

多粘类芽胞杆菌 SC2 基因敲除体系的建立

张文娣, 丁延芹, 姚良同, 刘凯, 杜秉海*

山东农业大学生命科学学院, 山东省农业微生物重点实验室, 泰安 271018

摘要: 【目的】建立多粘类芽胞杆菌 SC2 的基因敲除体系。【方法】利用电转化把温敏型自杀质粒 pRN5101 导入到多粘类芽胞杆菌 SC2 中。采用基因重组技术敲除 SC2 中的多粘菌素基因 E (*pmxE*), 得到突变株 SC2-E。利用抗细菌性能检测和高效液相色谱分析合成多粘菌素的能力, 来证实 *pmxE* 基因是否被敲除。【结果】成功构建了多粘类芽胞杆菌 SC2 的基因敲除体系。pRN5101 转入 SC2 后能够在 28℃ 复制, 39℃ 自杀。突变株失去了合成多粘菌素的能力, 成功敲除 *pmxE* 基因, 验证了此体系的可用性。【结论】首次构建了多粘类芽胞杆菌的基因敲除体系, 拓展了 pRN5101 的使用范围, 为研究多粘类芽胞杆菌的基因功能提供了高效的遗传操作工具。

关键词: 多粘类芽胞杆菌, pRN5101, 基因敲除, 多粘菌素基因 E

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 12-1258-09

多粘类芽胞杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 广泛存在于土壤等生态环境中, 具有抗菌谱广、促进植物生长等特性, 是农用生防微生物的重要资源^[1-3]。朱辉等^[4]从辣椒根际筛选到一株多粘类芽胞杆菌 SC2 菌株, 对辣椒根腐病原菌 (*Fusarium solani*)、黄瓜枯萎病原菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 等植物病原菌具有良好的拮抗性能, 已广泛应用于农业生产中。Ryu 等^[5]报道了一株分离自冬小麦根际土壤的多粘类芽胞杆菌 E681, 对终极腐霉菌 (*Pythium ultimum*)、水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 等病原菌有很好的拮抗效果; Kharbanda 等^[6]由油菜残株上分离的多粘类芽胞杆菌 PKB1, 对黑胫病原菌 (*Leptosphaeria maculans*) 有很好的拮抗效果。

近年来, 陆续有一些关于多粘类芽胞杆菌生防

作用分子机制的报道。Li 等^[7]和 Choi 等^[8]分别通过构建 cosmid 和 fosmid 文库的方法对抗真菌物质 Fusaricidin 的合成基因 *fusA* 进行敲除得知基因的功能。Choi 等^[9]利用 fosmid 文库和在枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中异源表达的方法鉴定了抗细菌物质多粘菌素 (Polymyxin) 合成基因簇 *pmxABCDE*。构建 cosmid、fosmid 基因组文库操作复杂, 费用高, 容易导致失败; 异源表达的方法要求条件苛刻, 使用范围较窄, 限制性较强。所以需要更加简便高效的方法鉴定基因功能。

随着高通量基因组测序技术的快速发展, 基因组学方法已经用于多粘类芽胞杆菌作用分子机制的研究。Kim 等^[10]完成了多粘类芽胞杆菌 E681 的全基因组测序工作, 基因组大小为 5.4 Mb, 合成可能的抑菌物质有 Fusaricidin, Polymyxin, lantibiotic 等。

基金项目: 国家自然科学基金 (31100005); “十二五”国家科技支撑计划 (2011BAD11B01)

* 通信作者。Tel: +86-534-8247806; E-mail: du_binghai@163.com

作者简介: 张文娣 (1988 -), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物方向的研究。

收稿日期: 2013-04-22; **修回日期:** 2013-05-17

王翠翠等^[1]完成了多粘类芽胞杆菌 SC2 的基因组测序,基因组大小为5.7 Mb,还含有一个0.5 Mb的质粒。基因组注释信息及代谢网络分析显示,SC2 不仅可能产生 Fusaricidin, Polymyxin, Lanthionine, Microcystin, Bacillorin, IturinA, Bacitracin, Gramicidin S 等多种抗生素,还可能合成生长素等植物促生物质。SC2 中还大量未知功能的基因,占到基因总数的五分之一。多粘类芽胞杆菌 SC2 的基因组数据信息为研究其作用分子机制提供了便利,但是由于缺乏高效的基因敲除体系,给基因功能鉴定工作带来困难。

pRN5101 质粒是温敏型自杀质粒,同时也是穿梭质粒,能够在低 GC 含量的革兰氏阳性细菌和大肠杆菌中复制^[12]。可以将外源基因克隆到 pRN5101 上,利用抗性盒将目标基因进行体外敲除,

再将携带有突变基因的重组质粒转移到受体细胞中,进行同源重组,筛选基因敲除突变株。

本文研究了 pRN5101 对多粘类芽胞杆菌 SC2 的转化条件;以多粘菌素合成的关键基因 *pmxE* 为目标基因,以氯霉素抗性盒作为筛选标记,构建重组质粒,转化 SC2 菌株,进行基因敲除试验,获得敲除突变株。并通过菌落 PCR 扩增,大肠杆菌拮抗试验以及高效液相色谱 (HPLC) 分析,检验基因敲除系统的可用性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所用菌株与质粒见表 1。

