

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(4):445-452; 4 April 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

生防菌 Bs-916 合成脂肽类化合物 *Bac* 操纵子突变株构建及功能

罗楚平^{1,2}, 陈志谊^{1*}, 刘永锋^{1,2}, 张杰², 刘邮洲¹, 王晓宇¹, 聂亚锋¹

(¹江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

(²中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 生防枯草芽孢杆菌 Bs-916 对水稻纹枯病有很好的防治效果。【目的】明确其合成脂肽类化合物操纵子 *Bac* 功能, 为遗传改良提高 Bs-916 防效奠定基础。【方法和结果】采用同源重组方法成功更换 *Bac* 内源启动子为组成性表达强启动子和插入失活 *Bac* 启动子, 分别得到突变株 BGG104 和 BGG105。突变株生物学活性测定结果表明: BGG104 上清液相对 Bs-916 上清液对几种病原真菌毒力, 血红细胞的溶血能力都显著提高; 而 BGG105 则显著降低。采用 6 mol/L 盐酸沉淀及甲醇抽提方法从 Bs-916 和突变株培养液中制备脂肽类化合物。反相 HPLC 结果表明 Bs-916 产生的脂肽类化合物与 iturin A 具有不同保留时间, BGG104 培养液中脂肽类化合物量增加了 3 倍, BGG105 培养液中未检测到脂肽类化合物峰。运用基质辅助解离质谱方法测得 *Bac* 合成的脂肽类化合物分子量分别为: 1007.7 Da, 1021.7 Da 和 1035.7 Da; 推测属于相差一个 (-CH₂) 亚甲基同系物。【讨论】研究表明 *Bac* 编码多功能复合酶催化合成脂肽类化合物是 Bs-916 抗真菌活性关键因子, 表达量提高可以增强其对多种病原真菌的毒力。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 脂肽类化合物, 操纵子, 突变株, 功能

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0445-08

应用枯草芽孢杆菌防治植物病害已经有几十年的历史, 目前全世界保存的野生型生防枯草芽孢杆菌有 400 多株, 据研究证实能够产生 40 多种具有不同结构和功能的抗菌物质^[1]。其中分泌的脂肽类化合物是一类由亲水性环状短肽头部和长链疏水性脂肪酸尾巴组成的双亲性化合物, 是一种生物表面活性剂, 具有强溶血性能。脂肽类化合物由于具有抗真菌活性高、抑菌谱广、结构稳定, 对人兽无害等特性, 极具潜力开发为一种新型、环境友好的生物农药^[2-4]。据国外报道, 已经有许多具有优良性状的枯草芽孢杆菌菌株产生的脂肽类化合物的结构、功

能及遗传机理被阐明, 目前操纵子已被克隆的脂肽类化合物有表面活性素 (surfactin), 伊枯草素类 (iturinA, bacillomycin, mycosubtilin) 和泛革素 (Fengycin)^[1,5-7]。国内只有少数枯草芽孢杆菌菌株产生脂肽类化合物的结构被鉴定, 如: B3 菌株产 surfactin 同系物、JA 菌株产 iturinA 同系物等^[8-10]; 然而, 对其遗传机制研究更是鲜有报道。因此, 加强对国内具有优良生防性状的枯草芽孢杆菌菌株产生脂肽类化合物的结构、功能及遗传机制研究具有重要意义。枯草芽孢杆菌 Bs-916 是江苏农科院 20 世纪 90 年代与国际水稻研究所合作、分离获得的生防

基金项目: 国家“863”计划——现代农业技术领域重大项目(2006AA10A211); 江苏省农业科技自主创新基金(CX(08)109); 植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金项目(2007PD6); 江苏省自然科学基金(BK2008350)

* 通信作者。Tel: +86-25-84390393; Fax: +86-25-84391002; E-mail: chzy@jaas.ac.cn

作者简介: 罗楚平(1979-), 男, 湖南衡南人, 硕士, 助研, 主要从事生物防治和分子生物学研究。E-mail: chupingluo@sina.com, luochuping@163.com

