

## 抗甲磺隆假单胞菌的分离及其乙酰乳酸合酶的大小亚基 *ilvIH* 基因的克隆和表达

孙笑非, 黄星, 陈博, 李顺鹏, 何健\*

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:** 乙酰乳酸合酶(也称乙酰羟酸合酶 *acetohydroxyacid synthase*, AHAS)是植物、真菌和细菌细胞内支链氨基酸 Val、Leu、Ile 生物合成过程中关键酶, 是乙酰乳酸合酶抑制剂类除草剂如磺酰脲类、咪唑啉酮类、嘧啶水杨酸和磺酰氨基类的作用靶标。【目的】获得抗甲磺隆的乙酰乳酸合酶基因, 构建其表达载体, 并分析基因中的位点突变与乙酰乳酸合酶对磺酰脲类除草剂抗性产生原因。【方法】从长期使用甲磺隆的土壤中分离到 1 株抗甲磺隆的菌株 Lm10, 利用 PCR 技术从 Lm10 总 DNA 中克隆到乙酰乳酸合酶的大小亚基基因 *ilvIH*, 对 *ilvIH* 氨基酸序列进行比对分析。分别将 *ilvI* 和 *ilvH* 分别连接到表达载体 pET29a(+)-多克隆位点, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 获得转化子 BL21(pET-I) 和 BL21(pET-H), 并诱导表达。【结果】菌株 Lm10 鉴定为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 对甲磺隆的最高耐受浓度达到 14000  $\mu\text{mol/L}$ , 且对各种乙酰乳酸合酶抑制剂类除草剂具有交叉抗性。Lm10 与甲磺隆敏感菌株 KT2440 的小亚基氨基酸序列完全相同, 而大亚基有 6 个氨基酸位点发生变异。转化子在 IPTG 诱导下, 乙酰乳酸合酶的大小亚基的蛋白成功表达, 粗酶液酶活试验结果表明 Lm10 的 *ilvI* 基因表达的乙酰乳酸合酶大亚基对甲磺隆有很强的抗性。【结论】发现菌株 Lm10 的乙酰乳酸合酶大亚基对甲磺隆有很强的抗性, 抗甲磺隆菌株 Lm10 与敏感菌株 KT2440 的 *ilvI* 有 6 个氨基酸位点差异, 这些位点突变可能是乙酰乳酸合酶对甲磺隆抗性产生的原因。

**关键词:** 乙酰乳酸合酶抑制剂类除草剂; 除草剂抗性细菌; 乙酰乳酸合酶; *ilvIH*

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1493-06

除草剂的使用使杂草的防除效率大大提高, 但除草剂在土壤中的残留会对下茬敏感作物产生严重的药害; 种植抗除草剂转基因作物是解决除草剂药害的最佳途径<sup>[1]</sup>。目前, 大量针对各种除草剂的抗性基因资源被发掘, 如抗草甘膦的 EPSP 合成酶基因 *aroA*<sup>[2,3]</sup>, 抗磺酰脲的乙酰乳酸合酶基因, 降解草丁膦的 *bar* 基因<sup>[4,5]</sup>和降解的阿特拉津氯水解酶基因 *atzA* 等, 有的抗性基因已成功转入作物中, 有的转基因抗性作物已到商业应用阶段, 如美国孟山都公司开发的转 *aroA*

基因的抗草甘膦作物, 包括大豆、玉米、棉花等, 已经成功在全球推广应用, 种植面积在亿亩以上<sup>[1]</sup>。

乙酰乳酸合酶(也称乙酰羟酸合酶, *acetohydroxyacid synthase*, AHAS)是植物、真菌和细菌细胞内支链氨基酸 Val、Leu、Ile 生物合成过程中关键酶, 是乙酰乳酸合酶抑制剂类除草剂如磺酰脲类、咪唑啉酮类、嘧啶水杨酸和磺酰氨基类除草剂的作用靶标<sup>[6-8]</sup>, 因而具有非常重要的农学意义。乙酰乳酸合酶敏感性下降突变是获得磺酰脲类除草剂抗性的主要途

基金项目: 国家自然科学基金(30500010); 国家自然科技平台项目(2005DKA21201-2)