表 1. 菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain/Plasmid	Relevant characteristic and usage	Source
<i>P. polymyxa</i> SC2	wild type strain	this laboratory
<i>P. polymyxa</i> SC2-E	<i>pmxE</i> mutant, <i>pmxE</i> ::Cm, Cm ^r	this study
<i>E. coli</i> DH5 α	used for cloning of pMD18-T	TaKaRa
<i>E. coli</i> JM109	used for cloning of pRN5101	this laboratory
<i>E. coli</i> SCS110	used for demethylation of pRN5101	Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agriculture Sciences
pRN5101	<i>Bacillus thuringiensis</i> - <i>E. coli</i> shuttle, temperature-sensitive plasmid, Amp ^r , Ery ^r	Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agriculture Sciences
pRN5101-EC	pRN5101 having <i>pmxE</i> gene disrupted by Cm-cassette, Amp ^r , Ery ^r , Cm ^r	this study
pDG1661	carrying Cm cassette, Amp ^r , Spe ^r , Cm ^r	Institute for Biophysical Chemistry, Pierre et Marie Curie, Paris, France
pMD18-T	T-A cloning vector, Amp ^r	TaKaRa
pMD18-TPE	PCR product of <i>pmxE</i> cloned into pMD18-T, Amp ^r	this study
pMD18-TEC	Cm-cassette in <i>Bgl</i> III and <i>Mlu</i> I site inserted into <i>pmxE</i> of pMD18-T, Amp ^r , Cm ^r	this study

1.1.2 酶和生化试剂: KOD-Plus-Neo 高保真 DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司, *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, *Hind* III、*Bam*H I、*Mlu*I、*Bgl*III 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 ThermoFisher 公司, 红霉素 (Ery, 6 μ g/mL)、氯霉素 (Cm, 5 μ g/mL, 15 μ g/mL) 购自北京索来宝科技有限公司, 多粘菌素 B (PMB, 1 mg/mL) 购自 Dr. Ehrenstorfer 公司, DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。

1.2 培养基和培养条件

多粘类芽胞杆菌 SC2 及 SC2-E 的培养和筛选

使用 LB 培养基,培养温度 37 $^{\circ}$ C 和 39 $^{\circ}$ C。大肠杆菌的培养使用 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 下培养。抗菌性能检测中多粘菌素发酵使用种子培养基和发酵培养基^[13],LB 固体培养基和半固体培养基。

1.3 多粘类芽胞杆菌 SC2 感受态细胞的制备及质粒 pRN5101 的电转化

1.3.1 分光光度计法测定多粘类芽胞杆菌 SC2 的生长曲线: 将 SC2 接种于 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养活化;以 5% (V/V) 的接种量分别接种到 15 个含 50 mL LB 液体培养基 (含 0.5 mol/L 山梨醇, pH7.0) 的三角瓶中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 下培养;分别按

对应时间将三角瓶取出,立即放冰箱中贮存,待培养结束时一同测定 *OD* 值。将未接种的 LB 培养基 (0.5 mol/L 山梨醇) 倒入比色杯中,选用 660 nm 波长上调节零点,作为空白对照,并对不同时间培养液依次进行测定,对浓度大的菌悬液用未接种的含 0.5 mol/L 山梨醇的 LB 液体培养基适当稀释后测定,使其 *OD* 值在 0.10 - 0.65 以内,经稀释后测得的 *OD* 值要乘以稀释倍数,才是培养液实际的 *OD* 值。将所测的 *OD* 值与其对应的培养时间作图,绘出 SC2 在此条件下的生长曲线。

1.3.2 SC2 感受态细胞的制备: 将 SC2 接种于 LB 液体培养基中,37°C 过夜培养;以 5% (V/V) 的接种量转接到 50 mL 含 0.5 mol/L 山梨醇的 LB 液体培养基中,37°C 摇菌;当 $OD_{660} = 0.70 - 0.95$ 时,停止培养,冰上放置 10 min, 5000 × g 离心 5 min; 使用 Solution A (0.5 mol/L 山梨醇 + 0.5 mol/L 的甘露醇 + 10% 的甘油) 洗涤菌体 4 次;用 1 mL 的 Solution A 重悬细胞,分装成 60 μL/管, -80°C 保存。

1.3.3 电转化: 取 1 μL 的 pRN5101 (50 ng/μL) 加入 60 μL 的 SC2 感受态细胞中,把混合液转移到 0.1 cm 的电击杯中,冰上放置 1 - 3 min,电击,参数为 2.2 kV, 4 - 5 ms, 然后加入 1 mL 的 Solution B (含 0.5 mol/L 的山梨醇和 0.38 mol/L 的甘露醇的 LB 液体培养基), 28°C 摇床培养 3 - 4 h 后涂布于含 Ery (6 μg/mL) LB 培养基上, 28°C 培养 48 h。