收稿日期: 2008-11-11; 修回日期: 2009-02-05

菌 依托其为主要成分开发的新一代新型生物杀菌剂“纹曲宁”累计推广面积达到 5000 万亩,产生了巨大的社会、经济和生态效益。据本实验室以前研究报道, Bs-916 分泌抗真菌物质主要存在发酵液中,一类是经过核糖体途径合成的抗菌蛋白和抗菌肽^[11],另一类是经过非核糖体途径合成的脂肽类抗生素^[12]。本实验室还从 Bs-916 基因组中克隆测序到一个完整的合成脂肽类化合物的操纵子 *Bac* (FJ194462),经同源比对分析表明其属于伊枯草素类化合物操纵子,但与 *iturinA*, *mycosubtilin*, *bacillomycin* 操纵子存在一段高度可变区域。为进一步明确 Bs-916 *Bac* 合成的脂肽类化合物遗传机制及功能,本研究报道了(1)通过同源重组技术更换和破坏了 Bs-916 *Bac* 启动子区域,筛选到突变株 BGG104 和 BGG105 (2)测定了 Bs-916、BGG104 和 BGG105 上清液对几种病原真菌毒力及溶血性能 (3)从 Bs-916 和突变株培养液中提取了脂肽类化合物并进行了 HPLC 和质谱分析。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics ^a	Source
<i>E. coli</i> JM110	<i>rpsIK</i> (str), <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> ,	Lab stock
Bs-916	Wild strain	Lab stock
BGG104	Bs-916 derivative, <i>Bac</i> native promoter replaced by P_{repU} , Nm^r	This study
BGG105	Bs-916 derivative, <i>Bac</i> operon promoter disrupted strain, Nm^r	This study
pBEST501	pGEM4 carrying the PrepU promoter and neo gene from pUB110, Nm^r	Reference ^[15]
pMD18-T	Cloning vector, Ap^r	TaKaRa
pUC19	Cloning vector, Ap^r	TaKaRa
pBAC101	0.75-kb IPbacF fragment inserted into pUC19, Ap^r	This study
pBAC102	0.80-kb IPbacR fragment inserted into pUC19, Ap^r	This study
pBAC103	0.80-kb IPbacR fragment from pBAC102 inserted into pBAC101, Ap^r	This study
pBAC104	PrepU-neo fragment inserted into pBAC103, Ap^r , Nm^r	This study
pBAC105	PrepU-neo fragment inserted into pBAC103, Ap^r , Nm^r	This study

^a Ap^r : resistance to ampicillin; Nm^r : resistance to neomycin.

1.1.2 引物:以硫酸新霉素作为筛选标记构建整合质粒载体,通过双交换形式破坏和更换 *Bac* 启动子。根据 *Bac* 核酸序列(GenBank 序列号:FJ194462)设计

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及细菌生长条件:①本研究所用细菌及质粒见表 1;②病原真菌:水稻纹枯、西瓜枯萎、白菜黑斑、番茄早疫、油菜菌核、稻瘟、番茄灰霉都由本实验室保存。③生防菌 Bs-916(*Bacillus subtilis* 916)和突变株 BGG104 所用培养基为 YPGA (每升含蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,葡萄糖 5 g, pH 7.0) 28℃培养。水稻纹枯病菌及其它病原真菌培养基为 PDA 培养基(每升含马铃薯 200 g,蔗糖 20 g, pH 7.0) 28℃培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*)所用培养基为 Luria broth 37℃培养。Bs-916 感受态细胞制备培养基采用 Sp1 和 Sp2 培养基^[13]。④ *E. coli* 感受态细胞制备用 SOB 培养基^[14]。⑤抗生素的用法及用量为 *E. coli*:氨苄青霉素 100 μ g/mL; *B. subtilis*:硫酸新霉素 20 μ g/mL。

两对引物(表 2)。用于扩增 IPbacF 片段,正向引物 primer 1 和反向引物 primer 2。用于扩增 IPbacR 片段,正向引物 primer 3 和反向引物 primer 4。

表 2 引物名称和序列

Table 2 Primer name and sequence

Primer name	Size/bp	Restriction site	Sequence (5'→3')
Primer1	24	GCATGC (<i>Sph</i> I)	CCAGCATGCCGCTTTGTCCGGGATA
Primer2	26	CTGCAG (<i>Pst</i> I)	CCACTGCAGGGGATAACAATATCCTAC
Primer3	26	TCTAGA (<i>Xba</i> I)	CCATCTAGATAAAGGGATATTTTGTGA
Primer4	24	CCCGGG (<i>Xma</i> I)	AAACCCGGGCGCCGGTGACATT

1.1.3 主要试剂和仪器:DNA Marker、限制性内切核酸酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pUC19 和 pMD18-T 购自宝生物工程大连有限公司(TaKaRa);

卡那霉素、硫酸新霉素、DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司;1kb Marker 为 NEB(New England Biolabs, Beverly, MA, USA) 公司产

品 iturinA 和 surfactin 标准样品购自美国 Sigma 公司,其它试剂均为国产分析纯或色谱纯。Agilent 6410 三重串联四级杆质谱仪,Agilent 1100 高效液相色谱仪购自美国安捷伦科技股份有限公司。MyCycler™ 梯度 PCR 仪购自美国 BioRad 公司。