\*通讯作者。Tel: +86-25-84396685; Fax: +86-25-84396314; E-mail: hejian@njau.edu.cn

作者简介: 孙笑非(1984-), 女, 山东泰安人, 研究方向为环境微生物学。E-mail: sun2005116035@163.com.cn

收稿日期: 2008-05-09; 修回日期: 2008-06-11

径。在不同微生物和植物的乙酰乳酸合酶中,已经鉴定出一些对除草剂具有抗性的乙酰乳酸合酶突变株<sup>[9]</sup>。

微生物适应不良环境能力强及基因变异性快,更容易从中获得不同抗性水平和抗性谱的乙酰乳酸合酶基因。目前主要是通过诱变获得微生物来源的(如 *Escherichia coli* 和酵母)乙酰乳酸合酶基因抗性突变体,其抗性强度比野生型提高约 10~50 倍;而自然界来源的抗性乙酰乳酸合酶基因还未见报道。本文从长期受甲磺隆污染的土壤中分离,纯化出 1 株甲磺隆的抗性菌 Lm10,其乙酰乳酸合酶在甲磺隆高达 2500  $\mu\text{mol/L}$  仍有很强的酶活,比 *Escherichia coli* 野生型乙酰乳酸合酶抗性提高约 100 倍,是研究除草剂抗性产生机制及构建转基因作物的良好材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 培养基:**无机盐培养基, LB 培养基的配制见文献[10]。根据需要加入不同浓度的除草剂(甲醇助溶)。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**限制性内切酶等工具酶和分子试剂购自 TaKaRa 公司;化学试剂均为分析纯。紫外扫描仪:岛津 UV-PC2401;722 分光光度计:上海光学精密仪器厂。

### 1.2 甲磺隆降解细菌的富集、分离和纯化

供试土样取自江苏南京长期使用甲磺隆的农田土壤。取 1g 土样放入 100mL 含 500  $\mu\text{mol/L}$  甲磺隆的无机盐培养基中,并逐渐将甲磺隆的浓度提高至 1500  $\mu\text{mol/L}$ ,培养液在含 1500  $\mu\text{mol/L}$  甲磺隆的基础盐平板上划线纯化。

### 1.3 菌株的鉴定

菌株形态和生理生化,参照文献[11]进行;16S rDNA 扩增及系统发育分析参照文献[12]。

### 1.4 乙酰乳酸合酶粗酶液的提取和抗甲磺隆强度的测定

粗酶液提取采用超声波破碎法,乙酰乳酸合酶酶活采用间接比色法测定,参考文献[8]。

### 1.5 菌株抗除草剂强度的测定

在含 2g/L 葡萄糖的基础盐固体培养基中加入不同浓度的甲磺隆和氯磺隆、咪唑乙烟酸、唑嘧磺草胺和五氟磺草胺,将菌株 Lm10 点接于平板上,以对甲磺隆敏感的菌株 *pseudomonas putida* KT2440 和 *E. coli* BL21 为对照,30 $^{\circ}\text{C}$  培养,培养 3 天观察菌株的生长情况。

### 1.6 乙酰乳酸合酶基因克隆和同源性分析

总 DNA 提取参考文献[10],根据已报道的与 Lm10 亲缘关系相近(16S rDNA 同源性 > 98%)菌株 *pseudomonas putida* KT2440 的基因组序列,分别在其 *ilvIH* 基因的上下游设计引物扩增包含 *ilvIH* 基因的 DNA 片段,正向引物为 5'-CCTGGATGATGGAAAG-GTCGCA-3',反向引物为 5'-CCC GCAACTCTGG-GGATCTC-3'。以菌株 Lm10 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,采用 50  $\mu\text{L}$  反应体系,扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 57 $^{\circ}\text{C}$  2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 产物交由上海英俊公司测序。

**1.7 乙酰乳酸合酶基因 *ilvIH* 表达载体的构建及表达**  
扩增 *ilvI* 基因的正向引物 5'-AGCTGGATCCGT-GGAGCTTTTATCTGGCGCTG-3' (*Bam*H<sup>I</sup>),反向引物 5'-AGCTGAGCTCATGATGCTGAGCACTTTG-TCGC-3' (*Sac*I);扩增 *ilvH* 基因的正向引物 5'-AGC-TGGATCCCGGCACATCATCTCCCT-3' (*Bam*H<sup>I</sup>),反向引物 5'-AGCTGAGCTCATGGTACGCTCCGTC-TTGCTCA-3' (*Sac*I)。PCR 反应条件同本文材料与方法 1.6。把扩增的目的片段用相应的限制性内切酶酶切后与同样双酶切的 pET29a(+)载体酶连,酶连产物转化 *E. coli* BL21(DE3)中,在含卡那霉素的 LB 固体平板上筛选转化子。重组表达质粒的诱导和 SDS-PAGE 电泳参照文献[13~15]。