1.4 *pmxE* 部分基因片段和 Cm 抗性盒的 PCR 扩增与 DNA 测序

对 SC2 中的 *pmxE* 基因在 NCBI 上进行比对,选择 *pmxE* 基因编码区中特异性很强且不与 SC2 基因组其他序列同源的一段设计引物,上下游引物分别为 mxEF 和 mxER,产物长度为 1415 bp。氯霉素基因的扩增以 pDG1661 为模板,上游引物 CmF 5'端加上 *Mlu* I 酶切位点,下游引物 CmR 5'端加上 *Bgl* II 酶切位点,产物长度 1203 bp,引物序列见表 2,表 2 中下划线表示酶切位点。

PCR 反应体系 (50 μL): 10 × PCR buffer for KOD-Plus-Neo 5 μL, 2 mmol/L dNTPs 5 μL, 25 mmol/L MgSO₄ 3 μL, SC2 genome DNA 200 ng, 10 μmol/L Primer F 1.5 μL, 10 μmol/L Primer R 1.5 μL, KOD-Plus-Neo 1 μL, ddH₂O 32 μL。反应条件: 94°C 2 min; 98°C 10 s, Tm 30 s, 68°C 90 s, 30 个循环。在 PCR 结束后加入 0.5 μL *Taq* DNA 聚合

酶和 3 μL dNTPs 添加 dA 尾巴。将上述两种扩增产物连接到 pMD18-T 载体上,送样测序。

表 2. 本研究所用引物

Table 2. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size/bp
mxEF	CGAAATGTCCAGGAGCAG	18
mxER	AGGTAGAAGCAGACCGTGAG	20
CmF	GAAGATCTTCATGTTTGACAGCTTATCATCG	30
CmR	CGACGGCTCCACGCCGAAACAAGCGCTC	28
YanF	CGGATTTCTCTCTGTG	18
YanR	CTGTATTTGAGTTTATCACCCCT	22

1.5 敲除载体 pRN5101-EC 的构建及电转化

将克隆得到的 *pmxE* 与克隆载体 pMD18-T 连接转化 *E. coli* DH5α, 使用质粒小提试剂盒提取质粒得到载体 pMD18-TPE。通过限制性酶切分析得知 *pmxE* 部分基因片段内有 *Mlu* I、*Bgl* II 酶切位点,使用限制性内切酶 *Mlu* I、*Bgl* II 将 pMD18-TPE 双酶切与经过 *Mlu* I、*Bgl* II 酶切的氯霉素 (Cm) 基因连接转化大肠杆菌 DH5α, 提取质粒得到载体 pMD18-TEC。此载体上含有被 Cm 抗性盒破坏的 *pmxE* 基因。再使用 *Hind* III 和 *Bam* H I 将含 Cm 抗性盒的 *pmxE* 基因切下,与经过 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切的质粒 pRN5101 连接,转化 *E. coli* JM109, 提取质粒得到敲除质粒 pRN5101-EC。构建好的质粒 pRN5101-EC 用引物 mxEF、mxER 进行 PCR 扩增,送样测序验证序列的正确性。将敲除质粒 pRN5101-EC 转入 *E. coli* SCS110 中,使它在 SCS110 完成去甲基化的复制,然后再提取质粒 pRN5101-EC,用作下面的电转化,电转化步骤见方法 1.3.3。

1.6 多粘类芽胞杆菌 SC2-E 的筛选

1.6.1 筛选具有氯霉素抗性无红霉素抗性的重组子: 将鉴定正确的转化子接种于 LB 液体培养基 (含 Ery 6 μg/mL, Cm 15 μg/mL) 中过夜培养; 5% (V/V) 接种量转接至 50 mL LB 液体培养基 (Cm 5 μg/mL) 中, 39°C、220 r/min 摇床培养, 每 12 h 转接 1 次, 连续转接 3 次; 菌液进行适当的梯度稀释, 涂布在含 Cm (5 μg/mL) 的平板上, 39°C 温箱培养; 挑 Cm 板上的单菌落分别对应地接种到 Cm (5 μg/mL) 单抗、Cm (5 μg/mL) 和 Ery (6 μg/mL) 双抗平板上, 39°C 温箱培养; 选择单抗平板上生长而双抗平板上不生长的菌落做 PCR 鉴定。

1.6.2 菌落 PCR 筛选双交换子: 在扩增得到的 *pmxE* 片段上游设计一个引物 YanF, 下游设计一个

引物 YanR, 引物序列见表 2。未发生双交换的菌株扩出的片段长度是 1640 bp, 发生双交换的菌株扩出的片段长度为 2212 bp, 将扩出的长度为 2212 bp 的片段送样测序。

1.7 抗细菌性能检测

将多粘类芽胞杆菌 SC2 和 SC2-E 分别接种到多粘菌素种子培养基上过夜培养, 然后按照 3% 的接种量接种到发酵培养基里, 发酵条件为: 初始 pH 6.72, 温度 30℃, 发酵时间 38 h, 转速 200 r/min^[13]。

