

## 利用转座子将 *parDE* 与 pCPP430 体内重组 提高生防工程菌的遗传稳定性\*

张 丽 申 泉 赵立平\*\*

(山西大学生物技术研究所 太原 030006)

**摘 要:**带有梨火疫欧氏杆菌(*Erwinia amylovora*)完整的 *hrp* 基因簇的重组粘粒 pCPP430 转化到植物的附生菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)308R 中后可以使成团泛菌获得在烟草等植物上引发过敏反应和诱导植物抗病性的能力。pCPP430 携带着约 40kb 的梨火疫欧氏杆菌的染色体 DNA,在成团泛菌 308R 中不能稳定遗传。本文首先把广宿主范围质粒 RK2 的控制质粒稳定性的 *parDE* 片段插入到转座载体 pUT/mini-Tn5 Km 的唯一克隆位点 *NotI* 上,然后利用 Tn5 的转座特性,将 *parDE* 体内重组到 pCPP430 上,经过在无抗生素选择压下反复传代和过敏反应活性测定,筛选到了遗传稳定性显著提高的重组生防工程菌。

**关键词:**过敏反应,质粒稳定性, *parDE*, 转座子, pUT/mini-Tn5 Km

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 06-0662-07

重组粘粒 pCPP430 携带着约 40kb 的梨火疫病病菌(*Erwinia amylovora*)的功能完整的 *hrp* 基因簇,它编码的 harpin 蛋白可以诱发非寄主植物的过敏反应,进而诱导出系统性抗病性<sup>[1-3]</sup>。我们通过电击转化的方法将 pCPP430 转入成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)308R 中,构建了可以表达过敏素(harpin)的生防工程菌 308R(pCPP430)<sup>[4]</sup>,但是发现该质粒在 308R 中不能稳定遗传<sup>[5]</sup>。在构建生防工程菌时,希望重组质粒在没有选择压的情况下具有稳定遗传的性质,这样的工程菌在田间使用时,可增强生防效果,而且在大规模发酵生产时可以不使用抗生素,不仅降低了生产成本,还减少了对环境的污染<sup>[6]</sup>。

广宿主范围质粒 RK2 与保证质粒正确分配有关的基因已被克隆在 3.2kb 的片段上,其中 0.8kb 的 *parDE* 可使多种异源质粒在苜蓿根瘤菌中稳定,特别是从根瘤中回收的细菌可以 100%带着质粒<sup>[7]</sup>。该片段还可以使不同复制子的质粒在大肠杆菌和成团泛菌中稳定遗传<sup>[8]</sup>,这些结果显示了 *parDE* 片段可使植物细菌中的质粒稳定遗传的潜力。但是,由于难以找到唯一的酶切位点,利用常规的克隆手段将 *parDE* 插入分子量约为 50kb 的质粒 pCPP430 中困难较大。pUT/mini-Tn5 Km<sup>[9]</sup>是 Tn5 的一个衍生物。利用转座子 pUTmini-Tn5 Km 的转座特性将 *parDE* 体内重组到 308R(pCPP430)的质粒 pCPP430 中来提高它的遗传稳定性,同时保留了它的产 harpin 的能力。

\* 国家“863”生物技术计划(863-101-03-02-02)国家自然科学基金(39770509)资助

\*\* 通讯联系人

作者简介:张 丽(1973-),女,山西晋中市人,山西大学生物技术研究所硕士,主要从事分子生物学研究。

收稿日期:2001-01-18,修回日期:2001-06-11

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

本研究所用的菌株与质粒的特性和来源见表 1。

表 1 菌株与质粒的特性和来源  
Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype	Source
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>sup</i> E44 $\Delta$ <i>lac</i> U196( $\phi$ 80 <i>lac</i> Z $\Delta$ M15) <i>rec</i> A <i>end</i> A Nx <sup>r</sup>	Laboratory collection
<i>E. coli</i> S <sub>17-1/</sub> <i>Apr</i>	<i>rec</i> A <i>thi</i> <i>pro</i> <i>had</i> R <sup>-</sup> M <sup>+</sup> lysogenized with RP4, Sm <sup>r</sup>	Prof. Zhang Jie
<i>P. agglomerans</i> 308R	Spontaneous rifampicin-resistant mutant	Laboratory collection
<i>E. coli</i> MM294(pRK2013)	Triparental mating helper	Prof. Zhou Junchu
pCPP430	Cosmid clone of <i>hrp</i> genes cluster, Sp <sup>r</sup>	Wei <i>et al.</i> , 1992
pTR102	Recombinant with <i>parDE</i>	Prof. Zhou Junchu
pUT/mini-Tn5 Km	Derivative of Tn5, Km <sup>r</sup>	Prof. Zhang Jie
pTP	<i>parDE</i> inserted in pGEM-T, Amp <sup>r</sup>	This study
pTnp	<i>parDE</i> inserted in <i>Not</i> I site of PUTmini-Tn5 Km, Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	This study
pRTnp	pCPP430 <i>in vitro</i> recombinant with <i>parDE</i> , sp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	This study