## 2 结果

### 2.1 Lm10 的分离和鉴定

从土壤中经初筛、复筛,得到一株抗甲磺隆的菌株 Lm10。在含甲磺隆的基础盐培养基平板上,菌落白色半透明,边缘较圆整,表面光滑,菌体长杆状,大小约为 0.5~0.7  $\mu\text{m}$  × 1.4~2.0  $\mu\text{m}$ ;生理生化特征为:发酵葡萄糖产酸产气,发酵木醇糖产气,水解淀粉,可利用蔗糖等无机碳源生长,接触酶、氧化酶、吲哚和甲基红试验阳性,V.P 试验阴性;对氨苄青霉素、四环素、链霉素有抗性,对卡那霉素、庆大霉素、氯霉素、新霉素敏感。

Lm10 的 16S rDNA (GenBank 登录号为 EU240462)在 RDP 数据库中 (<https://rdp.cme.msu.edu/>) 的 BLAST 结果显示与 *Pseudomonas* 属细菌有较高的同源性,图 1 为菌株 Lm10 与亲缘关系相近的 20 株 *Pseudomonas* 属模式菌株的 16S rDNA 序列构建的系统发育树,结合形态和生理生化特征,将菌株 Lm10 初步鉴定为 *Pseudomonas* sp.。

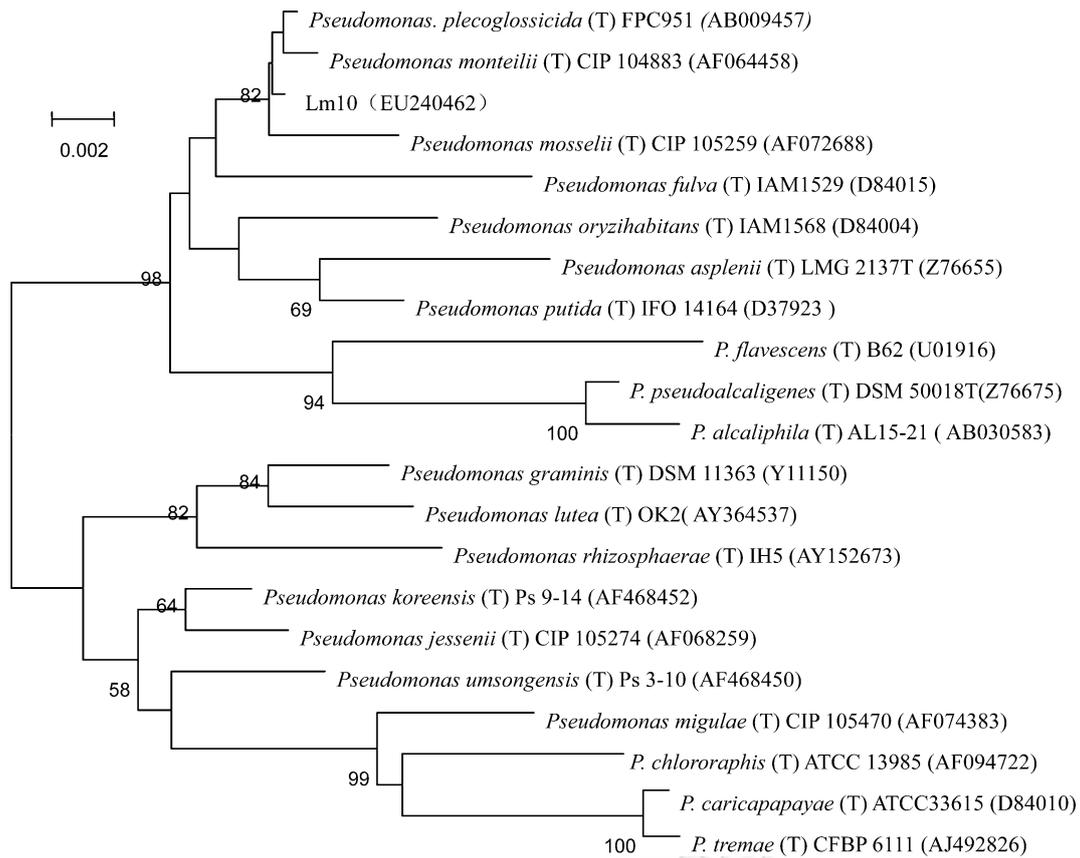


图 1 基于 16S rDNA 序列同源性的菌株 Lm10 和相关菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences showing the relationships of strain Lm10 with the closest related bacteria. The scale bar indicates 0.002 substitutions per nucleotide position. Boot-strap values greater than 50 % are shown at the branch points. In the brackets after each bacterial name are 16S rDNA accession numbers in GenBank Databases.