牛津杯法: 以灭菌的 LB 固体培养基做下层, 倒板; 凝固后, 将平板分为三部分, 每一区放入一个牛津杯 (8 mm), 再将半琼脂 LB 培养基混入大肠杆菌, 倒入平板做上层; 凝固后, 将牛津杯拔出, 上层培养基中形成小槽。分别取 SC2 菌株发酵液, SC2-E 菌株发酵液和 PMB 标准品 (1 mg/mL, 对照) 各 70 μL 加入到小槽内。在 37℃ 培养箱中培养 24 h 后观察抑制圈的有无及大小。

1.8 多粘类芽胞杆菌 SC2-E 发酵液的 HPLC 分析

将 1.7 中的发酵液进行以下处理: 5000 × g, 离心 10 min, 加入甲醇萃取体积比是 1:4, 4℃ 放置 30 min, 离心取上清液, 然后用 0.22 μm 的有机系微孔滤膜过滤, 滤液做 HPLC 分析。同时使用 PMB 标准品 (1 mg/mL) 作对照。HPLC 系统参数: 美国 Waters 色谱仪, 510 型, 色谱柱: C18 柱 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相为 0.07% 的三氟乙酸 (TFA) 水溶液: 乙腈 = 85:15 (V/V), 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长: 紫外检测器, 波长 219 nm, 柱温: 28℃。

2 结果和分析

2.1 pRN5101 质粒对多粘类芽胞杆菌 (*P. polymyxa*) SC2 的转化条件

由图 1 得知, 在含 0.5 mol/L 山梨醇的 LB 液体培养基中, *P. polymyxa* SC2 在 0–2 h 是调整期, 2–8 h 是指数期, 8 h 以后是稳定期和衰落期。取培养时间为 5–6 h、处于对数前中期的细胞做 SC2 感受态细胞, 此阶段的 SC2 细胞还没有形成芽孢, 适合用来做感受态细胞。

将 SC2 接种于 LB 液体培养基中, 37℃ 过夜培养; 再以 5% (V/V) 的接种量转接到 50 mL 含 0.5 mol/L 山梨醇的 LB 液体培养基中 (pH = 7.0),

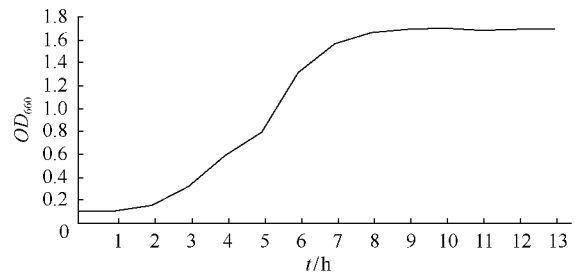


图 1. 多粘类芽胞杆菌 SC2 在含有 0.5 mol/L 山梨醇的 LB 液体培养基中的生长曲线

Figure 1. Growth curve of *P. polymyxa* SC2 in LB broth with 0.5 mol/L sorbitol

37℃, 220 r/min 摇菌 5–6 h, $OD_{660} = 0.70 - 0.95$ 时停止培养; 冰上放置 10 min, 5000 × g 离心 5 min; 使用 Solution A (0.5 mol/L 山梨醇 + 0.5 mol/L 的甘露醇 + 10% 的甘油) 洗涤菌体 4 次, 洗涤时充分混匀, 去掉 SC2 产生的胞外多糖类物质; 用 1 mL 的 Solution A 重悬细胞, 分装成 60 μL/管, -80℃ 保存。

取 pRN5101 质粒 (50–200 ng) 加到 60 μL SC2 感受态细胞中, 冰上放置 1–3 min, 电击, 参数为 2.2 kv, 4–5 ms, 电击后置置于冰上 5 min, 再加入 1 mL 的 Solution B (含 0.5 mol/L 的山梨醇和 0.38 mol/L 的甘露醇的 LB 培养基), 28℃ 摇床培养 3–4 h 后离心浓缩涂布于含 Ery (6 μg/mL) LB 平板上, 28℃ 培养 48 h。平板上菌落数是 15–30 个, 经过鉴定这些菌落都是正确的转化子。然后将转化子接种到含 Ery (6 μg/mL) 的 LB 液体培养基中, 39℃, 220 r/min 摇菌, 每 12 h 转接 1 次, 连续转接 3 次后涂布于含 Ery (6 μg/mL) LB 平板上, 没有菌落生长, 说明 pRN5101 在 SC2 中 39℃ 的培养温度下连续传代后发生自杀。

2.2 基因敲除载体 pRN5101-EC 的构建

对含有 *pmxE* 片段的质粒 pMD18-TPE 进行限制性酶切位点的分析, 发现 *pmxE* 片段内 356 bp 和 987 bp 处分别有一个 *Bgl*II 和 *Mlu*I 酶切位点, 对质粒 pMD18-TPE 进行 *Bgl*II 和 *Mlu*I 双酶切, 回收大片段。然后与带 *Bgl*II 和 *Mlu*I 酶切位点的 Cm 基因连接, *pmxE* 片段内 631 bp 被 1203 bp 的 Cm 基因代替, 得到载体 pMD18-TEC。再对 pMD18-TEC 进行限制性酶切位点的分析, 利用载体 pMD18-T 上的多克隆位点内的 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点将被 Cm 抗性盒破坏的 *pmxE* 片段切下, 长度为 1972 bp。回收此片段与经过 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切的线性载