1.2 整合载体的构建和突变株筛选

IPbacF 片段扩增条件:95℃ 3 min;94℃ 45 s,56℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。IPbacR 片段扩增条件除退火温度为 52℃ 外,其它条件同上。IPbacF 片段经过 *Sph* I 和 *Pst* I 双酶切后,插入到 pUC19 克隆载体构建为质粒载体 pBAC101。IPbacR 片段经过 *Xba* I 和 *Xma* I 双酶切后,插入到 pUC19 克隆载体构建为质粒载体 pBAC102。pBAC102 中 IPbacR 片段经 *Xba* I 和 *Xma* I 双酶切后亚克隆至 pBAC101 构建为质粒载体 pBAC103,pBEST501 质粒经过 *Xba* I 酶切后释放一条长 1280 bp 片段插入 pBAC103 的 *Xba* I 酶切位点区域,顺向插入构建整合质粒载体为 pBAC104,反向插入构建整合质粒载体为 pBAC105。

1.3 整合载体转化、突变株筛选及鉴定

通过化学转化的方法^[13]将 pBAC104 和 pBAC105 转化至 Bs-916,涂布在含有 20 μg/L 硫酸新霉素的 LB 平板上,37℃ 培养,筛选转化子。提取转化子基因组 DNA 作为模板,利用 1.2 中正向引物 1 和反向引物 4 进行 PCR 鉴定,确定转化子基因组中是否含有硫酸新霉素抗性基因。PCR 条件:95℃ 3 min,94℃ 45 s,54℃ 45 s,72℃ 3 min,30 个循环,72℃ 10 min。PCR 产物经凝胶回收后,克隆至 pMD18-T 质粒载体,测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.4 生长曲线、培养液抑菌活性及溶血性能测定

以过夜培养的 Bs-916 和突变菌株培养液接种至 250 mL LB 培养基中,初始 OD 值为 0.2,180 r/min 28℃ 培养,每隔 2 h 测定其 OD₆₀₀ 值,测定突变株生长曲线。72 h 培养 Bs-916 及突变株发酵液离心后,采用 0.2 μmol/L 滤膜过滤得到无菌滤液。采用平板对峙实验测定无菌滤液对水稻纹枯病菌等病原真菌抑菌活性。取 100 μL 无菌滤液滴加至含 5% 新鲜绵羊血细胞的血清琼脂平板中,37℃ 培养至呈现透明溶血圈^[16]。

1.5 脂肽类化合物制备及 HPLC (High-performance liquid chromatography) 分析

脂肽类化合物提取采用酸沉淀和甲醇抽提方法^[17]。100 mL YPGA 培养基培养 72 h Bs-916 和突

变株 BGG104、BGG105 发酵液,离心除去菌体,用浓盐酸调至 pH 2.0 沉淀过夜。8000 g 离心 25 min 得到沉淀,沉淀采用 10 mL 甲醇分两次抽提,每次抽提 2 h,合并甲醇抽提物。甲醇抽提物经 0.22 μmol/L 微孔滤膜后,即为粗制备的脂肽类化合物样品。iturinA 配制成 1 mg/mL 作为标准样品。标准样品和粗制备脂肽类化合物进行 HPLC 分析,采用 C18 (5 μm 250 by 4.6 mm,VDAC 218 TP,VDAC Hesperia,CA) 柱,流动相为乙腈:水:三氟乙酸(40:60:0.5 V/V)流速为 1 mL/min,紫外检测波长为 205 nm^[16]。

1.6 脂肽类化合物质谱分析

按 1.5 方法粗制备脂肽类化合物采用含有饱和 α-萘基-4-羟基桂皮酸 0.1% 三氟乙酸、乙腈和水(体积比 3:1)溶液稀释 1000 倍后,通过注射器直接进样。采用基质辅助解离质谱法测定化合物的分子量,电喷雾条件为:毛细管电压 32 V、喷雾电压 20 kV、毛细管温度 320℃,检测方式:正离子。

2 结果

2.1 整合质粒载体构建

根据 *Bac* 序列,设计引物从 Bs-916 基因组 DNA 中分别扩增到 *Bac* 部分启动子区域 IPbacF 和 *BacD* 部分区域 IPbacR。以 IPbacF、IPbacR 作为同源臂,以含有组成性强表达启动子和硫酸新霉素抗性基因表达盒(P_{repU} -neo)作为筛选标记,经过几次酶切和连接反应,构建整合质粒载体 pBAC104 和 pBAC105。上述质粒载体构建具体过程如图 1。整合质粒载体 pBAC104,用于更换 *Bac* 启动子为组成性表达启动

