗性基因、红霉素抗性基因、ColE1 复制起点和一个能在芽孢杆菌中复制的温度敏感型复制子。当以芽孢杆菌为宿主时,高于 35°C 的培养温度可使该质粒从宿主中自动消除。ColE1 复制起点和壮观霉素抗性基因处于插入序列的内部,这便于突变子的筛选以及插入基因的鉴定。通过将突变子基因组 DNA 选用适当的限制性内切酶酶切后自连,可以形成含有 ColE1 复制起点的重组质粒,连接产物转

化大肠杆菌,利用壮观霉素抗性筛选即可获得含有重组质粒的转化子,由于该重组质粒带有插入位点两侧的部分基因序列,从而可以确认其在芽孢杆菌基因组上的位置(图 1)。该方法解决了芽孢杆菌转化困难的问题,具有转化效率高,突变子筛选方便以及突变表型稳定等优点。

本文对一株野生型解淀粉芽孢杆菌进行 mini-Tn10 转座突变库的构建,以菌落形态差异进行初筛,利用结晶紫染色法筛选出生物被膜缺陷菌株,以此发现芽孢杆菌生物被膜形成相关基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒: 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) NK10.BAhjaWT、大肠杆菌 DH5α 均由本实验室保存。pIC333 质粒由日本国家食品研究中心越智幸三博士惠赠。

1.1.2 主要试剂和溶液: T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司;基因组提取试剂盒为明日百傲公司产品;壮观霉素,红霉素购自 Sigma 公司;甘氨酸为华美公司产品,其他试剂均为国产分析纯产品。EP 溶液 (0.625 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L MgCl₂)。

1.1.3 培养基和培养条件: M9-YE 培养基: 酵母提取物(Oxoid 公司) 3 g/L, 酸水解干酪素(Sigma 公司) 10 g/L, 10×M9 盐溶液 10%, 200 g/L 的葡萄糖溶液 1%, 1 mol/L 的 MgSO₄ 0.2%, 1 mol/L 的 CaCl₂ 0.01%。LB 培养基: 酵母提取物(Oxoid 公司) 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L。生物被膜评价培养基: LB 液体培养基中添加 1 mmol/L 的 MgSO₄ 和 0.1% 葡萄糖。对于芽孢杆菌转化子的筛选和培养,在 LB 培养基中添加终浓度分别为红霉素(Ery) 1 μg/mL, 和壮观霉素(Spc) 100 μg/mL, 培养温度为 30°C。在突变诱导过程中,仅添加壮观霉素(Spc) 100 μg/mL。重组质粒在大肠杆菌中的筛选添加壮观霉素 100 μg/mL, 培养温度为 37°C。

1.1.4 引物: 测序及引物合成由英骏生物技术有限公司完成,鉴定用引物序列如下:

P1: 5'-GCCGCGTTGGCCGATTC-3'

P2: 5'-GATATTACGGTTTAC-3'

1.2 方法

1.2.1 感受态细胞的制备和电转化: 将芽孢杆菌单

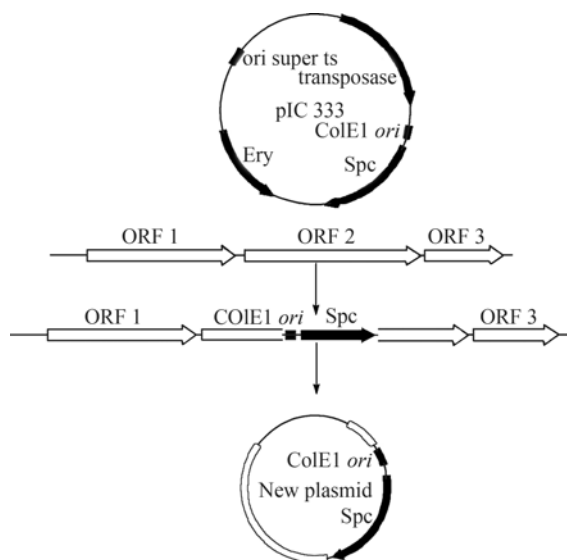


图 1 转座载体 pIC333 插入染色体 DNA 的示意图

Fig. 1 Insertion of pIC333 into chromosome

菌落接种于 5 mL 含 5 g/L 的甘氨酸的液体 M9-YE 培养基中, 于 30°C、200 r/min 振荡过夜培养; 再按 1:100 接种于 25 mL 含 5 g/L 甘氨酸的液体 M9-YE 培养基中, 于 37°C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 0.5 时终止; 4°C、6000 r/min 离心 10 min 收集菌体; 用 1/3 体积预冷的 EP 溶液洗涤细胞, 于 4°C、6000 r/min 离心 5 min 重新收集细胞; 用 1/50 体积预冷的 EP 溶液悬浮细胞, 冰上放置 1 h。