### 1.2 培养基与试剂

细菌生长、传代和临时保存使用 LB 培养基;抗生素购自华美生物工程公司,使用浓度:卡那霉素(Km)30 $\mu$ g/mL,利福霉素(Rm)300 $\mu$ g/mL,氨基青霉素(Amp)100 $\mu$ g/mL,壮观霉素(Sp)40 $\mu$ g/mL,链霉素(Sm) $\mu$ g/mL,萘啶酮酸(Nx)15 $\mu$ g/mL;各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、以及琼脂糖、dNTP 等生化试剂均购自 Promega 公司。

### 1.3 实验技术

**1.3.1 分子克隆技术:**采用碱裂解法进行质粒的小规模提取和重组子检测,用 Wizardplus Midipreps(Promega)DNA 纯化试剂盒进行质粒的中规模提取,DNA 的切割、连接、转化等重组过程采用标准方法[10]。根据 GenBank 中登录的 *parDE* 的序列设计引物,以 pTR102 为模板扩增该片段,引物序列如下:

正向引物 Par3:5' TATAGCGGCCGCGCGTCCCCCTTGGTCAAAT3';

反向引物 Par4:5' TATAGCGGCCGACAGTACGCCATCAGGACGT3'。

两个引物中各包含了一个 *Not*I 切点(见下划线部分)。

PCR 反应体系:ddH<sub>2</sub>O 16.5 $\mu$ L,200 $\mu$ mol/L dNTPs 2 $\mu$ L,10 $\times$  缓冲液 2.5 $\mu$ L,25mmol/L Mg-Cl<sub>2</sub> 2 $\mu$ L,50pmol/ $\mu$ L 引物 P<sub>1</sub> 0.5 $\mu$ L,50pmol/ $\mu$ L 引物 P<sub>2</sub>,0.5 $\mu$ L,100ng/ $\mu$ L 模板 0.5 $\mu$ L,5U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 0.4 $\mu$ L,矿物油 20 $\mu$ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C,变性 4min,94 $^{\circ}$ C,1min,50 $^{\circ}$ C,2min,72 $^{\circ}$ C,3min,共 25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

**1.3.2 转座接合实验<sup>[9]</sup>:**在含有相应抗生素的 LB 培养基中过夜培养受体菌 308R (pCPP430)(Sp, Rm, 28 $^{\circ}$ C)和带有 mini-Tn5-*parDE* 的供体菌 S<sub>17-1/</sub>*Apr* (pTnp) (Sm, Amp, Km, 37 $^{\circ}$ C)。分别取每一种培养物各 1mL,离心后用灭菌的 10mmol/L MgSO<sub>4</sub> 等体积重悬,各取

100 $\mu$ L 菌液混匀,滴于 LB 平板上的 0.45 $\mu$ m 的滤膜中央,放置 0.5 ~ 1.0h,待液体基本渗干,将平板置于 28 $^{\circ}$ C 培养 8 ~ 12h。将滤膜上生长的细胞用灭菌的 5mL 10mmol/L MgSO<sub>4</sub> 洗下后用于筛选稳定性提高的突变体。

**1.3.3 利用稳定性筛选 308R(pRTnp):**将转座接合实验中滤膜上生长的细胞用灭菌的 10mmol/L MgSO<sub>4</sub> 洗下后,转接于含有 Rm Km Sp 的 5mL 液体 LB 中,然后每隔 24h 按 10% 的菌量转接于只含 Rm Km 的 5mL 液体 LB 中,进行传代培养。按[11]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。