2.2 抗性菌株对各类乙酰乳酸合酶抑制剂类除草剂除草剂的抗性强度

以除草剂敏感菌株 *pseudomonas putida* KT2440 和 *E. coli* BL 21 为参照，测定菌株 Lm10 对各类乙酰乳酸合酶抑制剂类除草剂的抗性强度。从表 1 中可以看出，菌株 Lm10 对甲磺隆和氯磺隆（磺酰脲类）、咪唑乙烟酸（咪唑啉酮类）、唑嘧磺草胺（磺酰胺类）和五氟磺草胺有较高的耐受能力，说明菌株 Lm10 对各类乙酰乳酸合酶抑制剂类除草剂有交互抗性。

2.3 菌株细胞 AHAS 酶粗酶液对甲磺隆的抗性强度

从图 2 中可以看出，加入甲磺隆后，敏感菌株 KT2440 和 *E. coli* BL 21 的乙酰乳酸合酶活性被强烈

抑制，并且抑制作用随甲磺隆浓度的升高而加强；而菌株 Lm10 的乙酰乳酸合酶活性在没加甲磺隆时，比 KT2440 的要低，但随着甲磺隆浓度升高其活性下降很缓慢，在甲磺隆高达 2500 μmol/L 时菌株 Lm10 的 AHAS 酶粗酶液酶活仍有无甲磺隆时粗酶液酶活的 50%，说明菌株 Lm10 的 AHAS 酶对高浓度的甲磺隆有很强的抗性。

2.4 *ilvIH* 基因的克隆和分析

利用 PCR 技术从菌株 Lm10 的总 DNA 中扩增出了大小约为 2400 bp 的 DNA 片段，GenBank 登录号为 EU344810。测序和比对分析结果表明该片段包含

表 1 菌株 Lm10 和 KT2440, *E. coli* BL 21 对几种除草剂的最高耐受浓度

Table 1 Resistance of strains Lm10, KT2440 and *E. coli* BL 21 to different ALS inhibitor herbicides

Strains	c(Herbicide)/(μmol/L)				
	Metsulfuron-methyl	Chlorsulfuron	Imazethapyr	Flumetsulam	Penoxsulam
Lm10	14000	5600	10000	2000	6000
KT2440	<200	250	1000	200	600
BL 21	<100	<100	<100	<100	<100

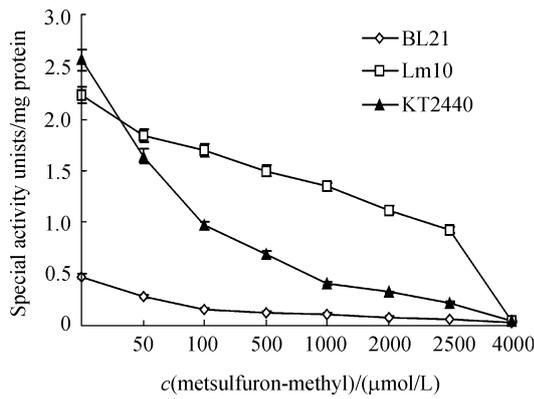


图 2 不同浓度甲磺隆对 Lm10, KT2440 和 BL21 AHAS 粗酶液酶活的影响

Fig. 2 Effect of metsulfuron-methyl concentrations on the activities of crude AHAS enzymes of strains Lm10, KT2440 and BL21.