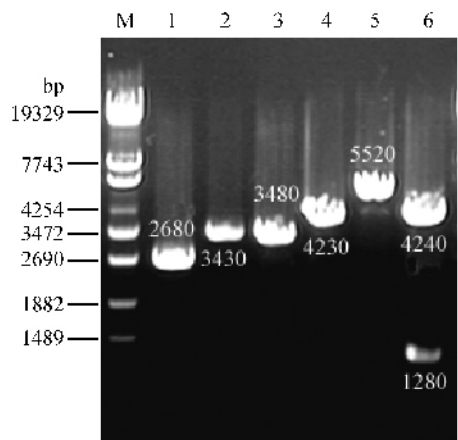


Fig. 1 凝胶电泳分析整合质粒载体构建过程

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of the procedure of the construction of integrational vectors. M: DNA marker; Lanes 1-6 stand for pUC19, pBAC101, pBAC102, pBAC103, pBAC104, pBAC105 vectors digested by *Pst* I restriction enzyme.

子 整合质粒载体 pBAC105 用于插入失活 *Bac* 启动子区域。

2.2 转化、筛选及 PCR 鉴定

根据文献 [13] 经过几次转化实验 将整合质粒 pBAC104 和 pBAC105 转化至野生型菌株 Bs-916 然后涂布在含有 20 μg/mL 硫酸新霉素 LB 平板上,共筛选到 16 个转化子。提取野生型菌株和转化子基因组 DNA 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 直接酶切后进行凝胶电泳,电泳图谱未发生重要变化。通过整合质粒

pBAC104 筛选转化子, P_{repU} -neo 表达盒以图 2-B 方式 命名为 BGG104 ;通过整合质粒 pBAC105 筛选转化子以图 2-C 方式插入,命名为 BGG105。采用 primer1 和 primer4 引物,通过 PCR 方法进一步鉴定 P_{repU} -neo 表达盒是否插入到 Bs-916 基因组 DNA 中。结果表明,从转化子扩增到大小约 2.8 kb 片段,从 Bs-916 中扩增到大小约 1.5 kb 片段(图 3)。根据扩增到的 1.5 kb 和 2.8 kb 片段克隆测序结果表明 P_{repU} -neo 表达盒成功插入到 *Bac* 启动子区域。

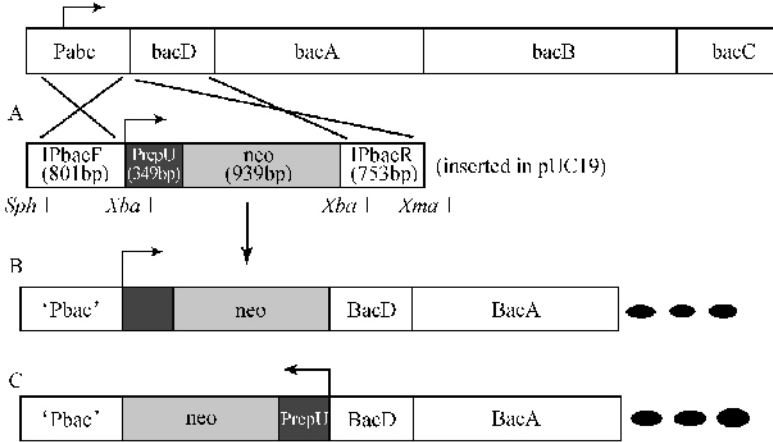


图 2 Bs-916 *Bac* 操纵子启动子 P_{bac} 更换为组成性表达强启动子 P_{repU} 和失活

Fig.2 Replacement in Bs-916 of the original P_{bac} promoter by the P_{repU} and disruption. (A) Recognition of homologous regions located (i) partial region of the P_{bac} was generated by PCR and was designated IPbacF (ii) immediately downstream of the P_{bac} promoter was designated IPbacR. Four genes *bacD*, *bacA*, *bacB* and *bacC*, constitute the *bac* operon and code for a malonyl coenzyme A transacylase and three peptide synthetases, respectively. P_{repU} , promoter of the replication gene of pUB110, *neo* gene conferring resistance to neomycin/kanamycin from pUB110. (B) Construct obtained for the genomic DNA of the strain following homologous recombination. The *bac* operon came under control of the constitutive promoter P_{repU} . (C) According to the methods described above, construct obtained for the genomic DNA of the strain following homologous recombination, the P_{bac} was disrupted by the insertion P_{repU} -neo cassette.