体 pRN5101 连接, 得到敲除质粒 pRN5101-EC。使用引物 mxEF、mxER PCR 扩增产物送样测序结果正

确。构建流程见图 2。

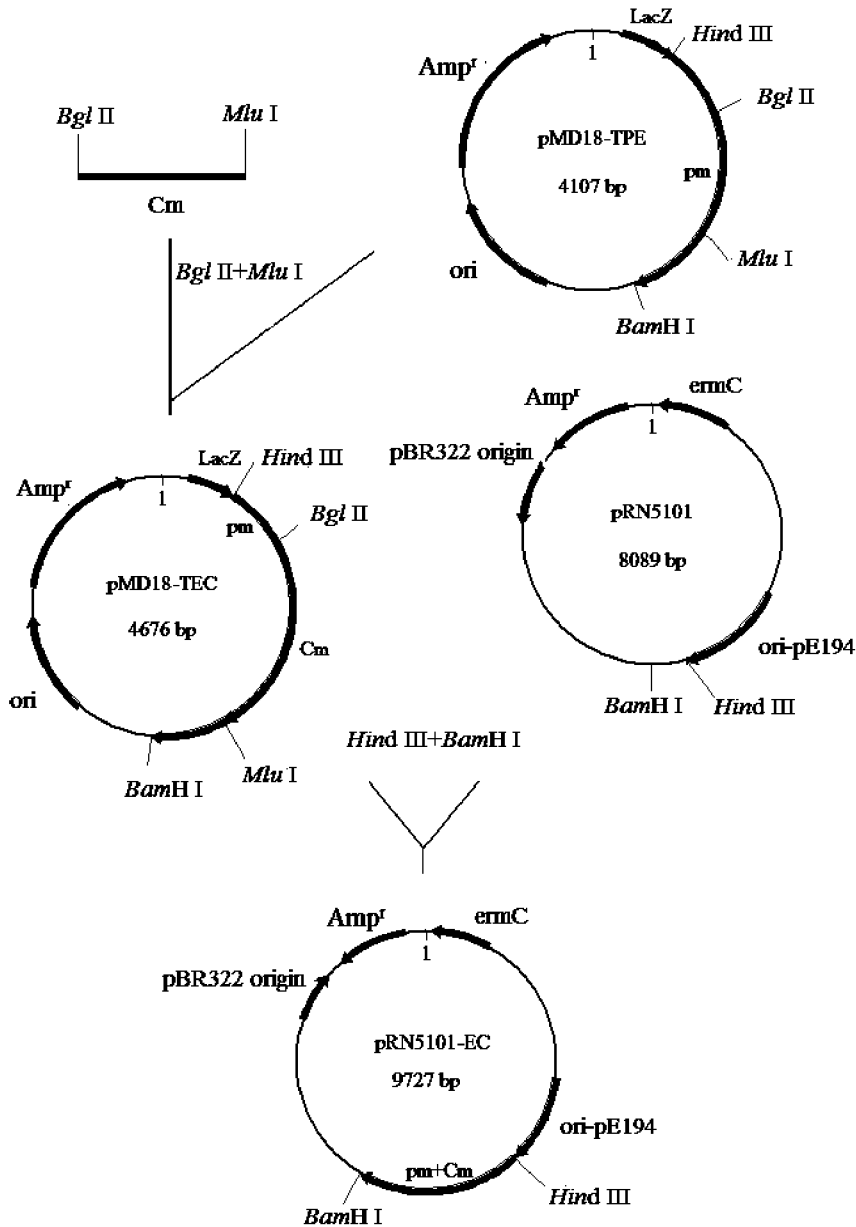


图 2. 敲除载体 pRN5101-EC 构建流程图

Figure 2. Construction of knock-out vector pRN5101-EC.

2.3 多粘类芽胞杆菌 SC2-E 的筛选

通过电转化, 将敲除质粒 pRN5101-EC 转入多粘类芽胞杆菌 SC2 中, 敲除质粒上的 *pmxE::Cm* 与 SC2 基因组中的 *pmxE* 基因发生同源重组, 对 *pmxE* 基因进行敲除 (图 3)。

理论上, 敲除载体 pRN5101-EC 在 39°C 以上就会停止复制, 发生自杀。本实验采用的温度是

39°C。将带有 pRN5101-EC 的转化子在 39°C 多次传代后, 涂布于含 *Cm* (5 μg/mL) 的 LB 平板上 39°C 温箱培养; 挑 *Cm* 板上的单菌落分别对应地接种到 *Cm* (5 μg/mL) 单抗、*Cm* (5 μg/mL) 和 *Ery* (6 μg/mL) 双抗平板上, 39°C 培养; 在 200 个克隆中筛选到 3 个在单抗平板上生长, 双抗平板上不生长的克隆, 做菌落 PCR 鉴定。由图 4 看出, 重组子 PCR 扩增产物大