**1.3.4 利用过敏反应活性筛选 308R(pRTnp)<sup>[11]</sup>:**随机选取分裂 200 代后用于菌落计数的带有质粒抗药性标记的单菌落,接种于含有 Rm Km Sp 的 5mL 液体 LB 中 28 $^{\circ}$ C 培养过夜,按 2% 菌量转接后继续培养,生长到 OD<sub>600</sub>0.8 时,进行过敏反应活性测定:离心收集 1mL 菌体,用 5mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.5)洗一次,然后重新悬浮到 0.5mL 的 5mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.5)中。用针在番茄叶面扎小孔,将菌液吸入无菌无针的注射器内,用手指垫在小孔背面,注射器口贴紧小孔正面,缓缓将菌液挤入叶肉细胞间隙中,注射部位应出现水渍斑。16h 后观察接种部位枯斑反应情况。有过敏反应活性的部位会变黄,枯死。

**1.3.5 三亲交配实验<sup>[12]</sup>:**分别挑取帮助菌 *E. coli* MM294(pRK2013),供体菌 308R(pRTnp),受体菌 DH5 $\alpha$  三种菌的单菌落,37 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 培养 16h,菌体分别离心,用液体 LB 培养基洗一次,再重悬于 LB 中,分别取三种菌 20 $\mu$ L 混匀,滴于 LB 平板上的 0.45 $\mu$  的滤膜中央,放置 0.5 ~ 1.0h,待液体基本渗干,将平板于 37 $^{\circ}$ C 静置培养 24h。将滤膜上生长的细胞梯度稀释后涂布于含相应抗生素(Nx Km Sp)的平板上,所得单菌落即为三亲交配后的接合子。

**1.3.6 主要技术路线:**见图 1。

## 2 结果和分析

### 2.1 *parDE* 片段的克隆及其与转座载体 pUT/mini-Tn5 Km 的重组

我们根据 GenBank 中登录的 790bp 的 *parDE* 基因序列设计了引物 Par3 和 Par4,分别包括了编码链和互补链 5' 端以下 19bp 和 18bp 序列,另外各增加了包含 *NotI* 识别位点在内的 12bp 序列,以便在扩增出的目的片段上下游各外挂 1 个 *NotI* 切点。用 pTR102 的 DNA 为模板,Par3 和 Par4 作引物扩增出了 814bp 的目的片段,经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收后与 pGEM-T 载体 DNA 连接,转化 DH5 $\alpha$ ,通过质粒提取、酶切,鉴定出重组质粒 pTP。*NotI* 切割 pTP DNA,低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 0.8kb 的片段,与经同一酶切、CIP 脱除 5' 磷酸基团的 pUT/mini-Tn5 Km DNA 连接后转化 *E. coli* S<sub>17-1/</sub> $\Delta$ <sub>pir</sub>,通过质粒提取、酶切,鉴定出重组质粒 pTnp,经酶切物理图谱分析和 PCR 扩增(图 2),证明确切无误。

### 2.2 *parDE* 片段与 pCPP430 的体内重组、筛选

*parDE* 片段插入到转座质粒载体 pUT/mini-Tn5 Km 的转座基因中唯一的 *NotI* 克隆位点,得到重组质粒 pTnp,通过电击法转化到 *E. coli* S<sub>17-1/</sub> $\Delta$ <sub>pir</sub> 中。以 308R(pCPP430)为受体菌,S<sub>17-1/</sub> $\Delta$ <sub>pir</sub> (pTnp)为供体菌进行转座接合,两种菌混匀并在滤膜上培养过夜后,膜上生长