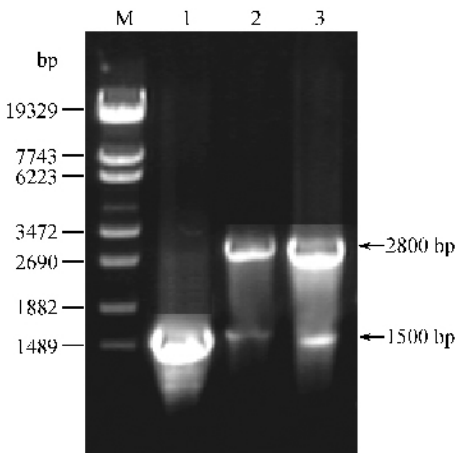


图 3 凝胶电泳分析采用引物 1 和引物 4 PCR 产物

Fig.3 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product generated by primer 1 and primer 4. 1. the PCR product from Bs-916 genomic DNA 2. the PCR product from BGG104 genomic DNA 3. the PCR product from BGG105 genomic DNA.

2.3 Bs-916 及突变株生物学特性及抑菌活性

Bs-916 和突变株 BGG104、BGG105 生长曲线表明突变株相对 Bs-916 的生长速度没有显著差异。溶血性能测定表明, Bs-916 的滤液滴加在血清平板上,经 37°C 培养后呈现明显的溶血透明圈,突变株 BGG105 上清液滴加处溶血透明圈明显减弱,突变株 BGG104 上清液滴加处透明圈明显加强(图 4)。Bs-916 和突变株 BGG104、BGG105 上清液抑菌活性测定表明: BGG104 对多种病原真菌抑菌活性得到明显增强, BGG105 抑菌活性显著降低(表 3)。因此,上述实验结果表明 BGG104 更换为组成性表达强启动子 P_{repU} 后,加强了 *Bac* 操纵子转录强度,增加了脂肽类化合物合成量,从而增强其上清液溶血能力和对病原真菌抑菌活性; BGG105 由于 *Bac* 操纵子启动子遭到破坏,相应脂肽类化合物合成量降低,从而降低其对病原真菌拮抗能力。

表 3 Bs-916 和突变株 BGG104, BGG105 上清液对病原真菌抑制活性

Table 3 Antifungal activities of supernatants obtained from the Bs-916 and the mutants BGG104, BGG105 culture broth

Strain	Supernatant antagonistic activity ^a		
	Bs-916	BGG104	BGG105
<i>Rhizoctania solani</i>	++	+++	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	+++	+++	+
<i>Alternaria brassicae</i>	++	+++	+
<i>Alternaria solani</i>	++	+++	+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	++	+++	-
<i>Pyricularia oryzae</i>	+++	+++	+
<i>Botrytis cinerea</i>	++	+++	-

The intensity of the antagonistic activity was rated on the basis of the size of growth inhibition zones from the wells in which supernatant were deposited to the edge of the spreading fungal mycelium or cell colony. - 0 mm ; +, 1 to 4 mm ; ++ 5 to 8 mm ; +++ 9 mm or more.

2.4 Bs-916 及突变株产脂肽类化合物的 HPLC 分析

高效液相色谱结果表明从 Bs-916 和 BGG104 发酵液中制备脂肽类化合物虽然与 iturinA 在色谱柱中保留时间不同,但是与 iturinA 标样都有 3 个峰,

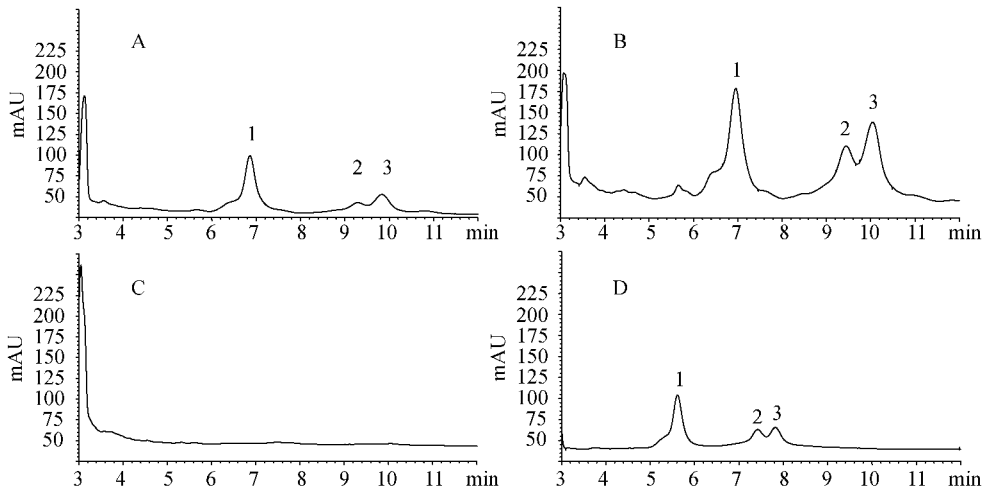


图 5 HPLC 分析脂肽类抗生素图谱

Fig.5 HPLC spectrograms for lipopeptides production. A :Crude lipopeptides extracts from B-916 ;B :Crude lipopeptides extracts from BGG104 ;C :Crude lipopeptides extracts from BGG105 ;D Standard iturinA(1 mg/mL).