约为 2.2 kb, 而 SC2 菌株的 PCR 扩增产物约为 1.6 kb; 结果说明, 在重组子基因组中, *pmxE* 基因的 631 bp 的 DNA 片段确实是通过双交换而被 1203 bp 的氯霉素 (Cm) 抗性盒 DNA 片段所取代, 它们是正确的双交换子。

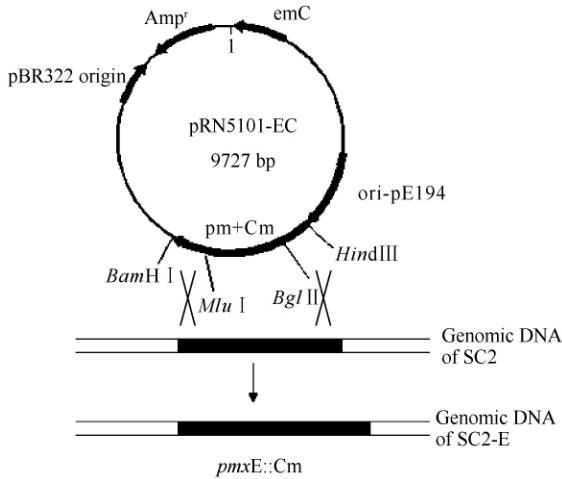


图 3. Cm 抗性盒对多粘类芽胞杆菌 SC2 *pmxE* 基因的敲除示意图

Figure 3. Deletion of *pmxE* in *P. polymyxa* SC2 with Cm cassette.

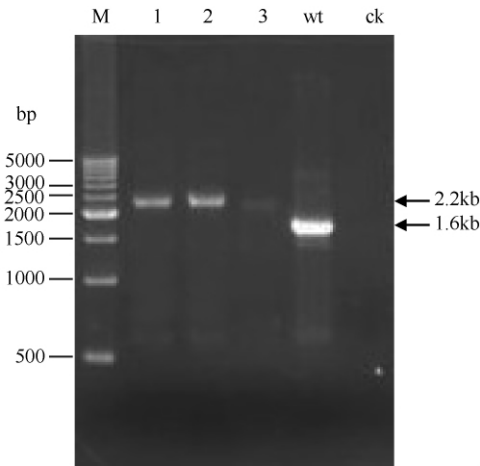


图 4. 重组子菌落 PCR 鉴定

Figure 4. Identification of double cross over (DCO) mutants by colony PCR using primers YanF and YanR. M: 500 bp DNA ladder marker; lane 1-3: DCOs; wt: SC2 wild type; ck: did not have temple.

2.4 多粘类芽胞杆菌 SC2-E 的抗菌性能检测

取多粘类芽胞杆菌 SC2 和 SC2-E 的多粘菌素发酵液 70 μ L 加入以大肠杆菌为供试菌的牛津杯法制备的小槽内, 同时以 PMB (1 mg/mL) 做对照。正着放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h, 抑菌圈的检测结果

见图 5。由图 5 可知, SC2 有抑菌圈但不如对照 PMB (1 mg/mL) 的抑菌圈大, 由此可知 SC2 产生多粘菌素, 该发酵液中多粘菌素的浓度低于 1 mg/mL; SC2-E 没有抑菌圈, 发酵液中没有多粘菌素, 说明它失去了合成多粘菌素的能力。

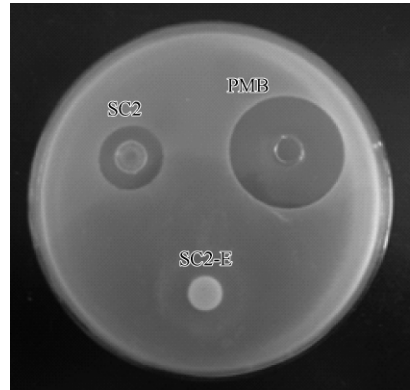


图 5. 多粘类芽胞杆菌 SC2 和 SC2-E 的抗菌实验
Figure 5. Antibacterial activities of *P. polymyxa* SC2-E compared to SC2 wild-type.

2.5 多粘类芽胞杆菌 SC2-E 发酵液的 HPLC 分析

高效液相色谱结果见图 6。图 6-A 可知, SC2 的保留时间与 PMB 标准品的保留时间基本一致, 而且 SC2 和 PMB 标准品等比例混合液的主峰只有一个, 保留时间也基本一致, 证明 SC2 菌株产生多粘菌素 B。SC2-E 没有相应的峰 (图 6-B), 证明 SC2-E 突变株不产生多粘菌素 B。综上所述, 敲除 *pmxE* 基因后的 SC2-E 突变株不产生多粘菌素 B, 本实验成功敲除了 *pmxE* 基因并且进一步证明 *pmxE* 基因是合成多粘菌素 B 不可缺少的基因。

3 讨论

多粘类芽胞杆菌因其细胞壁厚, 易产生多粘类物质和形成芽孢, 其分子遗传学和遗传工具的发展一直比较滞后, 基因功能方面的研究工作开展比较困难。本实验对 *P. polymyxa* 感受态细胞的制备及转化条件进行了不断的摸索后第一次成功的运用电转化的方法把质粒 pRN5101 转入 *P. polymyxa* SC2, 并成功的敲除了 *P. polymyxa* SC2 中的 *pmxE* 基因。pRN5101 以前用于低 GC 含量的革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 李氏杆菌 (*Listeria monocytogenes*), 蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus*