取 100 μ L 芽孢杆菌感受态细胞与 1 μ L pIC333 质粒(约 10 ng)混合后加入预冷的电转化杯(0.2 cm 规格)中, 使用 Micro pulser 电转化仪(Bio-Rad 公司)以 2 kV 电压电击, 然后加入 1 mL 于 30°C 保温的液体 M9-YE 培养基, 以 30°C、120 r/min 复苏 1 h 取 100 μ L 菌液涂布于 LB 固体培养基上, 30°C 倒置过夜培养, 进行转化菌落的计数与筛选。

1.2.2 突变库的构建: 挑取部分芽孢杆菌转化子提取质粒, 经验证含有 pIC333 质粒后制备甘油管, 保存于-70°C 以用于突变库的构建。取一只甘油管接种于 5 mL 液体 LB 培养基中 30°C 过夜培养。然后按 1:100 转接于 5 mL LB 液体培养基, 继续培养 3 h 进行突变诱导, 而后转移至 42°C 培养 4 h, 使未发生插入突变的质粒消除。将培养物进行 10^3 稀释后, 取部分菌液涂布于 LB 固体平板上, 30°C 培养 48 h, 筛选突变子。

由于生物被膜的形成需要胞外多糖的合成以及细胞运动相关基因的参与, 而这些基因的缺失或表达水平的改变亦可以影响菌落在固体平板上的生长形态^[7]。因此, 本文以 NK10.BAhjaWT 为对照, 通过菌落形态的差异进行生物被膜缺陷菌株的初步筛选。

1.2.3 生物被膜的评价: 应用结晶紫染色法, 对突变菌株在固相表面的成膜能力进行评价, 方法参照文献^[8], 将过夜培养物稀释到 OD_{600} 0.3, 取 1 μ L 加入到含有 99 μ L 液体 LB 培养基的 96 孔板中, 30°C 分别静置培养 24 h 和 48 h, 然后小心移去表面薄层和培养物, 每个孔用蒸馏水洗涤 2 次, 然后加入 150 μ L 浓度为 1% 的结晶紫对残留细胞和基质进行染色, 25 min 后用蒸馏水清洗 2 次, 加入 150 μ L DMSO 溶解吸附于生物被膜上的结晶紫, 然后测定其在 570 nm 下的吸光度。

1.2.4 基因的鉴定: 将突变株接种于液体 LB 培养基中 30°C 过夜培养, 提取基因组 DNA。然后采用 Hind III 对基因组 DNA 进行酶切消化(转座插入序列上没有

该酶的酶切位点), 形成一系列 DNA 片段。酶切产物经乙醇沉淀后进行自连, 将自连产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 转化产物涂布于 LB 固体平板筛选转化子。提取质粒后进行序列测定与同源性比对, 确定被插入失活的基因。

2 结果与讨论

2.1 转化效率检测与突变子的筛选

从 1 mL 转化细胞中取 100 μ L 涂布平板, 得到 156 个转化子, 故 pIC333 质粒的转化效率 = $156 \text{ CFU} \times 10 / 10 \text{ ng} = 1.56 \times 10^5 \text{ CFU} / \mu\text{g}$ 。

根据菌落形态与 NK10.BAhjaWT 相比较, 筛选出 4 株菌落形态发生较大差异的菌株 1~4#, 见图 2。1#菌株和 2#菌株的色素合成能力消失, 初步判断其呼吸链可能受到影响。3#菌株和 4#菌株的菌落较之于野生型菌落变得光滑, 褶皱消失, 可能是胞外多糖的合成能力受到弱化所致。