AHAS 基因大小亚基 *ilvI* 和 *ilvH*, 其中 *ilvI* 为 1725 bp, 编码 574 个氨基酸, *ilvH* 为 492 bp, 编码 163 个氨基酸。

抗性菌株 Lm10 与敏感菌株 *Pseudomonas* KT2440 的小亚基氨基酸序列比较结果表明 Lm10 与 KT2440 的小亚基氨基酸排列完全相同, 而大亚基有 6 个氨基酸位点发生变异, 其中 3 个位点连锁在一起 (位点 134、135 和 136, 见表 2), 但到底是哪些位点变化导致 AHAS 抗性强度发生变化, 需要通过点突变等技术作进一步研究。

表 2 抗性菌株 *ilvI* 基因氨基酸序列同源性比对结果

Table 2 8-6 Analysis of mutation amino acid sequence of *ilvI* in resistance strain

Strains	Mutation sites					
	134	135	136	210	214	486
Lm10	N	P	T	V	Y	W
KT2440	H	A	S	I	F	S

2.5 *ilvIII* 基因的表达及表达产物对甲磺隆的抗性强度

分别将 *ilvI*, *ilvH* 克隆到 pET29a(+) 的多克隆位点, 构建了表达载体 pET-I 和 pET-H, 并转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中。图 4 为转化子 IPTG 诱导后 SDS-PAGE 全细胞蛋白质电泳分析图谱, 从图中结果可见, 经过 IPTG 诱导后, 含有重组质粒 pET-I 和 pET-H 的转化子 BL21 分别在 67 kDa 和 20 kDa 附近出现很强的表达条带, 这和该酶的大小亚基的理论大小是一致的。

从图 5 中可以看出, 含 pET-I 的菌株 BL21(pET-I) 粗酶液的乙酰乳酸合酶活性要比 BL21 及含 pET-H 的菌株 BL21(pET-H) 粗酶液的乙酰乳酸合酶活性高 5 倍以上, 说明菌株 Lm10 的 *ilvI* 基因表达的 AHAS 大亚基具有催化活性, *ilvH* 表达的小亚基没有催化活性,

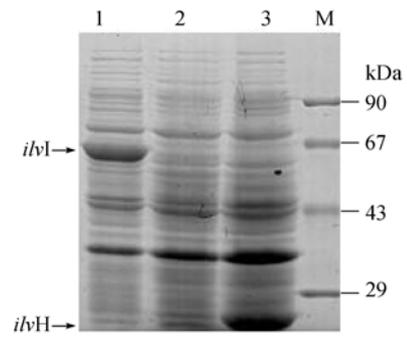


图 4 转化子 pET-H 和 pET-I(BL21) 全蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 4 SDS-PAGE of BL21(pET-H and pET-I). 1. pET-I (BL21) (induced 4h); 2. *E. coli* BL21(DE3); 3. pET-H (BL21) (induced 4h); M. protein molecular.

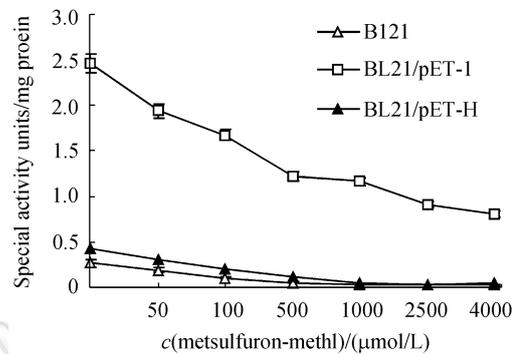


图 5 不同浓度甲磺隆对敏感菌株 BL21 和 BL21(pET-I 和 pET-H) AHAS 粗酶液酶活的影响

Fig. 5 Effect of metsulfuron-methyl concentrations on the activities of AHAS enzymes of strains BL21 and BL21(pET-I, pET-H).

这跟文献报道是一致的<sup>[19]</sup>; 加入甲磺隆后, BL21 及 BL21(pET-H) 粗酶液的乙酰乳酸合酶活性被强烈地抑制, 而含 pET-I 的菌株 BL21(pET-I) 粗酶液在高甲磺隆浓度下仍保持较高的酶活, 说明菌株 Lm10 的 *ilvI* 基因编码的 AHAS 大亚基对甲磺隆有很强的抗性。

3 讨论

乙酰乳酸合酶是一个四聚体, 由两个大亚基和两个小亚基构成, 大亚基是催化中心, 小亚基是调控中心。在 Duggleby 等对酿酒酵母 AHAS 与氯磺隆共结晶进行 X-射线衍射后建立的模型中, 发现乙酰乳酸合酶大亚基的反应中心呈“V”构型, 氯磺隆分子能与通道的氨基酸残基相互作用, 插入并堵塞这一通道, 使催化脱羧反应的 ThDP 不能进入反应中心使乙酰乳酸合酶失活; “V”构型开口上的氨基酸残基突变使“V”构型空间结构发生改变, 除草剂分子不能完全堵塞这