2.5 脂肽类化合物的质谱分析

将从 Bs-916, BGG104 和 BGG105 中制备的脂肽类化合物分子量进行基质辅助解离质谱法测定(图 6)。结果表明 Bac 操纵子合成化合物质子化峰分别为 1008.7、1022.7 和 1036.7 ;而 1030.7、1044.5 和 1058.7 为化合物的钠离子加合物峰。据此推测该化合物为脂肪酸链相差一个亚甲基(-CH₂)的同系物,分子量分别为 1007.7、1021.7 和 1035.7。在上述

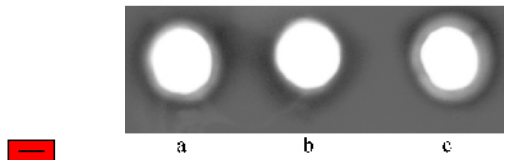


图 4 Bs-916 和突变株培养液溶血活性

Fig.4 Hemolytic activities of supernatants obtained after growth of the Bs-916 and Mutants. a :Bs-916 b :BGG105 c :BGG104.

且峰形相似。据此,推测 Bac 合成脂肽类化合物的结构类似 iturinA,也是由 3 种具有不同脂肪酸链的同系物组成(图 5)。以 iturinA 作为参照,根据峰面积粗略估算 Bs-916 分泌该脂肽类化合物的量约为 111 mg/L, BGG104 分泌量约为 344 mg/L,相对 Bs-916 总量提高了约 3 倍(图 5)。进一步分析发现 BGG104 相对 Bs-916 三个峰提高的比例不一致,峰 1 大约为 2.2 倍,峰 2 和峰 3 大约为 5 倍。突变株 BGG105 制备物中未检测到相应的脂肽类化合物合成,推测可能是 Bac 启动子的破坏,导致丧失合成该脂肽类化合物的能力。

质荷比(m/z)处, BGG104 离子峰强度相对 Bs-916 明显增强,在 BGG105 未检测到相对应离子峰(表 4)。据报道,目前分子量已被测定的 iturin 家族脂肽类化合物 iturinA 分子量为:1028.4, 1042.4, 1056.5 ; mycosubtilin 分子量为:1056.6, 1076.6, 1084.6 ; bacillomycin 分子量为:1030.6, 1044.7, 1058.7 [7,9,16] ; 这些化合物的分子量都与 Bac 合成的脂肽类化合物分子量不一致。

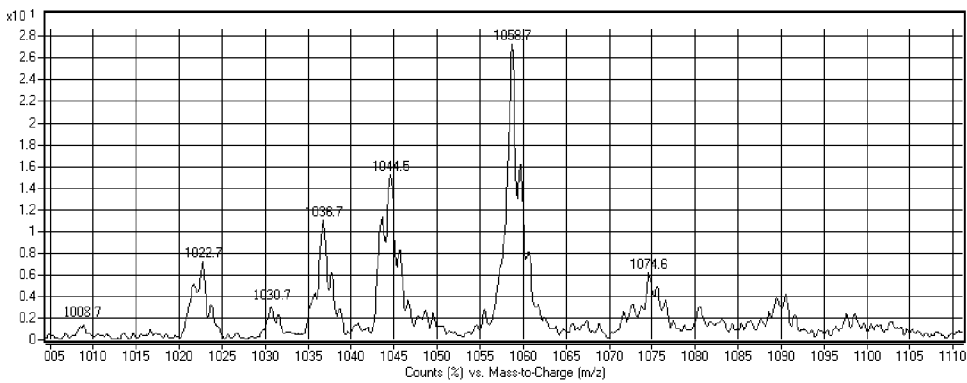


图6 基质辅助解离质谱法分析提取的脂肽类化合物

Fig.6 Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight spectra analysis of the extracted lipopeptides.