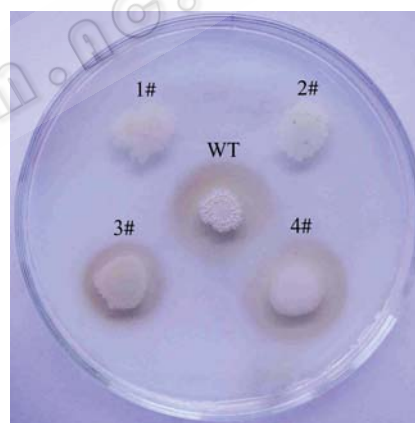


图 2 突变株的菌落形态

Fig. 2 Colony morphology of the mutants

2.2 生物被膜的评价

以 NK10.BAhjaWT 为对照, 分别对其生长 24 h 和 48 h 生物被膜生成量进行比较, 结果见图 3。与 NK10.BAhjaWT 相比, 突变株的生物被膜形成能力都显著降低, 大概为 NK10.BAhjaWT 的 50% 左右。在实验所采取的液体培养条件下, 菌株生长 48 h 后生物被膜合成量略高于生长 24 h 后的合成量, 但是差异不显著。

2.3 基因鉴定

对突变菌株的基因组片段进行克隆和测序, 与已公布的芽孢杆菌全基因组序列比对, 以确认插入片段在基因组中的位置和发生插入突变的基因, 结

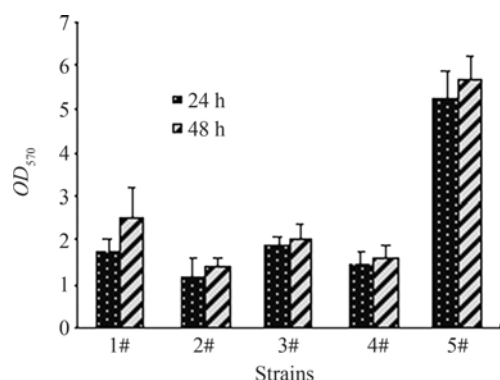


图3 突变株与野生型菌株的生物被膜生成能力比较

Fig. 3 Comparison of biofilm formation ability between the wide type strain and the mutants

果见表1。其中所列基因与NCBI所公布的相应基因的同源性都在95%以上,故认为是同一基因。*citB*、*citG*和*gpsA*三个基因的表达产物分别是乌头酸水合酶(EC 4.2.1.3),延胡索酸水合酶(EC 4.2.1.2)和3-磷酸甘油脱氢酶(EC 1.1.1.94),都是与碳源代谢相关的基因,这些基因的缺失,一方面会对细胞整体的能量代谢产生影响,使生长减弱;另一方面,生物被膜形成所需的胞外多糖和合成能力也会因为这些基因的缺失而减弱。其中乌头酸水合酶与真核蛋白IRP-1(iron regulatory protein 1)具有同源性,除了参与三羧酸循环的代谢过程,负责在有氧状态下的碳源代谢,其自身还是RNA结合蛋白,与离子响应元件(iron response elements, IREs)以及类似序列结合,其中包括色素氧化酶和离子摄入系统。从图2可以看出,1#菌株的色素合成能力基本丧失。该蛋白通过控制离子结合蛋白的表达,对芽孢杆菌生长后期的基因表达有调节作用,最终影响到生物被膜的形成^[9-12]。3-磷酸甘油脱氢酶的产物3-磷酸甘油酸是细胞膜合成和胞外多糖合成的重要前体物质,而胞外多糖则是形成生物被膜的主要成分。因此该酶的缺失直接影响到生物被膜的生成能力^[13]。3#突变株所发生插入突变基因*yvfB*的功能目前尚无明确报道,通过对该基因表达产物的蛋白序列比对发现,该蛋白与解淀粉芽孢杆菌的胞外多糖合成酶蛋白EpsK具有较高的同源性,酶蛋白EpsK属于*epsA-O*操纵子中*epsK*基因的转录产物,为解淀粉芽孢杆菌胞外多糖合成的关键酶之一,2006年Branda等人通过对*eps*基因簇进行缺失突变所得突变子的菌落形态扁平,生物被膜合成亦有显著降低^[14],与本文中3#突变株的菌落形态特征相似。

表1 发生插入突变的基因位置
Table 1 Transposon integration sites

菌株 Strain	基因 Gene	功能 Function	插入位置 Insertion site
1#	<i>citB</i>	顺乌头酸水合酶	ACGTA-Tn10-TACTTTA
2#	<i>citG</i>	延胡索酸水合酶	TGAAG-Tn10-ATGCGTG
3#	<i>yvfB</i>	可能为胞外多糖合成酶蛋白	CAAAG-Tn10-CATGCAA
4#	<i>gpsA</i>	3-磷酸甘油脱氢酶	AAAGA-Tn10-GGCTGTT

近年来,随着许多细菌基因组全序列的获得,人们关注的热点已经从结构基因组学转到对功能基因组的研究。通过反向遗传学手段,对基因组进行加工与修饰,使生物的表型和性状发生改变,从而达到对特定基因的功能认知。