一通道, ThDP 仍能进入反应中心底部, 导致乙酰乳酸合酶对磺酰脲类除草剂抗性产生。大量实验证明一个氨基酸残基发生突变就会导致细菌、酵母和植物乙酰乳酸合酶除草剂抗性产生, 且突变位点绝大部分出现在形成这通道的氨基酸残基上(虽然在一级结构上这些位点分布在多肽链的不同部位)<sup>[16-19]</sup>; 在 *E. coli*、酵母和植物中已经报道的抗性突变有 A26V、V99M、A108V、P192S、M460AN、V210I、Y214F 和 W464AFLQY 等, 导致其对磺酰脲类除草剂耐受性分别提高了约 5~40 倍, 对甲磺隆的最高耐受浓度从约 0.5  $\mu\text{mol/L}$  提高到约 5~20  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[17]</sup>。有研究表明, 酵母乙酰乳酸合酶的 W586L 突变株导致其对氯磺隆的敏感度呈 6250 倍少, G116S 型突变株与野生种类相比敏感度降低了 1000 倍。Lys225I 被 Thr 替代后, Thr 的形成保护了酶的氢键, 导致该酶对磺隆的抗性提高了 23 倍<sup>[9]</sup>。

本文从长期使用甲磺隆的土壤中分离的抗甲磺隆菌株 Lm10 中, 乙酰乳酸合酶在甲磺隆高达 2500  $\mu\text{mol/L}$  仍有较强酶活, 比 *E. coli* 野生型乙酰乳酸合酶抗性提高约 100 倍, 比 *Pseudomonas putida* KT2440 乙酰乳酸合酶提高约 50 倍, 是研究除草剂抗性产生机制及构建转基因作物的良好材料; 通过氨基酸序列比较, 我们发现抗甲磺隆菌株 Lm10 与敏感菌株 KT2440 的 *ilvH* 在氨基酸水平上无差异, 而 *ilvI* 则有 6 个氨基酸位点差异, 分别为 N134H、P135A、T136S、V210I、Y214F 和 W486S, 其中位点 V210I 和 Y214F 已经报道<sup>[20]</sup>, 而 N134H、P135A、T136S、W486S 目前在 *E. coli*、酵母和植物中还未见相应的位点突变导致抗性产生的报道。这些位点突变与乙酰乳酸合酶对磺酰脲类除草剂抗性产生之间的关系, 有必要通过点突变等技术作进一步分析, 以确定这些位点突变与乙酰乳酸合酶对磺酰脲类除草剂抗性产生之间的关系。

### 参 考 文 献

[1] 程序. 美国孟山都公司作物基因工程研究开发的成就. 世界农业(*World Agriculture*), 1997, 9(221): 18-19.  
 [2] 李汝刚, McFerson J, Kresovich S. 乙酰乳酸合酶基因在芸苔属栽培种内的遗传变异. 生物多样性(*Chinese Biodiversity*), 1998, 6(1): 6-12.  
 [3] 朱玉, 于中连, 林敏. 草甘膦生物抗性和生物降解及其转基因研究. 分子植物育种(*Molecular Plant Breeding*), 2003 年, 1(4): 435-441.  
 [4] 任江萍, 王爱萍, 王智琴, 等. 植物抗除草剂基因研究进展. 山西农业大学学报(*Journal of Shanxi Agricultural University*),