表4 质谱检测从野生型菌株 Bs-916 和突变株 BGG104、BGG105 提取脂肽类抗生素

Table 4 Lipopeptide products extracted from wild type Bs-916 and mutants BGG104 ,BGG105 detected by MS

Strain	Intensity					
	1008.7 (m/z)	1022.7 (m/z)	1030.7 (m/z)	1036.7 (m/z)	1044.6 (m/z)	1058.7 (m/z)
Bs-916	1.0	7.0	3.0	11.0	15.0	27.0
BGG104	2.5	12.5	7.6	28.0	38.0	84.0
BGG105	0	0	0	0	0	0

3 讨论

本研究通过同源重组的方法,分别成功地构建了 *Bac* 启动子区域失活的突变株 BGG105 和 *Bac* 组成性表达的突变株 BGG104。BGG104 和 BGG105 对多种病原的真菌的抑菌性能测定及抗菌物质分泌特征研究表明 *Bac* 操纵子合成的抗真菌物质是属于含有 7 个氨基酸残基的环脂肽类化合物,其结构可能与已报道的伊枯草素类化合物存在差异,是 Bs-916 防治水稻纹枯病菌的关键因子。目前枯草芽孢杆菌抗菌物质研究已从纯化、特性、鉴定深入到遗传、代谢、理性改造三个方面。如:通过更换脂肽类化合物内源启动子为强启动子,构建工程菌株分别 3 倍提高了 iturinA 表达量和 15 倍提高了 mycosubtilin 表达量^[5,16]。Bs-916 脂肽类化合物合成操纵子 *Bac* 置于组成性表达启动子下,其相应脂肽类化合物表达量也提高了 3 倍。脂肽类化合物分泌量不仅与相应操纵子转录强度相关,还与菌株自身免疫能力、分泌系统、反馈抑制途径等密切相关^[1]。随着对脂肽类化合物遗传机制研究日益深入,为采用基因工程手段大幅度提高枯草芽孢杆菌脂肽类化合物分泌量奠定了基础^[20]。另外,对合成脂肽类化合物结构基因进行重新洗牌设计合成新型脂肽类化合物已有成功报道^[21]。*Bac* 操纵子与已报道的脂肽类化合物操纵子相比具有可变区域,本研究结果也证实其分泌的脂肽类化合物结构可能与已报道

iturin 家簇其它化合物不同。因此,对 *Bac* 结构域与其它脂肽类化合物合成操纵子结构域进行互换,有可能理性设计合成出新型的脂肽类化合物。迄今为止,本实验室已从 *B. subtilis* Bs-916 发酵液中鉴定出具有抗真菌活性的抗菌蛋白 Bacisubin 和克隆到一个完整的合成脂肽类化合物操纵子 *Bac*。Bs-916 抗真菌活性物质基础及遗传机制的阐明,为我们采用基因工程的手段改良 Bs-916,提高其在田间对病原真菌的防治效果奠定基础^[22]。

参考文献

- [1] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 2005, 56 (4) 845 - 857.
- [2] Peypoux F, Guimand M, Michel G, et al. Structure of iturinA, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 1978, 17 3992 - 3996.
- [3] Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1999, 51 553 - 563.
- [4] Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, et al. Fengycin a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *Journal of Antibiotics*, 1986, 39 888 - 901.
- [5] Tsuge K, Akiyama T, Shoda M. Cloning sequencing and characterization of the IturinA Operon. *Journal of Bacteriology* 2001, 183(21) 6265 - 6273.
- [6] Moyne A, Cleveland T, Tuzun S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide

- bacillomycin D. *FEMS Microbiology Letters* 2004, 234(1): 43–49.
- [7] Koumoutsis A, Chen X, Henne A, et al. Structural and function characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloquelificans* strain FZB42. *Journal of Bacteriology* 2004, 186(4): 1084–1096.
- [8] 高学文, 姚仕义, Pham H, 等. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的表面活性素变异体的纯化和鉴定. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2003, 43(5): 647–652.
- [9] 陈华, 袁成凌, 蔡克周, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 产生脂肽类抗生素—iturinA 的纯化及电喷雾质谱鉴定. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2008, 48(1): 116–120.
- [10] 王大威, 刘永健, 林忠平, 等. 一株产生脂肽的枯草芽孢杆菌的分离鉴定及脂肽对原油的作用. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2008, 48(3): 304–311.
- [11] Liu Y, Chen Z, Ng T, et al. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides* 2007, 28(3): 553–559.
- [12] Li DQ, Nie YF, Wei LH, et al. Screening of high-yielding biocontrol bacterium Bs-916 mutant by ion implantation. *Applied Microbiology Biotechnology* 2007, 75: 1401–1408.
- [13] 罗楚平, 陈志谊, 刘永锋, 等. 杀虫晶体蛋白基因 *CryIAc* 在生防菌 B-916 中的表达. 江苏农业学报 (*Jiangsu Journal of Agriculture Sciences*) 2007, 23(4): 306–311.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Itaya M, Kondo K, Tanaka T. A neomycin resistance gene cassette selectable in a single copy state in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17: 4410.
- [16] Leclere V, Bechet M, Adam A, et al. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71(8): 4577–4584.
- [17] 高学文, 齐放军, 姚仕义, 等. 枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌的共培养及其对生物活性物质产生的影响. 南京农业大学学报 (*Journal of Nanjing Agricultural University*) 2003, 26(3): 32–35.
- [18] Tsuge K, Akiyama T, Shoda M. Cloning sequencing and characterization of the IturinA Operon. *Journal of Bacteriology* 2001, 183(21): 6265–6273.
- [19] Moyné A, Cleveland T, Tuzun S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiology Letters* 2004, 234(1): 43–49.
- [20] Koumoutsis A, Chen XH, Vater J, et al. DegU and YczE positively regulate the synthesis of bacillomycin D by *Bacillus amyloquelificans* strain FZB42. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, 73(21): 6953–6964.
- [21] Moota HD, Schwarzer D, Marrahiel MA. Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *The Proceedings of the National Academy of Sciences US*, 2000, 97(11): 5843–5848.
- [22] 罗楚平, 陈志谊, 刘永锋, 等. 利用基因工程改良枯草芽孢杆菌. 江苏农业学报 (*Jiangsu Journal of Agriculture Sciences*) 2008, 24(2): 204–209.