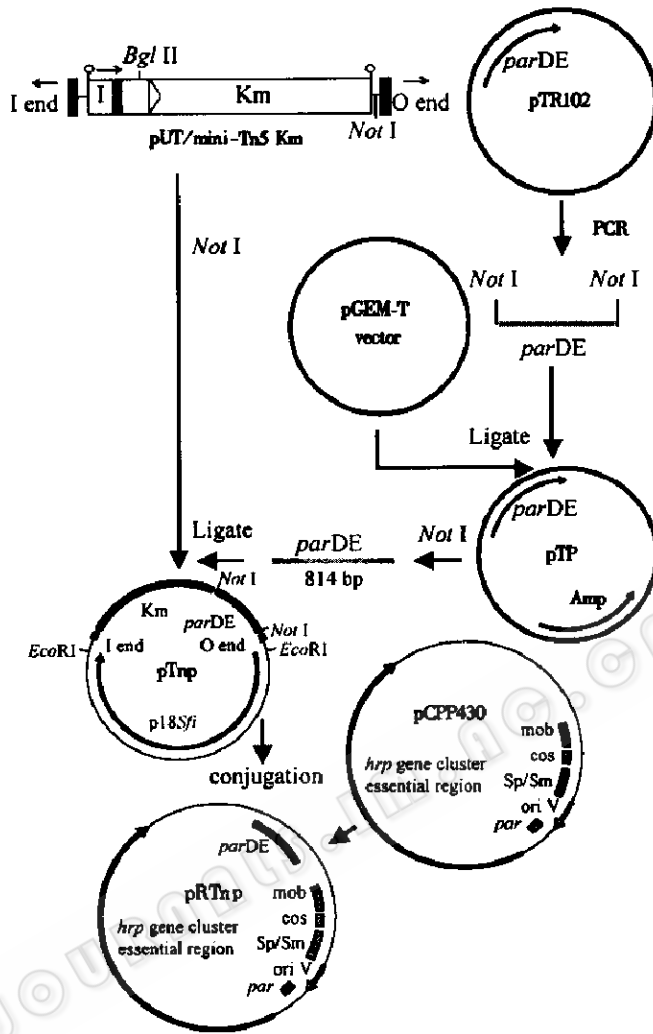


图 1 主要技术路线

Fig.1 Main routing

的菌体用  $MgSO_4$  溶液洗下,将混合的菌体直接转接于含相应抗生素的液体 LB 中进行连续传代实验,利用 *parDE* 的稳定特性筛选 pCPP430 中插入了 *parDE* 的转座突变株,同时设 308R(pCPP430)为阴性对照。生长 100 代后,带有质粒 pCPP430 的 308R 菌量不到总菌量的 1%,接合子混合菌体中带有质粒 pTnp 的菌量占总菌量的 64%(图 3)。

混合菌体生长 200 代后,随机挑选抗性平板上生长的单菌落测定其过敏反应活性。共选取 200 个,注射番茄叶片,24h 后观察发现,200 个突变株中共有 24 个突变株有过敏反应枯死斑,图 4 中显示了部分筛选结果。

### 2.3 带有 *parDE* 的转座突变质粒 pRTnp 的分子验证

**2.3.1 重组质粒 pRTnp 在 308R 中的分子验证:**将通过稳定性和过敏反应活性筛选出的 24 个突变株分别提取质粒,并以所提质粒为模板,Par3、Par4 为引物进行 PCR 反应,PCR 反应退火温度由 50℃改为 60℃,特异性扩增出与 *parDE* 片段大小相同的条带。以地高辛标记的 *parDE* 作为探针,与 PCR 产物进行杂交,结果全部为阳性。

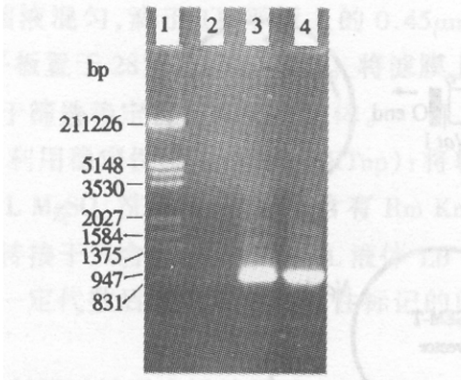


图2 质粒 pTnp 的 PCR 验证

Fig.2 PCR of plasmid pTnp

1. *EcoRI* + *HindIII*; 2. Negative Control; 3. Positive Control; 4. *parDE* PCR Product (pTnp as Template).

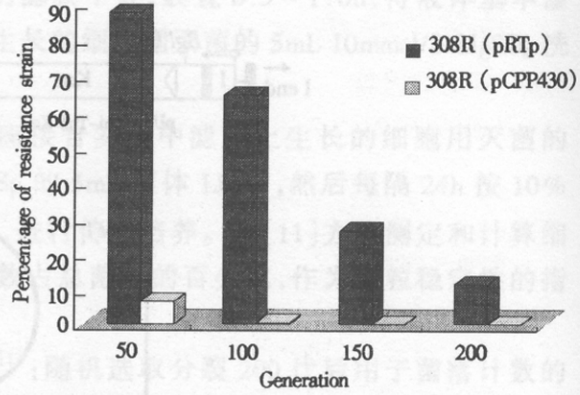


图3 筛选 308R(pRTnp)的传代稳定性

Fig.3 Conjugator screened by genetic stability



图4 利用过敏反应筛选接合子(箭头所示为过敏反应枯死斑)

Fig.4 Conjugator screened by hypersensitive response

*NotI* 克隆位点,这一酶切序列在大多情况下出现频率都很低,允许使用者较方便地克隆所需的 DNA 片段。我们为了将 *parDE* 插入这一位点,重新设计了两端分别带有 *NotI* 切点的引物 Par3、Par4。现在已经构建出 mini-Tn5 的一系列其它衍生物,除了单一的 *NotI* 位点外,在转座单元内含有一个 MCS<sup>[13]</sup>,这样,转座子对 G<sup>-</sup> 细菌的插入诱变将更加广泛和简单。