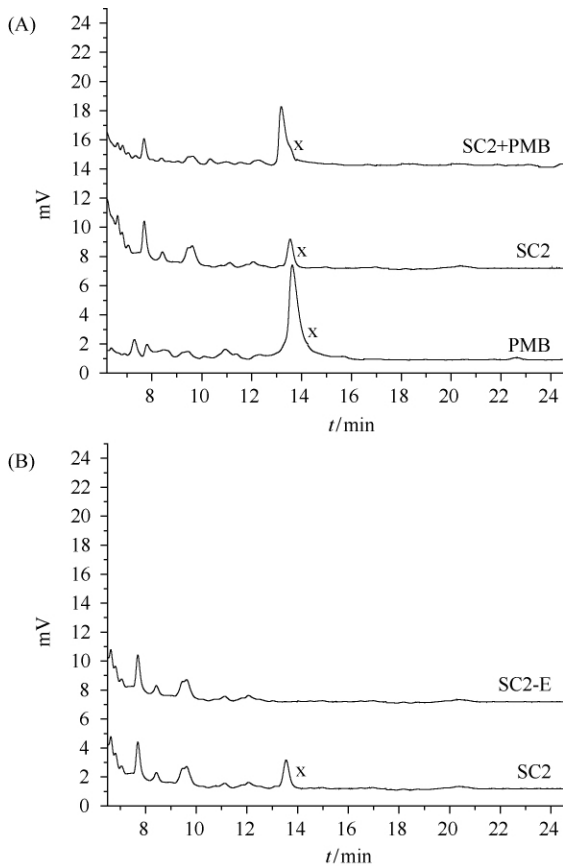


图 6. 多粘类芽胞杆菌 SC2 和 SC2-E 发酵液的甲醇萃取液的高效液相色谱图

Figure 6. HPLC profiles for methanol extracts of culture supernatants from *P. polymyxa* SC2 and SC2-E. A: HPLC profiles for methanol extracts of culture supernatants from *P. polymyxa* SC2 and polymyxin standards (PMB); SC2 + PMB: Mixture of methanol extracts of culture supernatants from *P. polymyxa* SC2 and polymyxin standards on equal proportion, x: target peak of PMB; B: HPLC profiles for methanol extracts of culture supernatants from *P. polymyxa* SC2 and SC2-E.

cereus) 和苏云金芽胞杆菌 (*Bacillusthuringiensis*) 中的基因敲除, 本实验大胆尝试证明它也可以用于 *P. polymyxa*, 说明此质粒具有更广泛的宿主, 扩大了其使用范围。同时质粒 pRN5101 是温敏型自杀质粒, 虽然 35℃ 就不能复制, 但在不同的宿主菌中自杀温度不一定相同, 本实验找到在 *P. polymyxa* SC2 中自杀又不影响 SC2 生长的温度是 39℃, 在此温度下我们筛选到了重组子。不论是电转化还是热激转化, 感受态细胞的感受活性是影响转化效率的关键因素, 对于 *P. polymyxa*, 制备感受态细胞时一定不能形成芽孢且处于对数生长期的早期或中期。

从遗传学角度来讲, 基因敲除不能对靶基因的上游和下游基因产生极性效应, 基因敲除的片段并不是越长越好, 而需要综合考虑^[14]。尤其是在原核生物中, 往往靶基因处于操纵子内部, 因此在敲除策略上必须考虑读码框内敲除。

目前, 在原核生物和真核生物中, 基因敲除体系主要使用的是同源重组的原理。由于在天然情况下, 发生在菌株体内的自发重组效率很低, 因此完成基因置换和敲除需要借助外部的选择压力, 因此需要不断地完善和更新遗传工具和基因操作系统。与大肠杆菌不同, 在 *P. polymyxa* 中可用的抗生素抗性基因并不多。本实验验证氯霉素抗性基因可以在 *P. polymyxa* 中表达, 而卡那霉素不表达, 而且氯霉素抗性基因的表达浓度可以到达 15 μg/mL。本实验采用氯霉素抗性基因, 筛选转化子的浓度为 15 μg/mL, 筛选重组子的浓度为 5 μg/mL。

后基因组学是以鉴定基因功能, 系统研究多基因蛋白作用为目标的功能基因组学^[15], 它涉及转录组, 蛋白质组, 代谢组, 糖组, 变异组等多个研究领域。*P. polymyxa* SC2 基因组测序工作已经完成。基因敲除体系是对其进行功能基因组学研究的必要遗传操作工具, 同时也为 *P. polymyxa* 的研究提供了可能的遗传操作工具。利用它可以阐明 SC2 基因组内每个基因的作用或功能, 还可以研究基因的调节及表达谱, 进而从整个基因组及全套蛋白质产物的结构、功能和机理的高度去了解 *P. polymyxa* SC2。