Construction and function analysis of *Bac* operon mutants of bio-control strain *Bacillus subtilis* Bs-916

Chuping Luo^{1,2}, Zhiyi Chen¹, Yongfeng Liu^{1,2}, Jie Zhang², Youzhou Liu¹, Xiaoyu Wang¹, Yafeng Nie¹

(¹ Institute of Plant Protection Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

(² State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* Bs-916 is an effective biocontrol agent in control rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. We identified and analyzed the operon *Bac* in Bs-916 responsible for synthesis of iturin-like lipopeptides. The research plays an

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A211)

* Corresponding author. Tel: +86-25-84390393; Fax: +86-25-84391002; E-mail: chzy@jaas.ac.cn

Received: 11 November 2008 / Revised: 5 February 2009

important part in genetic engineered Bs-916 for further improving its bio-control activity. Taking advantage of homologous recombination method ,the one mutant obtained by replacement of the Bac original promoter by a constitutive promoter P_{repU} and designated BGG104 ;the other mutant was obtained by disruption of the Bac promoter by insertion and designated BGG105 . The biological activities results showed the mutant BGG104 enhanced antagonistic activities against several pathogenic fungi and also clearly increased in hemolytic activities. However ,the mutant BGG105 decreased clearly in both antagonistic activities and hemolytic activities. Crude lipopeptides were extracted with methanol from precipitates ,which were obtained by adding 6 mol/L HCl to the cell-free culture broth. The results of reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of crude lipopeptides showed lipopeptides produced by Bs-916 have a different retention time compared to iturinA. The mutant BGG104 produced up to 3-fold more lipopeptides than Bs-916. However ,the mutant BGG105 has not been detected counterpart lipopeptides production. The molecular weights of the lipopeptides synthesized by Bac determined by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry(MS) were 1007.7 Da ,1021.7 Da and 1035.7 Da. They were presumed to belong to homologues differed by a structure of $-CH_2$ and their molecular weights were not the same as the other iturin-like lipopeptides ' ,such as iturinA ,mycosubtilin and bacillomycin ,molecular weights. In conclusion ,this paper showed the lipopeptides synthesized by Bac play crucial part in Bs-916 antifungal activities and the lipopeptides overproduction were able to enhance Bs-916 bio-control activities.

Keywords : *Bacillus subtilis* ; lipopeptide ; operon ; mutant ; function

(本文责编 :王晋芳)

《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要 :基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 ,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围 ,采用的手段和方法 ,得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要 :包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点 :英文摘要的内容应与中文摘要一致 ,但比中文摘要更详尽。要求在文中按照 [Objective] [Methods] [Results] [Conclusion]顺序分项撰写。英文摘要完成后 ,务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的 ,即使学术上可以达到刊出的水平 ,本刊也将推迟发表。
 - (1) 在英语摘要中 ,不要使用任何汉字字符 ,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
 - (2) 建议使用第一人称 ,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3) 建议用主动语态 ,被动语态表达拖拉模糊 ,尽量不用 ,这样可以免好多长句 ,以求简单清晰。
 - (4) 摘要应当使用过去时态 ,语法正确 ,句子通顺。
 - (5) 摘要中不用缩写语 ,除非是人人皆知的 ,如 :DNA ,ATP 等。
 - (6) 句子的开头处最好不要使用数字。