我们利用 *E. coli* S<sub>17-1</sub>/*Δpir* (pTnp) 和 308R(pCPP430) 进行转座接合实验时,不用抗性平板筛选,而是通过稳定性和过敏反应活性筛选突变株,是由于 S<sub>17-1</sub>/*Δpir* 抗 Sm, pCPP430 抗 Sp,

2.3.2 重组质粒 pRTnp 通过三亲交配法转移到 DH5α 中的分子验证:从 24 个突变株中随机选取 5 个菌株,它们是 308R (pRTnp40, 60, 120, 169, 200),通过三亲交配的方法将它们所带重组质粒转移到具有萘啶酮酸抗性 (Nx<sup>r</sup>) 的 DH5α 中,利用 Nx Km Sp 抗性筛选接合了 DH5α(pRTnp)。5 个菌株中有 3 个得到了接合子,它们是 DH5α (pRTnp120, 169, 200)。我们对其中 2 个接合子进行质粒的中规模提取,分别 *Bam*HI 酶切作为模版进行 *parDE* 的扩增,并以地高辛标记的 *parDE* 作为探针,对两个质粒及其 PCR 产物进行了 Southern Blotting 验证(图 5)。

### 3 讨论

转座载体 pUT/min-Tn5 Km 在其构建过程中,就在转座基因内部设计了一个唯一的

这两种抗性是由同一基因编码的,如果用 SpKm 抗性平板筛选 pCPP430 中插入了 *parDE* 的突变株,则不能反选掉供体菌 *E. coli* S<sub>17-1/Δpir</sub> (pTnp)。因此,只能利用除抗生素抗性外的 DNA 的其它特性进行筛选,我们选择了 *parDE* 提高质粒稳定性的特性和 pCPP430 中 *hrp* 基因簇的过敏反应活性来筛选我们需要的转座突变体。

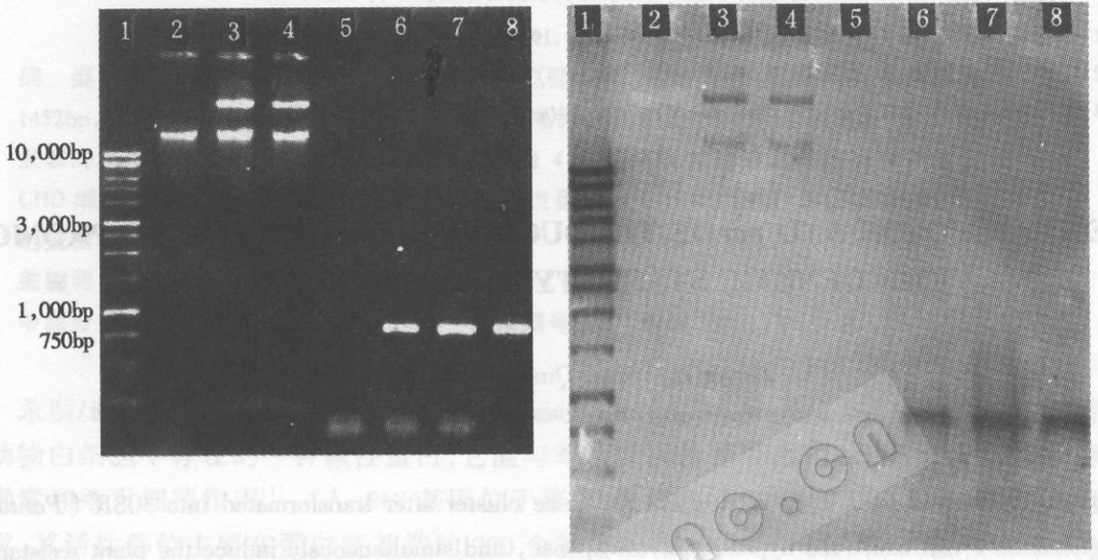


图5 遗传稳定性提高的转座突变体 pRTnp 的 PCR 及 Southern blotting 杂交验证

Fig.5 PCR and Southern blotting of increased stability plasmid pRTnp

1. 1kb Ladder; 2. pCPP430; 3. pRTnp 120; 4. pRTnp169; 5. pCPP430 BamHI digestion; 6. PCR product with pTR102 as template; 7~8. PCR products with pRTnp120 and pRTnp169 as templates.