当前,用于芽孢杆菌突变库的构建方法主要有人工Mu转座复合物、Tn917转座子以及本文中所采用的mini-Tn10转座插入3种方法。其中人工Mu转座插入的方法虽然具有随机单点插入的优点,但是由于转化效率较低,约为 10^2 CFU/ μ g,使得突变库容量成为难以突破的瓶颈。Tn917的转座插入机制与mini-Tn10相似,但是由于其自身序列长度在5 kb以上^[15],使以Tn917为基础构建的转座载体体积较大,如转座质粒pLTV3大小为22.1 kb^[16],影响该质粒在芽孢杆菌中的转化效率。并且由于Tn917的插入序列当中含有许多常见的酶切位点,这使得克隆得到含有完整插入序列的质粒非常困难,增加了突变基因的鉴定难度。与之相比,含有mini-Tn10的转座质粒pIC333整体大小仅为7 kb左右,转化效率可以提高到 10^5 以上。mini-Tn10的转座基因经过突变改造,使得其在转座插入的序列专一性大大降低,更有利于在全基因组上产生随机的突变^[17]。基于以上分析,含有mini-Tn10的pIC333质粒是研究芽孢杆菌的基因功能的有效工具。

突变库的构建为功能基因的鉴定提供了有力手段,但是由于插入突变往往可以引发极性效应,使插入位置下游的基因受到影响。因此,要想准确获得某一基因的功能信息还需要进行定点的敲除和互补工作。本文所筛选出的4个基因对于生物被膜形成的影响机制还需要进一步深入研究和探讨。

参 考 文 献

- [1] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 2000, **54**: 49–79.
- [2] Pratt LA, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol*, 1999, **2** (6): 598–603.
- [3] Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6** (3): 199–210.
- [4] Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, *et al*. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate. *Microbiology*, 2006, **152** (Pt 9): 2801–2807.
- [5] Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, *et al*. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, **322**: 1–16.
- [6] Steinmetz M, Richter R. Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome. *J Bacteriol*, 1994, **176** (6): 1761–1763.
- [7] Branda SS, Gonzalez-Pastor JE, Dervyn E, *et al*. Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2004, **186** (12): 3970–3979.
- [8] Lazarevic V, Soldo B, Medico N, *et al*. *Bacillus subtilis* alpha-phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (1): 39–45.
- [9] Serio AW, Pechter KB, Sonenshein AL. *Bacillus subtilis* aconitase is required for efficient late-sporulation gene expression. *J Bacteriol*, 2006, **188** (17): 6396–6405.
- [10] Craig JE, Ford MJ, Blaydon DC, *et al*. A null mutation in the *Bacillus subtilis* aconitase gene causes a block in Spo0A-phosphate-dependent gene expression. *J Bacteriol*, 1997, **179** (23): 7351–7359.
- [11] Nakano MM, Zuber P, Sonenshein AL. Anaerobic regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *J Bacteriol*, 1998, **180** (13): 3304–3311.
- [12] Alen C, Sonenshein AL. *Bacillus subtilis* aconitase is an RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (18): 10412–10417.
- [13] Nishibori A, Kusaka J, Hara H, *et al*. Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. *J Bacteriol*, 2005, **187** (6): 2163–2174.
- [14] Branda SS, Chu F, Kearns DB, *et al*. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol*, 2006, **59** (4): 1229–1238.
- [15] Shaw JH, Clewell DB. Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 1985, **164** (2): 782–796.
- [16] Camilli A, Portnoy A, Youngman P. Insertional mutagenesis of *Listeria monocytogenes* with a novel Tn917 derivative that allows direct cloning of DNA flanking transposon insertions. *J Bacteriol*, 1990, **172** (7): 3738–3744.
- [17] Bender J, Kleckner N. IS10 transposase mutations that specifically alter target site recognition. *Embo J*, 1992, **11** (2): 741–750.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年,是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及高新技术创新、应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究;农业微生物学研究;工业微生物学研究;医学微生物学研究;食品微生物学研究;环境微生物学研究;微生物功能基因组研究;微生物蛋白组学研究;微生物模式菌株研究;微生物工程与药物研究;微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖,2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,更换了彩色封面,纸张改用铜版纸,由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本(210×297),发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2009 年的每册定价为 48 元,全年 576 元,我们将按期免费邮寄。

另,本刊编辑部现存有少量过期期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系,获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: (010)64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; http://journals.im.ac.cn

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413