致谢 感谢中国农业科学院植物保护研究所宋福平研究员提供的温敏型自杀质粒 pRN5101 和 *E. coli* SCS110, 感谢法国巴黎皮埃尔 & 玛丽·居里大学物理化学研究所的 Patrick Stragier 教授提供的质粒 pDG1661。

参考文献

- [1] Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Letter of Applied Microbiology*, 1998, 27 (1) :9-13.
- [2] Dijksterhuis J, Sanders M, Gorris LG, Smid EJ. Antibiosis plays a role in the context of direct interaction

- during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 86 (1) : 13-21.
- [3] Guemori-Athmani S, Berge O, Bourrain M, Mavingui P. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *European Journal of Soil Biology*, 2000, 36: 149-159.
- [4] Zhu H, Yao LT, Tian F, Du BH, Ding YQ. Screening and study on biological characteristics of antagonistic bacteria against *Fusarium solani*. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 1: 156-159. (in Chinese)
朱辉, 姚良同, 田方, 杜秉海, 丁延芹. 辣椒根腐病拮抗细菌的筛选及其生物学特性研究. *生物技术通报*, 2008, 1: 156-159.
- [5] Ryu CM, Kim J, Choi O, Park SY, Park SH. Nature of a root-associated *Paenibacillus polymyxa* from field-grown winter barley in Korea. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 2005, 15: 984-991.
- [6] Kharbanda PD, Yang J, Beatty PH. Potential of a *Bacillus* sp. to control blackleg and other diseases of canola. *Phytopathology*, 1997, 87: S51.
- [7] Li JR, Perrin K, Saleh S, Jensen SE. Use of PCR-targeted mutagenesis to disrupt production of fusaricidin-type antifungal antibiotics in *Paenibacillus polymyxa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (11) : 3480-3489.
- [8] Choi SK, Park SY, Kim R, Lee CH, Kim JF, Park SH, Park SH. Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 365 (1) : 89-95.
- [9] Choi SK, Park SY, Kim R, Kim SB, Lee CH, Kim JF, Park SH. Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of *Paenibacillus polymyxa* and heterologous expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (10) : 3350-3358.
- [10] Kim JF, Jeong H, Park SY, Kim SB, Park YK, Choi SK, Ryu CM, Hur CG, Ghim SY, Oh TK, Kim JJ, Park CS, Park SH. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (22) : 6103-6104.
- [11] Ma MC, Wang C, Ding YQ, Li L, Shen DL, Jiang X, Guan DW, Cao FM, Chen HJ, Feng RH, Wang X, Ge YF, Yao LT, Bing XH, Yang XH, Li J, Du BH. Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* SC2, a strain of plant growth-promoting Rhizobacterium with broad-spectrum antimicrobial activity. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (1) : 311-312.
- [12] Villafane R, Bechhofer DH, Narayanan CS, Dubnau D. Replication control genes of plasmid pEI94. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169 (10) : 4822-4829.
- [13] Tian D, Yuan QP, Sun XX, Shen XL. Optimization of fermentation conditions for polymyxin B production by response surface method. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26 (15) : 53-57. (in Chinese)
田东, 袁其朋, 孙新晓, 申晓林. 响应面法优化多粘菌素 B 的发酵条件. *中国农学通报*, 2010, 26 (15) : 53-57.
- [14] Merlin C, McAteer S, Masters M. Tools for characterization of *Escherichia coli* genes of unknown function. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (16) : 4573-4581.
- [15] Flicek P, Keibler E, Hu P, Korf L, Brent MR. Leveraging the mouse genome for gene prediction in human: from whole-genome shotgun reads to a global synteny map. *Genome Research*, 2003, 13: 46-54.

Construction of gene knock-out system for *Paenibacillus polymyxa* SC2

Wendi Zhang, Yanqin Ding, Liangtong Yao, Kai Liu, Binghai Du*

College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Shandong Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Tai'an 271018, China

Abstract: [Objective] To construct an efficient gene knock-out system for *Paenibacillus polymyxa* SC2. [Methods] Temperature sensitive plasmid pRN5101 was transformed into *P. polymyxa* SC2 by electrotransformation. A mutant SC2- Δ was obtained, in which *pmxE* was disrupted by homologous recombination. To confirm whether *pmxE* was knocked out, we used antibacterial activity assay and high performance liquid chromatography to analyze the ability of mutants synthesizing polymyxin. [Results] We developed an efficient gene knock-out system for *P. polymyxa* SC2. Plasmid of pRN5101 could replicate at 28°C and suicide at 39°C in SC2. Mutants lost the ability of synthesizing polymyxin, indicating that *pmxE* gene was successfully knocked out. [Conclusion] The constructed gene knock-out system for *P. polymyxa* provides a high-efficiency tool to detect genes function for *P. polymyxa*.

Keywords: *Paenibacillus polymyxa*, pRN5101, gene knockout, *pmxE*

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100005) and by the Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program during the 12th Five-year Plan Period (2011BAD11B01)

* Corresponding author. Tel: +86-534-8247806; E-mail: du_binghai@163.com

Received: 22 April 2013 / Revised: 17 May 2013

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。