从 200 个遗传稳定的突变体中共选出 24 个有过敏反应活性的,分子验证表明 *parDE* 片段已经在 pCPP430 上。

为了进一步证明重组菌的正确性,选择有独特抗性标记的 DH5α(Nx<sup>r</sup>)作为受体菌,利用三亲交配方法将得到的突变体 pRTnp 转入 DH5α(Nx<sup>r</sup>)中,抗生素选用 Nx Km Sp,如果能够得到接合子,此实验本身就证明 pCPP430 中插入了带有 Km 抗性的转座基因,也就是插入了 *parDE* 片段。此外,从 PCR 产物、质粒及酶切的 Southern blotting 的结果可见, *parDE* 确实插入了质粒 pCPP430 中,有待于进一步探讨的是它的准确定位。

综上所述,我们得到了几株既有过敏反应活性而遗传稳定性又显著提高的工程菌 308R(pRTnp),可以根据 *parDE* 的准确定位、它们的遗传稳定性高低以及活性强弱选择一或两株效果最好的工程菌进行发酵及田间实验。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Zhongmin Wei, Laby R J, Zumoff C H, et al. *Science*, 1992, 257: 85 ~ 88.  
 [ 2 ] Zhongmin Wei, Steven V. Beer Proceedings of the 5th International Workshop on Fireblight. University of Brock, Toronto, Canada, August 1st ~ 7th, 1995.  
 [ 3 ] 赵立平,梁元存,刘爱新,等.高技术通讯,1997,7(9):1~4.  
 [ 4 ] 赵立平,申 泉,李艳琴,等.植物病理学报,1999,29(2):142~146.  
 [ 5 ] 李艳琴,宁红秀,申 泉,等.微生物学通报,1999,26(2):400~403.

- [ 6 ] 李永红,王二力,俞俊棠,等.生物工程学报,1988,4(2):81~86.
- [ 7 ] Weinstein M, Roberts R C, Helinski D R, *et al.* *J Bacteriology*, 1992,174(22):7486~7489.
- [ 8 ] 赵立平,张丽,李艳琴,等.中国生物防治,1999,15(2):49~53.
- [ 9 ] Victor D L, Marta H, Ute J, *et al.* *J Bacteriology*, 1990,172(11):6568~6572.
- [ 10 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 11 ] Gerlitz M, Hrabak O, Schwab H, *et al.* *J Bacteriology*, 1990,172(11):6194~6203.
- [ 12 ] 杨苏声,吴拙如,高为民,等.生物工程学报,1993,9(3):193~197.
- [ 13 ] Alexeyev M F, Shokolenko I N, Croughan T P. *Can J Microbiol*, 1995,41:1053~1055.

## USE TRANSPOSON AND *parDE* THROUGH *IN VIVO* CLONING TO PROMOTE THE GENETIC STABILITY OF PLASMID pCPP430\*

Zhang Li Shen Quan Zhao Liping\*\*

(*Institute of Biotechnology Shanxi University, Taiyuan 030006, China*)

**Abstract:** Plasmid pCPP430 carrying the *hrp* gene cluster after transformed into 308R (*Pantoea agglomerans*) can cause the hypersensitive response, and simultaneously induce the plant resistance to disease. It was genetically unstable in *P. agglomerans*. 0.8kb *parDE* region of the broad-host range plasmid RK2 is responsible for plasmid partition. It can mediate plasmid maintenance of many kinds in *Rhizobium meliloti*, and also can promote the genetic stability of recombinant plasmid in the biocontrol bacteria *P. agglomerans*. In this paper, we cloned *parDE* into pCPP430 *in vivo* through transposition to promote its genetic stability. *parDE* was amplified by PCR, inserted into pGEM-T vector and cut out and religated to *Not*I-cut transposon vector pUT/mini-Tn5 Km to get a *parDE* containing mini-Tn5, pTnp. After conjugation between S<sub>17-1/λpir</sub> (pTnp) and 308R (pCPP430), *parDE* was cloned *in vivo* into plasmid pCPP430 to obtain pRTnp. It was demonstrated that the insertion of *parDE* in pCPP430 increased significantly the plasmid's stability in *P. agglomerans*.

**Key words:** Hypersensitive response, Stability of plasmid, *parDE*, Transposon, pUT/mini-Tn5 Km

\* Project of China National Programs for High Technology Research and Development (863-101-03-02-02) and National Natural Foundation of China(39770509)

\*\* Corresponding author