2001, 21(2): 168-172.  
 [5] 向文胜, 肖振平, 赵长山. 抗除草剂转基因作物. 东北农业大学学报(*Journal of Northeast Agricultural University*), 1998, 29(2): 201-208.  
 [6] Eoyang L, Silverman PM. Purification and subunit composition of acetohydroxyacid synthase I from *Escherichia coli* K212. *J Bacteriol*, 1984, 157: 184-189.  
 [7] Hattori J, Rutledge R, Labbe H, et al. Multiple resistance to sulfonyleureas and imidazolinones conferred by an acetohydroxyacid synthase gene with separate mutations for selective resistance. *Mol Gen Genet*, 1991, 229(1): 31-40.  
 [8] Chang SK, Kang MK, Choi JD, et al. Soluble overexpression in *Escherichia coli*, and purification and characterization of wild-type recombinant Tobacco acetolactate synthase. *Bio And Bio Research Communications*, 1997, 234, 549-553  
 [9] 姜玲, 王相晶, 向文胜. 除草剂与乙酰乳酸合成酶相互作用的分子机理研究进展. 农药学报(*Chinese Journal of Pesticide Science*), 2007, 9(1): 6-13  
 [10] Joseph S, Fritsch EF, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.  
 [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.  
 [12] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 406-425.  
 [13] 谢龙旭, 徐培林, 聂燕芳, 等. 抗草甘膦抗虫植物表达载体的构建及其转基因烟草的分析. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2003, 5: 545-550.  
 [14] 谢龙旭, 李云锋, 徐培林, 等. 根癌农杆菌介导的转 *aroAM12* 基因棉花植株的草甘膦抗性. 植物生理与分子生物学学报(*Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*), 2004, 2.  
 [15] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.  
 [16] Hill CM, Duggleby RG. Mutagenesis of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and characterization of three herbicide-insensitive forms. *J Biochem*, 1998, 333: 765-770.  
 [17] Duggleby RG, Pang SS, Yu HQ, et al., Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. *Eur. J Biochem*, 2003, 270: 2895-2904.  
 [18] Pang SS, Duggleby RG, Guddat LW. Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J Mol Biol*, 2002, 317: 249-262.  
 [19] Pang SS, Guddat LW, Duggleby RG. Molecular basis of sulfonyleurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. *J Biol Chem*, 2003, 278: 7639-7644.  
 [20] Chipman IDM, Duggleby RG, Tittmann K. Mechanisms of acetohydroxyacid synthases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9: 475-481.

## Isolation of a metsulfuron-methyl-resistant bacteria and cloning and expression of the acetohydroxyacid synthase genes *ilvIH*

Xiaofei Sun, Xing Huang, Bo Chen, Shunpeng Li, Jian He\*

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Microbiology Department, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Acetohydroxyacid synthase (EC 4.1.3.18) is the enzyme that catalyses the first step in the synthesis of the branched-chain amino acids valine, leucine and isoleucine in plant, fungi and bacteria, and also is target of the sulfonylurea, imidazolinone, triazolopyrimidine and other acetohydroxyacid synthase inhibitor herbicides. **[Objective]** The purpose of this study is to get the resistant gene, prepare a functional bacteria with acetohydroxyacid synthase, and investigate the relationship between the mutation sites of the acetohydroxyacid synthase and the herbicides-resistant. **[Methods]** A metsulfuron-methyl-resistant bacterium Lm10 was isolated from metsulfuron-methyl contaminated soil. Acetohydroxyacid synthase genes *ilvIH* was amplified from the genome DNA of strains Lm10 by PCR. The *ilvI* and *ilvH* were cloned into the bacterial expression vector pET29a(+) respectively. **[Results]** Strain Lm10 was identified preliminarily as *Pseudomonas* sp.. It can endure 14000  $\mu\text{mol/L}$  metsulfuron-methyl and showed cross resistance to different acetohydroxyacid synthase inhibitor herbicides, such as chlorsulfuron, imazethapyr, flumetsulam and penoxsulam. The alignment result of the *ilvIH* amino acid sequence showed that *ilvI* of strains Lm10 differed from that of strain KT2440 by 6 sites, While the *ilvH* of the two strains were the same. The gene *ilvI* and *ilvH* were functional expressed in the *Escherichia coli* strain BL21(DE3) respectively. The expressed production pET-I displayed acetohydroxyacid synthase activity and showed resistance to high concentration of metsulfuron-methyl. **[Conclusion]** The *ilvI* displayed acetohydroxyacid synthase activity. The 6 different sites in *ilvI* of strains Lm10 probably led to herbicides resistance.

**Keywords:** Acetohydroxyacid synthase inhibitors herbicides; herbicides-resistant bacterium; acetohydroxyacid synthase; *ilvIH*

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500010) and the Chinese National Technology Platform Programs (2005DKA21201-2)

\*Corresponding author. Tel: +86-25-84396685; Fax: +86-25-84396314; E-mail: hejian@njau.edu.cn

Received: 9 May 2008/ Revised: 11 June 2008

### 《微生物学报》答作者问——关于署名

问：我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表，如果想在作者和单位方面增、减新的内容，并且修改作者及单位署名顺序是否可以？是否需要提供什么证明或者相关的材料？

答：可以变更，但需要作者再提供以下材料。

- (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(邮寄或扫描后 E-mail 发来)，新的变更即可生效。